

ДЛИНА ТЕЛОМЕР КАК МАРКЕР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОЛГОЛЕТИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

И. П. ШЕЙКО

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству»,
г. Жодино, Республика Беларусь, 222163

Д. Д. ЖЕРНОСЕКОВ, Г. Г. ПИРХАНОВ

Витебский государственный университет имени П.М. Машерова,
г. Витебск, Республика Беларусь, 210038

(Поступила в редакцию 12.06.2023)

Здоровье и выживаемость в настоящее время являются ключевыми целевыми характеристиками селекционного разведения сельскохозяйственных животных. В молочном скотоводстве значительная часть дойных коров выбывает из стада до достижения ими полного продуктивного потенциала из-за плохого состояния здоровья или проблем с фертильностью, что приводит к серьезным экономическим потерям из-за высоких затрат на выращивание телок. Эти затраты не покрываются ожидаемой прибылью от производства молока от взрослой коровы. В связи с этим актуален поиск маркера, с помощью которого будет определяться продуктивное долголетие и здоровье животных. Таким маркером, по мнению ряда ученых, может быть длина теломер. Длина теломер, измеряемая в лейкоцитах, является хорошим биомаркером-кандидатом, поскольку TL связан со здоровьем, старением и стрессом у людей и других видов. Исследованиях с теломерами использовался широкий спектр методов экстракции ДНК, а недавние количественные исследования, основанные на ПЦР (кПЦР), показывают, что выбор метода экстракции ДНК может влиять на средние относительные измерения длины теломер. Такие эффекты метода экстракции могут ограничивать использование собранных образцов ДНК многолетних давности, извлеченных различными методами. Однако, если эффекты метода экстракции являются систематическими, калибратор конкретного метода экстракции может быть в состоянии скорректировать их, поскольку систематические эффекты будут влиять на образец калибратора так же, как и на все другие образцы. Так же при измерении длины теломер может повлиять много факторы как условия хранения образцов так же этапы ПЦР. В статье анализируются современные литературные данные по изучению длины теломер у крупного рогатого скота и дается краткое описание использованных методов.

Ключевые слова: теломеры, продуктивное долголетие КРС, ПЦР.

Health and survival are currently key targets for selective breeding of farm animals. In dairy farming, a significant proportion of dairy cows are retired from the herd before reaching their full productive potential due to poor health or fertility problems, resulting in serious economic losses due to the high costs of raising heifers. These costs are not covered by the expected profit from producing milk from an adult cow. In this regard, the search for a marker that will be used to determine the productive longevity and health of animals is relevant. Such a marker, according to some scientists, may be telomere length. Telomere length, measured in white blood cells, is a good candidate biomarker because TL is associated with health, aging, and stress in humans and other species. Telomere studies have used a wide range of DNA extraction methods, and recent quantitative PCR (qPCR)-based studies suggest that the choice of DNA extraction method can influence average relative telomere length measurements. Such extraction method effects may limit the use of collected decades-old DNA samples extracted by different methods. However, if the effects of an extraction method are systematic, the calibrator of a particular extraction method may be able to correct for them, since systematic effects will affect the calibrator's sample in the same way as all other samples. Also, when measuring telomere length, many factors can influence such as sample storage conditions and PCR stages. The article analyzes modern literature data on the study of telomere length in cattle and provides a brief description of the methods used.

Key words: telomeres, productive longevity of cattle, PCR.

Введение

В настоящее время актуальной задачей сельскохозяйственных предприятий в странах с развитым молочным скотоводством, является увеличение продуктивного долголетия коров. Увеличение продуктивной жизни молочных коров позволит уменьшить выбраковку, улучшить отбор, увеличить прибыль молочных предприятий, удовлетворить потребительский спрос и повысить уровень содержания животных [1, 2, 3].

Известно, что сельскохозяйственные животные редко достигают своего биологического предела продолжительности жизни, и поэтому показатель длины их теломер изначально не вызывал большого исследовательского интереса. Однако, по мере того как стали накапливаться результаты исследований, связанных с изучением теломер у людей, и были получены данные о сложной связи теломер со здоровьем, старением и стрессом, этот показатель выходит на первый план в качестве потенциально-го биомаркера долголетия у сельскохозяйственных животных [4, 5]. Но выводы, полученные на основе данных по исследованию длины теломер у людей, следует использовать с осторожностью, когда речь идет о животных. Ввиду ранней выбраковки у коров отсутствуют возрастные заболевания, такие

как рак, атеросклероз, аутоиммунные заболевания, ожирение, хроническая обструктивная болезнь легких, сахарный диабет, гематологические расстройства и нейродегенеративные заболевания), что зачастую является причиной повышенной скорости укорочения теломер у пожилых людей. Кроме того, нужно учитывать особенности породы молочного скота, методов для отбора биологического материала и ряд стрессовых факторов, которые влияют на длину теломер [7].

Основная часть

Структурные особенности теломер. Анализ методов выделения ДНК и измерения относительной длины теломер. Теломеры — это специализированные нуклеопротеиновые структуры, которые локализованы на концах хромосом. Теломеры состоят из повторяющихся нуклеотидных последовательностей и набора специальных белков, которые взаимодействуют с ДНК с образованием нуклеопротеинового комплекса [8]. У большинства эукариот необходимая длина теломер поддерживается теломеразой, которая восполняет потерянные при репликации повторы на 3'-конце ДНК. Комплементарную цепь при этом достраивает ДНК-полимераза [9].

Теломераза – рибонуклеопротеиновый комплекс, состоящий из фермента теломеразной обратной транскриптазы (TERT) и теломеразного РНК-компонента (TERC), который содержит матричную последовательность для удлинения теломеры – 3'-AAUCCC-5'. Теломераза неактивна в большинстве соматических клеток млекопитающих. Хотя РНК-компонент транскрибируется на постоянном уровне почти во всех клетках, в соматических не синтезируется белковая часть – обратная транскриптаза. При искусственной активации экспрессии ее генов культура соматических клеток избегает репликативного старения, то есть клетки приобретают способность делиться неограниченно долго. Теломераза собирается и работает в стволовых, половых и некоторых других типах клеток, которым нужно делиться постоянно (например, клетках эпителия кишечника) [11]. Считается, что активация этого фермента связана с развитием рака: теломераза активна в 85 % раковых опухолей, в остальных 15 % действуют альтернативные механизмы поддержания длины теломер, основанные на рекомбинации [12, 13]. Для защиты теломер от повреждения имеется специальный комплекс из шести белков, который получил название шелтерин, или телосома. Этот комплекс регулирует активность теломеразы. Связываясь с повторами TTAGGG на теломерной ДНК, шелтерин способствует образованию на ее конце t-петли – своеобразного «колпачка», прячущего свободный конец хромосомы от репарационных ферментов. Отсутствие или критический недостаток шелтерина в клетке «распечатывает» теломеры, и они становятся доступными нуклеазам и прочим ферментам, подвергаются деструкции и сливаются с концами других хромосом, что в итоге приводит к клеточной сенесценции или апоптозу. Длина теломеры не является стабильной, она может изменяться в течение времени под воздействием определенных факторов. Укорочение теломер может быть результатом потери их защиты и стабильности. Это может быть вызвано накоплением нерепарированных повреждений ДНК во время клеточного цикла за счет дестабилизации теломерных белковых комплексов таких как компоненты шелтеринового комплекса, т.е. теломерный повтор фактор связывания 1 и 2 теломерных повторов (TRF1 и TRF2) telomeric repeat binding factor 1 and 2 (TRF1 and TRF2) [14].

Влияние методов выделения ДНК на длину теломер было показано в работах [15, 16]. Авторы работы [15] сравнили использование двух разных типа колонок с кремнеземом для выделения ДНК с методом высаливания [17]. Полученные результаты лишь частично сопоставимы с результатами *Cunningham et al.* [17], которые использовали коммерческие наборы для высаливания, обеспечивающие высокое качество ДНК. В другой работе [18] сравнивали использование наборов для выделения ДНК на основе кремнеземных мембран с методом высаливания. Было обнаружено, что методы экстракции ДНК на основе кремнеземных мембран дают более короткие значения длины теломер, чем при использовании немембранного метода. Кроме того, было обнаружено, что также условия хранения образцов ДНК вносят существенную изменчивость в результаты количественной ПЦР при определении длины теломер [19].

Анализируя методы выделения ДНК для измерения длины теломер, можно прийти к определенным выводам. Во-первых, широко используемые методы выделения ДНК дают значительные различия в измерениях длины теломер. Во-вторых, игнорирование этих различий при сравнении результатов исследований, в которых применялись разные методы выделения ДНК, или смена методов выделения ДНК в ходе одного и того же исследования может привести к неправильным выводам. Поэтому желательно использовать один метод выделения ДНК для всего исследования. В качестве альтернативы можно использовать калибратор, специфичный для метода выделения ДНК, если планируется несколько методов выделения.

Ниже рассмотрены преимущества и недостатки основных методов, разработанных для измерения длины теломер (TL) в клетках и тканях. К ним относятся qPCR (количественная полимеразная цепная реакция), анализ TRF (терминальный рестрикционный фрагмент), различные методы Q-FISH (количественная флуоресцентная гибридизация *in situ*), Flow-FISH (проточная флуоресцентная гибридизация *in situ*), STELA (S анализ длины теломеры) и TeSLA (анализ самой короткой длины теломер) [20]. Основные методы измерения длины теломер представлены в табл. 1.

Первоначальное определение панели теломер позвоночных было выполнено путем секвенирования ДНК. Основываясь на знаниях о высокой консервативности последовательности теломер (TTAGGG) *n*, был разработан анализ TRF с использованием зонда, меченного (TTAGGG) *n*, и в настоящее время он является широко используемым методом измерения теломер [21].

Анализ TRF считается «золотым стандартом» для измерения длины теломер, он позволяет измерить интенсивность мазков теломер, чтобы определять среднее значение TL. В то время как диапазон размеров теломер можно увидеть с помощью Саузерн-блоттинга, самые короткие теломеры визуализировать невозможно [22].

Метод Q-FISH использует микроскоп для определения интенсивности флуоресценции теломер после гибридизации с зондом флуоресцентной пептидной нуклеиновой кислоты (PNA) и теломерного повтора (CCCTAA)³ [23].

Коммерческая модификация Q-FISH, называемая высокопроизводительной Q-FISH (HT Q-FISH) [20], позволяет проводить крупномасштабные исследования фиксированных лимфоцитов.

В отличие от Q-FISH, другие методы как qPCR и Саузерн-блоттинг требуют выделения ДНК. [17].

Некоторые методы исследований нацелены на самые короткие теломеры, такие как анализ длины одиночных теломер (STELA) и анализ наименьшей длины теломер (TeSLA) [24, 25].

Самым большим преимуществом STELA является возможность генерировать высокоточные измерения длины теломер с ограничением исходного материала. Действительно, ДНК в диапазоне пикограмм или всего 50 клеток достаточно для обеспечения надежных измерений длины, и в этом отношении STELA хорошо подходит для анализа редких типов клеток [26].

Однако, каждый из перечисленных методов имеет свои недостатки. Особенности анализа TRF и метода Q-FISH ограничивают использование этих методов в популяционных исследованиях. Например, для Саузерн-блоттинга требуется большое количество геномной ДНК, поэтому он не подходит для исследований с ограниченным количеством образцов. Метод Q-FISH требует свежей крови и не применим для твердых тканей или архивных образцов. Кроме того, анализ TRF и Flow-FISH являются трудоемкими и дорогостоящими.

Наиболее заметным недостатком метода TRF является требование значительного количества ДНК. Другим недостатком является относительная нечувствительность метода TRF к очень коротким теломерам. Поскольку самые короткие теломеры, вероятно, являются наиболее важными в запуске старения, нечувствительность к обнаружению коротких концов снижает универсальность метода TRF [27].

Известно, что метод qPCR относительно недорог и может быть выполнен с использованием небольшого количества ДНК, полученного из большинства архивных образцов. Этот метод остается наиболее подходящим для крупных популяционных исследований, для которых обычно требуются сотни или тысячи образцов. Однако при использовании qPCR необходим тщательный методологический анализ каждого шага этого процесса [28, 29, 30]. Недостатком qPCR является то, что он вносит большую ошибку измерения и, таким образом, снижает статистическую мощность анализа [28].

Кроме того, при использовании этого метода существует много факторов, приводящих к ошибкам. Необходим правильный выбор праймеров, выбор мастер-микса, устранение ошибки пипетирования, правильное положение планшета. В работе [31] было показано, что наблюдались систематические изменения в измерениях qPCR TL в зависимости от положения лунки термоциклера.

Принимая во внимание все вышеперечисленные моменты, можно сделать вывод что метод qPCR является наиболее подходящим методом для измерения длины теломер.

Особенности породы. Большинство работ по изучению длины теломер было проведено для коров голштино-фризской породы [36, 37]. Однако стоит обратить внимание на коров агеролезской породы, которая является наиболее типичной для итальянского региона. Важным является тот факт, что возраст выбраковки агеролезских коров попадает в диапазон от 8 до 13 лет, в то время как выбраковка голштино-фризской породы начинается с 6 лет. Ранее [38] изучали длину теломер в лейкоцитах в 50 образцах японского черного крупного рогатого скота (возрастной диапазон 0–18 лет) и показали снижение длины теломер с возрастом. Результаты авторов работы [39] выявили более высокие значения

длины теломер у долгоживущей автохтонной породы крупного рогатого скота (агеролезская). Так как была показана наследуемость длины теломер TL [40] и отмечено, что более длинные теломеры у породы крупного рогатого скота связаны с более продолжительным периодом продуктивной жизни, включение этого параметра в планы селекции может представлять значительный интерес. [40].

Таблица 1. Основные методы измерения длины теломер

Метод	qPCR	TRF	Q-Fish	Flow-Fish	STELA	TeSLA
Требуемое количество клеток/ДНК	Низкий (> 50нг ДНК)	Высокая (05–10 мкл ДНК)	Любое количество жизнеспособных клеток	05–2×106 жизнеспособных клеток	Очень низкий (<2нг ДНК)	Очень низкий (20 нг ДНК для каждой реакции)
Трудоемкость	Низкий	Высокий	Очень высокий	Очень высокий	Очень высокий	Очень высокий
Время обработки на образец	Низкий	Высокий	Высокий	Низкий	Очень высокий	Высокий
Единица измерения	Амплификация теломер относительно контрольного гена	Средний TL по всем яечкам	Средняя TL яечки	Средняя TL в определенных типах клеток	Одиночная хромосома TL	Одиночная хромосома TL
Включает интерстициальную последовательность теломер	Да	Да	Нет	Нет	Нет	Нет
Оценка длины теломер	Амплификация соотношения теломер и стандартных одиночных копий гена	Средняя длина для общей клеточной популяции	Средняя длина яечки	Удельная средняя длина клетки	Конкретная длина одного конца хромосомы	Конкретная длина одного конца хромосомы
Литература	[22]	[32]	[33]	[26]	[34]	[35]

Влияние оксидативного, теплового и метаболического стресса на длину теломер. Оксидативный стресс как правило связан с продукцией активных форм кислорода (АФК). Считают, что теломеры, богатые гуанином, особенно восприимчивы к окислительному стрессу [41]. В результате неферментативного свободнорадикального окисления 2-дезоксигуанозина образуется 8-оксо-2-дезоксигуанозин. Эту молекулу рассматривают как премутагенное повреждение, которое приводит к появлению трансверсий GC-TA, что впоследствии выражается в неадекватной репликации теломерной ДНК, ускорении укорачивания теломер. Если механизм репарации ДНК нарушен, то это может привести к старению или клеточному апоптозу [42].

В этой связи нужно отметить, что теломеры имеют сниженную реакцию на повреждение ДНК, что приводит к неэффективному восстановлению ДНК при воздействии окислительного повреждения [43]. Развитие оксидативного стресса у молочных коров это довольно распространенное явление. Так, например, это состояние отмечается при таком заболевании. Такое состояние, возникает в основном у высокопродуктивных молочных коров после родов. LDA вызывает экономические потери, связанные с прямыми и косвенными затратами. Возникает LDA преимущественно в течение первого месяца лактации, и более чем в 50% случаев диагностируется на первой и второй неделе после родов. В послеродовой период коровы испытывают метаболический стресс, поэтому животные переходят в состояние отрицательного энергетического баланса. Повышенная мобилизация липидов, которая наблюдается при таком состоянии может увеличить образование активных форм кислорода. [44].

Заключение

Проанализированные данные позволяют прийти к следующему заключению:

1. С целью избежания стресса при отборе биологического материала для анализа длины теломер лучше использовать молоко, однако остальные методы не исключаются.
2. Желательно использовать один метод выделения ДНК на протяжении всего исследования.
3. Метод qPCR является наиболее подходящим для измерения длины теломер у крупного рогатого скота.
4. Все виды стрессового воздействия (оксидативный, тепловой и метаболический) оказывают негативное влияние на длину теломер.

5. При отборе животных с целью увеличения продуктивного долголетия следует обратить внимание на использование животных местных пород, которые имеют более поздние сроки выбраковки, лучше адаптированы к природным условиям данной местности и, соответственно, будут менее подвержены действию стрессовых факторов окружающей среды.

6. Возраст самок играет значительную роль для продуктивного долголетия потомства. Отбор телок, рожденных зимой, от молодых самок может способствовать увеличению продолжительности жизни молочного скота.

ЛИТЕРАТУРА

1. Albert, D. V. (2020). Symposium review: why revisit dairy cattle productive lifespan. *J. Dairy Sci.* 103, 3838–3845. doi: 10.3168/jds.2019-17361.

2. Grandl, F., Furger, M., Kreuzer, M., and Zehetmeier, M. (2019). Impact of longevity on greenhouse gas emissions and profitability of individual dairy cows analysed with different system boundaries. *Animal* 13, 198–208. doi: 10.1017/S175173111800112X.

3. Шейко, Р. И. Использование методов ДНК-технологий при повышении продуктивных качеств сельскохозяйственных животных / Р. И. Шейко, И. П. Шейко // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2013. – Т. 57, № 6. – С. 118–123.

4. Пирханов, Г. Г. Молекулярно-генетические маркеры как инструмент отбора животных, характеризующихся более высоким генетическим потенциалом по признакам молочной продуктивности и фертильности / Г. Г. Пирханов, Д. Д. Жерносеков // IX белорусско-китайский молодежный инновационный форум «новые горизонты – 2022».

5. Laubenthal L, Hoelker M, Frahm J, Dänicke S, Gerlach K, Südekum K-H, et al. Short communication: Telomere lengths in different tissues of dairy cows during early and late lactation. *J Dairy Sci.* American Dairy Science Association; 2016; 1–5. doi: 10.3168/jds.2015-10095.

6. Hu H, Mu T, Ma Y, Wang X, Ma Y. Analysis of Longevity Traits in Holstein Cattle: A Review. *Front Genet.* 2021 Aug 3;12:695543. doi: 10.3389/fgene.2021.695543. PMID: 34413878; PMCID: PMC8369829.

7. Celtikci B, Erkmekci GK, Dikmen ZG. Regulation and Effect of Telomerase and Telomeric Length in Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2021;16(7):809-823. doi: 10.2174/1574888X15666200422104423. PMID: 32321410.

8. De Lange T, Lundblad V and Blackburn EH (eds): *Telomeres*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, pp21-48, 2006.

9. Zvereva MI, Shcherbakova DM, Dontsova OA. Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry (Mosc).* 2010 Dec;75(13):1563-83. doi: 10.1134/s0006297910130055. PMID: 21417995.

10. Zvereva MI, Shcherbakova DM, Dontsova OA. Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry (Mosc).* 2010 Dec;75(13):1563-83. doi: 10.1134/s0006297910130055. PMID: 21417995.

11. Giardini MA, Segatto M, da Silva MS, Nunes VS, Cano MI. Telomere and telomerase biology. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014; 125:1-40. doi: 10.1016/B978-0-12-397898-1.00001-3. PMID: 24993696.

12. Bollmann F. M. (2007). Targeting ALT: the role of alternative lengthening of telomeres in pathogenesis and prevention of cancer. *Cancer Treat. Rev.* 33, 704–709.

13. Lee J, Pellegrini MV. *Biochemistry, Telomere And Telomerase*. 2022 Dec 11. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 35015454.

14. Razgonova MP, Zakharenko AM, Golokhvast KS, Thanasoula M, Sarandi E, Nikolouzakis K, Fragkiadaki P, Tsoukalas D, Spandidos DA, Tsatsakis A. Telomerase and telomeres in aging theory and chronographic aging theory (Review). *Mol Med Rep.* 2020 Sep;22(3):1679-1694. doi: 10.3892/mmr.2020.11274. Epub 2020 Jun 25. PMID: 32705188; PMCID: PMC7411297.

15. Denham J, Marques FZ, Charchar FJ. Leukocyte telomere length variation due to DNA extraction method. *BMC Res Notes.* 2014 Dec 4;7:877. doi: 10.1186/1756-0500-7-877. PMID: 25475541; PMCID: PMC4289347.

16. Raschenberger J, Lamina C, Haun M, Kollerits B, Coassin S, Boes E, Kedenko L, Köttgen A, Kronenberg F. Influence of DNA extraction methods on relative telomere length measurements and its impact on epidemiological studies. *Sci Rep.* 2016 May 3;6:25398. doi: 10.1038/srep25398. PMID: 27138987; PMCID: PMC4853716.

17. Cunningham JM, Johnson RA, Litzelman K, Skinner HG, Seo S, Engelman CD, Vanderboom RJ, Kimmel GW, Gangnon RE, Riegert-Johnson DL, Baron JA, Potter JD, Haile R, Buchanan DD, Jenkins MA, Rider DN, Thibodeau SN, Petersen GM, Boardman LA. Telomere length varies by DNA extraction method: implications for epidemiologic research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013 Nov;22(11):2047-54. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0409. Epub 2013 Sep 9. PMID: 24019396; PMCID: PMC3827976.

18. Seeker LA, Holland R, Underwood S, Fairlie J, Psifidi A, Ilsa JJ, Bagnall A, Whitelaw B, Coffey M, Banos G, Nussey DH. Method Specific Calibration Corrects for DNA Extraction Method Effects on Relative Telomere Length Measurements by Quantitative PCR. *PLoS One.* 2016 Oct 10;11(10):e0164046. doi: 10.1371/journal.pone.0164046. PMID: 27723841; PMCID: PMC5056729.

19. Dagnall CL, Hicks B, Teshome K, Hutchinson AA, Gadalla SM, Khincha PP, Yeager M, Savage SA. Effect of pre-analytic variables on the reproducibility of qPCR relative telomere length measurement. *PLoS One.* 2017 Sep 8;12(9):e0184098. doi: 10.1371/journal.pone.0184098. PMID: 28886139; PMCID: PMC5590866.

20. Lai TP, Wright WE, Shay JW. Comparison of telomere length measurement methods. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2018 Mar 5;373(1741):20160451. doi: 10.1098/rstb.2016.0451. PMID: 29335378; PMCID: PMC5784071.

21. Mender I, Shay JW. Telomere Restriction Fragment (TRF) Analysis. *Bio Protoc.* 2015 Nov 20;5(22):e1658. doi: 10.21769/bioprotoc.1658. PMID: 27500189; PMCID: PMC4972328.

22. Kimura M, Stone RC, Hunt SC, Skurnick J, Lu X, Cao X, Harley CB, Aviv A. Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths. *Nat Protoc.* 2010 Sep;5(9):1596-607. doi: 10.1038/nprot.2010.124. Epub 2010 Sep 2. PMID: 21085125.

23. Canela A, Vera E, Klatt P, Blasco MA. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 27;104(13):5300-5. doi: 10.1073/pnas.0609367104. Epub 2007 Mar 16. PMID: 17369361; PMCID: PMC1828130.

24. Serakinci N, Cagsin H, Mavis M. Use of U-STELA for Accurate Measurement of Extremely Short Telomeres. *Methods Mol Biol.* 2019;2045:217-224. doi: 10.1007/7651_2018_120. PMID: 29542055.
25. Pearce EE, Horvath S, Katta S, Dagnall C, Aubert G, Hicks BD, Spellman SR, Katki H, Savage SA, Alsaggaf R, Gadalla SM. DNA-methylation-based telomere length estimator: comparisons with measurements from flow FISH and qPCR. *Aging (Albany NY).* 2021 Jun 3;13(11):14675-14686. doi: 10.18632/aging.203126. Epub 2021 Jun 3. PMID: 34083495; PMCID: PMC8221337.
26. Aubert G, Hills M, Lansdorp PM. Telomere length measurement-caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutat Res.* 2012 Feb 1;730(1-2):59-67. doi: 10.1016/j.mrfm.2011.04.003. Epub 2011 Jun 12. PMID: 21663926; PMCID.
27. Nussey DH, Baird D, Barrett E, Boner W, Fairlie J, Gemmell N, Hartmann N, Horn T, Haussmann M, Olsson M, Turbill C, Verhulst S, Zahn S, Monaghan P. Measuring telomere length and telomere dynamics in evolutionary biology and ecology. *Methods Ecol Evol.* 2014 Apr;5(4):299-310. doi: 10.1111/2041-210X.12161. Epub 2014 Mar 2. PMID: 25834722; PMCID: PMC4375921.
28. Lin J, Smith DL, Esteves K, Drury S. Telomere length measurement by qPCR - Summary of critical factors and recommendations for assay design. *Psychoneuroendocrinology.* 2019 Jan;99:271-278. doi: 10.1016/j.psyneuen.2018.10.005. Epub 2018 Oct 10. PMID: 30343983; PMCID: PMC6363640.
29. Dahlgren PN, Bishop K, Dey S, Herbert BS, Tanaka H. Development of a New Monochrome Multiplex qPCR Method for Relative Telomere Length Measurement in Cancer. *Neoplasia.* 2018 May;20(5):425-431. doi: 10.1016/j.neo.2018.02.007. Epub 2018 Mar 21. PMID: 29573637; PMCID: PMC5915991.
30. Sun G, Cao H, Bai Y, Wang J, Zhou Y, Li K, Xiao JH. A novel multiplex qPCR method for assessing the comparative lengths of telomeres. *J Clin Lab Anal.* 2021 Sep;35(9):e23929. doi: 10.1002/jcla.23929. Epub 2021 Aug 4. PMID: 34347924; PMCID: PMC8418462.
31. Eisenberg DT, Kuzawa CW, Hayes MG. Improving qPCR telomere length assays: Controlling for well position effects increases statistical power. *Am J Hum Biol.* 2015 Jul-Aug;27(4):570-5. doi: 10.1002/ajhb.22690. Epub 2015 Mar 10. PMID: 25757675; PMCID: PMC4478151.
32. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002 May 15;30(10):e47. doi: 10.1093/nar/30.10.e47. PMID: 12000852; PMCID: PMC115301.
33. Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, Raap AK, Tanke HJ. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet.* 1996 May;5(5):685-91. doi: 10.1093/hmg/5.5.685. PMID: 8733138.
34. Baird DM, Rowson J, Wynford-Thomas D, Kipling D. Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nat Genet.* 2003 Feb;33(2):203-7. doi: 10.1038/ng1084. Epub 2003 Jan 21. PMID: 12539050.
35. Lai TP, Zhang N, Noh J, Mender I, Tedone E, Huang E, Wright WE, Danuser G, Shay JW. A method for measuring the distribution of the shortest telomeres in cells and tissues. *Nat Commun.* 2017 Nov 7;8(1):1356. doi: 10.1038/s41467-017-01291-z. PMID: 29116081; PMCID: PMC5676791.
36. Ilska-Warner, J.J., Psifidi, A., Seeker, L.A., Wilbourn, R.V., Underwood, S.L., Fairlie, J. et al. (2019) The genetic architecture of bovine telomere length in early life and association with animal fitness. *Frontiers in Genetics*, 10, 1048.
37. Seeker LA, Ilska JJ, Psifidi A, Wilbourn RV, Underwood SL, Fairlie J, Holland R, Froy H, Bagnall A, Whitelaw B, Coffey M, Nussey DH, Banos G. Longitudinal changes in telomere length and associated genetic parameters in dairy cattle analysed using random regression models. *PLoS One.* 2018 Feb 13;13(2):e0192864. doi: 10.1371/journal.pone.0192864. PMID: 29438415; PMCID: PMC5811042.
38. Miyashita, N., Shiga, K., Yonai, M., Kaneyama, K., Kobayashi, S., Kojima, T. et al. (2002) Remarkable differences in telomere lengths among cloned cattle derived from different cell types. *Biology Reproduction*, 66, 1649-55.
39. Iannuzzi A, Albarella S, Parma P, Galdiero G, D'Anza E, Pistucci R, Peretti V, Ciotola F. Characterization of telomere length in Agerolese cattle breed, correlating blood and milk samples. *Anim Genet.* 2022 Oct;53(5):676-679. doi: 10.1111/age.13227. Epub 2022 Jul 1. PMID: 35775462; PMCID: PMC9544343.
40. Seeker, L.A., Underwood, S.L., Wilbourn, R.V., Fairlie, J., Froy, H., Holland, R., Ilska, J.J., Psifidi, A., Bagnall, A., Whitelaw, B., Coffey, M., Banos, G., Nussey, D.H. Life-long telomere attrition predicts health and lifespan in a large mammal bioRxiv 2020.06.22.165563; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.22.165563>.
41. Mori Y, Kobayashi H, Fujita Y, Yatagawa M, Kato S, Kawanishi S, Murata M, Oikawa S. Mechanism of reactive oxygen species generation and oxidative DNA damage induced by acryloylhydroxamic acid, a putative metabolite of acrylamide. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2022 Jan;873:503420.
42. Gavia-García G, Rosado-Pérez J, Arista-Ugalde TL, Aguiñiga-Sánchez I, Santiago-Osorio E, Mendoza-Núñez VM. Telomere Length and Oxidative Stress and Its Relation with Metabolic Syndrome Components in the Aging. *Biology.* 2021; 10(4):253. <https://doi.org/10.3390/biology10040253>.
43. Ahmed W, Lingner J. Impact of oxidative stress on telomere biology. *Differentiation.* 2018 Jan-Feb;99:21-27. doi: 10.1016/j.diff.2017.12.002. Epub 2017 Dec 14. PMID: 29274896.
44. Fiore F, Spissu N, Sechi S, Cocco R. Evaluation of Oxidative Stress in Dairy Cows with Left Displacement of Abomasum. *Animals (Basel).* 2019 Nov 13;9(11):966. doi: 10.3390/ani9110966. PMID: 31766198; PMCID: PMC6912308.