

Długość telomerów – nowy biomarker w medycynie

Telomere Length – a New Biomarker in Medicine

Agnieszka Kozłowska^{1 (a,b)}, Agnieszka Mikołajczyk^{1 (a,b)}, Natalia Pawlas^{1 (a,b,c)}

¹ Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego, Zakład Szkodliwości Chemicznych i Toksykologii Genetycznej w Sosnowcu, Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. A. Sobczak

^(a) opracowanie koncepcji i założeń

^(b) opracowanie tekstu i piśmiennictwa

^(c) opieka merytoryczna i idea

STRESZCZENIE

Szereg szkodliwych czynników zewnętrznych w środowisku i w miejscu pracy oddziałuje na nasze zdrowie i życie. Biomarkery są narzędziem umożliwiającym pomiar takich oddziaływań i ich skutków w organizmie. Obecnie wśród nowych biomarkerów molekularnych wykorzystywanych w monitoringu biologicznym, medycynie i diagnostyce możemy wyróżnić długość telomerów, zmiany epigenetyczne, mutacje i zmiany w aktywności genów. Telomery pełnią rolę zegara molekularnego odmierzającego długość życia komórki a tym samym starzenia się organizmu, powstawania uszkodzeń, rozwijania chorób i nowotworzenia. Długość telomerów uzależniona jest od szeregu mechanizmów zachodzących podczas procesu replikacji oraz od aktywności telomerazy. Coraz częściej długość telomerów jest wykorzystywana jako biomarker wrażliwości lub ekspozycji.

W niniejszej publikacji poruszono aspekt długości telomerów jako biomarkera starzenia się komórki, stresu oksydacyjnego, markera wielu chorób oraz zaprezentowano wykorzystanie jako markera ekspozycji środowiskowej i zawodowej.

Słowa kluczowe: biomarker, telomery, stres oksydacyjny, choroby, środowisko

ABSTRACT

A number of xenobiotics in the environment and workplace influences on our health and life. Biomarkers are tools for measuring such exposures and their effects in the organism. Nowadays, telomere length, epigenetic changes, mutations and changes in gene expression pattern have become new molecular biomarkers. Telomeres play the role of molecular clock, which influences on expectancy of cell life and thus aging, the formation of damages, development diseases and carcinogenesis. The telomere length depends on mechanisms of replication and the activity of telomerase. Telomere length is currently used as a biomarker of susceptibility and/or exposure. This paper describes the role of telomere length as a biomarker of aging cells, oxidative stress, a marker of many diseases including cancer, and as a marker of environmental and occupational exposure.

Key words: biomarker, telomeres, oxidative stress, disease, environment

1. BIOMARKER – DEFINICJA, RODZAJE

Środowisko naturalne narażone jest na zanieczyszczenia szkodliwymi czynnikami biologicznymi, chemicznymi i fizycznymi, które nieustannie wpływają na organizmy żywe. Poza ograniczaniem emisji związków toksycznych do środowiska, ważne jest aby odpowiednio określić stopień narażenia na dany czynnik oraz ocenić wywołane przez niego zmiany oraz skutki oddziaływania na zdrowie. Biomarkery są narzędziem pozwalającym

na pomiar takich zmian w danym organizmie. Według definicji podanej przez WHO biomarkerem jest każda substancja, struktura, proces lub produkt ich przemian, który umożliwia pomiar zmian w organizmie będących wynikiem interakcji ze szkodliwym czynnikiem [1]. Informacje o funkcjonowaniu danych systemów biologicznych jakie dostarczają biomarkery pozwalają ocenić wrodzoną lub nabytą podatność danego organizmu na odpowiedź wywołaną przez określony czynnik (biomarker wrażliwości), określić stopień szkodliwości wchłonię-

tego czynnika (biomarkery skutków) oraz sprawdzić czy istnieje narażenie na czynnik toksyczny (biomarkery narażenia) [2-4]. Z pośród biomarkerów narażenia (ekspozycji) można wyróżnić grupę tych, które wskazują na obecność określonego czynnika toksycznego w organizmie np.: 1-hydroksypiren w moczu świadczy o narażeniu na WWA, podwyższone ZPP (cynkoprotoporfiryna) we krwi świadczy o narażeniu na ołów, a obecność kwasu mukonowego w moczu wskazuje na kontakt z benzenem. Są one określane jako biomarkery dawki wewnętrznej. Natomiast drugą grupę mogą stanowić biomarkery dawki biologicznie skutecznej, czyli ilość substancji toksycznej wchłoniętej do organizmu, która reaguje ze składnikami komórki np. z DNA lub białkami. Przykładem takiego rodzaju biomarkerów mogą być addukty z hemoglobina, addukty z albuminami przy narażeniu na ksenobiotyki [5]. Biomarkerów wrażliwości upatruje się pośród polimorficznych wersji genów kodujących enzymy biorących udział w metabolizowaniu związków chemicznych, czy naprawie DNA np.: polimorfizm genów cytochromu P450. Biomarkery skutków mogą natomiast odzwierciedlać uszkodzenia łańcucha DNA, zmiany cytogenetyczne m.in. aberracje chromosomowe, wymiany chromatyd siostrzanych, mikrojądra czy wystąpienie objawów choroby nowotworowej [5,6].

Biomarkery jako mierzalne wskaźniki narażenia na ksenobiotyki spełniają obecnie kluczową rolę w biologicznym monitoringu ludzi, badaniach biomedycznych, diagnostyce chorób, opracowywaniu nowych leków [5,7]. Biomarkery pozwalają na ilościową i jakościową ocenę różnych zjawisk, stanów a także cech biologicznych. Biomarkerem może być zarówno wynik oznaczenia danej substancji w próbce pobranej z materiału biologicznego tj.: krwi, moczu, tkanki tłuszczowej, potu, śliny surowicy jak i wynik badania ciśnienia krwi, wartości tętna czy EKG [8]. Stanowią one również nieocenione źródło wiedzy biomedycznej stosowanej we wczesnej diagnostyce chorób nowotworowych czy profilaktyce, między innymi za pomocą technik obrazowania (np. echokardiografii, tomografii komputerowej czy rezonansu magnetycznego), proteomiki czy badań genetycznych (transkrypcji czy ekspresji genów). Obecnie w medycynie coraz częściej używane jest określenie biomarkerów w ujęciu molekularnym opartym na kwasach nukleinowych. Jedną z najnowszych i najbardziej doskonałych technik analizy kwasów nukleinowych jest qPCR (ang. *quantitative polymerase chain reaction*). Umożliwia ona monitorowanie ilości DNA w czasie rzeczywistym poddanego amplifikacji [9]. Techniki te pozwalają na badanie bardzo interesujących i złożonych struktur jakimi są telomery. Umożliwiają one również na określenie aktywności telomerazy, która może być molekularnym markerem procesu nowotworowego [10,11]. O tym jak bardzo ważny jest aspekt telomerów we współczesnej nauce świadczy fakt, że w roku 2009 amerykańskie Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider i Jack Szostak zostali uhonorowani Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny za odkrycie w jaki sposób końce chromosomów są chronione dzięki telomerom i telomerazie [12]. Dodatkowo długość telomerów zaczyna być postrzegana w kategoriach biomarkera ekspozycji jak również biomarkera wrażliwości [4].

2. TELOMERY – LOKALIZACJA, BIAŁKA, PROBLEM REPLIKACYJNY

Telomery to zakończenia chromosomów składające się z konserwatywnych, oligomerowych sekwencji nukleotydów. Zbudowane są z chromatyny nieaktywnej transkrypcyjnie w przeciwieństwie do obszaru subtelomero-wego, który ochraniają – zlokalizowanego bezpośrednio za telomerami. U człowieka podobnie jak u innych kręgowców sekwencja telomerowa składa się z krótkich, kilkukrotnie powtórzonych nukleotydów: $(5'-TTAGGG-3')_n$ tworzących podwójną nic DNA. Odcinek DNA obejmujący telomery zakończony jest jednoniciowym wolnym końcem 3' bogatym w guaninę (G) [13-15]. W przestrzeni telomery dzięki aktywności białek tzw. „shelterin” (ang. *shelter* – *schronienie* kompleks sześciu białek ochronnych – POT1, TPP1, TRF1, TRF2, RAP1, TIN2) mogą przybierać strukturę dwóch pętli D-loop i T-loop. Dwuniciowa sekwencja telomerowa dzięki aktywności białek shelterin ulega zawinięciu i zamknięciu w taki sposób, aby stworzyć większą pętlę T. Natomiast wolna nic 3' na końcu chromosomu wewnątrz pętli T łączy się z dwuniciowym fragmentem telomeru tworząc mniejszą pętlę D. Funkcją pętli T i D jest ochrona przed enzymami odpowiadającymi za naprawę uszkodzonego DNA [6,11,12,14-19]. Przede wszystkim należy zaznaczyć, że budowa telomerów, ich struktura przestrzenna, szereg kompleksów białkowych oraz lokalizacja w obrębie chromosomu warunkują ich funkcję. W razie braku odpowiednich kompleksów białek oraz struktury pętli T, w niezabezpieczonych końcach chromosomów może dojść do uszkodzenia DNA oraz do łączenia się chromosomów. Telomery oraz wspomniane kompleksy białek ochronnych stabilizują więc strukturę chromosomu, zapobiegają utracie informacji genetycznej podczas replikacji, chronią przed działaniem egzonukleaz oraz przed niehomologicznym łączeniem się końców chromosomów [6,13]. Struktura shelterin może występować w formie niedostępnej dla enzymu telomerazy tzw. „zamkniętej” oraz formie umożliwiającej dostęp enzymu tzw. „otwartej”, która pozwala na wydłużenie i odbudowę powtarzających się sekwencji telomerowych [6].

Długość telomerów warunkowana jest między innymi przez mechanizmy zachodzące podczas procesu replikacji i waha się w granicy od 2 do 10 kbp [13]. W czasie podziału komórki nic wiodąca replikowanego DNA ulega powieleniu w sposób ciągły, jednak nic opóźniona powstaje w postaci fragmentów Okazaki. Polimeraza DNA działa tylko w kierunku 3'→5' (buduje nic w kierunku 5'→3'), uniemożliwiając w ten sposób replikację fragmentu na wolnym końcu 3' oraz syntezę ostatniego skrajnego fragmentu Okazaki z resztą nici, co w następstwie skutkuje skróceniem telomeru [15]. Duża liczba krytycznie krótkich telomerów w komórkach ulegających podziałom prowadzi do masowej ich śmierci. Jest to wynikiem zaburzeń w rozdziale chromosomów do komórek potomnych [20].

Problem replikacyjny końca opóźnionej nici DNA (ang. *end-replication effect*) może zostać rozwiązany dzięki obecności enzymu – telomerazy (ang. *human telomerase reverse transcriptase*) – terminalnej transferazy niezależnej od RNA. Enzym ten działa w komórkach embrionalnych,

natomiast jest nie aktywny w komórkach somatycznych (za wyjątkiem komórek macierzystych skóry, hematopoetycznych komórek macierzystych, aktywnych limfocytów, komórek krypt jelitowych) [13,21,22]. Jest zbudowany z odwrotnej transkryptazy TERT oraz z TERC czyli telomerazowego RNA bogatego w cytozynę (C). Podczas replikacji TERT rozpoznaje starter bogaty w guaninę (G) na końcu 3' i dosyntytyzuje nowy fragment DNA na podstawie matrycy RNA (5'-3') jaką tworzy TERC. Zbudowany z telomerowych powtórzeń brakujący odcinek DNA zostaje zreplikowany i połączony z pozostałymi fragmentami nici DNA, dzięki czemu długość określonego telomeru zostaje zachowana. Dodatkowo jeden z regionów telomerazy TERT – GQ – zakotwicza ją do DNA telomerów i ułatwia ich kontakt. Ponadto dostępność sekwencji telomerowych dla telomerazy jest regulowana przez białka TRF1 i TRF2 (TRF1 – reguluje dostęp telomerazy, nadekspresja TRF2 powoduje skracanie się telomerów natomiast brak ekspresji prowadzi do apoptozy i niehomologicznego łączenia się końców), również RAP1 i TIN2 są negatywnymi regulatorami długości telomerów, natomiast TPP1 i POT1 stabilizują strukturę telosomu (telomeru i telomerazy), a POT1 bierze udział w hamowaniu elongacji [13,23,24]. Zmiany epigenetyczne też wpływają na dostępność telomerazy, a tym samym regulują długość chromosomów. Krótsze chromosomy o luźniejszej strukturze charakteryzują się większą dostępnością dla telomerazy. Zmiany w procesie wyciszania chromatyny sprzyjają rekombinacji [18].

Obok aktywnej telomerazy w komórkach charakteryzujących się niejednorodną długością końców chromosomów, istnieje inny niezależny mechanizm wydłużania telomerów – ALT (ang. *alternative lengthening of telomeres*) – działający prawdopodobnie na zasadzie homologicznej rekombinacji chromatyd siostrzanych [18].

3. TELOMERY JAKO MARKER STARZENIA KOMÓRKI

Starzenie się jest naturalnym procesem utraty dotychczasowej funkcjonalności i sprawności komórek organizmu. Za proces ten odpowiada szereg czynników takich jak np.: tryb życia, stres, narażenie środowiskowe czy zmiany genetyczne. Według naukowców główną przyczyną starzenia jest nagromadzenie się uszkodzeń DNA. Markerami starzenia się mogą być: niestabilności genomu, długość telomerów, zmiany epigenetyczne, zaburzenia proteostazy, dysfunkcja mitochondriów, wyczerpanie komórek macierzystych, zmiany w procesach międzykomórkowych [25].

Zasadniczą rolę w procesie starzenia się komórek odgrywa efekt związany ze skróceniem telomerów wraz z wiekiem. Komórki posiadające zdolność proliferacji zachowują odpowiednią długość telomerów. Sytuacja zmienia się w komórkach somatycznych, gdzie brak aktywności telomerazy podczas mechanizmów cyklu komórkowego prowadzi do skracania się telomerów [26]. Długość telomerów zmniejsza się wraz z wiekiem, średnio o 14 bp w ciągu roku [27]. Krótkie telomery przybie-

rają inną strukturę przestrzenną niż dotychczas, niestabilne chromosomy zaczynają łączyć się ze sobą, komórka aktywuje więc systemy naprawcze DNA co powoduje zatrzymanie podziałów komórkowych, a następnie może wprowadzić komórkę na drogę apoptozy [27-29]. Każda komórka posiada ograniczoną liczbę podziałów komórkowych czyli tzw. limit Hayflika – wpływający na długość życia danego organizmu [6,30,31]. Telomery jako „zegar molekularny” zawiadamiają komórkę o wartości krytycznej życia komórki. Granica Hayflika jest cechą gatunkowo-specyficzną i u człowieka wynosi około 80 podziałów. Istnieje przekonanie, że ograniczona możliwość podziałów i starzenie się komórek jest naturalnym sposobem obrony komórki przed powstawaniem niestabilności genetycznej. Wydłużenie telomerów zapewnia komórce większą możliwość podziałów, ale tym samym zwiększa ryzyko gromadzenia się mutacji co może prowadzić do nowotworzenia [32,33]. Potwierdza to fakt wzmożonej aktywności telomerazy w przypadku większości nowotworów [24]. Naukowcy od lat poszukują odpowiedniej metody przedłużającej żywotność komórek między innymi poprzez uaktywnienie enzymu telomerazy. W najnowszych badaniach Ramunas i wsp. dowodzą, że wprowadzenie odcinka mRNA kodującego TERT do komórek fibroblastów i mioblastów powoduje wzmożenie aktywności telomerazy (przez 24 – 48h) co prowadzi w konsekwencji do wydłużania telomerów i zwiększenia zdolności proliferacji tych komórek [34].

Rozwój technik biologii molekularnej umożliwia obecnie nie tylko na pomiar długości telomerów, ale też określenie o ile dany chromosom uległ skróceniu [6].

Zarówno komórki nowotworowe jak i prawidłowe są identyfikowane w oparciu o te same markery. Zśród najbardziej popularnych markerów można wymienić: zmianę morfologii komórki, zahamowanie syntezy DNA i zatrzymanie proliferacji, podwyższoną aktywność SA- β -galaktozydazy (ang. *senescence associated β -galactosidase*), syntezę inhibitorów cyklu komórkowego np. p21 i p16, specyficzny fenotyp wydzielniczy SASP (ang. *senescence associated secretory phenotype*), wzrost poziomu białka PML (ang. *promyelocytic leukemia protein*) [12,20,35]. Zainteresowanie naukowców skierowano na drogę poszukiwania farmakologicznych inhibitorów enzymu telomerazy oraz immunoterapii pozwalającej na eliminację komórek nowotworowych. Uważa się, że komórki starzeją się gdy telomery ulegną skróceniu do połowy swojej pierwotnej długości i dotyczy to większości komórek. Badania długości telomerów prowadzone na populacji pawianów w różnym wieku (5 miesięcy do 30 lat) dowodzą teorii, że u starszych osobników telomery ulegają skróceniu, a odsetek uszkodzeń DNA wzrasta w znacznej ilości komórek. Potwierdzają to również badania prowadzone na limfocytach, tkankach skóry, wątrobie czy nerkach pochodzących od ludzi w podeszłym wieku [12].

W komórkach somatycznych np. u myszy obserwowane jest zwiększenie aktywności enzymu telomerazy, gdzie u ludzi jest to zjawisko rzadkie. Pomiar długości telomerów można zastosować jako marker do badania starzenia replikacyjnego np.: przy użyciu techniki Real Time PCR czy FISH (ang. *fluorescence in situ hybridiza-*

tion) [35]. Odkryty kilkanaście lat temu enzym ludzkiej telomerazy – odwrotna transkryptaza – można uznać za marker proliferacji i nieśmiertelności komórek. Telomeraza jest nie tylko centralnym mechanizmem regulującym czas życia komórek, ale także mechanizmem, który może być ponownie włączony, przedłużając replikacyjny okres życia komórek, posiadających markery ekspresji genów charakterystycznych dla młodej komórki. Oznaczenie aktywności telomerazowej może być markerem skuteczności leczenia początkowych stadiów nowotworów przy niewielkich zmianach klinicznych u pacjentów poddanych chemioterapii w celu ograniczenia powstawania przerzutów [36].

4. TELOMERY JAKO MARKER STRESU OKSYDACYJNEGO

Stres oksydacyjny postrzegany jest jako dysproporcja pomiędzy produkcją reaktywnych form tlenu (RTF) a ich usuwaniem przez system antyoksydacyjny, jest również czynnikiem zaangażowanym w starzenie komórek. Komórki mogą przestać się dzielić z powodu starzenia replikacyjnego, które jest wynikiem skracania telomerów [37]. Starzenie się komórek może być indukowane przez wewnątrzkomórkowy program związany ze zmianami budowy telomerów (tzw. *uncapping*) ich skracaniem oraz przez czynniki środowiskowe, spośród których najważniejszym jest stres oksydacyjny. Czynnikiem o dużym znaczeniu dla telomerowego DNA jest działanie RTF (reaktywnych form tlenu). Badania przeprowadzone przez zespół von Zglinickiego na przykładzie fibroblastów hodowanych w warunkach podwyższonej prężności tlenu wykazały skrócenie telomerów, które były narażone na stres oksydacyjny. Odnotowano, że w tych komórkach tempo skracania telomerów wzrosło prawie pięciokrotnie (z 90 bp do 500 bp na 1 podział), efektem tego było zatrzymanie proliferacji komórek po kilku podwojeniach populacji [38]. Uważa się, że zarówno stres oksydacyjny jak i tzw. problem replikacji końca odpowiada za skracanie telomerów [37]. Stres oksydacyjny prowadzi także do regulacji w dół (tzw. *downregulation*) białka 637 zawierającego tzw. palce cynkowe (ang. *zinc finger protein 637*), co skutkuje obniżoną aktywnością podjednostki TERT telomerazy i skracaniem telomerów [39].

Również Houben i wsp [2008] w artykule przeglądowym przedstawiają koncepcje oceny długości telomerów jako biomarkerów stresu oksydacyjnego [40]. Daje to także nadzieje na możliwość pewnych interwencji dietetycznych lub farmakologicznych (witaminy antyoksydacyjne) w celu zahamowania skracania się telomerów.

5. TELOMERY W CHOROBAH

Opisany wyżej efekt niestabilności chromosomowej w wyniku skracania się telomerów prowadzi do powstania wielu chorób, najczęściej nowotworowych, cukrzycy, chorób sercowo-naczyniowych i chorób neurodegeneracyjnych [25]. Podejmowane są próby wyjaśnienia

roli telomerów w powstawaniu wielu chorób noszących nazwę telomeropatii. Obecnie jako markery diagnostyczne wykorzystuje się długość telomerów, aktywność telomerazy, mutacje, ekspresje genów i zmian epigenetycznych w genach kodujących białka shelterin [6].

Dotychczas wykazano, że u osób w wieku powyżej 60 lat długość telomerów jest skorelowana z większym ryzykiem śmierci. Osoby posiadające krótsze telomery prawie dwukrotnie częściej umierały niż osoby z krótszymi telomerami co było związane przede wszystkim z większą podatnością na choroby zakaźne lub układu krążenia [27]. Dyskusyjne pozostaje stwierdzenie, że to krótkie telomery prowadzą do większej zachorowalności. Możliwe jest również, że to choroby prowadzą do szeregu zmian, uszkodzeń i skracania telomerów [41].

Wielu badaczy skupia swoją uwagę na znaczeniu długości telomerów w stosunku do rozwoju chorób nowotworowych czy hematologicznych. W komórkach nowotworowych nie dochodzi do skracania się telomerów w kolejnych podziałach, co wskazuje na fakt iż stabilność telomerów może być niezbędna w procesie nowotworzenia i uniknięcia starzenia lub śmierci komórki [6]. W komórkach nowotworowych utrzymanie długości telomerów uzależnione jest od udziału telomerazy oraz w niewielkim procencie od szlaku ALT. Często metodą blokowania aktywności telomerazy prowadzącej do jej spadku aktywności jest zahamowanie ekspresji genów kodujących poszczególne komponenty kompleksu. Zbyt drastyczne skrócenie sekwencji telomerowych może prowadzić komórki na szlak apoptozy, co w konsekwencji wywoła pożądany efekt terapii przeciwnowotworowej [11]. Skrócenie telomerów następuje również przy długotrwałym stosowaniu chemioterapii i radioterapii [36].

Ciężka postać niedokrwistości aplastycznej (ang. *severe aplastic anemia* – SAA) jest związana z zaburzeniem długości telomerów. Większe ryzyko nawrotu choroby oraz zaburzeń chromosomalnych występuje u pacjentów z krótkimi telomerami, zarówno w populacji dorosłych jak i dzieci [36,42,43]. W przypadku przewlekłej białaczki limfatycznej skracanie telomerów koreluje ze stopniem zaawansowania choroby. Zarówno w przypadku białaczki limfatycznej jak i szpikowej zmiany w długości telomerów mogą wpływać na niestabilność chromosomową, co może powodować aberracje chromosomowe obserwowane w komórkach nowotworowych [6,36,43,44]. W zależności od rodzaju nowotworu oraz stopnia jego zaawansowania uzależniona jest obecność polimerazy DNA zależnej od RNA – telomerazy. Zaobserwowano znaczny wzrost aktywności telomerazy w przypadku białaczki przewlekłej, chłoniaka niezłazniczego, raka sutka, raka jelita grubego czy guzów litych u dzieci zarówno w trakcie choroby jak i leczenia. Podwyższony poziom telomerazy jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym i świadczy o złych rokowaniach i może stanowić marker potencjału wzrostowego nowotworu [36].

Jakkolwiek wyniki badań długości telomerów w chorobach nowotworowych są niejednoznaczne. W niektórych nowotworach np. pęcherza moczowego zaobserwowano większą zapadalność wśród osób z krótszymi telomerami w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej [45,46]. Podczas gdy w metaanalizie 3 badań prospek-

tywnych kohort stwierdzono, że osoby z dłuższymi telomerami mają zwiększone ryzyko zachorowania na raka płuc [47]. W badaniu prospektywnym 787 osób bez choroby nowotworowej, krótsze telomery były związane zarówno z zwiększonym ryzykiem wystąpienia choroby nowotworowej jak i zgonu z powodu nowotworu w trakcie 10 letniej obserwacji [48].

Również w chorobach cywilizacyjnych, o etiologii wieloczynnikowej, wykazano zależność między długością telomerów a częstością występowania chorób serca i cukrzycy. Krótsze telomery obserwowano u pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi [49], w tym nadciśnieniem tętniczym, miażdżycą, chorobą niedokrwinną serca i ostrym zespołami wieńcowymi [50], z powikłaną cukrzycą typu 2 [51], a także u chorych na otyłość [52-54] i u dzieci z autyzmem [55]. Są to jednak w większości wyniki badań przekrojowych. Niewiele jest badań prospektywnych, ale zauważono zwiększone ryzyko rozwoju zespołu metabolicznego u osób z krótszymi telomerami w wieku 18-65 lat poddanych 2-6 letniej obserwacji [56] i cukrzycy typu 2 w czasie 15-letniej obserwacji [57]. Podobnie w grupie 800 osób w wieku 45-84 lat krótsze telomery były czynnikiem ryzyka rozwoju zaawansowanej miażdżycy w ciągu 10 lat obserwacji, nie stwierdzono tych zależności natomiast dla początkowego stadium choroby naczyń [58]. W innych badaniach prospektywnych zauważono, że krótsze telomery są niekorzystnym czynnikiem prognostycznym u chorych z idiopatycznym zwłóknieniem płuc, rakiem pęcherza moczowego i okrzętnicy [59-61]. Inną ciekawą obserwacją jest, że w podgrupie matek rodzących dziecko w wieku 35-42 lat, u których występowały krótsze telomery, zaobserwowano większą częstość występowania zespołu Downa u dzieci w porównaniu do ich rówieśnic z dłuższymi telomerami [62].

6. TELOMERY JAKO MARKER EKSPOZYCJI ŚRODOWISKOWEJ I ZAWODOWEJ

Zmiany w długości telomerów mogą być objawem skutków chorobowych, objawem starzenia organizmu ale również działaniem szkodliwego czynnika. Nie jest wykluczone, że długotrwała ekspozycja nawet na niskie stężenia niektórych środków chemicznych, co charakteryzuje obecną wysoko rozwinięte społeczeństwa może być przyczyną skracania telomerów, niestabilności genomu w efekcie chorób nowotworowych [63]. Długotrwała ekspozycja na szkodliwe czynniki znajdujące się w powietrzu atmosferycznym potwierdziła hipotezę o skracaniu telomerów. Zostało to udowodnione przez badaczy z Chin oraz z Włoch [64,65]. Przebadali oni kierowców samochodów ciężarowych i pracowników ruchu drogowego oraz grupę kontrolną, którą stanowili pracownicy zatrudnieni na stanowiskach biurowych. W wyniku tych badań stwierdzono znacznie krótsze telomery u osób poddanych długotrwałej ekspozycji na szkodliwe związki zawarte w powietrzu. Natomiast krótkotrwała ekspozycja na pył zawieszony u pracowników przemysłu metalowego skutkowała wydłużeniem telomerów [66]. Natomiast w badaniach prospektywnych Wong i wsp. [2014] obserwowano, że wraz ze wzrostem narażenia na pył PM 2.5

zawartego w dymie spawalniczym u pracowników długość telomerów zmniejszała się oraz że przede wszystkim było to związane z niedawną ekspozycją [67].

Nawet narażenie na dym tytoniowy zarówno podczas czynnego palenia papierosów [45], jak również w trakcie prenatalnej ekspozycji płodu u matek palących [68,69] było związane z występowaniem krótszych telomerów. W tym samym badaniu McGrath i wsp. [2007] krótsze telomery u osób palących papierosy były związane z podwyższonym ryzykiem nowotworu pęcherza moczowego.

Skrócenie sekwencji telomerowych zaobserwowano także wśród osób mających kontakt z niektórymi pestycydami (2,4-D, pochodne diazynonu) [70], wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi (WWA) [71], n-nitrozaminami [72] czy ołowiem [69,73,74]. Inny pestycyd – alachlor związany był z wydłużeniem się telomerów u ludzi pracujących w kontakcie z nim. [70].

W badaniach *in vitro* na linii komórkowej HaCaT wykazano, że polichlorowane bifenyle, będące zanieczyszczeniem środowiska, także przyczyniają się do skracania telomerów oraz zwiększania ilości mikrojąder (będących także biomarkerem uszkodzenia materiału genetycznego) w komórkach [75].

Co ciekawe w przypadku ekspozycji na niektóre związki chemiczne, w tym udowodnione związki rakotwórcze dla człowieka, stwierdzono dłuższe telomery niż w grupie nieeksponowanej. Przykładem takich związków jest arsen [76], benzen [77], i trwałe organiczne zanieczyszczenia środowiska (ang. *persistent organic pollutants*) [78].

Destabilizacja struktury chromosomów wynikająca z łamania telomerów lub zahamowania ich syntezy może powodować zaburzenia w ekspresji genów oraz prawidłowe funkcjonowanie komórek. Zatem telomery mogą posłużyć jako markery ekspozycji na zanieczyszczenia środowiska [64,65,72].

Źródło finansowania: Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji nr DEC-2011/03/D/NZ7/05018.

PIŚMIENNICTWO

1. WHO International Programme on Chemical Safety Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. 2001. Retrieved from <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>
2. Kapka-Skrzypczak L., Cyranka M., Kruszewski M., i in.: Środki ochrony roślin a zdrowie rolników-biomarkery oraz możliwości ich wykorzystania do oceny ekspozycji na pestycydy. Med. Ogólna i Nauki o Zdr., 2011; 17, 1: 28-32
3. Jakubowski M.: Monitoring biologiczny narażenia na czynniki toksyczne. Med. Pracy, 2004; 55, 1: 13-18
4. Silins I., Hogberg J.: Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. Int. J. Environ. Res. Public Health, 2011; 8: 629-647
5. Bukowska B.: Addukty hemoglobiny jako biomarkery narażenia człowieka na wybrane ksenobiotyki. Postępy Hig. Med. Dośw., 2015; 69: 668-680
6. Wysoczańska B.: Zachowanie długości telomerów. Postępy Hig. Med. Dośw., 2013; 67: 1319-1330

7. Strimbu K., Tavel J.A.: What are Biomarkers?. *Curr Opin HIV AIDS*, 2010; 5, 6: 463-466
8. Śpiewak M., Kruk M.: Biomarkery w ostrych zespołach wieńcowych. *Postępy w Kardiologii Interwencyjnej*, 2008; 4, 4, 14: 183-187
9. Kozubek M., Długosz A., Pawlik K.: Zastosowanie technik PCR w toksykologii. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2010; 64: 482-489
10. Kowalska A., Kowalik A.: Telomer i telomeraza w onkogenezie. *Współczesna Onkologia*, 2006; 10, 10: 485-496
11. Kowalska M., Lipińska M., Romaniuk A., i in.: Telomeraza jako cel terapii przeciwnowotworowej. *Diagn. Lab.*, 2014; 50, 2: 159-167
12. Bielak-Żmijewska A., Grabowska W., Przybylska D.: Rola starzenia komórkowego w starzeniu organizmu i chorobach związanych z wiekiem. *Postępy Biochemii*, 2014; 60, 2: 147-160
13. Neidle S., Parkinson G.N.: The structure of telomeric DNA. *Current Opinion in Structural Biology*, 2003; 13: 275-283
14. Lu W., Zhang Y., Liu D., i in.: Telomeres – structure, function, and regulation. *Experimental Cell Research* 2013; 319: 133-141
15. Stewart J.A., Chaiken M.F., Wang F., i in.: Maintaining the end: Roles of telomere proteins in end-protection, telomere replication and length regulation. *Mutat Res.*, 2012; 730, 2: 12-19
16. Greider C.W.: Telomeres do D-loop-T-loop. *Cell*, 1999; 97: 419-422
17. Griffith J.D., Comeau L., Rosenfield S., i in.: Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, 1999; 97: 503-514
18. Blasco M.A.: Telomere length, stem cells and aging. *Nature chemical biology*, 2007; 3: 640-649
19. de Lange T.: Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Gene and Development*, 2005; 19, 18: 2100-2110
20. Mosieniak G., Strzeszewska A.: Rola starzenia komórkowego w kancerogenezie i terapii przeciwnowotworowej. *Postępy Biochemii*, 2014; 60, 2: 194-206
21. Sampathi S., Chai W.: Telomere replication: poised but puzzling. *Cell. Mol. Med.*, 2011; 15, 1: 3-13
22. Broccoli D., Young J.W., de Lange T.: Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 9082-9086
23. Osterhage J.L., Friedman K.L.: Chromosome end maintenance by telomerase. *Journal of biological chemistry*, 2009; 284: 16061-16065
24. Cifuentes-Rojas C., Shippen E.D.: Telomerase Regulation. *Mutat Res.*, 2012; 1, 730, 1-2: 20-27
25. López-Otín C., Blasco A.M., Partridge L., i in.: The Hallmarks of Aging Cell, 2013; 153, 6: 1194-1217
26. Aubert G., Lansdorp P.M.: Telomeres and aging. *Physiol. Rev.*, 2008; 88: 557-579
27. Cawthon M.R., Smith R.K., O'Brien E., i in.: Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *The Lancet.*, 2003; 361: 393-395
28. Murnane J.P.: Telomere dysfunction and chromosome instability. *Mutat Res.*, 2012; 730: 28-36
29. Muraki K., Nyhan K., Han L., i in.: Mechanisms of telomere loss and their consequences for chromosome instability. *Front. Oncol.*, 2012; 2: 135
30. Hayflick L.: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, 1965; 37: 614-636
31. Shalev I., Entringer S., Wadhwa P.D., i in.: Stress and telomere biology: a lifespan perspective. *Psychoneuroendocrinology*, 2013; 38: 1835-1842
32. Hirai Y., Masutomi K., Ishikawa F.: Kinetics of DNA replication and telomerase reaction at a single-seeded telomere in human cells. *Genes Cells*, 2012; 17: 186-204
33. Xu L., Li S., Stohr B.A.: The role of telomere biology in cancer. *Annu. Rev. Pathol.*, 2013; 8: 49-78
34. Ramunas J., Yakubov E., Brady J.J. i in.: Transient delivery of modified mRNA encoding TERT rapidly extends telomeres in human cells. *FASEB Journal*, 2015; 29, 5: 1930-1939
35. Alster O., Korwek Z.: Znaczniki starzenia komórkowego. *Postępy Biochemii*, 2014; 60, 2: 138-146
36. Kazanowska B., Mikołajewska A., Reich A., i in.: Telomery i aktywność telomerazy w komórkach prawidłowych oraz w komórkach nowotworowych. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2003; 12, 1: 87-95
37. von Zglinicki T.: Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci.*, 2002; 27: 339-344
38. von Zglinicki T., Saretzki G., Docke W., i in.: Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res.*, 1995; 220: 186-193
39. Gao B., Li K., Wei Y.Y., i in.: Zinc finger protein 637 protects cells against oxidative stress-induced premature senescence by mTERT-mediated telomerase activity and telomere maintenance. *Cell Death & Disease*, 2014; 5: e1334
40. Houben J.M.J., Moonen H.J.J., Schooten F.J., i in.: Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic. Biol. Med.*, 2008; 44: 235-246
41. Hornsby P.J.: Short telomeres: cause or consequence of aging? *Aging Cell*, 2006; 5: 577-578
42. Pawelec K.: Krótkie telomery czynnikiem prognostycznym w leczeniu nabytej anemii aplastycznej. *Postępy Nauk Med.*, 2014; XXVII, 4: 288-291
43. Chaber R., Reich A., Kazanowska B., i in.: Aktywność telomerazy i długość telomerów w nowotworach złośliwych u dzieci. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2003; 12, 4: 415-422
44. Matysiak M., Karp M., Kapka – Skrzypczak L.: Nowe markery prognostyczne przewlekłej białaczki limfocytowej. *Hygeia. Public Health*, 2014; 49, 3: 435-441
45. McGrath M., Wong J.Y.Y., Michaud D., i in.: Telomere length, cigarette smoking and bladder cancer risk in men and women. *Cancer Epidemiol Prev.*, 2007; 16, 4: 815-819
46. Broberg K., Björk J., Paulsson K., i in.: Constitutional short telomeres are strong genetic susceptibility markers for bladder cancer. *Carcinogenesis*, 2005; 26, 7: 1263-71
47. Seow W.J., Cawthon R.M., Purdue M.P., i in.: Telomere length in white blood cell DNA and lung cancer: a pooled analysis of three prospective cohorts. *Cancer Res.*, 2014; 74: 4090-4098
48. Willeit P., Willeit J., Mayr A., i in.: Telomere length and risk of incident cancer and cancer mortality. *JAMA*, 2010b; 304, 1: 69-75
49. Muller M., Rabelink T.J.: Telomere shortening: a diagnostic tool and therapeutic target for cardiovascular disease? *Eur. Heart J.*, 2014; 35, 46: 3245-3247
50. Fyhrquist F., Saijonmaa O., Strandberg T.: The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 2013; 10, 5: 274-283.
51. Testa R., Olivieri F., Sirolla C., i in.: Leukocyte telomere length is associated with complications of type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.*, 2011; 11, 1388-1394
52. Guan J.Z., Guan W.P., Maeda T., i in.: Analysis of telomere length and subtelomeric methylation of circulating leukocytes in women with Alzheimer's disease. *Aging Clin. Exp. Res.*, 2013; 25, 1: 17-23
53. Moverare-Skrtic S., Johansson P., Mattsson N., i in.: Leukocyte telomere length (LTL) is reduced in stable mild cognitive impairment but low LTL is not associated with conversion to Alzheimer's disease: a pilot study. *Exp. Gerontol.*, 2012; 47, 2: 179-182
54. Honig L.S., Kang M.S., Schupf N., i in.: Association of shorter leukocytes telomere repeat length with dementia and mortality. *Arch. Neurol.*, 2012; 69, 10: 1332-1339

55. Li Z., Tang J., Li H., i in.: Shorter telomere length in peripheral blood leukocytes is associated with childhood autism. *Sci. Rep.*, 2014; 17, 4: 7073
56. Revesz D., Milaneschi Y., Verhoeven J.E., i in.: Telomere length as a marker of cellular aging is associated with prevalence and progression of metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2014; 99, 12: 4607-4615
57. Willeit P., Raschenberger J., Heydon E.E., i in.: Leucocyte telomere length and risk of type 2 diabetes mellitus: new prospective cohort study and literature-based meta-analysis. *PLOS ONE*, 2014; 9, 11: e112483
58. Willeit P., Willeit J., Brandstatter A., i in.: Cellular aging reflected by leukocyte telomere length predicts advanced atherosclerosis and cardiovascular disease risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2010a; 30: 1649-1656
59. Stuart B.D., Lee J.S., Kozlitina J., i in.: Effect of telomere length on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: an observational cohort study with independent validation. *Lancet Respir. Med.*, 2014; 2, 7: 557-565
60. Russo A., Modica F., Guarrera S., i in.: Shorter leukocyte telomere length is independently associated with poor survival in patients with bladder cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2014; 23, 11: 2439-2446
61. Chen Y., Qu F., He X., i in.: Short leukocyte telomere length predicts poor prognosis and indicates altered immune functions in colorectal cancer patients. *Ann. Oncol.*, 2014; 25: 869-876
62. Ghosh S., Feingold E., Chakraborty S., i in.: Telomere length is associated with types of chromosome 21 nondisjunction: a new insight into the maternal age effect on Down syndrome birth. *Hum. Genet.*, 2010; 127, 4: 403-409
63. Langie S., Koppen G., Desaulniers D., i in.: Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society. *Carcinogenesis*, 2015; 36, 1: 61-88
64. Zhang X., Lin S., Funk W.E., i in.: Environmental and occupational exposure to chemicals and telomere length in human studies. *Occup. Environ. Med.*, 2013; 70, 10: 743-749
65. Hoxha M., Dioni L., Bonzini M., i in.: Association between leukocyte telomere shortening and exposure to traffic pollution: a cross-sectional study on traffic officers and indoor office workers. *Environ. Health*, 2009; 8: 41
66. Dioni L., Hoxha M., Nordio F., i in.: Effects of short-term exposure to inhalable particulate matter on telomere length, telomerase expression, and telomerase methylation in steel workers. *Environmental Health Perspectives*, 2011; 119, 5: 622-627
67. Wong J.Y., De Vivo I., Lin X., i in.: Cumulative PM (2.5) exposure and telomere length in workers exposed to welding fumes. *J. Toxicol Environ Health*, 2014; 77, 8: 441-455
68. Salihu H.M., Pradhan A., King L., i in.: Impact of intrauterine tobacco exposure on fetal telomere length. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2014; 211, 1: e1-1.e8
69. Pawlas N., Płachetka A., Kozłowska A., i in.: Telomere length in children environmentally exposed to low-to-moderate levels of lead. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2015; 287: 111-118, doi: 10.1016/j.taap.2015.05.005
70. Andreotti G., Hoppin J., Savage S., i in.: Pesticide use and relative telomere length in the Agricultural Health Study. *Occup Environ Med.*, 2014; 71: A14-A15
71. Pavanello S., Pesatori A.C., Dioni L., i in.: Shorter telomere length in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis*, 2010; 31:216-221
72. Li H., Jönsson B.A., Lindh C.H., i in.: N-nitrosamines are associated with shorter telomere length. *Scand J Work Environ Health*, 2011; 37, 4: 316-324
73. Wu Y., Liu Y., Ni N., i in.: High lead exposure is associated with telomere length shortening in Chinese battery manufacturing plant workers. *Occup. Environ. Med.*, 2012; 69, 557-563
74. Pawlas N., Płachetka A., Kozłowska A., i in.: Telomere length, telomerase expression and oxidative stress in lead smelters. *Toxicology and Industrial Health*, e-pub doi:10.1177/0748233715601758
75. Jacobus J.A., Flor S., Klingelutz A., i in.: 2-(4'-chlorophenyl)-1,4-benzoquinone increases the frequency of micronuclei and shortens telomeres. *Environ Toxicol Pharmacol.*, 2008; 25, 2: 267-272
76. Li H., Engstrom K., Vahter M., i in.: Arsenic exposure through drinking water is associated with longer telomeres in peripheral blood. *Chem. Res. Toxicol.*, 2012; 25: 2333-2339
77. Bassig B.A., Zhang L., Cawthon R.M., i in.: Alterations in leukocyte telomere length in workers occupationally exposed to benzene. *Environ. Mol. Mutagen.*, 2014; 55: 673-678
78. Shin J.Y., Choi Y.Y., Jeon H.S., i in.: Low-dose persistent organic pollutants increased telomere length in peripheral leukocytes of healthy Koreans. *Mutagenesis*, 2010; 25: 511-516

Adres do korespondencji:

Agnieszka Kozłowska
Zakład Szkodliwości Chemicznych i Toksykologii
Genetycznej
Pracownia Toksykologii Genetycznej
Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego
ul. Kościelna 13; 41-200 Sosnowiec
tel. 32 6341194; fax. 32 266 11 24
e-mail: a.kozłowska@imp.sosnowiec.pl