

Измерение абсолютной длины теломер методом проточной цитометрии

И.А. Дёмина¹, А.А. Семченкова¹, З.Р. Кагирова², А.М. Попов¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

² ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

Длина концевых участков хромосом – теломер – динамическая постоянная величина, которая характеризует процесс клеточного старения. Измерение длины теломер (ДТ) и ее связь с диагностикой, течением, прогнозом и лечением целого ряда заболеваний в последние годы вызывает большой интерес исследователей. Применяемые для этого методы, в первую очередь молекулярно-биологические, разнообразны. Вариативность методических подходов, отсутствие единого стандарта измерения ДТ, измерения в абсолютных и относительных единицах – все это приводит к получению результатов, которые невозможно сравнивать между собой. Цель данной работы – разработка алгоритма пересчета данных, полученных с помощью проточной цитофлуориметрии, в абсолютную ДТ, выраженную в тысячах пар нуклеотидов (kb). Проведено исследование венозной крови детей в возрасте 2–3 лет (8 – здоровые и 3 – с врожденным дискератозом). В качестве контрольного материала использовались клетки линии 1301 (ATCC, Великобритания). Относительную ДТ определяли методом *FlowFISH* с использованием набора *Telomere PNA Kit/FITC* (DakoCytomation, Глоstrup, Дания). Индекс RTL и абсолютную ДТ рассчитывали для каждого участника исследования. Данные о ДТ пациентов сравнивали с данными относительной ДТ здоровых детей соответствующего возраста. Среднее значение RTL для здоровых детей 2–3 лет – 30,1; абсолютная ДТ – 15,56 kb. Длина теломер пациентов с врожденным дискератозом была достоверно короче (RTL – 1,4–4,3; абсолютное значение ДТ – 0,3–2,4 kb). Представленный алгоритм пересчета молекулярного эквивалента флуоресценции в абсолютную ДТ универсален, его можно использовать в любых лабораториях, оснащенных проточным цитофлуориметром. Полученные в результате данные о ДТ можно сравнивать с данными, выраженными в абсолютных единицах при помощи других методов.

Ключевые слова: теломеры, проточная цитометрия, врожденный дискератоз

Дёмина И.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2018; 17 (4): 66–72.

DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-4-66-72

Flow cytometric measurement of absolute telomere length

I.A. Demina¹, A.A. Semchenkova¹, Z.R. Kagirova², A.M. Popov¹

¹ Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

² Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow

The length of the end of chromosomes – telomeres is a dynamic and constant characterizes cellular aging process. Measurement of telomere length (TL) and its connection with the diagnosis, course, prognosis and treatment of a number of diseases in recent years, is of great interest for researchers. The methods used for this are varied and are primarily by molecular biological. Variability of methodological approaches, the lack of a common standard of measurement TL measurements in absolute and relative terms: all this leads to results that cannot be compared with each other. The aim of this work is the development of data conversion algorithm is obtained by flow cytometry in absolute telomere length, expressed in kilobases (kb). The study was conducted from venous blood of children 2–3 years of age (8 healthy children and 3 patients with dyskeratosis congenita). As control material used cell line 1301 (ATCC, UK). Determination of relative telomere length was performed by using a set *FlowFISH Telomere PNA Kit / FITC* (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). RTL code and the absolute length of telomeres were calculated for each study participant. Data on the length of patients telomere were compared with data on TL healthy children of appropriate age. RTL average value for healthy children 2–3 years was 30.1, and an absolute telomere length – 15.56 kb. Telomere length patients with dyskeratosis congenita was significantly shorter (RTL 1.4–4.3, the absolute value of TL 0.3–2.4 kb). The algorithm conversion molecular fluorescence equivalent in absolute TL is universal and can be used in any laboratory equipped with a flow cytometer. The resulting data TL can be compared with the data expressed in absolute units and obtained by any other method.

Key words: telomere, flow cytometry, dyskeratosis congenita

Demina I.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2018; 17 (4): 66–72.

DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-4-66-72

Контактная информация:

Дёмина Ирина Андреевна, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и иммуногенеза НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: idemina@mail.ru

© 2018 by NMRC PHOI

Correspondence:

Irina A. Demina, PhD, leading scientist Laboratory of cell's immunology and immunogenesis Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation.
Address: Russia 117997, Moscow, Samory Mashela st., 1
E-mail: idemina@mail.ru

Теломеры представляют собой нуклеопротеиновые структуры, которые находятся на концах хромосом и защищают их от деградации, участвуя таким образом в поддержании общей геномной устойчивости. Структура теломер всех позвоночных одинакова: они состоят из гексамерных повторов ДНК (TTAGGG)_n, отличается только количество повторов – от сотен до нескольких десятков тысяч [1]. Количество повторяющихся гексамеров уменьшается при каждом делении клетки и, как следствие, длина теломер (ДТ) в большинстве дифференцированных клеток уменьшается пропорционально продолжительности жизни организма. Критическое укорочение теломер может привести к их слиянию и увеличению степени хромосомной неустойчивости, которая, в свою очередь, является ключевым событием при многих онкологических заболеваниях разных органов и тканей (включая легкие, молочную железу, толстую кишку и предстательную железу), а также некоторых видах лейкозов [2–5].

В многочисленных наблюдениях было показано, что укорочение теломер может быть заметно ускорено под воздействием целого ряда факторов окружающей среды, таких как режим питания, психологический и физиологический стресс, курение, ожирение и др. [6–10]. Было показано, что ДТ коррелирует со степенью риска формирования инфаркта миокарда, безрецидивной выживаемостью при некоторых формах рака, смертностью после инсульта, а также с общей выживаемостью, не зависящей от генетической предрасположенности [11].

В связи со столь разнообразным влиянием ДТ практически на все факторы здоровья и даже интеллектуальные возможности человека интерес к измерению ДТ в последние годы растет в геометрической прогрессии. Исследователи разработали широкий спектр методов: в первую очередь, это анализ терминальных рестрикционных фрагментов (TERF); используют также количественную ПЦР (qPCR), STELA (*Single TElomere Length Analysis*) – анализ длины единичной теломеры; MMQPCR (*monochrome multiplex Q-PCR*), Q-FISH (*Quantitative fluorescence*) – определение ДТ в метафазных хромосомах при помощи флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) и количественного измерения флуоресценции; FlowFISH – определение относительной ДТ с помощью проточной цитофлуориметрии.

Метод Flow-FISH основан на использовании флуоресцентно-меченой (CCCTAA)₃ пептид-нуклеиновой кислоты (PNA – *peptide nucleic acid*) – PNA-зонда в клеточной суспензии с последующим анализом методом проточной цитофлуориметрии. Причем условия гибридизации подобраны таким образом, чтобы внутрихромосомные теломероподобные последовательности TTAGGG не связывались с зондом. Такой подход

позволяет также анализировать ДТ в различных клеточных субпопуляциях в одном образце при использовании соответствующих флуоресцентно-меченых антител.

Этот метод обладает максимальной пропускной способностью и высокой воспроизводимостью за счет создания полуавтоматического формата и роботизирования некоторых процедур пробоподготовки [12]. К недостаткам метода относятся довольно жесткие условия гибридизации, что ведет к разрушению некоторых типов нефиксированных клеток и требует проведения нескольких циклов отмывок или выделения интересующих клеточных фракций на градиентах плотности с помощью центрифугирования. В настоящее время *FlowFISH* – единственный метод, пригодный для клинического применения.

Все указанные выше методы, кроме TERF, измеряют ДТ относительно какого-либо стандарта, что существенно усложняет, а зачастую делает невозможным сравнение результатов, полученных в разных лабораториях. В связи с лавинообразным накоплением данных о ДТ при разных патологиях и попытках использования ее в качестве прогностического фактора успешности ряда сложных медицинских процедур (например, трансплантации гемопоэтических клеток) возникла потребность формирования протокола измерения абсолютной ДТ максимально воспроизводимым, простым и быстрым методом, применяемым в клинических исследованиях. Таким методом является *FlowFISH*, используя который, мы предприняли попытку перевода относительной ДТ в абсолютные значения, что существенно упрощает сравнение полученных при его помощи результатов с результатами других исследовательских групп.

Цель данной работы: разработка алгоритма пересчета данных, полученных с помощью проточной цитофлуориметрии, в абсолютную длину теломер, выраженную в тысячах пар нуклеотидов (kb).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве материала для исследования использовали венозную кровь здоровых детей (n = 8) и детей с установленным диагнозом «врожденный дискератоз» (ВД) (n = 3) в возрасте 2–3 лет. Выделяли макрофагально-лимфоцитарную фракцию клеток периферической крови при помощи центрифугирования на фиколле 1077. Затем клетки отмывали и подсчитывали с использованием автоматического клеточного анализатора *rosH-100i* (*Sysmex*, Япония).

Для анализа требовалось 2 × 10⁶ клеток крови и такое же количество контрольных клеток. В качестве контрольного материала использовали клетки линии 1301 (ATCC, Великобритания). Клетки выращивали в суспензионной культуре в среде RPMI 1640

+ GlutaMAX (Gibco, Великобритания) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США) при температуре +37°C, 5% CO₂. Культуру собирали на 3-й день, в поздней логарифмической фазе роста, и замораживали в криобирках. До использования клетки хранились при температуре -80°C не более 3 месяцев. Относительную ДТ определяли методом FlowFISH с использованием набора Telomere PNA Kit/FITC (DakoCytomation, Глоstrup, Дания). Все процедуры выполняли согласно рекомендации фирмы-изготовителя. Результаты измеряли с помощью проточного цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter, США). Получали двумерные изображения распределения флуоресценции анализируемых объектов по каналам FITC и пропидия йодида. Для вычисления молекулярного эквивалента флуоресценции использовали флуоросферы, меченые FITC (DakoCytomation, Глоstrup, Дания). Измерения проводили согласно рекомендациям фирмы-изготовителя. Настройки прибора по каналу флуоресценции FITC были одинаковыми для всех измерений. Для анализа цитофлуориметрических изображений использовали программу Kaluza 1.5a (Beckman Coulter, США).

Количественное определение какого-либо цитометрического параметра предусматривает необходимость компенсации различий, которые существуют между проточными цитометрами и их суточными характеристиками. Для количественного измерения ДТ также необходима стандартизация/калибровка. Для калибровки отдельного инструмента и создания стандартной кривой на основе флуорохрома использовали калибровочные частицы FluoroSpheres

(DakoCytomation, Глоstrup, Дания). Они несут на своей поверхности известное количество молекул флуорохрома, что позволяет проводить калибровку и определение линейности работы проточного цитометра. Таким образом, конкретное значение интенсивности флуоресценции на проточном цитометре может быть сопоставлено с фактическим числом молекул флуорохрома и установлена взаимосвязь между относительным сигналом флуоресценции и числом связанных PNA-зондов (и количества повторов теломер) на клетку. Пример гистограммы смеси немеченых и меченых частиц, несущих флуоресцеинизотиоцианат (FITC), представлен на рисунке 1.

Исследуемые клетки были тщательно ресуспендированы, чтобы избежать попадания в образец слипшихся объектов. Каждый образец делили на четыре равные части и исследовали в двух повторах – с PNA-зондом и без него. При анализе полученных изображений в расчет брали только популяцию клеток, находящихся в фазе G₀/G₁. Их легко отделить по каналу флуоресценции пропидия йодида. Использование контрольных клеток с каждым образцом крови необходимо для внутреннего контроля процесса гибридизации флуоресцентного зонда с теломерными последовательностями при измерении относительной ДТ.

Для обработки полученных результатов использовали программу XLSTAT-2016.

Индекс RTL и абсолютную ДТ рассчитывали для каждого участника исследования. Данные о ДТ пациентов сравнивались с данными относительной ДТ здоровых детей соответствующего возраста.

Рисунок 1

Гистограмма смесей калибровочных частиц MESF (DakoCytomation, Глоstrup, Дания): регион А соответствует немеченым частицам; регионы от В до F – частицам, несущим разное количество молекул FITC

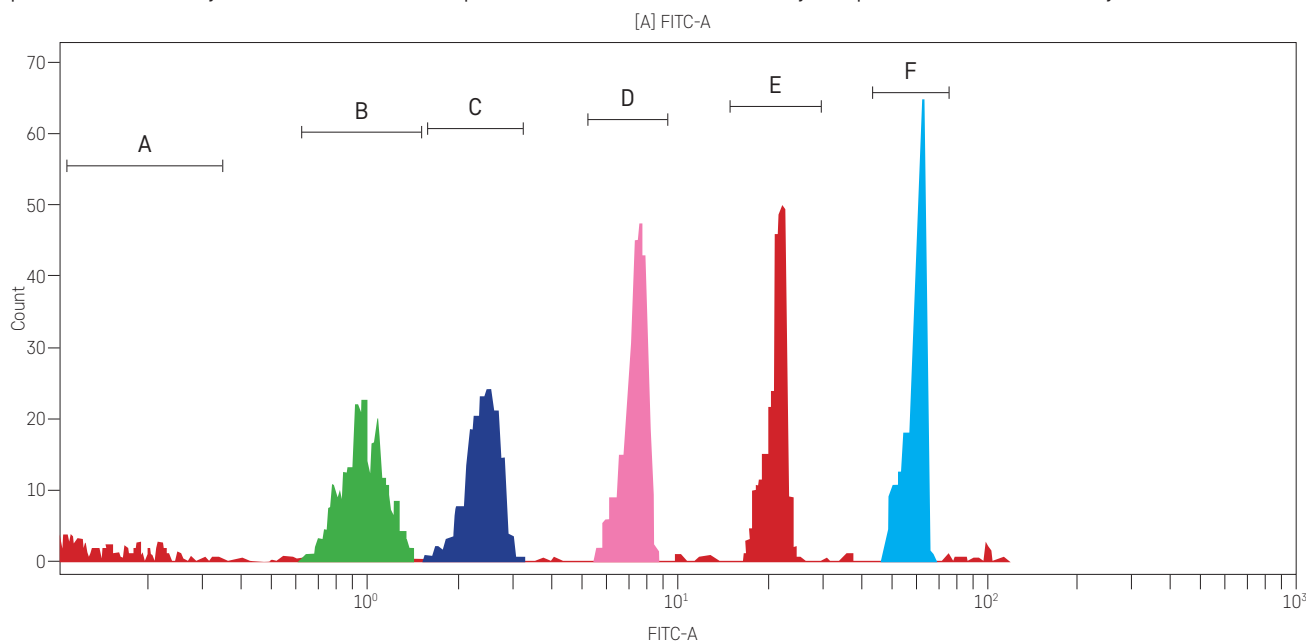
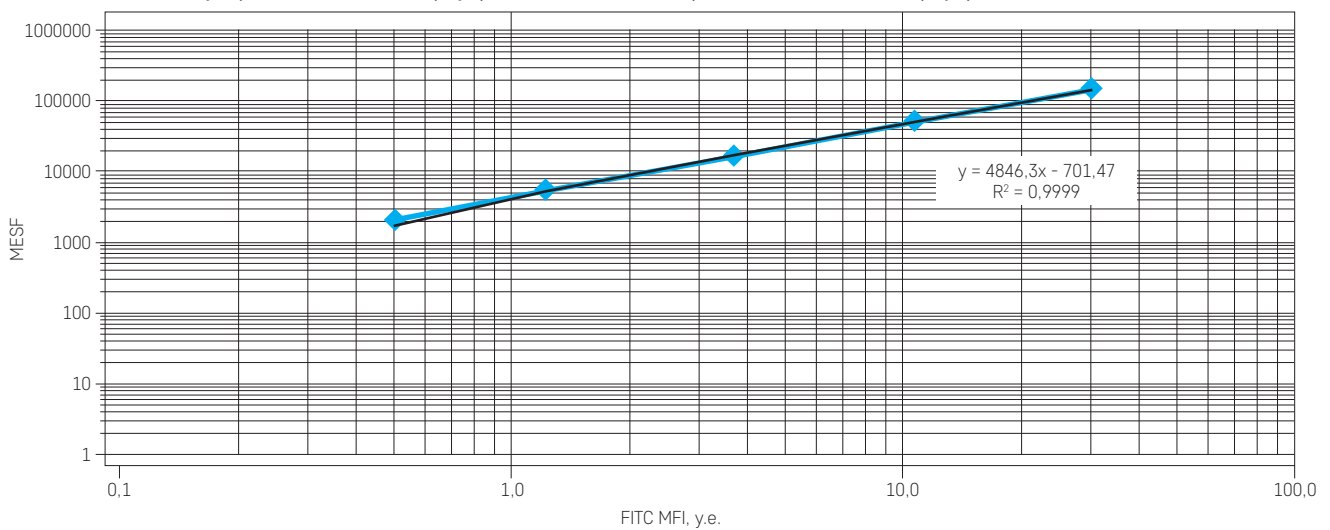


Рисунок 2

Соотношение молекулярного эквивалента флуоресценции (MESF) и средней интенсивности флуоресценции (MFI)



РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

M. Hultdin и соавт. [13] предложили использовать в качестве контрольных клеток клеточную линию 1301. Эта Т-лимфобластная линия является тетраплоидной и имеет очень длинные теломеры, что позволяет легко отличить их от исследуемых клеток. Было показано, что ДТ этих клеток составляет 70 kb [14]. Зная абсолютную ДТ контрольной линии и среднюю флуоресценцию популяции одиночных клеток по FITC, а также учитывая данные флуоресценции калибровочных частиц с известным количеством флуорохрома, можно вывести формулу, позволяющую переводить измеренный уровень флуоресценции в абсолютную ДТ в kb. Приняв значения молекулярного эквивалента флуоресценции (MESF) за стандарт, была выведена формула соответствия MESF и средней интенсивности флуоресценции (MFI) (рисунки 2). Зная MFI контрольных клеток с известной ДТ, была выведена формула пересчета MFI для исследуемых клеток с учетом тетраплоидности линии 1301:

$$y = (4846,3 \times 2x - 701,47) \times 0,00141;$$

где x – разность между средними значениями MFI по FL1 образцов, инкубированных с PNA-зондом и без него; коэффициент 2 введен для учета тетраплоидности контрольной линии 1301; 0,00141 – расчетный коэффициент, который показывает, скольким тысячам пар нуклеотидов соответствует один молекулярный эквивалент флуоресценции.

Для определения абсолютной ДТ исследуемых образцов необходимо вычислить разницу между средним от двух измерений MFI клеток, инкубированных с PNA-зондом и без него, для вычета аутофлуоресценции, а затем подставить полученное значение в приведенную выше формулу.

Эта формула может быть универсальной и применяться для обсчета результатов с любых проточных цитометров при условии калибровки по одним и тем же частицам и сохранения одинаковых настроек. Каждая лаборатория может вывести свою формулу соответствия длины любого постоянного контрольного материала с известной ДТ с MESF, измеренным с помощью флуоресцентных частиц любого производителя, и настроить все приборы, участвующие в исследовании ДТ, единым способом. Это поможет стандартизировать проводимые исследования и уменьшить влияние человеческого фактора на точность получаемых результатов.

Для проверки возможности применения данного подхода к вычислению абсолютной ДТ был проведен анализ ДТ нескольких пациентов с установленным диагнозом «врожденный дискератоз» и здоровых детей того же возраста. Пациентов с ВД выбрали в качестве исследуемой группы, так как ранее было показано, что для этого заболевания характерно наличие ультракоротких теломер [15]. Известно, что при этой патологии определяются мутации в одном или нескольких из 6 основных генов (*TERT*, *TERC*, *DKC1*, *WRAP53*, *NOP10* и *NHP2*), продуцирующих белки теломеразного комплекса. При повреждении этих генов их белковые продукты оказываются функционально дефектными, что ведет к снижению активности всего теломеразного комплекса и, как следствие, к невозможности полноценного восстановления теломер в процессе жизнедеятельности клетки. Было показано, что при ВД достоверно уменьшена длина теломер в нескольких типах лейкоцитов, включая гранулоциты, лимфоциты, Т-клетки памяти, наивные Т-клетки [16].

Результаты определения относительной ДТ (RTL) и рассчитанная абсолютная ДТ у 3 пациентов с ВД и 8 здоровых детей аналогичного возраста представлены в таблице 1. Среднее значение RTL для здо-

Таблица 1

Длина теломер у 3 пациентов с врожденным дискератозом и у 8 здоровых детей в возрасте 2–3 лет, выраженная в RTL и абсолютных единицах

		Длина теломер	
		RTL	абсолютное значение, kb
Пациенты с ВР	1	9,3	1,8
	2	1,4	0,3
	3	11,3	2,4
Здоровые дети	1	31,8	19,5
	2	29,6	17,2
	3	31,2	9,7
	4	36,6	13,5
	5	41,2	19,6
	6	17,4	14,7
	7	23,5	15,6
	8	29,3	14,7

ровых детей 2–3 лет составило 30,1, а абсолютная ДТ – 15,56 kb. Длина теломер пациентов с ВД была достоверно короче (RTL – 1,4–4,3; абсолютное значение ДТ – 0,3–2,4 kb) (рисунк 3).

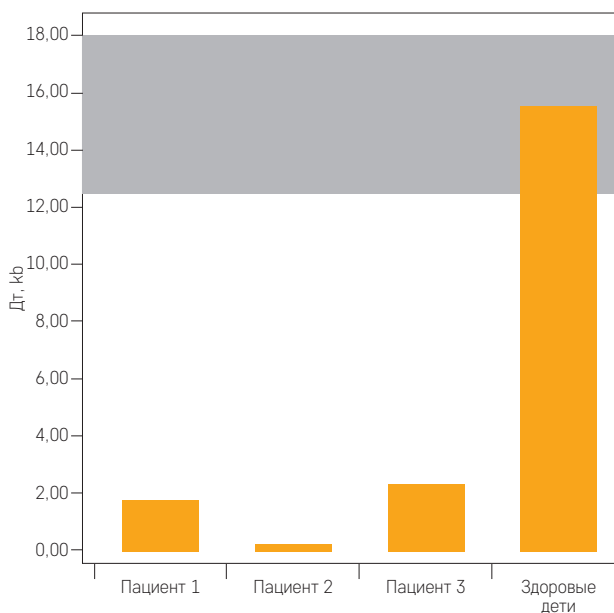
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В течение многих лет анализ терминальных рестрикционных фрагментов (TERF) был единственным количественным методом измерения ДТ и сегодня считается «золотым стандартом». Его используют и как эталонный метод при оценке достоверности последующих методических разработок в этой области. В основе этого метода лежит определение размера фрагментов, полученных в результате обработки геномной ДНК рестриктазами и меченных флуоресцентным зондом на теломерные последовательности методом электрофореза в агарозном геле с последующим Саузерн-блотом. Размер меченого фрагмента сравнивают со стандартом – известным размером фрагмента ДНК. Этот метод достаточно трудоемкий, субъективный и имеет значительную вероятность технических артефактов. Сравнение результатов TERF, выполненных в различных лабораториях, представляет существенную трудность, поскольку изначально не были стандартизованы пары ферментов рестрикции и даже исходное количество ДНК, что ведет в конечном итоге к большой вариабельности измерений.

STELA (*Single TElomere Length Analysis*), или анализ длины единичной теломеры, – это метод, основанный на том, что все теломеры на 3' конце имеют тройной G-повтор. Используется линкер в сочетании

Рисунок 3

Сравнение рассчитанной абсолютной длины теломер у пациентов с врожденным дискератозом и у здоровых детей (серым цветом выделен диапазон нормальных значений)



с праймером, специфичным для уникальной субтеломерной последовательности, для формирования индивидуального ампликона для каждой отдельной теломеры в процессе ПЦР. Основной нюанс этого метода состоит в том, что не все хромосомные концы имеют подходящую последовательность для создания уникальных праймеров. Таким образом, применение метода STELA обычно ограничено несколькими хорошо охарактеризованными областями – ХрYp, 2p, 11q, 12q и 17p [17]. Продукты реакции визуализируются электрофорезом в агарозном геле и последующим Саузерн-блотом. Метод не нуждается в сложном специальном оборудовании, но требует существенного опыта в области ПЦР одиночных молекул. Самое большое преимущество STELA – способность измерять ДТ с высокой точностью при незначительном количестве исходного материала. Достаточно нескольких пикограмм ДНК или 50 клеток для обеспечения надежного результата измерения, поэтому STELA хорошо подходит для анализа ДТ редких типов клеток [18]. Однако из-за технических сложностей, трудоемкости процедур и низкой пропускной способности этот метод имеет ограниченное применение в клинических исследованиях.

MMQPCR (*monochrome multiplex Q-PCR*) – этот метод основан на использовании праймеров к C- и G-богатым участкам теломеры, но имеющих отличия в своей структуре. Их наличие приводит к уменьшенному формированию димеров. Процесс амплификации происходит только на самих теломерах при более низких температурах отжига в первых двух циклах ПЦР. Последующие циклы проводят с повышением температуры, предотвращая формирование дальней-

шей амплификации теломерной последовательности и увеличивая генерацию продуктов фиксированной длины. Амплификацию измеряют количественно и сравнивают с изначальным геном в единственном экземпляре. Метод нуждается в тщательной калибровке и наличии панели стандартных образцов для обеспечения воспроизводимости. Применение разных протоколов и стандартов приводит к наличию противоречивых данных в публикациях, использующих данный метод [19].

Q-FISH (*Quantitative fluorescence*) – метод определения ДТ в метафазных хромосомах с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) и количественного измерения флуоресценции. Используется флуоресцентно меченая (CCCTAA)₃ пептид-нуклеиновая кислота (PNA), которая специфически гибридизуется с денатурированной ДНК теломер. Флуоресцентный сигнал может быть затем измерен по отношению к стандартам известной ДТ в метафазных хромосомах при помощи специального программного обеспечения для анализа изображений Q-FISH [20]. Q-FISH – метод выбора для измерения ДТ с высоким разрешением на определенных концах хромосом (и для всех хромосом), так как он позволяет одновременно проводить кариотипирование. Чтобы получить достоверные результаты измерения ДТ, достаточно провести анализ 15–20 метафазных хромосом. Метод Q-FISH может быть использован для обнаружения концов хромосомы без определяемых ПЦР повторов (< 0,5 kb), а также в слитых хромосомах. Основным недостатком этого метода – невозможность измерения теломер в терминально стареющих, аберрантных и неделящихся клетках, а также клетках с низким митотическим индексом. Метод Q-FISH подходит для измерения ДТ в клетках крови и срезах тканей [21].

При прямом сравнении результатов qPCR и FlowFISH было показано, что FlowFISH – более точный и воспроизводимый метод. Оба эти метода – FlowFISH и qPCR – обладали высокой чувствительностью (100%) и специфичностью (93 и 89% соответственно) при измерении теломер нормальной длины. Однако чувствительность qPCR (40%) и специфичность (63%) для обнаружения коротких теломер были ниже

по сравнению с FlowFISH (80 и 85% соответственно). В клинических условиях метод FlowFISH давал более точные, воспроизводимые, чувствительные и специфические результаты по сравнению с qPCR [22].

Существенный недостаток цитофлуориметрического метода заключается в его относительности. Использование в качестве контрольных клеток тимоцитов быка, спленоцитов мыши, ряда клеточных культур не позволяет проводить адекватный сравнительный анализ результатов, получаемых в разных лабораториях, поскольку известно, что, например, ДТ у мышей колеблется в зависимости от линии и может составлять от 20 до 150 kb даже без учета возрастных изменений. Поэтому так актуален поиск возможности максимально стандартизировать получаемые результаты.

Использование универсальных калибровочных частиц, позволяющих унифицировать настройки точных цитометров разных производителей, и любого контрольного материала с известной стабильной ДТ делает возможным перевод относительно измеренных единиц ДТ в общепринятые единицы длины генетического материала – kb.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование предлагаемой нами формулы позволяет сравнивать результаты, полученные цитофлуориметрическим методом в разных лабораториях, и проводить ретроспективный пересчет полученных ранее результатов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Demina I.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4317-2094>

Semchenkova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7082-1694>

Kagirova Z.R. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9002-7909>

Popov A.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0889-6986>

Литература

- de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & development* 2005; 19 (18): 2100–10.
- Callen E., Surrallés J. Telomere dysfunction in genome instability syndromes. *Mutation research* 2004; 567 (1): 85–104.
- Jang J.S., Choi Y.Y., Lee W.K., Choi J.E., Cha S.I., Kim Y.J., et al. Telomere length and the risk of lung cancer. *Cancer science* 2008; 99 (7): 1385–9.
- Plentz R.R., Wiemann S.U., Flemming P., Meier P.N., Kubicka S., Kreipe H., et al. Telomere shortening of epithelial cells characterises the adenoma-carcinoma transition of human colorectal cancer. *Gut* 2003; 52 (9): 1304–7.
- Sieglova Z., Zilovcova S., Cermak J., Rihova H., Brezinova D., Dvorakova R., et al. Dynamics of telomere erosion and its association with genome instability in myelodysplastic syndromes (MDS)

- and acute myelogenous leukemia arising from MDS: a marker of disease prognosis? *Leukemia research* 2004; 28 (10): 1013–21.
6. Epel E.S., Blackburn E.H., Lin J., Dhabhar F.S., Adler N.E., Morrow J.D., Cawthon R.M. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *PNAS* 2004; 101 (49):17312–5.
 7. Morla M., Busquets X., Pons J., Sauleda J., MacNee W., Agusti A.G. Telomere shortening in smokers with and without COPD. *Eur Respir J* 2006; 27 (3): 525–8.
 8. Paul L., Cattaneo M., D'Angelo A., Sampietro F., Fermo I., Razzari C., et al. Telomere length in peripheral blood mononuclear cells is associated with folate status in men. *J Nutrit* 2009; 139 (7): 1273–8.
 9. Zannolli R., Mohn A., Buoni S., Pietrobelli A., Messina M., Chiarelli F., Miracco C. Telomere length and obesity. *Acta Paediatr* 2008; 97 (7): 952–4.
 10. Stefa A., Lamprokostopoulou A., Briana D.D., Kontogeorgou A., Papageorgiou I., Malamitsi-Puchner A., et al. The effect of intrauterine growth on leukocyte telomere length at birth. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2018. DOI: 10.1080/14767058.2018.1479392
 11. Bakaysa S.L., Mucci L.A., Slagboom P.E., Boomsma D.I., McClearn G.E., Johansson B., Pedersen N.L. Telomere length predicts survival independent of genetic influences. *Aging cell* 2007; 6 (6): 769–74.
 12. Baerlocher G.M., Vulto I., de Jong G., Lansdorp P.M. Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH). *Nat Protoc* 2006; 1 (5): 2365–76.
 13. Hultdin M., Gronlund E., Norrback K., Eriksson-Lindström E., Just T., Roos G. Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Nucleic Acids Res* 1998; 26 (16): 3651–6.
 14. O'Callaghan N.J., O'Callaghan M.F. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biol Proced Online* 2011; 13: 3. DOI: 10.1186/1480-9222-13-3
 15. Mitchell J.R., Wood E., Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 1999; 402 (6761): 551–5.
 16. Alter B.P., Giri N., Savage S.A., Rosenberg P.S. Telomere length in inherited bone marrow failure syndromes. *Haematologica* 2015; 100 (1): 49–54.
 17. Britt-Compton B., Rowson J., Locke M., Mackenzie I., Kipling D., Baird D.M. Structural stability and chromosome-specific telomere length is governed by cis-acting determinants in humans. *Hum Mol Genet* 2006; 15 (5): 725–33.
 18. Baird D.M., Rowson J., Wynford-Thomson D., Kipling D. Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nat Genet* 2003; 33 (2): 203–7.
 19. Njajou O.T., Hsueh W.C., Blackburn E.H., Newman A.B., Wu S.H., Li R., et al. Association between telomere length, specific causes of death, and years of healthy life in health, aging, and body composition, a population-based cohort study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009; 64 (8): 860–4.
 20. Poon S.S., Lansdorp P.M. Measurements of telomere length on individual chromosomes by image cytometry. *Methods Cell Biol* 2001; 64 (part B): 69–96.
 21. Canela A., Vera E., Klatt P., Blasco M.A. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *PNAS* 2007; 104 (13): 5300–5.
 22. Gutierrez-Rodriguez F., Santana-Lemos B.A., Scheucher P.S., Alves-Paiva R.M., Calado R.T. Direct comparison of Flow-FISH and qPCR as diagnostic tests for telomere length measurement in humans. *PLOS ONE* 2014; 9 (11): e113747. DOI: 10.1371/journal.pone.0113747