

Міністерство охорони здоров'я України  
Національна академія медичних наук України  
Український центр наукової медичної інформації  
та патентно-ліцензійної роботи

«УЗГОДЖЕНО»

в.о. начальника лікувально-  
організаційного управління

НАМН України, д. м. н.

О.О. Петриченко

«16» 12 2014 р.

«УЗГОДЖЕНО»

Директор департаменту  
медичної допомоги МОЗ України

С.Г. Хотіна

«26» 12 2014 р.

**ЗАСТОСУВАННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ ТА ПСИХОМЕТРИЧНИХ  
ПОКАЗНИКІВ ДЛЯ УДОСКОНАЛЕННЯ ДІАГНОСТИКИ  
ВІДДАЛЕНИХ ПОСТРАДІАЦІЙНИХ КОГНІТИВНИХ РОЗЛАДІВ  
(методичні рекомендації)**

(149.12/343.14)

Київ — 2014

**Установа-розробник:**

Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини  
Національної академії медичних наук України»

**Укладачі:**

чл.-кор. НАМН України,

д. мед. н., проф. Базика Дмитрій Анатолійович (044) 409 2955

д. мед. н., проф. Логановський Костянтин Миколайович (044) 452 1803

к. б. н. Ільєнко Ірина Миколаївна (044) 4518286

к. мед. н. Чумак Станіслав Анатолійович (044) 452 1803

Лясківська Олена Вікторівна (044) 4518286

**Рецензент:** д. мед. н. Бачинська Н. Ю.

**Голова Експертної проблемної комісії «Радіаційна медицина»  
МОЗ та НАМН України, чл.-кор. НАМН України, д. м. н., проф.  
Базика Д. А.**

## ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень .....	5
ВСТУП.....	6
1. Актуальність визначення молекулярного підґрунтя неврологічних ефектів в осіб, які зазнали ушкоджуючого впливу малих доз іонізуючого радіації після аварії на ЧАЕС.....	8
2. Психометрична діагностика і верифікація когнітивних розладів у постраждалих внаслідок Чорнобильської катастрофи .....	10
3. Основні положення методів визначення відносної довжини теломер та відносного рівня експресії генів асоційованих із теломеро-теломеразним комплексом у клітинах периферичної крові постраждалих внаслідок Чорнобильської катастрофи.....	13
3.1 Визначення відносної довжини теломер (RTL) методом flow-FISH (флуоресцентної гібридизації in situ з використанням проточної цитометрії).....	13
3.2 Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі (визначення відносного рівня генної експресії).....	17
4. Застосування молекулярно-генетичних досліджень теломеро-теломеразного комплексу клітин периферичної крові, як додаткового методу діагностики когнітивних дисфункцій в осіб, які зазнали ушкоджуючого впливу малих доз іонізуючої радіації після Чорнобильської катастрофи .....	19
ВИСНОВКИ.....	25
ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	26
ДОДАТКИ	
Додаток 1. Коротка шкала оцінки психічного статусу (MMSE).....	27

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ,  
ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
Зв	Зіверт
кДНК	комплементарна дезоксирибонуклеїнова кислота
ПК	периферична кров
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція
РНК	рибонуклеїнова кислота
УЛНА	Учасник ліквідації наслідків аварії
ЧАЕС	Чорнобильська атомна електростанція
FITC	флюоресцеїну ізотіоціанат
FL1	детектор, який відповідає за перший канал флуоресценції – зелений спектр
FL2	детектор, який відповідає за другий канал флуоресценції – жовтий спектр
Flow-FISH	проточно-цитометрична флюоресцентна гібридизація <i>in situ</i>
FSC	показник прямого світлорозсіювання
IQ	intellectual quotient: коефіцієнт інтелекту
MMSE	Mini-Mental Scale Examination: Коротка шкала оцінки психічного статусу
PNA	пептидна нуклеїнова кислота
RQ	Середнє значення відносного рівня генної експресії
RTL	відносна довжина теломер
SSC	показник бокового світлорозсіювання
TERF1	ген, який кодує теломерний зв'язуючий фактор 1
TERF2	ген, який кодує теломерний зв'язуючий фактор 2
TERT	ген, який кодує зворотню теломеразну транскриптазу людини
WAIS	Wechsler Adult Intelligence Scale: методика дослідження інтелекту для дорослих Д. Векслера

## ВСТУП

Порушення когнітивних функцій – одна з найбільш значимих характеристик нейродегенеративних захворювань та цереброваскулярної патології. Прогресуюче зростання числа нервово-психічних захворювань в осіб, які зазнали впливу малих доз іонізуючої радіації після аварії на Чорнобильській АЕС (ЧАЕС) актуалізує необхідність розробки та пошуку додаткових біомаркерів, які можуть бути використані для виявлення продромальних стадій захворювання.

Пошкодження головного мозку у віддаленому післячорнобильському періоді після опромінення малими дозами іонізуючого випромінювання, супроводжується розвитком імунопатологічних, дисциркуляторних та інших проявів. Поряд з цим додатковим фактором для даного контингенту осіб, яких впливає на функціональний стан організму є вік.

Вік є надзвичайно важливим у визначенні функціонального стану організму та його відповіді на вплив навколишнього середовища. Вивчення клітинно-молекулярних змін клітин крові, які координують розвиток передчасного клітинного старіння надасть змогу встановити біомаркери, пов'язані із цим процесом. Дослідження довжини теломер, теломеразної активності та генів, які регулюють ці показники (TERT, TERF1, TERF2) є важливою ланкою у вивченні біологічного старіння – комплексного процесу, який модифікується низкою факторів, в тому числі іонізуючою радіацією.

Ряд попередніх досліджень виявили зв'язок між стресом та скороченням теломерних ділянок, а також залежність між довжиною теломер та розвитком таких захворювань, як серцево-судинні патології, рак та деменція. З іншого боку, довгі теломери пов'язані зі здоровим старінням і загальною тривалістю життя. Таким чином, довжину теломер можна розцінювати як біомаркер старіння, стресу або раку.

Дані методичні рекомендації складені за результатами власних досліджень і мають за мету рекомендувати визначення та використання

показників експресії генів, асоційованих із теломеро-теломеразним комплексом, а також відносної довжини теломер у лімфоцитах периферичної крові (ПК) у якості додаткових біомаркерів наявності радіаційно-індукованих когнітивних розладів.

Дані методичні рекомендації розроблені у рамках науково-дослідної роботи відділу клінічної імунології та відділу радіаційної психоневрології Інституту клінічної радіології ДУ “Національного наукового центру радіаційної медицини НАМН України” „Визначення модифікуючого впливу іонізуючої радіації на генну регуляцію довжини теломер та апоптозу у розвитку цереброваскулярної патології у віддаленому періоді після опромінення” (УДК 612.014.48:577.21:616.831:616-001.28, № держреєстрації - 0110U000180, термін виконання 2010-12 рр.).

Методичні рекомендації призначені для лікарів у галузі психоневрології, радіаційної медицини та клінічної імунології.

## **1. Актуальність визначення молекулярного підґрунтя неврологічних ефектів в осіб, які зазнали ушкоджуючого впливу малих доз іонізуючої радіації після аварії на ЧАЕС**

Одним з факторів, вплив якого пов'язаний із порушенням генетичного апарату людини є вплив іонізуючої радіації. В останні роки зміни зі сторони центральної нервової системи пропонуються як один з найбільш виражених проявів ушкоджуючого впливу малих доз іонізуючої радіації, а розуміння молекулярного підґрунтя неврологічних ефектів може стати важливим для оцінки ризиків для здоров'я при медичному опроміненні, у працівників атомної енергетики та потенційному опроміненні населення.

При дослідженні учасників ліквідації наслідків аварії (УЛНА) на ЧАЕС у віддаленому періоді після опромінення необхідно враховувати, що у розвиток когнітивного дефіциту свій внесок робить вік та старіння організму. Сучасні молекулярні методи показали, що процес старіння є періодом відтворюваних динамічних генних змін. Рівень експресії одних генів зростає, тоді як інших знижується .

Множинні гени, які пов'язані із енергетичним метаболізмом, особливо мітохондріальною функцією та ланцюгами електронного транспорту, гіпоекспресуються із віком, в т.ч. асоційовані зі старінням та когнітивною функцією *agrin*, *Gap-43*, *Narp*, *Arc*, *Vgf*, нуклеопорін, *H2AZ*, протеїни трафіку (шаперони: *Hsp60*, *DnaJ*-подібний гомолог), гіперекспресуються гени, які асоційовані із гліальною функцією, запаленням, імунітетом та оксидативним стресом.

Старіння є біологічним процесом, що має вплив як на самі клітини так на організми в цілому. Не зважаючи на значний прогрес, що досягнутий за останні два десятиліття, наше розуміння біології старіння залишається неповним. Останнім часом важливу роль в біології розвитку старіння та захворювань, що пов'язані зі старінням надають теломерам.

Теломери спеціалізовані структури ДНК (дезоксирибонуклеїнова кислота), які розташовані на термінальних кінцях хромосом. Їх основна функція полягає в підтримці стабільності геному.

Теломери людини складаються з багатьох копій двох-ланцюгових послідовностей ДНК (TTAGGG), які закінчуються одно-ланцюговою послідовністю так званою “Т-петлею”.

Теломерний комплекс відіграє важливу роль, що захищає хромосому від ДНК пошкоджень, таких як “розриви” ДНК та активації p53 або p16<sup>INK4a</sup> шляхів, які зрештою призводять до клітинного старіння і апоптозу. У проліферуючих клітинах теломери поступово скорочуються під час кожного мітотичного ділення та зрештою клітини старіють. Таким чином, скорочення довжини теломер було визнано не тільки маркером біологічного старіння, але й механізмом з важливими функціональними наслідками. Спонтанна втрата теломер, яка відбувається за рахунок двониткового розриву, що аналогічно до розривів при дії іонізуючої радіації, може ініціювати нестабільність генома та генерувати багато типів хромосомних змін, що призводять до розвитку раку.

Також старіння може бути визначене як поступове зниження функцій в системах організму, що призводить до сповільнених відповідей на стрес і збільшення ризику хвороб, які асоційовані зі старінням. Наприклад, довжина теломер може бути скорочена у хворих на вікові дегенеративні хвороби, як наприклад хвороба Альцгеймера, атеросклероз та деменція, що пов’язана з цереброваскулярними захворюваннями.

Довжина теломер може бути потенційним біомаркером для точного розділення судинних та дегенеративних когнітивних розладів. Когнітивні функції знижуються з віком, а довжина теломер скорочується. Когнітивний дефіцит також супроводжує процес старіння і, тому, може корелювати з довжиною теломер. Heris et al. було знайдено зворотну кореляцію між вербальним тестом і довжиною теломер, але не спостерігалось жодних істотних взаємозв’язків з тестами на невербальне



міркування, вербальної декларативної пам'яті та скринінг на деменцію у пацієнтів, які мали 79 років. Контрастом є дослідження Valdes і інші., де були досліджені 382 пацієнта жіночої статті з широким діапазоном віку (середній вік 50 років, діапазон від 19 до 78 років) та знайдено кореляцію між довжиною теломер і когнітивними функціями на чотирьох з шести когнітивних тестів, окрім розпізнаванням образів і просторовими завданнями пам'яті. Ці дослідження доводять, що довжина теломер корелює з рівнем когнітивних функцій, та імовірно може бути біомаркером когнітивного старіння у пацієнтів перед настанням деменції.

Генетичні фактори вносять істотний внесок у варіативність когнітивних показників. Як частина комплексу діагностичних та прогностичних методів досліджень ступеню когнітивних розладів у опромінених осіб, нами пропонується використання даних відносної довжини теломер та експресії генів-регуляторів теломерно-теломеразного комплексу.

## **2. Психометрична діагностика і верифікація когнітивних розладів у постраждалих внаслідок Чорнобильської катастрофи**

Для психометричної діагностики порушень когнітивних функцій існує велика кількість різноманітних тестів. Незважаючи на великий вибір, практично у всіх у них спостерігається один з двох основних недоліків. Першим є тенденція до скорочення, коли використовується замало тестів і діагностика когнітивних розладів втрачає точність. Другим є надмірний об'єм різноманітних тестів, що, в свою чергу, знижує ефективність діагностики через виснаження пацієнта і використання занадто великої кількості зусиль і часу дослідника. Вирішення цієї проблеми полягає у використанні ретельно відібраних методів, спрямованих на оцінку саме характерних для того чи іншого патологічного процесу когнітивних розладів.

Діагностика тяжких когнітивних розладів (делірію, вираженої деменції, амнестичних розладів) вичерпно розроблена і представлена у відповідних психіатричних посібниках і не викликає особливих труднощів. В той же час, процедури діагностики і верифікації легких та помірних когнітивних порушень, які більш притаманні постраждалим внаслідок Чорнобильської катастрофи, потребують удосконалення та оптимізації проведення.

Відділ радіаційної психоневрології вже має багаторічний досвід оцінки когнітивних розладів. Протягом цього періоду для визначення когнітивних розладів використовувалися різноманітні нейропсихологічні батареї тестів. Останнім часом основним інструментом, який застосовувався саме для психометричної діагностики когнітивних розладів, була методика дослідження інтелекту для дорослих Д. Векслера (Wechsler Adult Intelligence Scale, WAIS). Цей тест є ефективним для об'єктивізації та експертизи когнітивних розладів. Однак досить великий об'єм завдань, істотна тривалість його проведення (від 45 хв. у здорових до кількох годин у дементних пацієнтів), потреба в наявності спеціально навченого кваліфікованого персоналу для його проведення суттєво обмежує його використання в рутинній клінічній практиці в якості скринінгової методики для диференціальної діагностики когнітивних розладів. Необхідним є інструмент, який би забезпечував достатній рівень оцінки когнітивних функцій, був простим, зручним і не забирав багато часу на його проведення .

На нашу думку, всім цим критеріям відповідає коротка шкала оцінки психічного статусу (Mini-Mental State Examination, MMSE). Окрім вище зазначених переваг, методика MMSE широко застосовується в більшості сучасних епідеміологічних та клінічних досліджень для скринінгу та оцінки когнітивних порушень, що підтверджує її валідність і придатність.

Шкала MMSE складається з ряду субтестів, які дозволяють швидко й ефективно оцінити орієнтування в часі, місці, а також стан

короткотривалої, довготривалої пам'яті, функцію мови, гнозиса, праксиса. Загальний бал вираховується шляхом сумачії балів по окремим субтестам (Додаток 1).

Окрім того, використання шкали MMSE доцільне, враховуючи можливість переведення (кореляції) балів, отриманих за допомогою тесту WAIS. Нижченаведена таблиця співставляє бали, отримані при проведенні тестів MMSE та WAIS (табл. 1).

Таблиця 1

***Критерії оцінки когнітивних порушень у дорослих на підставі порівняння значень тестів MMSE і WAIS***

Когнітивність	MMSE (бали)	WAIS, загальний IQ (бали)
Норма	28–30	90–140
Легкий когнітивний розлад	24–27	70–89
Деменція легкого ступеня	20–23	50–69
Деменція помірного ступеня	11–19	35–49
Важка деменція	≤10	≤34

### **3. Основні положення методів визначення відносної довжини теломер та відносного рівня експресії генів асоційованих із теломеро-теломеразним комплексом у клітинах периферичної крові постраждалих внаслідок Чорнобильської катастрофи**

#### ***3.1 Визначення відносної довжини теломер (RTL) методом flow-FISH (флуоресцентної гібридизації in situ з використанням проточної цитометрії)***

Одним із методів визначення відносної довжини теломер в ядерних гемопоетичних клітинах є метод flow-FISH (флуоресцентної гібридизації in situ з використанням проточної цитометрії) із використанням зв'язаних із флуоресцеїном зразків пептидної нуклеїнової кислоти (PNA).

Методика підготовки зразків складається з кількох етапів, а саме: попередня обробка, денатурація, гібридизація (1-й день); промивання, фарбування ДНК, аналіз (2-й день).

Необхідно приготувати клітинну суспензію, яка складається із суміші зразків клітин (ядерні гемопоетичні клітини хребетних) та контрольних клітин. В якості контрольних клітин використовують клітинну лінію 1301, яка є тетраплоїдною та має дуже довгі теломерні послідовності (>30 кілооснов). Клітинну лінію 1301 дуже легко відрізнити від більшості інших типів клітин завдяки її характерним ознакам: тетраплоїдності (видно по FL3) та довгим теломерам (видно по FL1).

Необхідні реактиви включають: гібридизаційний розчин (готовий до застосування); зразок теломерної PNA мічений FITC; розчин для промивання; розчин для зафарблення ДНК. Методика виконується 2 дні (табл. 2).

**Методика підготовки зразків для визначення відносної довжини  
теломер методом *flow-FISH***

1-ий день:

ПОПЕРЕДНЯ ОБРОБКА	Промивка дослідних та контрольних клітин в розчині, забуференому фосфатами.
	Підрахунок клітин в камері Горяєва.
	Змішати $2 \times 10^6$ дослідних клітин та $2 \times 10^6$ контрольних клітин. Додати розчин, забуферений фосфатами у кількості 6 мл. Розділити суміш на 4 однакові частини по 1.5 мл ( $1 \times 10^6$ клітин) та перенести у пробірки для мікроцентрифугування, які необхідно позначити літерами А, Б, В, Г.
	Центрифугувати всі зразки при 500 об./хв. Протягом 5 хв.
	Шляхом аспірації видалити супернатант.
ДЕНАТУРАЦІЯ	Додати 300 мкл гібридизаційного розчину до кожної з 2-х пробірок А та Б (контрольні пробірки) та 300 мкл РНА в гібридизаційному розчині міченої FITC до кожної з 2-х пробірок В та Г (дослідні пробірки). Перемішати за допомогою вихрової мішалки. Клітинні конгломерати ресуспендувати.
	4 пробірки розмістити у термошейкері, попередньо прогрітому до температури $+82^{\circ}\text{C}$ та залишити на 10 хв.
ГІБРИДИЗАЦІЯ	Залишити пробірки у темряві при кімнатній температурі $26-27^{\circ}\text{C}$ (на всю ніч).

2-ий день:

ПРОМИВАННЯ	Додати 1 мл розчину для промивання до кожної з 4-х пробірок та перемішати за допомогою вихрової мішалки.
	Розмістити пробірки у термошейкері, попередньо прогрітому до температури +40°C на 10 хв.
	Центрифугувати всі зразки при 500 об./хв протягом 5 хв.
	Обережно видалити супернатант у контейнер для відходів.
	До кожної пробірки для мікроцентрифугування додати 1 мл розчину для промивання та перемішати за допомогою вихрової мішалки.
	Розмістити пробірки у термошейкері, попередньо прогрітому до температури +40°C на 10 хв.
	Центрифугувати всі зразки при 500 об./хв протягом 5 хв.
	Видалити супернатант.
ЗАФАРБЛЕННЯ ДНК	Додати 0.5 мл розчину, який фарбує ДНК до кожної з 4-х пробірок та перемішати за допомогою вихрової мішалки.
	Перенести 4 зразки клітинних суспензій (А, Б, В, Г) у 4 пробірки для проточної цитометрії, які позначені літерами А, Б, В та Г. Ресуспендувати клітинну суспензію безпосередньо перед перенесенням задля того, щоб мінімізувати втрату клітин через їх прилипання до стінок пробірки.
	Залишити пробірки у темряві при температурі +2–8°C на 2–3 год.
АНАЛІЗ	Аналізувати зразки на проточному цитометрі, використовуючи логарифмічну шкалу для зразків А, Б та лінійну шкалу для зразків В, Г.

Зразки, які гібридизуються із пробою *PNA*, міченою *FITC*, мають показувати флуоресцентний сигнал по *FL1*, який вищий, ніж фоновий / аутофлуоресцентний сигнал, отриманий від зразків таких самих клітин, але гібридизованих за допомогою гібридизаційного розчину без проби *PNA*. Етапи графічного аналізу з встановленням регіонів дослідження наведено на рис. 1 а-б.

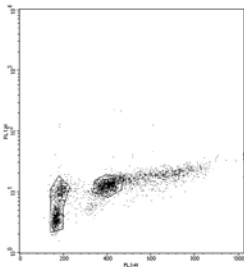


Рис.1 а. Аналіз у режимі *dot plot*: *FL1-H/FL3-H* (клітини, гібридизовані з гібридизаційним розчином без проби теломерної *PNA*). У виділених регіонах знаходяться як дослідні (мононуклеари людини), так і контрольні (лінія 1301) клітини у фазі G0/1.

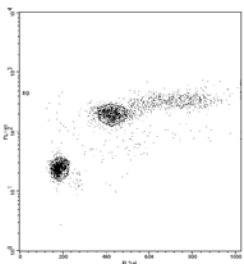


Рис.1 б. Аналіз у режимі *dot plot*: *FL1-H/FL3-H* (клітини, гібридизовані з гібридизаційним розчином з проби теломерної *PNA*). У виділених регіонах знаходяться як дослідні (мононуклеари людини), так і контрольні (лінія 1301) клітини у фазі G0/1.

Статистичні дані про клітини та їхні показники ДНК, які визначаються традиційним вимірюванням ДНК, потім використовують для розрахунку відносної довжини теломер (RTL) у дослідних клітин у порівнянні з контрольними клітинами наступним чином:

$$RTL = \frac{FL1 \text{ дослідн. клітин із } PNA\text{-зондом} - FL1 \text{ дослідн. клітин без } PNA\text{-зонда}}{FL1 \text{ контр. клітин із } PNA\text{-зондом} - FL1 \text{ контр. клітин без } PNA\text{-зонда}} \times 100$$

### ***3.2 Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі (визначення відносного рівня генної експресії)***

Для дослідження генної експресії був використаний метод полімеразної ланцюгової реакція (ПЛР) у реальному часі - лабораторний метод, який використовується для одночасної ампліфікації і вимірювання кількості даної молекули ДНК. Метод ПЛР в реальному часі включає одночасну детекцію та кількісне визначення специфічної послідовності ДНК у зразку. Метод базується на загальних принципах ПЛР. Основна відмінність полягає в тому, що вимірюється кількість ампліфікованої ДНК в реальному часі після кожного циклу ампліфікації. При дослідженні особливостей генної експресії у клітинах ПК при когнітивних дисфункціях у опромінених осіб нами проводилась ампліфікація кДНК за допомогою роботизованої системи 7900 HT Fast Real-Time PCR System із використанням TagMan технології.

Аналіз отриманих даних проводився за допомогою програмного забезпечення SDS2.3 та RQ-Manager. Показники відносного рівня генної експресії (RQ) розраховували за допомогою  $\Delta\Delta C_t$  порівняльного методу, де  $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{\text{зразок}}} - C_{t_{\text{ref}}})_{\text{контроль}} - (C_{t_{\text{зразок}}} - C_{t_{\text{ref}}})_{\text{опромін.}}$  і де оцінка співвідношення експресії дорівнює  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

Для проведення ПЛР-експерименту у реальному часі були виконані наступні кроки:

**I. Виділення РНК** із лейкоцитів периферичної крові за допомогою набору NucleoSpin RNAII та автоматичної станції QIAcube. Процес запуску системи складається з трьох кроків: завантаження зразків, завантаження буферів, завантаження адаптерів для роторів. Виділення тотальної РНК проводиться у автоматичному режимі шляхом стабілізації, лізису та гомогенізації клітин, додавання етанолу та зв'язування тотальної РНК, відмивки і DNase обробки та елюції тотальної РНК.



**II. Зворотна транскрипція** - процес утворення дволанцюгової ДНК на матриці одноланцюгової РНК. При зворотній транскрипції передача генетичної інформації відбувається у зворотному відносно транскрипції напрямку за допомогою зворотної транскриптази (ревертази). Подібно до всіх ДНК-полімераз, зворотна транскриптаза здатна функціонувати лише при наявності затравки. Під дією ревертази утворюється комплементарна ДНК (кДНК). Для синтезу нового ланцюга ферменту необхідна точка ініціації, дезоксинуклеотидфосфати (будівельний матеріал) та інгібітор рибонуклеаз.

Проведення реакції зворотної транскрипції є наступним етапом ПЛР у реальному часі. Готували реакційну суміш, яка містить складові необхідні для трансформації РНК у кДНК. Рівні об'єми зразку РНК (10µl) та реакційної суміші для проведення зворотної транскрипції (10µl) змішували. Отримані зразки переносили до термошейкери та проводили зворотну транскрипцію шляхом підтримки необхідного для цього процесу часового та температурного режиму. Робочі позиції термошейкери змінюють, як вказано у табл. 3.

Таблиця 3

***Робочі позиції термошейкери при проведенні зворотної транскрипції***

<b>Умови проведення зворотної транскрипції</b>	<b>Крок 1</b>	<b>Крок 2</b>	<b>Крок 3</b>	<b>Крок 4</b>
Температура	25 <sup>0</sup> С	37 <sup>0</sup> С	85 <sup>0</sup> С	4 <sup>0</sup> С
Час	10 хв.	120 хв.	5 хв.	необмежений час

**III. Ампліфікація кДНК** є останнім кроком у проведенні ПЛР-експерименту (рис. 2).

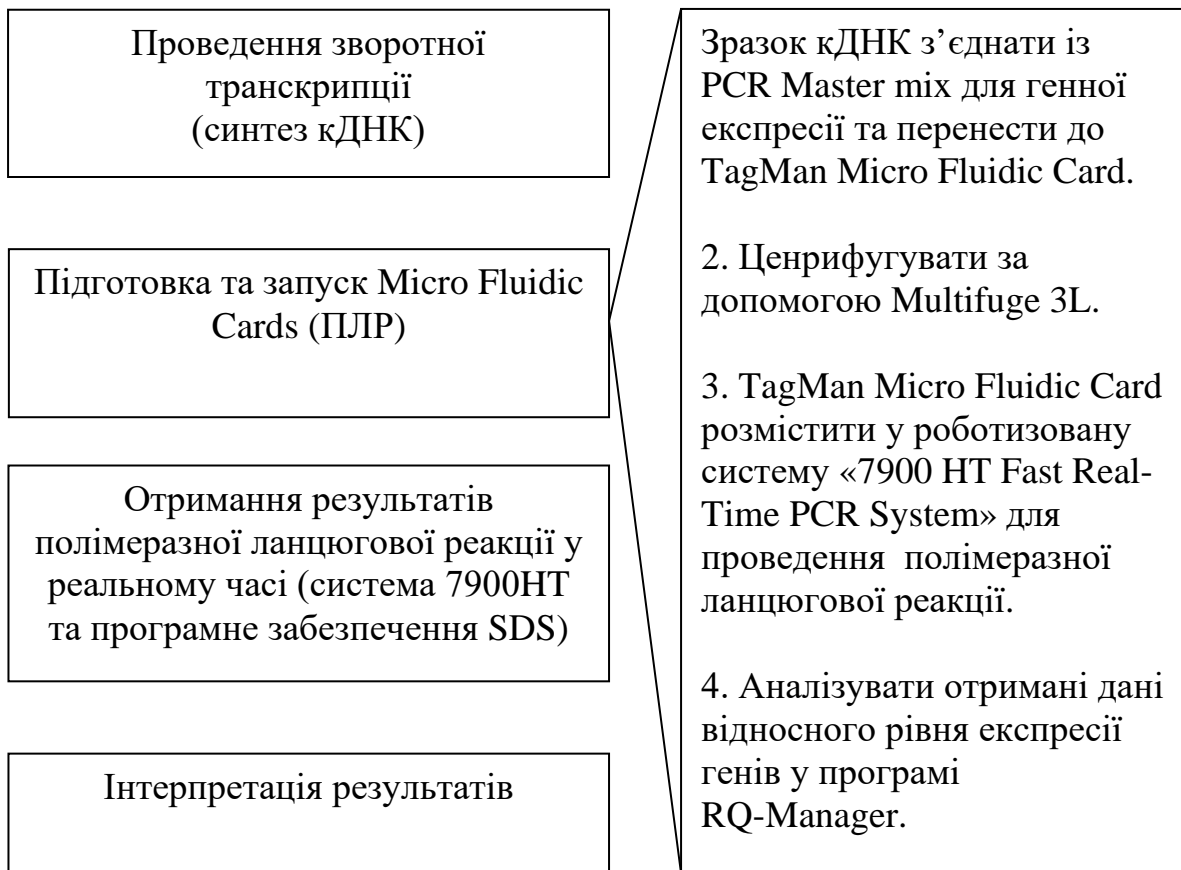


Рис.2 - Схема проведення ПЛР у реальному часі.

#### **4. Застосування молекулярно-генетичних досліджень теломеро-теломеразного комплексу клітин периферичної крові, як додаткового методу діагностики когнітивних дисфункцій в осіб, які зазнали ушкоджуючого впливу малих доз іонізуючої радіації після Чорнобильської катастрофи**

Проведене нами дослідження ґрунтувалося на визначенні відносних показників довжини теломер та експресії генів асоційованих із теломеро-теломеразним комплексом (TERT, TERF1, TERF2) у лейкоцитах ПК осіб із різним ступенем когнітивних розладів у віддаленому періоді після опромінення. Пропонується, в якості додаткового критерію у діагностиці когнітивних розладів після дії іонізуючого опромінення в малих дозах

використовувати генетичний аналіз лейкоцитів ПК людини із застосуванням методу flow-FISH для проточної цитометрії та ПЛР у реальному часі у комплексі із даними MMSE.

Аналіз вищезазначених показників здійснено на підставі обстеження 280 осіб із когнітивними розладами різного ступеня важкості та дозовим навантаженням в анамнезі у наступних діапазонах: 1 група: - 2-10 cSv, 2 група - 10-25 cSv, 3 група - 25-50 cSv, 4 група - >50 cSv. Контрольну групу склали 48 неопромінених осіб із когнітивними розладами різного ступеня важкості. Кількісна, вікова та дозова характеристика груп обстеження представлена у табл. 4.

Таблиця 4

***Кількісна, вікова та дозова характеристика груп обстеження***

<b>Групи обстеження</b> <i>(за ступенем дозового навантаження)</i>	<b>N</b>	<b>Вік</b> <b>M±SD</b> <b>min/max</b>	<b>Доза</b> <b>M±SD</b> <b>min/max</b>
1 (2-10 cЗв)	69	58.3±6.59 46/75	5.41±2.01 2.20/9.80
2 (10-25 cЗв)	81	56.6±7.94 45/76	18.59±4.58 10.0/25.0
3 (25-50 cЗв)	48	59.1±7.80 45/80	31.66±7.26 25.0/39.0
4 (>50 cЗв)	34	54,9±7,07 45/78	125.87±63.58 50.0/280.0
контроль	48	60,8±7,05 47/76	-
<i>загальна кількість</i>	<b>280</b>	-	-

Аналіз результатів відносної довжини теломер не показав статистично достовірних змін у групах 1 (2-10 сЗв) та 4 (>50 сЗв) порівняно із контролем.

Статистично достовірне зниження відносної довжини теломер встановлено у групах осіб із когнітивними розладами та дозою опромінення в інтервалах 10-50 сЗв та 25-50 сЗв (табл. 5).

Таблиця 5

***Відносна довжина теломер у лейкоцитах периферичної крові осіб із когнітивними розладами різного ступеня важкості***

Групи	RTL		t-value	p
	M	SD		
1 (2-10 сЗв)	16,26	2,27	1,55	0,12
2 (10-25 сЗв)	<b>15,89</b>	<b>2,56</b>	<b>2,42</b>	<b>0,02*</b>
3 (25-50 сЗв)	<b>15,85</b>	<b>2,43</b>	<b>2,24</b>	<b>0,02*</b>
4 (>50 сЗв)	16,36	1,95	1,56	0,12
контроль	17,21	2,01		

Примітка. \* - вірогідність розбіжностей з показниками контрольної групи  $p < 0,05$ .

Факторіальний аналіз даних за методом ANOVA показав наявність статистично значимих зв'язків між наявністю опромінення в анамнезі, наявністю когнітивного дефіциту за кількісними значеннями показника MMSE та довжини теломер (рис. 3).

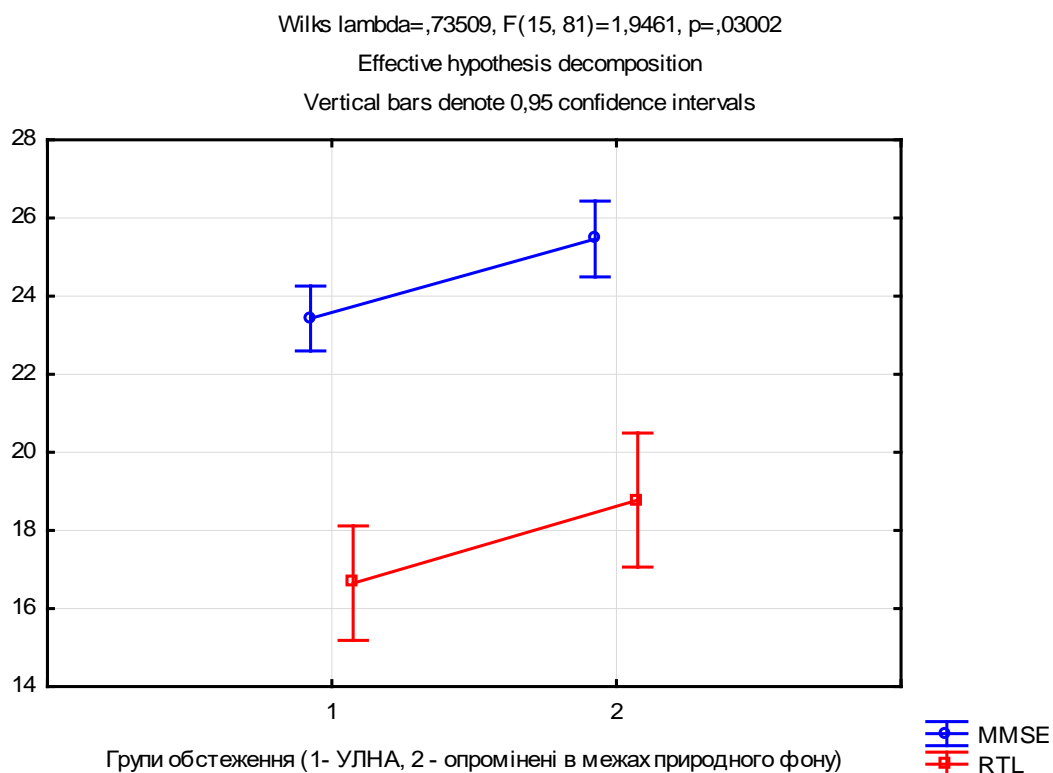


Рис. 3 - Результати аналізу ефективної гіпотези декомпозиції зв'язку когнітивного дефіциту, відносної довжини теломер та факту опромінення у УЛНА.

Дослідження експресії генів TERC1, TERC2, TERC в залежності від значень показника MMSE продемонструвало зростання рівня експресії генів-супресорів теломерази TERC1 та TERC2 у групах із когнітивними розладами різного ступеню важкості. Поряд з цим зафіксоване зниження експресії гену TERC залежно від ступеню важкості когнітивних розладів. Результати досліджень продемонстровано на рис. 4.

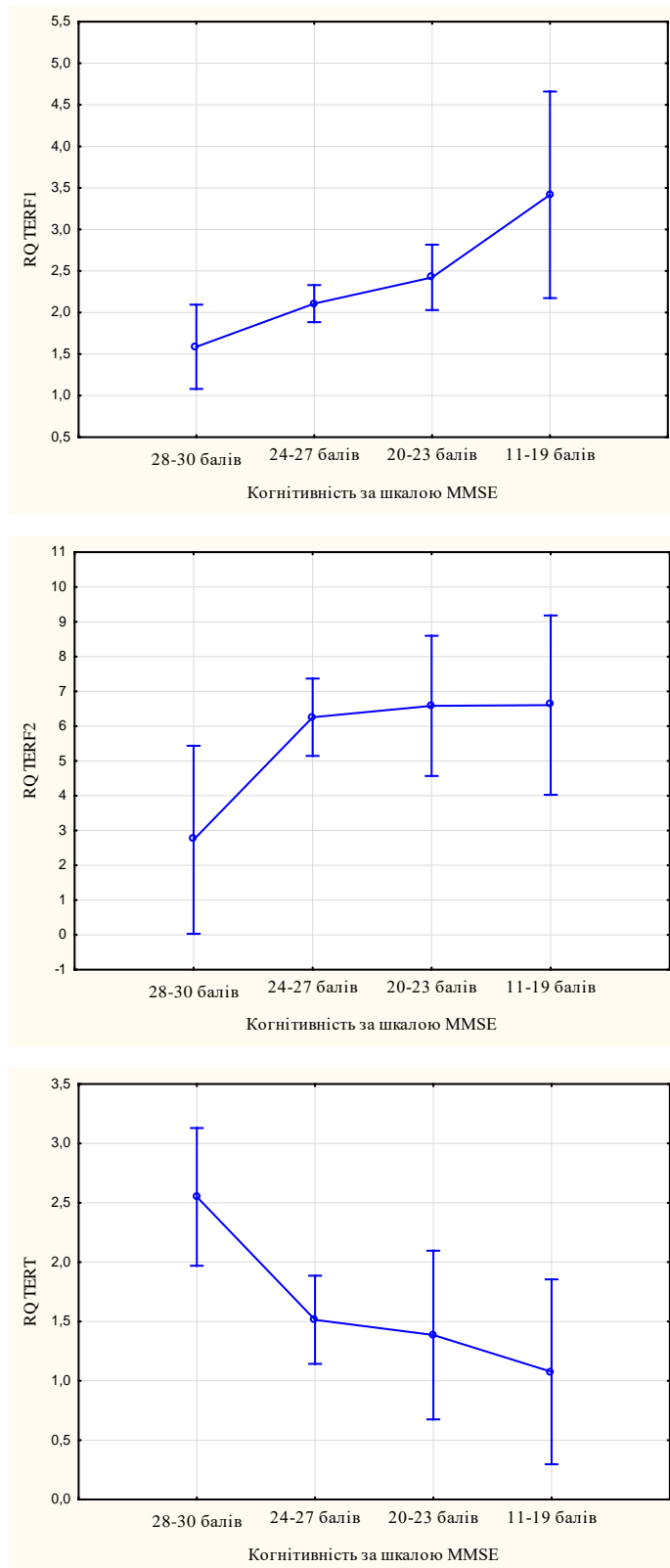


Рис. 4 – Відносний рівень експресії генів регуляторів довжини теломер TERF1, TERF2 та TERT при різних ступенях важкості когнітивних розладів.

На сьогодні дослідження генної експресії та відносної довжини теломер може стати додатковим та є біомаркером, який може бути рекомендованим для оптимізації діагностики когнітивних порушень, передчасного старіння та ступеня їх вираженості в опромінених осіб.

## ВИСНОВКИ

На підставі проведеного аналізу запропоновано вважати критеріями розвитку радіаційно-індукованих когнітивних розладів у постраждалих, опромінених в дозовому інтервалі 100-500 мЗв, наступні:

1. Стан когнітивної функції за показником MMSE менше 24 балів;
2. Відносну довжину теломер <15%.
3. Підвищений рівень експресії генів TERT та TERC на фоні зниженої експресії гену TERT.

Позитивний ефект від впровадження запропонованого методу діагностики включає:

- Значне розширення можливостей діагностики радіаційно пов'язаних порушень когнітивної функції після дії іонізуючої радіації для більше ніж 200 тис. учасників ЛНА 1986-1987 рр., а не тільки 134 хворих після гострої променевої хвороби.
- Підвищення ефективності методу за рахунок поєднання кількісних психометричних та молекулярних методів, що дозволяє використовувати технологію для визначення хронічної дії опромінення в професіональних рівнях (до 20 мЗв на рік), в т.ч. для персоналу об'єкту «Укриття», зони відчуження ЧАЕС.

Запропонована технологія дозволяє підвищити ефективність діагностики при ранніх проявах цереброваскулярної патології та сформувати групу ризику розвитку радіаційно-індукованих когнітивних розладів. Оптимізована діагностика у хворих на цереброваскулярну патологію з застосуванням пропонованої технології дозволяє зробити обґрунтований прогноз розвитку деменції, що має вирішальне значення для вибору індивідуальної терапевтичної тактики.

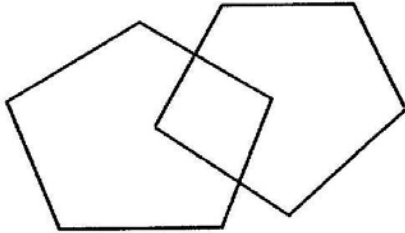


## ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Svenson U, Roos G Telomere length as a biological marker in malignancy. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792: 317–323.
2. Zhu, H. Healthy aging and disease: role for telomere biology? [Text] / H. Zhu, M. Belcher, P. van der Harst // *Clin Sci.* - 2011. - Vol. 120. - P. 427-40
3. Lukens, J. N. Comparisons of telomere lengths in peripheral blood and cerebellum in Alzheimer's disease [Text] / J. N. Lukens [et al.] // *Alzheimer Dement.* - 2009. - Vol. 5. - P. 463-469
4. Salthouse, T. A. Decomposing age correlations on neuropsychological and cognitive variables [Text] / T. A. Salthouse // *Journal of the International Neuropsychological Society.* - 2009. – Vol. 15(5). – P. 650–661
5. Mather, K. A. Cognitive performance and leukocyte telomere length in two narrow age-range cohorts: a population study [Text] / K. A. Mather [et al.] // *BMC Geriatr.* - 2010. -Vol. 16. - P. 10-62
6. Valdems, A. M. Leukocyte telomere length is associated with cognitive performance in healthy women [Text] / A. M. Valdems [et al.] // *Neurobiol Aging.* – 2010. - Vol. 31. №6. - P. 986-92
7. Bazyka Dmitry A. Cellular immunity and telomere length correlated with cognitive dysfunction in clean-up workers of the Chernobyl accident / D. Bazyka, K. Loganovsky, I. Ilienکو, S. Chumak [et al.] // *Clinical Neuropsychiatry.* – 2013. - № 6. - P. 280 - 281.
8. Ilienکو I. Analysis of relative telomere length and TERC1, TERC2 gene expression in blood cells of cleanup workers with cognitive impairment exposed after the Chernobyl accident / I. Ilienکو, K. Loganovsky, D. Bazyka // VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2014», Москва, Россия, 18–20 марта 2014 г. – 2014. – P. 147-148.

## Додаток 1

## Коротка шкала оцінки психічного статусу (MMSE)

Проба	Оцінка
Орієнтування у часі: Назвіть дату (число, місяць, рік, день тижня, пору року)	0 – 5
Орієнтування в місці: Де ми знаходимося? (країна, область, місто, клініка, поверх)	0 – 5
Сприйняття: Повторіть три слова: яблуко, копійка, стіл	0 – 3
Концентрація уваги і рахунок: Серійний рахунок («від 100 відняти 7») - п'ять разів або: Вимовте слово «земля» навпаки	0 – 5
Пам'ять : Пригадайте 3 слова, які були названі раніше	0 – 3
Мова: Показуємо ручку і годинник, запитуємо: «Як це називається?»	0 – 2
Просимо повторити речення: «Ніяких якщо, і або але»	0 – 1
Виконання: 3-етапної команди: «Візьміть правою рукою аркуш паперу, складіть його вдвічі і покладіть на стіл»	0 – 3
Читання: Прочитайте і виконайте: «Закрийте очі»	0 – 1
Письмо Напишіть речення	0 – 1
Копіювання Скопіюйте малюнок 	0 – 1
Загальний бал	0 – 30

Інструкції до застосування Короткої шкали оцінки психічного статусу  
(MMSE)

1. Орієнтування в часі. Попросіть хворого повністю назвати сьогоденне число, місяць, рік і день тижня. Максимальний бал (5) дається, якщо хворий самостійно і правильно називає число, місяць і рік. Якщо доводиться ставити додаткові питання, ставиться 4 бали. Додаткові питання можуть бути наступні: якщо хворий називає тільки число запитують «Якого місяця?», «Якого року?», «Який день тижня?». Кожна помилка чи відсутність відповіді знижує оцінку на один бал.

2. Орієнтування в місці. Задається питання: «Де ми знаходимося?». Якщо хворий відповідає не повністю, задаються додаткові питання. Хворий повинен назвати країну, область, місто, установу, в якій відбувається обстеження, номер кімнати (або поверх). Кожна помилка чи відсутність відповіді знижує оцінку на один бал.

3. Сприйняття. Дається інструкція: «Повторіть і постарайтеся запам'ятати три слова: «яблуко, копійка, стіл». Слова повинні вимовлятися максимально розбірливо зі швидкістю одне слово в секунду. Правильне повторення слова хворим оцінюється в один бал для кожного зі слів. Слід пред'являти слова стільки разів, скільки це необхідно, щоб випробуваний правильно їх повторив. Однак, оцінюється в балах лише перше повторення.

4. Концентрація уваги. Просять послідовно віднімати від 100 по 7. Досить п'яти вирахувань (до результату «65»). Кожна помилка знижує оцінку на один бал. Інший варіант: просять вимовити слово «земля» навпаки. Кожна помилка знижує оцінку на один бал. Наприклад, якщо вимовляється «ямлез» замість «ялмез» ставиться 4 бали, якщо «ямлзе» - 3 бали і т.д.

5. Пам'ять. Просять хворого згадати слова, які заучували в п.3. Кожне правильно назване слово оцінюється в один бал.

6. Мова. Показують ручку і запитують: «Що це таке?», Аналогічно - годинник. Кожна правильна відповідь оцінюється в один бал.

7. Просьба хворого повторити вищевказану складну в граматичному відношенні фразу. Правильне повторення оцінюється в один бал.

8. Виконання 3-етапної команди. Усно дається команда, яка передбачає послідовне здійснення трьох дій. Кожна дія оцінюється в один бал.

9. Читання. Дається письмова команда, хворого просять прочитати її і виконати. Команда повинна бути написані досить великими друкованими літерами на чистому аркуші паперу. За правильне виконання команди дається один бал.

10. Письмо. Хворий повинен самостійно написати осмислене і граматично закінчене речення. За правильне виконання команди дається один бал.

11. Копіювання. Хворому дається зразок (два пересічних п'ятикутника з рівними кутами), який він повинен перемалювати на нелінійованому папері. Якщо при перемальовуванні виникають просторові спотворення або нез'єднання ліній, виконання команди вважається неправильним. За правильне виконання дається один бал.

#### Інтерпретація результатів

Результат тесту виходить шляхом сумації результатів по кожному з пунктів. Максимально в цьому тесті можна набрати 30 балів, що відповідає найвищим когнітивним здібностям. Чим менше результат тесту, тим більш виражений когнітивний дефіцит.

30 - 28 балів - норма, порушення когнітивних функцій відсутнє

27 - 24 балів – легкий когнітивний розлад

23 - 20 балів - деменція легкого ступеня вираженості

19 - 11 балів - деменція помірного ступеня вираженості

10 - 0 балів - важка деменція