

УДК 618.19

Д. А. Бази́ка¹, І. М. Ільє́нко¹✉, К. М. Логановський¹, М. А. Бенотман², С. А. Чумак¹¹Державна установа “Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України”, вул. Мельникова 53, м. Київ, 04050, Україна²Відділ радіобіології Інституту навколишнього середовища, здоров'я та безпеки, Бельгійський центр ядерних досліджень (SCK-CEN), Бельгія

НЕГАТИВНА РЕГУЛЯЦІЯ ДОВЖИНИ ТЕЛОМЕР ГЕНАМИ *TERF1* ТА *TERF2* ПРИ КОГНІТИВНОМУ ДЕФІЦИТІ У ВІДДАЛЕНОМУ ПЕРІОДІ ПІСЛЯ ОПРОМІНЕННЯ У МАЛИХ ДОЗАХ

Мета: вивчити роль впливу іонізуючого випромінювання у діапазоні малих доз на генну регуляцію довжини теломер та патогенез цереброваскулярного когнітивного дефіциту у віддаленому періоді після аварії на Чорнобильській АЕС.

Матеріали і методи. Проведене дослідження експресії генів *TERF1*, *TERF2* та *TERT* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі та відносної довжини теломер за допомогою методу флюоресцентної гібридизації *in situ* та проточної цитометрії. Обстежено 258 учасників ліквідації наслідків аварії на Чорнобильській АЕС, розподілених на групи в залежності від дози опромінення (діапазон 22–2800 мЗв) та 78 неопромінених осіб групи порівняння з судинним когнітивним дефіцитом. Кількісні дані про тяжкість когнітивного дефіциту визначали за даними психометричних інтерв'ю.

Результати. Було встановлене статистично достовірне скорочення довжини теломер у групах ліквідаторів опромінених у діапазонах доз 100–250 та 250–500 мЗв ($M \pm SD$: 15,8 5 \pm 0,27; $p < 0,02$; 15,89 \pm 0,33; $p < 0,02$; контроль: 17,21 \pm 0,23). Показано, що відносна довжина теломер (RTL) зменшувалась із зростанням дози опромінення та гіперекспресією негативних регуляторів довжини теломер: гену *TERF2* і, в меншій мірі *TERF1*; протилежна тенденція була продемонстрована для експресії гену *TERT*. У групі опромінених в дозі більш ніж 500 мЗв достовірна гіперекспресія гену *TERT* поєднувалась із зниженням експресії генів *TERF1* і *TERF2* та відсутністю істотних змін RTL у порівнянні із групою учасників ліквідації наслідків аварії, які зазнали впливу низьких доз, що вказують на певну незалежність між експресією генів і зміною довжини теломер і наявністю можливих порогових ефектів у цьому діапазоні доз. Аналіз даних групи опромінених осіб порівняно із неопроміненими особами продемонстрував значне зниження ($p = 0,03$) середніх показників MMSE і RTL, що імовірно пов'язано з попереднім опроміненням.

Висновки. Дослідження продемонструвало паралельні зміни у зниженні когнітивних функцій і довжини теломер та відмінності у *TERF2*, *TERT* та *TERF1* генній регуляції у віддаленому періоді після опромінення у діапазоні малих доз та при радіаційному опроміненні понад 500 мЗв.

Ключові слова: теломери, радіація, когнітивні функції, експресія генів, *TERF1*, *TERF2*, *TERT*, Чорнобиль.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2014. Вип. 19. С. 170–185.

✉ Ільєнко Ірина Миколаївна, e-mail: ilyenko@ukr.net

D. A. Bazyka¹, I. M. Piyenko¹✉, K. N. Loganovsky¹, M. A. Benotmane², S. A. Chumak¹

¹State Institution “National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Melnykov str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine

²Radiobiology Unit, Institute for Environment, Health and Safety, Belgian Nuclear Research Centre, SCK-CEN, Belgium

***TERF1* and *TERF2* downregulate telomere length in cognitive deficit at the late period after low-dose exposure**

Purpose – to explore the role of radiation dose on gene regulation of telomere length and its influence on the pathogenesis of cerebrovascular neurocognitive deficit at the remote period of low-dose irradiation as a result of the Chernobyl accident.

Materials and methods. We performed a study of *TERF1*, *TERF2* and *TERT* genes expression (GE) by RT-PCR, and relative telomere length (RTL) by flow-FISH in 258 clean-up workers of Chernobyl accident divided by radiation dose groups (range 22–2800 mSv) and 78 controls with vascular cognitive deficit. Detailed psychometric interviews were performed to obtain quantitative data on the stage of cognitive deficit.

Results. Statistically significant telomere shortening was demonstrated in groups of clean-up workers with radiation doses in 100–250 mSv and 250–500 mSv range (subsequently $M \pm SD$: 15.85 ± 0.27 ; $p < 0.02$; 15.89 ± 0.33 ; $p < 0.02$; control: 17.21 ± 0.23). A decrease in RTL was in parallel to radiation dose increase and overexpression of negative telomere length regulators: *TERF2* genes and, to a lesser extent *TERF1*; the opposite tendency was demonstrated for *TERT* GE. In exposed over 500 mSv a significant *TERT* overexpression was combined with decreased *TERF1* and *TERF2* GE, and absence of significant RTL changes in comparison with clean-up workers exposed to lower doses indicating a certain independency between gene expression and telomere length changes and possible threshold effects at this dose range. Analysis of the group of exposed in comparison with non-exposed demonstrated a significant decrease ($p = 0.03$) both of the mean MMSE and RTL parameters suggesting influence of previous exposure.

Conclusion. This study shows parallel changes in decline of cognitive function and telomere length and differences in *TERF2*, *TERT* and *TERF1* gene regulation at the late period after low dose and over 500 mSv exposure.

Key words: telomeres, low-dose radiation, cognitive deficit, gene expression, *TERF1*, *TERF2*, *TERT*, Chernobyl.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2014;19:170-185.

ВСТУП

Дія іонізуючої радіації на здоров'я людини може залежати від дози опромінення та бути модифікованою низкою чинників, таких як психологічний стрес, а радіаційні ефекти підсилюються за рахунок синергізму імунологічних, метаболічних та генетичних процесів. Важливу роль в біології виживаності клітин, старіння та клітинної загибелі відіграють теломери – спеціалізовані структури ДНК, розташовані на кінцевих ділянках хромосом. Теломерний комплекс бере участь у захисті хромосом від пошкоджень ДНК шляхом активації p53 або p16 INK4a шляхів, які в кінцевому рахунку призводять до клітинного старіння і/або апоптозу [1]. У проліферуючих клітинах теломери поступово скорочуються протягом кожного мітотичного поділу, що призводить до клітинного старіння. Таким чином, скорочення довжини теломер є не тільки маркером біологічного старіння, а й механізмом з важливими функціональними наслідками. На моделі фібробластів людини показано значення модуляції довжи-

INTRODUCTION

Health effects after radiation exposure in humans could be induced by a radiation dose and modified due to confounding factors like psychological stress. Ionizing radiation could influence to human genome via translational or other changes. Effects could be enhanced through synergism of immunological, metabolic and genetic processes. Important role in the biology of cell survival, aging and death is played by telomeres – specialized DNA structures located at the terminal ends of chromosomes. Telomere complex plays an important role in protecting the chromosome from DNA damage, such as “breaks” DNA and activate p53 or p16 INK4a pathways, which ultimately lead to cellular senescence and apoptosis [1]. In proliferating cells, telomeres are gradually reduced during each mitotic division and ultimately cell aging. Thus, reducing the length of telomeres is recognized not only as marker of biological aging, but also a mechanism with important functional consequences.

ни теломер у розвитку нестабільності геному, індукованого іонізуючим випромінюванням [2]. Поряд з цим, іншими дослідниками отримані відмінні результати, а саме, не встановлено достовірного скорочення теломер у населення штату Керала при проживанні в умовах впливу високого природного фону опромінення. Даних про зміни експресії генів, пов'язаних з функцією теломер, не наводиться [3]. Сьогодні існує незначна кількість інформації щодо змін довжини теломер у віддаленому періоді після опромінення та його впливу на формування віддалених радіаційних наслідків.

Довжина теломер та їх функція регулюються групою генів. Серед них *TERT*, *TERF1*, *TERF2*. Теломераза складається із теломеразної зворотної транскриптази (*TERT*), теломеразної РНК (*hTR* та *TERC*) та дискерину. *TERT*, зворотня транскриптаза, є ферментом, який створює РНК на матриці ДНК. Кінцева ділянка теломер, яка подовжується за допомогою теломераз, має нуклеосому організацію. Ця ділянка – телосома складається з теломерної ДНК та шести основних білків: *TERF1*, *TERF2*, *Rap1* і *TPP1*. Основною функцією *TERF1* (telomere repeat binding factor 1) є регулювання довжини теломер. Збільшення продукції протеїну, регульованого *TERF1*, призводить до поступового та прогресуючого скорочення теломер у клітинах людини, тоді як зниження продукції цього білка призводить до їх подовження. Таким чином, *TERF1* є негативним регулятором довжини теломер. Оскільки не було встановлено впливу *TERF1* на рівень активності теломераз, дослідники припустили, що він інгібує дію теломераз на кінцевих ділянках окремих теломер. Є кілька можливих механізмів такого гальмування. Один з них – зростання білка *TERF1* сприяє більш інтенсивному формуванню Т-петлі, що призводить до неможливості подовження теломер за допомогою теломераз та їх подальшого скорочення. Суть іншого механізму – це *TERF1*-регулювання доступу теломераз до теломер через взаємодію з іншими теломерними білками, такими як *TIN2*, *TPP1* і *POT1*. Відповідно до третього механізму – *TERF1* може регулювати активність теломераз за допомогою взаємодії з білком *PinX1*, який здатний зв'язувати каталітичну субодиницю теломераз і тим самим потужно інгібувати її активність.

Білок *TERF2* (telomere repeat binding factor 2) також регулює довжину теломер, але крім цього відіграє ключову роль у захисті кінців теломер шляхом формування Т-петлі. Результати досліджень по-

The role of telomere length modulation in human cells is demonstrated in delayed chromosome instability induced by ionizing radiation [2]. However, studies in human subjects have shown different results. No significant influence on telomere shortening was demonstrated in Kerala population with high natural irradiation [3]. No data was presented on the expression of genes associated with telomere function. Few information is available on the telomere length change at the late period after exposure and its influence on the formation of late radiation effects.

Telomere length and function are regulated by a set of genes. Telomerase is composed of telomerase reverse transcriptase (*TERT*), telomerase RNA (*hTR* or *TERC*) and dyskerin. *TERT*, a reverse transcriptase, is an enzyme that creates single-stranded DNA from single-stranded RNA template. The end of the telomere, which are elongated by telomerase have non-nucleosome organization. Telomere region with non-nucleosome organization is called telosoma and includes telomeric DNA and six major proteins: *TERF1*, *TERF2*, *Rap1* and *TPP1*. The main function of *TERF1* (telomere repeat binding factor 1) is regulation of telomere length. The increased *TERF1* production leads to a gradual and progressive telomere shortening in human cells, while a decrease in production leads to their elongation. Thus, *TERF1* is a negative regulator of telomere length. As its effect on the level of telomerase activity was not observed, the researchers suggested that it inhibits action of telomerase at the ends of individual telomeres. There are several possible mechanisms for such inhibition. One of them – the increase of the *TERF1* protein contributes to a more intensive T-loop formation, which leads to impossibility of telomere elongation by telomerase and their further shortening. Content of another mechanism is the regulation by *TERF1* protein access of telomerase to telomeres through interaction with other telomeres proteins such as *TIN2*, *TPP1* and *Pot1*. In accordance with a third mechanism – *TERF1* may regulate telomerase activity through interaction with a protein *PinX1*, which is capable of binding the catalytic subunit of telomerase and thus inhibit its activity powerfully.

Protein *TERF2* (telomere repeat binding factor 2) like *TERF1* regulates telomere length, but other than that, it plays a key role in protecting the ends of telomeres in the formation of T-loops. Research

казують, що зниження продукції білка TERF2 у клітинах зі зниженою експресією гена, який кодує цей білок, призводить до втрати одноланцюгових кінців теломер і можливого подальшого злиття теломерних ділянок хромосом однієї з іншою. Відсутність TERF2 призводить до швидкого запуску апоптозу з подальшою загибеллю цих клітин. Роль гену TERF2 у формуванні Т-петлі зводиться до запуску синтезу одноланцюгової теломерної ДНК у дволанцюгову. Таким чином, саме завдяки участі TERF2 у формуванні Т-петлі, визначається його ключова роль у захисті кінцевих ділянок хромосом. Білок TERF2 також є регулятором довжини теломер. Збільшення продукції TERF2, як і збільшення продукції TERF1 сприяє прогресивному скороченню довжини теломер.

Довжина теломер соматичних клітин скорочується з віком та під впливом різних ендогенних та екзогенних факторів. Довжина теломер лейкоцитів периферичної крові може змінюватись, наприклад, після променевої терапії, а радіаційний ефект, як правило, проявляється у клітинах скороченням теломер [4]. У периферичній крові учасників ліквідації наслідків аварії (УЛНА) на Чорнобильській АЕС, які зазнали впливу малих доз іонізуючого випромінювання, теломерні послідовності скорочуються [5]. Довжина теломер у лейкоцитах в цілому була прийнята в якості стандарту виміру довжини теломер і в останнє десятиліття був встановлений зв'язок із деякими віковими захворюваннями, а саме: серцево-судинні захворювання, рак та слабоумство [6]. Довгі теломери, що є свідченням відносно низької клітинної проліферації, знайдені при зменшенні об'єму гіпокампу. Довжина теломер лейкоцитів пропонується як біомаркер наявності функціональних та структурних процесів старіння мозку [7].

Довжина теломер може бути потенційним діагностичним біомаркером у диференційній діагностиці дегенеративних та судинних когнітивних порушень. Когнітивні функції з віком знижуються, і довжина теломер зменшується з віком також. Когнітивний дефіцит також супроводжує процес старіння а, отже, може корелювати з довжиною теломер. Heris et al. [8] описано зворотну кореляцію між вербальним інтелектом та довжиною теломер, при цьому не знайдено достовірного зв'язку з невербальними міркуваннями, вербальною декларативною пам'яттю та деменцією у пацієнтів, старших за 79 років.

Протилежні дані отримані в дослідженнях Valdes et al. [9], які у 382 пацієнтів-жінок, із широким віковим спектром (середній вік 50 років, діапазон від 19 до 78

results show that the decrease of TERF2 protein production in cells with reduced expression of the gene encoding this protein, leads to loss of single-stranded ends of telomere and a possible further telomere fusions with each other. The lack of TERF2 led to quick start of apoptosis with further elimination of these cells. Role of TERF2 protein in the formation of T-loop is reduced to the implementation of the single-stranded telomeric DNA into double-stranded. Through participation TERF2 in the implementation phase formation T-loops its key role is defined in the protection of telomeric ends. TERF2 protein is also the regulator of telomere length. Increased production TERF2, like increased production TERF1, also contributes to the progressive shortening of telomere length.

The telomere length of somatic cells shortens with age and with other endogenous and exogenous pathogenic factors. The telomere length distribution of peripheral leukocytes could be affected by radiation therapy, and the effect of radiation tends to appear in cells with short telomeres [4]. In peripheral blood samples from the Chernobyl clean-up workers (clean-up workers) exposed to low doses of ionizing radiation telomeres were shortened [5]. Leukocyte telomere length has generally been accepted as a measurement of systemic telomere length and has in the last decade been found to be associated with several age-related disorders and attributes; e.g., cardiovascular disease, cancer, and dementia [6]. Long telomeres representing a history of relatively low cellular proliferation, reflected in smaller hippocampal volumes. The leukocyte telomere length being used as a biomarker for tapping functional and structural processes of the aging brain [7].

Telomere length can be a potential diagnostic biomarker for differentiation between the degenerative and vascular cognitive impairment. Cognitive functions decline with age, and telomere length is reduced. Cognitive deficits also accompanies the aging process and, therefore, may correlate with telomere length. Heris et al. found an inverse correlation between the verbal test and the length of telomeres, but observed no significant relationships with the tests on non-verbal reasoning, verbal declarative memory and screening for dementia in patients older than 79 [8].

Contrast studies were Valdes et al., where 382 female patients were examined at a wide range of age (mean age 50 years, range 19 to 78 years) and

років), виявили кореляцію між довжиною теломер та когнітивним дефіцитом за даними чотирьох з шести застосованих когнітивних тестів, за винятком паттерну розпізнавання та просторової пам'яті. Ці та інші дослідження дають підстави припустити, що довжина теломер корелює зі ступенем порушень когнітивних функцій, і може бути біомаркером когнітивного старіння у хворих до початку деменції [10].

Скорочення теломерних ділянок хромосом є біомаркером віку і на цей показник впливають багато факторів ризику, зокрема серцево-судинні захворювання. Скорочення довжини теломер виявляють у більш пізньому віці, при атеросклерозі, гіпертонії, ожирінні, цукровому діабеті, курінні, низькій фізичній активності, серцевій недостатності, жорсткому поведженні в дитинстві, забрудненні повітря внаслідок дорожнього руху, хронічній інфекції, у одинаків та при деменції. Було показано, що скорочення теломер було пов'язане з когнітивними порушеннями, включаючи деменцію [11]. Тим не менше, зв'язок між скороченням теломер і когнітивною дисфункцією не можна вважати встановленим [12]. Крім того, відсутні дані щодо взаємозв'язку між довжиною теломер і цереброваскулярним нейрокогнітивним дефіцитом після впливу малих доз радіації. Є свідчення, що малі дози опромінення (100 мГр) активують гени, відмінні від тих, які активуються після дії високих доз (2 Гр), а гени реагування на низькі дози пов'язані з унікальними сигнальними шляхами та функціями. Молекулярна реакція мозку миші протягом декількох годин після опромінення в низьких дозах включає зниження активності нейронних шляхів, пов'язаних з когнітивною дисфункцією, активність яких знижується при нормальному старінні людини та хворобі Альцгеймера [13]. Іонізуюче випромінювання вважається тригером старіння і асоційоване з хворобою Альцгеймера.

Експресія генів є чутливим індикатором радіаційного впливу. Незважаючи на те, що загальна схема змін експресії генів, пов'язаних з опроміненням відсутня, слід зазначити, що ці зміни є незаперечними і дозозалежними. Таким чином, ми можемо припустити, що профіль експресії генів може бути інформативним маркером опромінення. Основна мета дослідження полягала в тому, щоб дослідити роль радіаційного опромінення на генну регуляцію довжини теломер і його вплив на патогенез цереброваскулярного нейрокогнітивного дефіциту у віддаленому періоді після опромінення у діапазоні низьких доз внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС.

found a correlation between telomere length and cognitive function in four of the six cognitive tests, except for pattern recognition and spatial memory tasks [9]. These studies and other investigation suggest that telomere length correlates with different degrees of cognitive functions, and may be biomarkers of cognitive aging in patients before the onset of dementia [10].

The length of telomeres is influenced by many of the cardiovascular risk factors and is a biomarker of age. Many of the cardiovascular risk factors influence the cellular DNA by telomere shortening. Reduced telomere length are found in higher age, atherosclerosis, hypertension, adiposities, diabetes, smoking, physical inactivity, heart failure, maltreatment in childhood, exposure to traffic pollution, chronic infection, single life and dementia. It has been demonstrated that telomere shortening has been associated with cognitive impairment including dementia [11]. However, relationships between telomere shortening and cognitive dysfunction are contradictory [12]. Moreover, there are no available data concerning relationships between telomere length and cerebrovascular neurocognitive deficit following exposure to low-dose radiation. There are indications that a low-dose exposure (100 mGy) activates genes different from those after a high-dose radiation (2 Gy) and low-dose response genes are associated with unique pathways and functions. The molecular response of the mouse brain within a few hours after low-dose irradiation involves the down-regulation of neural pathways associated with cognitive dysfunctions that are also down-regulated in normal human aging and Alzheimer's disease [13]. Ionizing radiation is considered to be a trigger for aging and associated Alzheimer's disease.

Gene expression is a sensitive indicator of radiation exposure. Despite the fact that overall scheme of gene expression changes associated with irradiation is absent, but these changes are indisputable and dose-dependent. So, we can assume that the profile of gene expression may be informative marker of exposure. The main aim of the study was to explore the role of radiation dose on gene regulation of telomere length and its influence on the pathogenesis of cerebrovascular neurocognitive deficit at the remote period of low-dose irradiation as a result of the Chernobyl accident.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дизайн дослідження та вибірка. Дослідження було розроблено як перехресне з внутрішнім і зовнішнім паралельним контролем. Вибірка (n = 258) включала українських учасників ліквідації наслідків аварії на Чорнобильській АЕС, які працювали на індустріальному майданчику та найбільш забруднених територіях навколо ЧАЕС від 26 квітня 1986 року по 31 грудня 1989 року, і для яких встановлена доза опромінення (табл. 1). Група неопромінених осіб (78) включала в себе групу з судинним легким (помірним) когнітивним дефіцитом, групу з судинною де-

MATERIALS AND METHODS

Study Design and Sample. The study was designed as a cross-sectional study with both internal and external parallel control. The sample (n = 258) included Ukrainian clean-up workers (males) who worked on the industrial site and in the most contaminated areas around the Chornobyl nuclear power plant between April 26, 1986 and December 31, 1989, and for whom the radiation dose records are available (Table 1). The non-exposed comparison group (78) included the vascular mild cognitive impairment group, the vascular dementia

Таблиця 1
Дескриптивні характеристики досліджуваних груп
Table 1
Descriptive characteristics of study groups

	Групи опромінених / Groups of exposed				Контроль Controls
	1	2	3	4	
Кількість обстежених / N of subjects	78	92	54	34	78
Дозові обмеження для включення в групу, мЗв Dose limit for inclusion, mSv	20–100	100–250	250–500	> 500	
Діапазон доз, мSv Dose range, mSv	22–98	100–250	250–490	500–2800	
Середня доза, мGy (SD)† Mean dose, mGy (SD)†	54,1 (20,1)	185,9 (45,8)	316,6 (72,6)	1258,7 (635,8)	
Вік, років / age, years					
Середній вік (SD) / mean (SD)	58,2 (6,3)	57 (7,8)	59,1 (7,7)	60,8 (7,1)	57,1 (10,9)
Віковий діапазон / range	46–75	45–76	45–80	47–76	45–82
Вік на момент першої місії в 30-кілометрову Чорнобильську зону, років (відсоток) Age at first mission to the 30-km Chornobyl zone, years (percent)					
18–34	62 (79,5 %)	69 (75 %)	35 (64,8 %)	23 (67,7 %)	
35–41	10 (12,8 %)	16 (17,4 %)	15 (27,8 %)	5 (14,7 %)	
42–49	5(6,4 %)	7(7,6 %)	3(5,6 %)	6(17,6 %)	
50–63	1(1,3 %)	–	1(1,8 %)	–	
Проживання на момент опитування / type of residence at the time of interview					
Місто / urban	53 (67,9 %)	73 (79,3 %)	45 (83,3 %)	26 (76,5 %)	41 (52,6 %)
Село / rural	7 (8,9 %)	9 (9,78 %)	1 (1,8 %)	1 (2,9 %)	16 (20,5 %)
Невідомо / unknown	18 (23,1 %)	10 (10,9 %)	8 (14,8 %)	7 (20,6 %)	21 (26,9 %)
Освіта / education					
Вища / high school	12 (15,3 %)	22 (23,9 %)	14 (25,9 %)	13 (38,2 %)	23 (29,5 %)
Середня спеціальна / trade school	21 (26,9 %)	27 (29,3 %)	12 (22,2 %)	12 (35,3 %)	20 (25,6 %)
Середня / college	18 (23,1 %)	14 (15,2 %)	6 (11,1 %)	6 (17,6 %)	19 (24,4 %)
Неповна середня / 8 classes or less	1 (1,3 %)	1 (1,1 %)	–	–	4 (5,1 %)
Невідомо / unknown	26 (33,3 %)	28 (30,4 %)	22 (40,7 %)	3 (8,8 %)	12 (15,3 %)
Когнітивні порушення / cognitive impairment					
Здорові / healthy	17 (21,8 %)	25 (27,2 %)	9 (16,7 %)	5 (14,7 %)	23 (29,5 %)
Судинний легкий когнітивний дефіцит Vascular mild cognitive impairment	52 (66,7 %)	56 (60,9 %)	40 (74,1 %)	22 (64,7 %)	34 (43,6 %)
Судинна деменція Vascular severe cognitive impairment (dementia)	9 (11,5 %)	11 (11,9 %)	5 (9,2 %)	7 (20,6 %)	21 (26,9 %)

менцією та осіб без судинного когнітивного дефіциту. Ці особи відбиралися серед неопромінених пацієнтів ННЦРМ відповідно до критеріїв, наведених нижче.

Психоневрологічний протокол, верифікація діагнозів та критерії включення/виключення в групи. Діагностика судинного когнітивного дефіциту проводилась відповідно до критеріїв Американської серцевої асоціації та Американської асоціації інсульту (AHA/ASA), Наукового констатування судинного внеску до когнітивних порушень і деменції (Scientific Statement Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia) [14], Короткої шкали оцінки психічного стану (MMSE) [15], а також критеріїв МКХ-10 та DSM-IV.

Пацієнти (чоловіки) були розподілені в різні групи відповідно до тяжкості когнітивного дефіциту та наявності опромінення. Критерії включення/виключення представлені в табл. 2.

Згода та схвалення. Письмову інформовану згоду для участі в дослідженні отримували, відповідно, від кожного учасника. Дослідження було схвалено Комітетом з медичної етики ННЦРМ. Процедури дослідження проводилися відповідно до етичних стандартів відповідального комітету по проведенню досліджень з людьми (інституціонального або регіонального) та Хельсінкської декларації 1975 року, в редакції 1983 року.

group and subjects without vascular cognitive deficit. They were selected from the non-exposed patients of the NRCRM according to the criteria listed below.

Psychoneurological Protocol, Verification of Diagnoses, and Group Inclusion/Exclusion Criteria. The diagnostics of vascular cognitive impairment was done according to the criteria of American Heart Association/American Stroke Association (AHA/ASA) Scientific Statement Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia [14], Mini-Mental State Examination (MMSE) [15], *ICD-10 and DSM-IV criteria as well.*

Patients (males) were shared to different groups according to the severity of cognitive deficit and exposure to ionizing radiation. Inclusion/exclusion criteria are presented at Table 2.

Consent and Approval. Written informed consent to participate in the study was obtained from each study subject, as appropriate. The study was approved by the NRCRM Ethical Review Board. The procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, edition 1983.

Таблиця 2
Критерії включення та виключення в дослідження

Table 2
Inclusion and exclusion criteria for the study

Критерії включення / Inclusion criteria	Критерії виключення / Exclusion criteria
<p>Здоровий контроль / healthy control</p> <ul style="list-style-type: none"> > старші за 45 років / +45 years old; > відсутність фізичних та психічних розладів; absence of any physical and mental disorder; > MMSE \geq 28 	<p>Інші ніж цереброваскулярні захворювання нервової системи або психічні розлади; Any other than cerebrovascular diseases of the nervous system or mental disorder;</p> <ul style="list-style-type: none"> > небажання виконувати вимоги протоколу або процедури дослідження або нездатність зрозуміти інструкції; unwilling to comply with the protocol or procedures or unable to understand the language used; > важкі зорові або слухові порушення; severe visual or auditory disorders; > алкоголізм або наркотична залежність; alcoholism or drug dependence.
<p>Судинний легкий когнітивний дефіцит (СЛКД) / Vascular mild cognitive impairment (VaMCI)</p> <ul style="list-style-type: none"> > старші за 45 років / +45 years old; > верифікована неврологом цереброваскулярна хвороба; verified cerebrovascular disease by neurologist > пацієнт відповідає критеріям AHA/ASA для СЛКД; patients meet the AHA/ASA criteria for VaMCI; > MMSE = 24–27 	
<p>Судинна деменція (СД) / Vascular dementia (VaD):</p> <ul style="list-style-type: none"> > старші за 45 років / 45+ years old; > верифікована неврологом цереброваскулярна хвороба; verified cerebrovascular disease by neurologist; > пацієнт відповідає критеріям AHA/ASA, МКХ-10 та DSM-IV для СД; patients meet the AHA/ASA, ICD-10 and DSM-IV criteria for VaD; > MMSE \leq 23 	

Доза опромінення. Для кожної опроміненої особи індивідуальна доза зовнішнього опромінення була отримана з Державного реєстру України (ДРУ) (табл. 1)

Дослідження відносної довжини теломер за допомогою флуоресцентної гібридизації in situ та проточної цитометрії. Визначення відносної довжини теломер проводили за допомогою Telomer PNA Kit/FITC (DakoCytometry, Denmark). Набір рекомендовано для визначення теломер в ядерних гемопоетичних клітинах з використанням зв'язаних з флуоресцентним зразків пептидної нуклеїнової кислоти (PNA). Методика проведення аналізу складалась з декількох етапів, а саме: попередня обробка, денатурація, гібридизація (1-й день); промивання, фарбування ДНК, аналіз (2-й день). В якості контрольних клітин, була використана лінія лейкемічних клітин K562, яка має довгу та встановлену довжину теломер. Аналіз гібридизованих зразків із FITC-міченою PNA був проведений за допомогою проточного цитометра FACSCalibur. RTL розраховували за формулою:

$$RTL = \frac{(\text{mean FL1 sample cells with probe} - \text{mean FL1 sample cells without probe}) \times \text{DNA index of control cells}}{(\text{mean FL1 control cells with probe} - \text{mean FL1 control cells without probe}) \times \text{DNA index of sample cells}} \times 100 \quad (1)$$

Оцінка відносного рівня генної експресії (полімеразна ланцюгова реакція у режимі реального часу). Визначення відносного рівня генної експресії проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі зі зворотною транскрипцією. Виділення тотальної РНК проводили з лейкоцитів периферичної крові за допомогою автоматичної станції QIAcube (QIAGEN, Germany) для виділення нуклеїнових кислот та набору для виділення РНК – NucleoSpinRNAII (Macherey-Nagel, Germany). Синтез комплементарної ДНК (кДНК) із зразків виділеної РНК проводився з використанням HighCapacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). Ампліфікація кДНК проводилась на базі роботизованої станції 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) із застосуванням наборів TagMan для генів *TERT*, *TERF1* та *TERF2*. Аналіз отриманих даних проводили за допомогою програмного забезпечення SDS 2.3. Показники відносного рівня генної експресії (RQ) розраховували за допомогою $2^{-\Delta\Delta Ct}$ методу, де

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{sample}} - Ct_{\text{ref}})_{\text{control}} - (Ct_{\text{sample}} - Ct_{\text{ref}})_{\text{irradiated}} \quad (2)$$

Статистика. Статистичний аналіз проводився з використанням пакетів MS STATISTICA-7.0-10.0. Статистична обробка включала описову статистику, ANOVA, критерій Стьюдента, критерій хи-

Radiation Dose. For each exposed study subject, the individual dose of external irradiation was available in the State Registry of Ukraine (table 1).

Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. The relative telomere length (RTL) was assessed using the Telomere PNA Kit / FITC (Dako Cytometry, Denmark) for hematopoietic cells using PNA probe labeled with FITC. The Kit is recommended for determination of telomere in nuclear hematopoietic cells using fluorescein samples associated with peptide nucleic acid (PNA). FISH stage included preprocessing, denaturation, hybridization (the 1st day), washing, DNA staining, and analysis (the 2nd day). K562 cell line with long and determined telomere length was used as control cells. Hybridized samples with FITC-labelled PNA were counted at FACSCalibur cytometer. RTL was calculated by the equation as follows:

Real-time polymerase chain reaction (relative quantification of gene expression). Gene expression was explored by polymerase chain reaction (PCR) with real-time reverse transcription. RNA was segregated from peripheral blood mononuclear by the automated workstation QIAcube (QIAGEN, Germany) for nucleic acids segregation with spin-column kit for RNA segregation – NucleoSpin RNAII (Macherey-Nagel, Germany) using the DNase processing. cDNA was synthesized from segregated RNA samples with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). Amplification of cDNA was performed using robotic systems 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) with TagMan sets for *TERT*, *TERF1* and *TERF2* genes. The data were analyzed using the SDS 2.3 software and RQManager. Relative levels of gene expression (RQ) was calculated according to the $\Delta\Delta Ct$ comparative method (the expression ratio is $2^{\Delta\Delta Ct}$), where

Statistics. Statistical analysis we performed using MS STATISTICA-7.0-10.0 software. Statistical processing included descriptive statistic, ANOVA, Student's *t* test, the Chi-square test (criterion χ^2),

квадрат (χ^2), коефіцієнт кореляції Пірсона та регресійний аналіз. Парний t тест використовувався для аналізу даних у випадках, коли пара вимірювань була отримана від кожної особи. Різниця між групами вважалась значущою при $\alpha < 0,05$ і поправка Бонферроні використовувалася для зниження вірогідності помилок першого типу (хибно-позитивних) при проведенні множинних статистичних тестів ($p \leq \alpha/n$). При множинному регресійному аналізі незалежні або предикторні змінні склалися з: 1) дози зовнішнього опромінення; 2) віку на момент огляду; 3) віку на момент опромінення; 4) рівня супутніх (традиційних, нерадіаційних, факторів); 5) років освіти. Залежні або критеріальні змінні включали молекулярні та біологічні квантифіковані параметри. Відповідно до множинного регресійного та кореляційного аналізу, двовимірні або просторово змінні регресійні моделі, визначені рівняннями

$$Y = a + b \cdot X \quad (3)$$

де Y – залежна змінна, a – постійна величина, b – нахил лінії регресії, та X – незалежна змінна, були обчислені для зв'язку доза-ефект для найбільш інформативних залежних змінних, використовуючи дані всіх пацієнтів опромінених груп, якщо не було вказане інше.

РЕЗУЛЬТАТИ

Дескриптивні характеристики обстежених осіб представлені в табл. 1. Групи були в середньому одного віку. Не спостерігалось суттєвої різниці між групами з різними дозами у відсотку осіб з первинним опроміненням у віці до 35 років. В той же час, частка осіб з першою місією в Чорнобиль у віці 35 років і старше була вище ($p = 0,15$) у опромінених в дозі понад 250 мЗв (36,0 %) у порівнянні з опроміненими в менших дозах. Не було відзначено жодних статистично значущих відмінностей між групами опромінених за місцем проживання (місто/село) або за рівнем освіти, що могло б вплинути на оцінку когнітивного дефіциту. В контрольній групі відсоток мешканців сільських районів був вищим ($p = 0,0002$), однак він також представляв меншість осіб, як і в групі опромінених. Освітній рівень не показав значущих відмінностей, окрім більшої частки ліквідаторів з вищою освітою в групі опромінених з дозою понад 500 мЗв. Учасники ліквідації з деменцією були молодші за неопромінених пацієнтів з цим же діагнозом ($M \pm SD$: $(60,5 \pm 7,3)$ року проти $(66,9 \pm 11,2)$; $t = -2,5$;

Pearson product-moment correlation and regression analysis. The paired t test was used to analyze data when a pair of measurements was obtained on each individual. The differences between groups were accepted to be significant at $\alpha < 0.05$ and the Bonferroni correction was used to reduce the probability of type I (i. e., false-positive) errors when multiple statistical tests were performed ($p \leq \alpha/n$). In multiple regression analysis the independent or predictor variables consisted of: 1) doses of external radiation; 2) current age; 3) age at the time of exposure; 4) the level of confounding (traditional, non-radiation, factors); 5) years of education. The dependent or criterion variables included molecular and biological quantified parameters. Following the multiple regression and correlation analyses, the two dimensional or to variable space regression models, defining by the equation

where Y – the dependent variable, a – constant (intercept), b – slope (regression coefficient), and X – independent variable, were calculated for dose-effect relationships for the most informative dependent variables, using the data from all patients in the exposed groups, if other is not specified.

RESULTS

Descriptive characteristics of the examined subjects is presented at Table 1. Groups were of the same mean age and its range. There was no significant difference between the dose groups in percent of subjects with the first exposure at the age below 35 years. However, the proportion of subjects with first mission to Chernobyl at age of 35 years and older was higher ($p = 0.15$) in exposed over 250 mSv (36.0 %) in comparison with exposed to lower doses (21.1 %). The majority of subjects at time of interview lived in urban areas. There were no statistically significant differences between the exposed groups in rural/urban status or educational level that may influence cognitive function scaling. In a control group the percentage of inhabitants of rural areas was higher ($p = 0.0002$), however representing a minority of subjects like in exposed. Education status showed none of significant differences except of higher proportion of clean-up workers with high education in a group with radiation doses over 500 mSv. Clean-up workers with dementia were younger, than non-exposed patients with dementia ($M \pm SD$: 60.5 ± 7.3 years vs

$p = 0,016$, відповідно). Це може свідчити про більш ранній початок деменції у опромінених осіб, а також про прискорення процесів старіння у них. Не спостерігалось ніяких відмінностей рівня когнітивного дефіциту відповідно до балів MMSE між опроміненими та неопроміненими з однаковими діагнозами.

Аналіз RTL та експресії генів в залежності від з дози опромінення

Flow-FISH аналіз RTL у лейкоцитах периферичної крові показав тенденцію до вкорочення теломер після опромінення. Зафіксовані статистично достовірні відмінності в УЛНА, які зазнали опромінення більше 100 мЗв (табл. 3). Тенденція зниження відносних показників довжини теломер у групі УЛНА, опромінених у дозах більше 500 мЗв, статистичної достовірності не мала.

Однонаправлені зміни в експресії генів були продемонстровані в усіх групах УЛНА (табл. 4). Експресія гену TERT статистично достовірно не змінювалась в жодній з груп обстеження. Переконаліші дані були отримані щодо змін в експресії гену TERT2, ще одного негативного регулятора довжини теломер. Було встановлена гіперекспресія гену TERT2 у групах УЛНА, опромінених в діапазонах 100–250 та 250–500 мЗв порівняно з неопроміненими особами. Підвищення експресії гена TERT2 у віддаленому періоді після опромінення може вказувати на підсилення негативного контролю активності теломерази та довжини теломер. Ці дані узгоджуються з протилежною тенденцією змін експресії гену TERT – тобто, ген, який кодує білок, відповідальний за подовження теломер.

У групі осіб, опромінених в дозах нижче 100 мЗв, експресія генів *TERT1* і *TERT2* статистично не зміню-

66.9 ± 11.2 ; $t = -2.5$; $p = 0.016$, correspondingly). This could testify to the earlier dementia onset in irradiated persons as well as to an accelerated aging among them. There were no differences in the cognitive level according to the Mini-Mental State Examination (MMSE) between exposed and non-exposed groups with the same diagnosis.

Analysis of RTL and gene expression due to radiation dose

Flow-FISH analysis of RTL in peripheral blood leukocytes showed a tendency of telomere shortening in exposed. Differences became statistically significant in clean-up workers exposed over 100 mSv (Table 3). Tendency of mean RTL parameters decrease in group of clean-up workers exposed over 500 mSv occurred non-significant.

Unidirectional changes were demonstrated for gene expression in all the groups of clean-up workers (Table 4). None of statistically significant changes were found for TERT1 gene expression. More convincing figures were shown in the expression of TERT2, being another negative regulator of telomere length. In the groups of clean-up workers irradiated in the ranges of 100–250 mSv and 250–500 mSv the overexpression of TERT2, compared with non-exposed group was shown. Increase of the TERT2 gene expression in the remote period after irradiation could indicate strengthening of the negative control of telomerase activity and telomere length. These data are consistent with the opposite tendency of changes in TERT gene expression – that is, the gene encoding the protein responsible for telomere elongation.

For a group of exposed below 100 mSv no significant changes were demonstrated both for *TERT1*

Таблиця 3

Відносна довжина теломер у лейкоцитах периферичної крові осіб дослідних груп

Table 3

Relative telomere length in peripheral blood leukocytes of examination groups

Групи Groups by radiation dose	RTL		t-value	P
	M	m		
1 (20–100 мЗв / mSv)	16,26	0,26	1,55	0,12
2 (100–250 мЗв / mSv)	15,89	0,27	2,42	0,02*
3 (250–500 мЗв / mSv)	15,85	0,33	2,24	0,02*
4 (> 500 мЗв / mSv)	16,36	0,34	1,56	0,12
Неопромінені / non-exposed	17,21	0,23		

Примітка. * – статистично вірогідна різниця, порівняно із групою неопромінених осіб
Note. * – significant difference in comparison with the non-exposed group

Таблиця 4
Показники відносної експресії генів *TERF1*, *TERF2*, *TERT*

Table 4
Relative quantification of *TERF1*, *TERF2*, *TERT* gene expression

Групи Groups	Ген / Gene symbol (Assay)	Relative quantification		t-value	P
		M	m		
20–100 мЗв / mSv	<i>TERF1</i> (Hs00744634_s1)	1,04	0,35	1,80	0,07
	<i>TERF2</i> (Hs00194619_m1)	1,10	0,30	-1,25	0,21
	<i>TERT</i> (Hs00972656_m1)	5,74	2,43	-3,01	0,007*
100–250 мЗв / mSv	<i>TERF1</i> (Hs00744634_s1)	1,83	0,49	0,51	0,60
	<i>TERF2</i> (Hs00194619_m1)	1,77	0,37	-2,60	0,01*
	<i>TERT</i> (Hs00972656_m1)	2,34	0,86	-2,48	0,02*
250–500 мЗв / mSv	<i>TERF1</i> (Hs00744634_s1)	2,12	0,45	0,12	0,89
	<i>TERF2</i> (Hs00194619_m1)	1,78	0,57	-2,17	0,03*
	<i>TERT</i> (Hs00972656_m1)	3,17	1,82	-2,30	0,03*
>500 мЗв / mSv	<i>TERF1</i> (Hs00744634_s1)	1,16	0,50	1,32	0,19
	<i>TERF2</i> (Hs00194619_m1)	1,52	0,68	-1,62	0,11
	<i>TERT</i> (Hs00972656_m1)	10,79	3,45	-3,19	0,004*
неопромінені / non-exposed	<i>TERF1</i> (Hs00744634_s1)	2,20	0,50	–	–
	<i>TERF2</i> (Hs00194619_m1)	0,69	0,17	–	–
	<i>TERT</i> (Hs00972656_m1)	0,29	0,11	–	–

Примітка. * – статистично вірогідна різниця, порівняно із групою неопромінених осіб
Note. * – significant difference in comparison with the non-exposed group

валась, тоді як найбільш високі показники RQ гену *TERT* були пов'язані з мінімальними змінами у показниках відносної довжини теломер. Порівняльний аналіз (рис. 1) показав, що RTL зменшується (рис. 1A) зі збільшенням дози опромінення у дослідних групах та гіперекспресією негативних регуляторів довжини теломер *TERF1* і *TERF2* (рис. 1B, C). Протилежні тенденції були продемонстровані щодо гена *TERT*, особливо у групі осіб, опромінених у дозах більше 500 мЗв, де статистично достовірна гіперекспресія *TERT* (рис. 1D) поєднувалась зі зниженням RQ генів *TERF1* і *TERF2*, порівняно з УЛНА, опроміненими у нижчих дозах. Таке співвідношення в експресії вказаних генів, може свідчити про певну незалежність генної експресії та функції теломер і має наслідком відсутність дос-

and *TERT2* while the highest RQ indices for *TERT* were associated with minimal changes in RTL. Comparisons (Fig. 1) have shown that a decrease in RTL (Fig. 1A) is in parallel to an increase of the radiation dose by group and overexpression of negative telomere length regulators *TERF1* and *TERF2* genes (Fig. 1B, C). The opposite trends were demonstrated for *TERT* gene, especially in a group exposed over 500 mSv, when a significant *TERT* overexpression (fig. 1D) was combined with decreased RQ for *TERF1* and *TERF2*, as comparing with clean-up workers exposed to lower doses. Such gene expression equilibrium demonstrates certain independency in expression and influence on telomere function, and results in an absence of

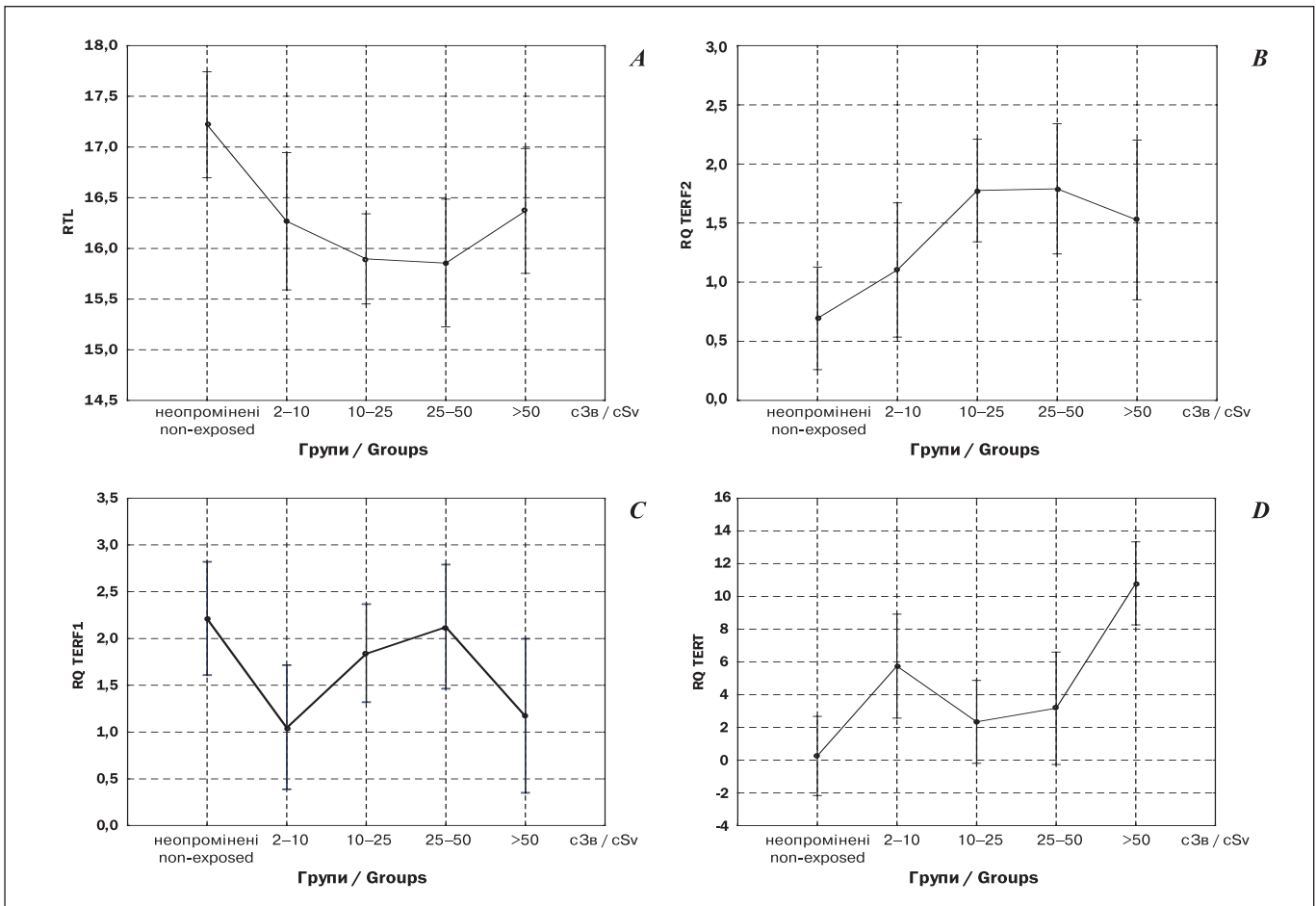


Рисунок 1. Довжина теломер та відносний рівень експресії генів *TERF1*, *TERF2*, *TERT* у лейкоцитах периферичної крові УЛНА на ЧАЕС через 25–27 років після опромінення ($M \pm SD$)

A – відносна довжина теломер; B – значення RQ для гену *TERF2*; C – значення RQ для гену *TERF1*; D – значення RQ для гену *TERT*

Figure 1. Telomere length and gene expression in Chernobyl clean-up workers 25–27 years after radiation exposure ($M \pm SD$)

X-axis – exposure groups; Y-axis: A – relative telomere length; B – RQ for *TERF2*; C – RQ for *TERF1*; D – RQ for *TERT* gene

товірних змін їх довжини після опромінення у дозах, вищих за 500 мЗв.

Довжина теломер, генна експресія та когнітивний дефіцит

Не було виявлено зв'язку між тяжкістю розладів і освітнім рівнем (відповідно $11,8 \pm 2,1$ та $12,1 \pm 1,7$ років освіти) та іншими факторами способу життя. В загальній групі УЛНА спостерігався суттєвий зв'язок між зниженням показника MMSE, який свідчив про наростаючий когнітивний дефіцит та віком ($p < 0,001$; рис. 2A). Найнижчі показники MMSE також відповідали найкоротшим теломерам, хоча характер залежності був не настільки показовим ($p < 0,01$). Аналіз показників групи опромінених у порівнянні з неопроміненними продемонстрував суттєве зниження ($p = 0,03$) і середнього значення MMSE, і RTL параметрів, що свідчить про вплив попереднього опромінення (рис. 3).

significant telomere length changes after exposure over 500 mSv.

Telomere length, gene expression and cognitive deficit

No connection was found between the severity of disease and education level (subsequently 11.8 ± 2.1 and 12.1 ± 1.7 years of education), and other lifestyle factors. In a total group of clean-up workers there was a significant relationship between the decrease of MMSE, indicating increasing cognitive deficit, and age ($p < 0.001$; Fig. 3A). The lowest MMSE also correspond to the shortest telomeres (Fig. 3B), however the character of dependency was not so demonstrative ($p < 0.01$). Analysis of the exposed group in comparison with non-exposed demonstrated a significant decrease ($p = 0.03$) both of the mean MMSE and RTL parameters suggesting influence of previous exposure (Fig. 3).

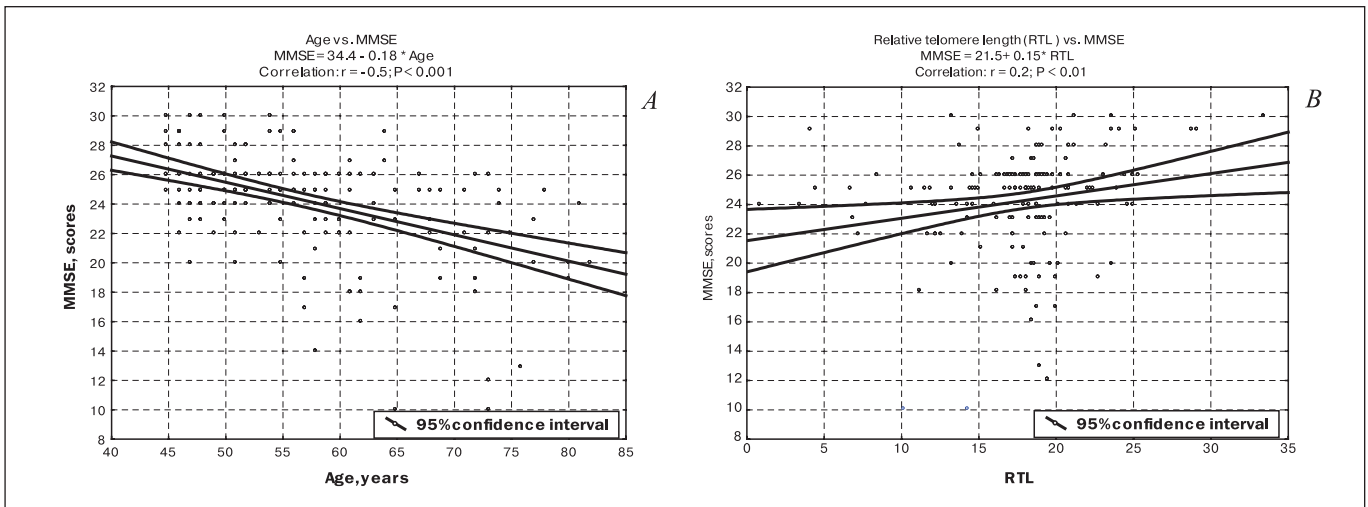


Рисунок 2. Залежність між когнітивним дефіцитом відповідно до MMSE, віку (A) та RTL (B) в УЛНА на ЧАЕС

Figure 2. Dependence between cognitive deficit according to the MMSE, age (A) and RTL (B) in clean-up workers of Chernobyl accident

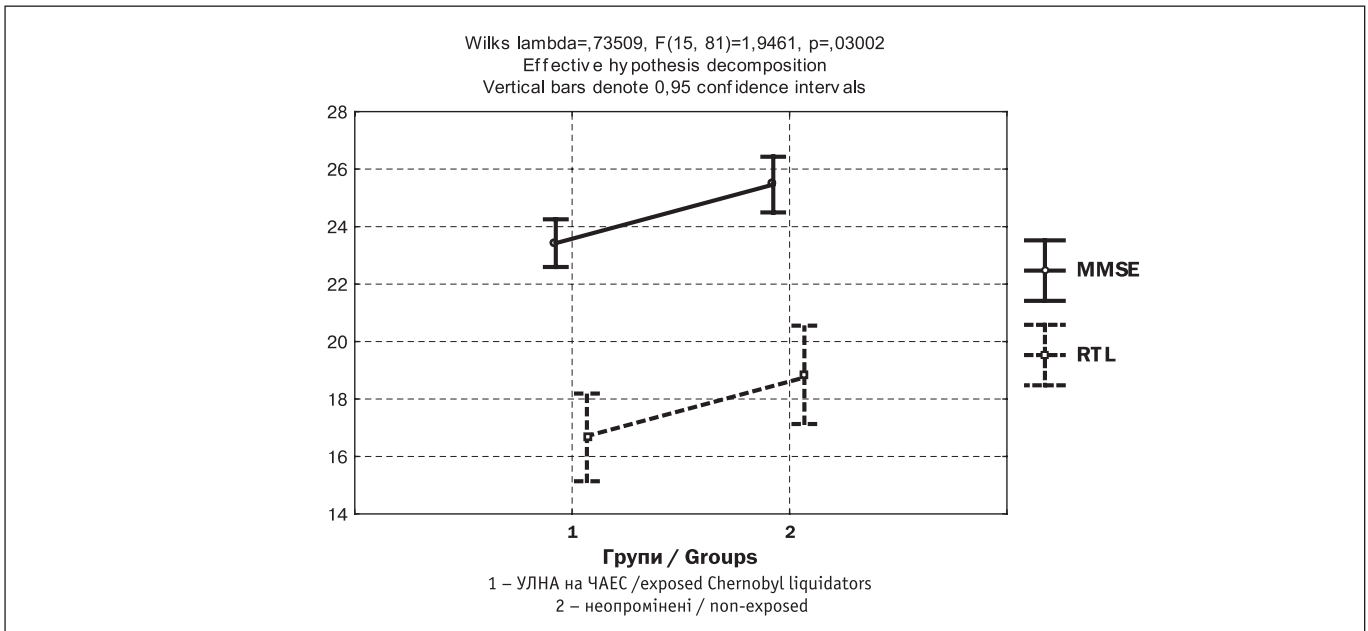


Рисунок 3. Середні значення MMSE та RTL в УЛНА на ЧАЕС та у групі неопроміненних осіб, стандартизованих за віком ($M \pm SD$)

Figure 3. Mean MMSE and RTL in clean-up workers vs the age-standardized group of non-exposed ($M \pm SD$)

ОБГОВОРЕННЯ

Довгостроковий несприятливий вплив Чорнобильської катастрофи на психічне здоров'я є міжнародно визнаним. Чорнобильський форум дійшов висновку, що психічне здоров'я було найбільш серйозною проблемою охорони здоров'я населення, викликану аварією. Цереброваскулярні розлади, органічне ураження головного мозку і когнітивні порушення є однією з основних патологій в УЛНА. Ряд національних і міжнародних досліджень показали присутність когнітивної дисфункції в УЛНА з перева-

DISCUSSION

The long-term unfavorable impact of the Chernobyl disaster on mental health is internationally recognized. The Chernobyl Forum concluded that mental health was the largest public health problem unleashed by the accident. Cerebrovascular disorders, organic brain damage and cognitive impairment are among the main pathology in the clean-up workers. Several national and international studies have demonstrated presence of cognitive dysfunction in clean-up workers with preva-

жанням депресивних змін, думок про самогубство тощо [16, 17]. Тим не менш, зв'язок судинної патології з іонізуючим випромінюванням після Чорнобилю повинен бути доведеним і розглядається в деяких коментарях, як аномальний [18]. Необхідно встановити механізми, що пов'язують дію радіації та судинну патологію в діапазоні малих доз. Завданням даного дослідження було з'ясувати зв'язок між дозою опромінення, довжиною теломер та її генною регуляцією, і когнітивним дефіцитом, як наслідком цереброваскулярної патології віддаленого періоду після опромінення.

Існують експериментальні докази змін довжини теломер внаслідок дії іонізуючого випромінювання [19]. Раніше експериментальні дослідження показали, що дисфункція теломер погіршує репарацію ДНК і підвищує чутливість до іонізуючої радіації. Подібні взаємозв'язки між дозою опромінення, довжиною теломер та апоптозом були описані нашою науковою групою у ранньому періоді після опромінення персоналу, який зазнає впливу іонізуючої радіації в малих дозах на Чорнобильській АЕС [5]. Інші дослідження [20] показали різні тенденції у зміні довжини теломер у 565 УЛНА з Латвії: довші теломери в учасників ліквідації наслідків аварії 1986 року та онкологічних хворих, та більш короткі теломери в УЛНА з радіаційними катарактами, остеопорозом, атеросклерозом або ішемічною хворобою серця. Інформація щодо доз опромінення в цьому дослідженні була відсутня.

Особливістю даного дослідження є те, що зміни довжини теломер та генної регуляції теломеро-теломеразного комплексу фіксуються у віддаленому періоді після радіаційного опромінення, включаючи вплив малих доз. Оскільки скорочення теломер описано при низці хвороб з когнітивним дефіцитом, природним було б очікувати зв'язок між теломерами та патологією, та те, що буде знайдено асоціацію між довжиною теломер, віком та когнітивним дефіцитом. Більш того, наші дані свідчать, що взаємозв'язок між змінами довжини теломер і дозою опромінення зберігається понад двадцять років. Наші дані також показують, що ці зміни довжини теломер пов'язані з експресією генів, що мають позитивні і негативні ефекти регулювання на функції теломер. Нами встановлено, що існує певна різниця в регуляції генів у дозах нижче і більше 500 мЗв у віддаленому періоді після опромінення. Необхідним є продовження дослідження з визначення стабільності змін експресії генів на протязі значного періоду часу після опромінення.

lence of depressive changes, suicide ideation etc. [16, 17]. However, the relationship of the vascular pathology excess after Chornobyl to ionizing radiation has to be proven and is regarded in some commentaries as anomalous [18]. Understanding of the mechanisms bridging radiation and vascular pathology at low dose range has to be established. The approach of this study was to find out the connection between the radiation dose, telomere length and its gene regulation, and cognitive deficit as a result of the cerebrovascular pathology of the late period.

The experimental evidence exists on the changes of telomeres due to ionizing radiation [19]. Earlier experimental studies have shown that telomere dysfunction impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionizing radiation. Similar relationships between the radiation dose, telomere length and apoptosis have been described by our group at the early period after exposure in staff exposed to low-doses at Chornobyl NPP [5]. Another study [20] demonstrated different patterns of telomere length changes in 565 clean-up workers from Latvia: longer telomeres in clean-up workers of 1986 working on deactivation and cancer patients and shorter telomeres in those clean-up workers with concomitant cataracts, osteoporosis, atherosclerosis, or coronary heart disease. Radiation doses were not available.

The peculiarity of this study is that the telomere length, its gene regulation changes are found at the late period after the radiation exposure including the exposure at low dose. As telomere shortening is described in a number of diseases with cognitive impairment, it is natural to expect the relationship between the telomeres and disease and the connection between the telomere length, age and cognitive deficit has been revealed. Moreover, our data suggest the relationship between the telomere changes and radiation dose more than twenty years after the exposure. Our data also demonstrate that these telomere changes are related to the expression of genes having positive and negative regulation effects on telomere function. We report that at the late period exists some difference in gene regulation at doses below and over 500 mSv. Follow-up study is needed to determine the stability of gene expression changes during the substantial time period after radiation exposure.

Подяка

Дослідження проведені за планом Національної академії медичних наук України (НДР № 492, номер державної реєстрації 0110U000180) спільно з грантом проекту CEREBRAD (№ 295552) Європейської рамкової програми FP7 “Когнітивні та цереброваскулярні ефекти, викликані малими дозами іонізуючого випромінювання”.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Changes of telomere length with aging / K. Takubo, J. Aida, N. Izumiya-Shimomura [et al.] // *Geriatr. Gerontol. Int.* – 2010. – Vol. 10, Suppl. 1. – P. 197–206.
2. The role of telomere length modulation in delayed chromosome instability induced by ionizing radiation in human primary fibroblasts / F. Berardinelli, A. Antocchia, R. Buonsante [et al.] // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2013. – Vol. 54, No. 3. – P. 172–179.
3. Das B. Telomere length in human adults and high level natural background radiation / B. Das, D. Saini, M. Seshadri // *PLoS One.* – 2009. – Vol. 4(12). – e8440.
4. Radiation-associated changes in the length of telomeres in peripheral leukocytes from inpatients with cancer / T. Maeda, K. Nakamura, K. Atsumi [et al.] // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2013. – Vol. 89(2). – P. 106–109.
5. Ilyenko I. Analysis of relative telomere length and apoptosis in humans exposed to ionising radiation / I. Ilyenko, O. Lyaskivska, D. Bazyka // *Exp. Oncol.* – 2011. – Vol. 33(4). – P. 235–238.
6. Svenson U. Telomere length as a biological marker in malignancy / U. Svenson, G. Roos // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1792(4). – P. 317–323.
7. Longer leukocyte telomere length is associated with smaller hippocampal volume among non-demented APOE ε3/ε3 subjects / M. Wikgren, T. Karlsson, J. Lind [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7(4). – e34292. – doi: 10.1371/journal.pone.0034292.
8. Salthouse T. A. Decomposing age correlations on neuropsychological and cognitive variables / T. A. Salthouse // *J. Int. Neuropsychol. Soc.* – 2009. – Vol. 15(5). – P. 650–661.
9. Cognitive performance and leukocyte telomere length in two narrow age-range cohorts: a population study / K. A. Mather, A. F. Jorm, K. J. Anstey [et al.] // *BMC Geriatr.* – 2010. – Vol. 16. – P. 10–62.
10. Telomere length and cognitive function in southern Chinese community-dwelling male elders / S. L. Ma, E. S. Lau, E. W. Suen [et al.] // *Age and Ageing.* – 2013. – Vol. 42(4). – P. 450–455.
11. 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 / S. Moverare-Skrtic, P. Johansson, N. Mattsson [et al.] // *Exp. Gerontol.* – 2012. – Vol. 47(2). – P. 179–182.
12. Telomere length and ApoE polymorphism in mild cognitive impairment, degenerative and vascular dementia / D. Zekry, F. R. Herrmann, I. Irminger-Finger [et al.] // *J. Neurol. Sci.* – 2010. – Vol. 299(1-2). – P. 108–111.
13. Early brain response to low-dose radiation exposure involves molecular networks and pathways associated with cognitive functions, advanced aging

Acknowledgements

This study was funded by the National Academy of Medical Sciences of Ukraine (grant No. 492, state registration No. 0110U000180) and supported jointly by the EU-FP7 project CEREBRAD (No. 295552) – Cognitive and Cerebrovascular Effects Induced by Low Dose Ionizing Radiation.

REFERENCES

1. Takubo K, Aida J, Izumiya-Shimomura N, Ishikawa N, Sawabe M, Kurabayashi R, et al. Changes of telomere length with aging. *Geriatr Gerontol Int.* 2010 Jul;10 Suppl 1:S197-206.
2. Berardinelli F, Antocchia A, Buonsante R, Gerardi S, Cherubini R, De Nadal V, et al. The role of telomere length modulation in delayed chromosome instability induced by ionizing radiation in human primary fibroblasts. *Environ Mol Mutagen.* 2013 Apr;54(3):172-9.
3. Das B, Saini D, Seshadri M. Telomere length in human adults and high level natural background radiation. *PLoS One.* 2009 Dec 23;4(12):e8440.
4. Maeda T, Nakamura K, Atsumi K, Hirakawa M, Ueda Y, Makino N. Radiation-associated changes in the length of telomeres in peripheral leukocytes from inpatients with cancer. *Int J Radiat Biol.* 2013 Feb;89(2):106-9.
5. Ilyenko I, Lyaskivska O, Bazyka D. Analysis of relative telomere length and apoptosis in humans exposed to ionising radiation. *Exp Oncol.* 2011 Dec;33(4):235-8.
6. Svenson U, Roos G. Telomere length as a biological marker in malignancy. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Apr;1792(4):317-23.
7. Wikgren M, Karlsson T, Lind J, Nilbrink T, Hultdin J, Slegers K, et al. Longer leukocyte telomere length is associated with smaller hippocampal volume among non-demented APOE ε3/ε3 subjects. *PLoS One.* 2012;7(4):e34292.
8. Salthouse TA. Decomposing age correlations on neuropsychological and cognitive variables. *J Int Neuropsychol Soc.* 2009 Sep;15(5):650-61.
9. Mather KA, Jorm AF, Anstey KJ, Milburn PJ, Eastaer S, Christensen H. Cognitive performance and leukocyte telomere length in two narrow age-range cohorts: a population study. *BMC Geriatr.* 2010 Sep 16;10:62.
10. Ma SL, Lau ES, Suen EW, Lam LC, Leung PC, Woo J, Tang NL. Telomere length and cognitive function in southern Chinese community-dwelling male elders. *Age Ageing.* 2013 Jul;42(4):450-5.
11. Moverare-Skrtic S, Johansson P, Mattsson N, Hansson O, Wallin A, Johansson JO, et al. 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 Feb;47(2):179-82.
12. Zekry D, Herrmann FR, Irminger-Finger I, Graf C, Genet C, Vitale AM, et al. Telomere length and ApoE polymorphism in mild cognitive impairment, degenerative and vascular dementia. *J*

- and Alzheimer's disease / X. R. Lowe, S. Bhattacharya, F. Marchetti, A. J. Wyrobek // *Radiat. Res.* – 2009. – Vol. 171(1). – P. 53–65.
14. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association / P. B. Gorelick, A. Scuteri, S. E. Black [et al.] // *Stroke* 2011. – Vol. 42(9). – P. 2672–2713.
15. Folstein M. F. "Mini-Mental State": A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician / M. F. Folstein, S. E. Folstein, P. R. McHugh // *J. Psychiatr. Res.* – 1975. – Vol. 12(3). – P. 189–198.
16. The mental health of clean-up workers 18 years after the Chernobyl accident / K. Loganovsky, J. M. Havenaar, N. L. Tintle [et al.] // *Psychol. Med.* – 2008. – Vol. 38(4). – P. 481–488.
17. Bromet E.J. A 25 year retrospective review of the psychological consequences of the Chernobyl accident / E. J. Bromet, J. M. Havenaar, L. T. Guey // *Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 23(4). – P. 297–305.
18. Akiba S. Circulation disease risk after low level ionizing radiation exposure / S. Akiba // *Radiation Emergency Medicine.* – 2013. – Vol. 2(2). – P. 13–22.
19. Belloni P. Relationship between spontaneous or radiation-induced apoptosis and telomere shortening in G(0) human lymphocytes / P. Belloni, P. Latini, F. Palitti // *Mutat. Res.* – 2010. – Vol. 701(2). – P. 118-122.
20. Telomere length in Chernobyl accident recovery workers in the late period after the disaster / J. Reste, R. Zvigule, T. Zvagule [et al.] // *J. Rad. Research.* – 2014. – Vol. 1. – P. 1–12.
13. Lowe XR, Bhattacharya S, Marchetti F, Wyrobek AJ. Early brain response to low-dose radiation exposure involves molecular networks and pathways associated with cognitive functions, advanced aging and Alzheimer's disease. *Radiat Res.* 2009 Jan;171(1):53-65.
14. Gorelick PB, Scuteri A, Black SE, Decarli C, Greenberg SM, et al. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Stroke.* 2011 Sep;42(9):2672-713.
15. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-Mental State": A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 1975 Nov;12(3):189-98.
16. Loganovsky K, Havenaar JM, Tintle NL, Guey LT, Kotov R, Bromet EJ. The mental health of clean-up workers 18 years after the Chernobyl accident. *Psychol Med.* 2008 Apr;38(4):481-8.
17. Bromet EJ, Havenaar JM, Guey LT. A 25 year retrospective review of the psychological consequences of the Chernobyl accident. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2011 May;23(4):297-305.
18. Akiba S. Circulation disease risk after low level ionizing radiation exposure. *Radiation Emergency Medicine.* 2013;2(2):13-22.
19. Belloni P, Latini P, Palitti F. Belloni P. Relationship between spontaneous or radiation-induced apoptosis and telomere shortening in G(0) human lymphocytes. *Mutat Res.* 2010 Aug 30;701(2):118-22.
20. Reste J, Zvigule G, Zvagule T, Kurjane N, Eglite M, Gabruseva N, et al. Telomere length in Chernobyl accident recovery workers in the late period after the disaster. *J Radiat Res.* 2014 Nov;55(6):1089-100.

Стаття надійшла до редакції 27.06.2014

Received: 27.06.2014