



ARTICOLO ORIGINALE

ORIGINAL ARTICLE

Sezione biogerontologica

Possibile relazione tra decadimento cognitivo e lunghezza dei telomeri

Possible relationship between cognitive impairment and telomere length

C. CIPRIANO^{1*}, S. TESEI^{1*}, M. MALAVOLTA^{1*}, F. MARCELLINI², C. GIULI², R. PAPA², F. LATTANZIO³, M. BLASCO⁴, E. MOCCHEGIANI¹

¹ Centro di Nutrigenomica e Immunosenescenza INRCA, Ancona; ² Centro di Gerontologia e Psicologia Sociale, INRCA, Ancona, Italia; ³ Direzione Scientifica INRCA, Ancona; ⁴ Istituto CNIO, Madrid, Spagna

Objective. The aim of this study is to assess a possible relationship between telomere length and cognitive function in old healthy subjects.

Methods. We analysed data from 132 healthy subjects (74 females; 58 males) age 60 to 97 years recruited within the framework of the European ZincAge Consortium. Peripheral blood was collected in EDTA and PBMCs were separated by ficoll-Histopaque gradient centrifugation. Telomere length were assessed by High-throughput quantitative FISH (Q-FISH). A decisional tree that uses as expansion method CHAID was used to stratify subjects and the association between telomere length and cognitive decline was evaluated.

Results. The shorting of telomeres observed with advancing age correlated with cognitive decline (MMSE), especially in subjects 65-80 yrs of age ($r = 0.267$; $p < 0.05$) (including males and females). A telomere length of ≤ 11.22 kb is associated with a severe cognitive impairment in 44.9% of cases.

Conclusions. The determination of telomere shortening in leukocytes may reflect degenerative neurological condition and could be a useful tool coupled with MMSE screening test to determine cognitive decline in elderly.

Key words: Telomeres • Cognitive impairment • Ageing

Introduzione

L'invecchiamento cognitivo non patologico è una delle maggiori cause della riduzione della qualità della vita. Le cause sono multifattoriali e includono sia fattori ambientali sia genetici ¹. È stato ipotizzato che lo stress ossidativo, attraverso la produzione di radicali liberi, contribuisce significativamente all'invecchiamento cellulare ². Il cervello è un organo particolarmente vulnerabile

■ * Gli Autori hanno contribuito in ugual misura al manoscritto.

■ Corrispondenza: dott.ssa Catia Cipriano, Laboratorio di Nutrigenomica e Immunosenescenza, Dipartimento Ricerche INRCA, via Birarelli 8, 60121 Ancona - Tel. +39 071 8004216 - Fax +39 071 206791 - E-mail: e.mocchegiani@inrca.it

al danno ossidativo con conseguente declino cognitivo e possibile insorgenza di malattie neurodegenerative³. Variazioni di alcuni geni come quelli preposti alla difesa antiossidante e che proteggono i neuroni da insulti esterni, come alcune neurotrofine appartenenti alla famiglia del BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), influenzano anche il declino cognitivo⁴. Recenti lavori hanno suggerito che lo stress ossidativo comporta un aumento di cellule senescenti che hanno come caratteristica un accorciamento della lunghezza di particolari complessi nucleari situati nella regione terminale del cromosoma, chiamati telomeri⁵. Il compito dei telomeri è quella di proteggere i cromosomi dalla perdita di informazioni durante la duplicazione cellulare⁶. Con l'avanzare dell'età durante ogni divisione cellulare una piccola quantità di DNA viene persa portando a telomeri sempre più corti con conseguente alterata struttura telomerica e ridotta capacità replicativa⁷, scatenando in tal modo la senescenza cellulare⁵. Studi sui linfociti hanno mostrato una correlazione positiva tra l'accorciamento dei telomeri e la demenza vascolare⁶. Questi studi potrebbero essere pertanto indicativi per un ruolo dell'accorciamento dei telomeri anche sul declino cognitivo nelle persone anziane. D'altra parte un accorciamento dei telomeri è un marker prognostico per il declino cognitivo e la demenza nei pazienti colpiti da ictus⁸. Per cui, lo scopo del presente lavoro è quello di valutare una possibile associazione tra lunghezza dei telomeri e funzione cognitiva in soggetti anziani sani.

Materiali e metodi

RECLUTAMENTO SOGGETTI

Lo studio includeva 132 donatori sani (74 Femmine; 58 Maschi) di età compresa tra i 60 e 97 anni reclutati nel contesto del progetto europeo ZINCAGE. Tutti i soggetti erano in buono stato di salute, indipendenti, non richiedevano speciali cure e non avevano ricevuto trattamenti terapeutici per almeno 2-3 mesi prima del reclutamento.

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DELLE CELLULE MONONUCLEATE DA SANGUE PERIFERICO (LINFOMONOCITI)

I campioni di sangue sono stati raccolti con provette contenenti eparina. Sono stati separati nei loro componenti cellulari mediante Ficoll (gradiente di densità $d = 1,077$) centrifugando

a 450g per 15 minuti alla temperatura di 20°C. Tutti campioni presentavano una vitalità > 90% (colorazione Tripan blue). Aliquote di 2×10^6 cellule/ml erano congelate in siero fetale bovino contenente 10% di dimetil solfossido in azoto liquido prima dell'uso.

DETERMINAZIONE DELLA LUNGHEZZA DEI TELOMERI

La determinazione della lunghezza dei telomeri è stata determinata con la tecnica HT Q-FISH con sonde telomeriche fluorescenti a PNA presso l'Istituto CNIO (Madrid, Spagna)⁹. Il numero totale dei nuclei analizzati è 1000 per soggetto.

DATI PSICOLOGICI

I dati psicologici sulla funzione cognitiva negli individui anziani sono stati ottenuti usando test e questionari approntati presso l'Istituto Nazionale Riposo e Cura per Anziani (INRCA Ancona) descritti in Marcellini et al., 2006 nell'ambito del progetto Zincage. In particolare il test di screening MMSE (*mini mental state examination*) è stato usato per valutare lo stato cognitivo, includendo orientamento, attenzione, concentrazione, linguaggio e l'abilità di seguire semplici comandi verbali e scritti. Il punteggio 24-30 indica una normale funzione cognitiva, 18-23 indica un indebolimento cognitivo leggero e 0-17 indica indebolimento cognitivo severo¹⁰.

ANALISI STATISTICA

La variabile MMSE, è stata suddivisa in terzili. I valori dei due terzili che definivano la variabile in tre gruppi erano: 23 e 28.

Poiché i valori del primo terzile per il MMSE corrispondono con i valori soglia generalmente utilizzati per individuare uno stato di declino cognitivo tale suddivisione è stata mantenuta in tutte le successive analisi.

Un albero decisionale che sfrutta come metodo di espansione l'algoritmo CHAID (*Chi-squared Automatic Interaction Detector*), basato sul Chi-quadro, è stato applicato per stratificare la popolazione in gruppi all'interno dei quali è stata valutata l'influenza della lunghezza dei telomeri sullo stato di declino cognitivo. Per ogni passaggio, il CHAID sceglie la variabile (predittore) indipendente (i.e. lunghezza dei telomeri) con la più forte interazione con la variabile dipendente. Le categorie di ogni predittore sono unite se non sono diverse in modo rilevante dalla variabile dipendente. Il processo di suddivisione in sottogruppi viene ripetuto dal CHAID fino a quando non viene incontrata una delle regole di

terminazione. Nel nostro caso sono state applicate le seguenti regole di terminazione: minimo numero di nodi padre/figlio = 10/5; Epsilon = 0.0010 e numero massimo di interazioni = 100 quali criteri di convergenza.

Le correlazioni tra le variabili sono state studiate utilizzando il coefficiente rho di Spearman poiché le variabili non seguivano una distribuzione gaussiana.

Risultati

ALBERO DECISIONALE E CORRELAZIONE TRA LUNGHEZZA DEI TELOMERI E FUNZIONE COGNITIVA (MMSE)

Usando l'algoritmo CHAID e suddividendo la popolazione in terzili in base al grado di MMSE, il 36,4% dei soggetti mostra un indebolimento cognitivo severo, il 32,6% dei soggetti ha un indebolimento cognitivo leggero mentre il 31,1% ha invece una normale funzione cognitiva non evidenziando differenze tra i soggetti in base al MMSE (Fig. 1). Invece, scegliendo l'età come variabile indipendente e suddividendo i soggetti in tre classi: ≤ 65 , 65-80 e > 80 anni, il modello CHAID indicava che l'età era un fattore determinante primario per l'indebolimento cognitivo. Come evidenziato nella Fig. 1, con l'avanzare dell'età si assiste ad un significativo aumento dei soggetti con indebolimento cognitivo severo (57,5%), mentre nella classe di età < 65 anni si evidenzia un numero molto ridotto di soggetti con indebolimento cognitivo severo (4,2%) e un numero invece molto elevato di soggetti con una normale funzione cognitiva (58,3%). Nella classe di età compresa tra 65 e 80, la percentuale di soggetti con differenti valori di MMSE è invece simile mostrando una distribuzione uniforme come nella suddivisione fatta in precedenza in terzili (Fig. 1). Per cui, questa classe di età si presta abbastanza per evidenziare una possibile relazione tra la lunghezza dei telomeri e il MMSE. Prendendo come cut-off per la lunghezza dei telomeri 11,22 kb come suggerito dall'algoritmo CHAID, il 44,9% dei soggetti con indebolimento cognitivo severo mostra una più corta lunghezza dei telomeri ($\leq 11,22$ kb) mentre solo il 20,4% mostra una funzione cognitiva normale con telomeri $\leq 11,22$ kb (Fig. 1). Per converso, vi è una più ampia popolazione con funzione cognitiva normale (63,2%) e una lunghezza di telomeri superiore a 11,22 kb (Fig. 1).

Questi dati evidenziano pertanto anche in questa classe di età una stretta interrelazione tra

lunghezza dei telomeri e MMSE con una correlazione positiva tra la lunghezza dei telomeri e il punteggio MMSE ($r = 0,267$; $p < 0,05$). Esiste una correlazione positiva tra la lunghezza dei telomeri e il punteggio MMSE nei maschi ($r = 0,451$; $p < 0,05$), ma non nelle femmine di età compresa tra 65 e 80 anni ($r = 0,223$; $p > 0,05$). Effettuando una correzione per età la relazione tra i due parametri considerati non mantiene la significatività ($r = 0,184$; $p > 0,05$).

Discussione

Nonostante i dati della letteratura sono concordi nella maggiore incidenza di demenza nelle donne¹¹ ed una maggiore erosione telomerica nelle donne al di sopra di 80 anni⁹, noi abbiamo trovato una correlazione positiva tra erosione dei telomeri e indebolimento cognitivo solo nei soggetti tra i 65 e 80 anni includendo sia i maschi che le femmine. Tale correlazione è mantenuta nei maschi di pari età ma non nelle femmine. Tuttavia, tale correlazione non si mantiene effettuando una correzione per età. Questi dati, nel loro complesso, suggeriscono che c'è una potenziale relazione tra l'erosione dei telomeri e il declino cognitivo che è età e sesso dipendente anche se non sono l'uno la causa dell'altro. Precedenti studi hanno evidenziato come il danno ossidativo gioca un ruolo nel mediare il declino delle performance cognitive età associate e che esiste una stretta relazione tra la lunghezza dei telomeri, danno ossidativo e capacità antiossidante⁵. Con l'avanzare dell'età il danno ossidativo aumenta con un'alta produzione di ROS, i quali a loro volta inducono un accorciamento dei telomeri⁶. La lunghezza dei telomeri è soprattutto determinata dalla relazione tra lo stress ossidativo e la capacità delle difese antiossidanti dell'individuo. Se la capacità antiossidante viene meno, i telomeri sotto l'influsso della produzione di radicali liberi da aumentati ROS, si accorciano e inducono una alterata proliferazione cellulare portando la cellula a senescenza. Questo fenomeno è stato evidenziato in vitro in varie condizioni di stress, come ipossia, sia nei fibroblasti umani¹² sia in cellule nervose⁵ comportando di conseguenza la possibile insorgenza di patologie degenerative. Non è un caso che un accorciamento dei telomeri è stato dimostrato in sindromi di invecchiamento precoce, come la sindrome di Down¹³, la quale oltre al danno cellulare presenta demenza e un forte declino cognitivo¹⁴.

Per cui, l'accorciamento dei telomeri e come evidenziato recentemente anche l'accumulo di cellule senescenti con telomeri corti nei soggetti anziani con ipertensione¹⁵, sotto l'influenza dello stress ossidativo, può contribuire ad un declino generale di molti meccanismi omeostatici, incluse le funzioni cerebrali, che si verificano con l'avanzare dell'età. La determinazione della lunghezza dei telomeri nei linfomonociti può perciò rappresentare una buona misura di questo declino, perché riflette la capacità dei leucociti di proliferare in risposta allo stress ossidativo⁶. In conclusione, l'accorciamento dei telomeri testato nei leucociti potrebbe riflettere quello che si verifica a livello cerebrale e come tale potrebbe essere un ulteriore utile strumento associato al test di screening MMSE per stabilire il declino cognitivo.

Obiettivo. L'obiettivo del presente lavoro è quello di valutare una possibile associazione tra lunghezza dei telomeri e funzione cognitiva in soggetti anziani sani.

Metodo. Lo studio includeva 132 donatori sani (74 Femmine; 58 Maschi) di età compresa tra i 60 e 97 anni reclutati nel contesto del progetto europeo ZINCAGE. I campioni di sangue raccolti sono stati separati nei loro componenti cellulari per la determinazione della lunghezza dei telomeri tramite tecnica HT Q-FISH. I dati sulla funzione cognitiva sono stati ottenuti usando il *mini-mental state examination*. Un albero decisionale che sfrutta come metodo di espansione l'algoritmo CHAID, è stato applicato per stratificare la popolazione in gruppi, all'interno dei quali è stata valutata l'influenza della lunghezza dei telomeri sullo stato cognitivo.

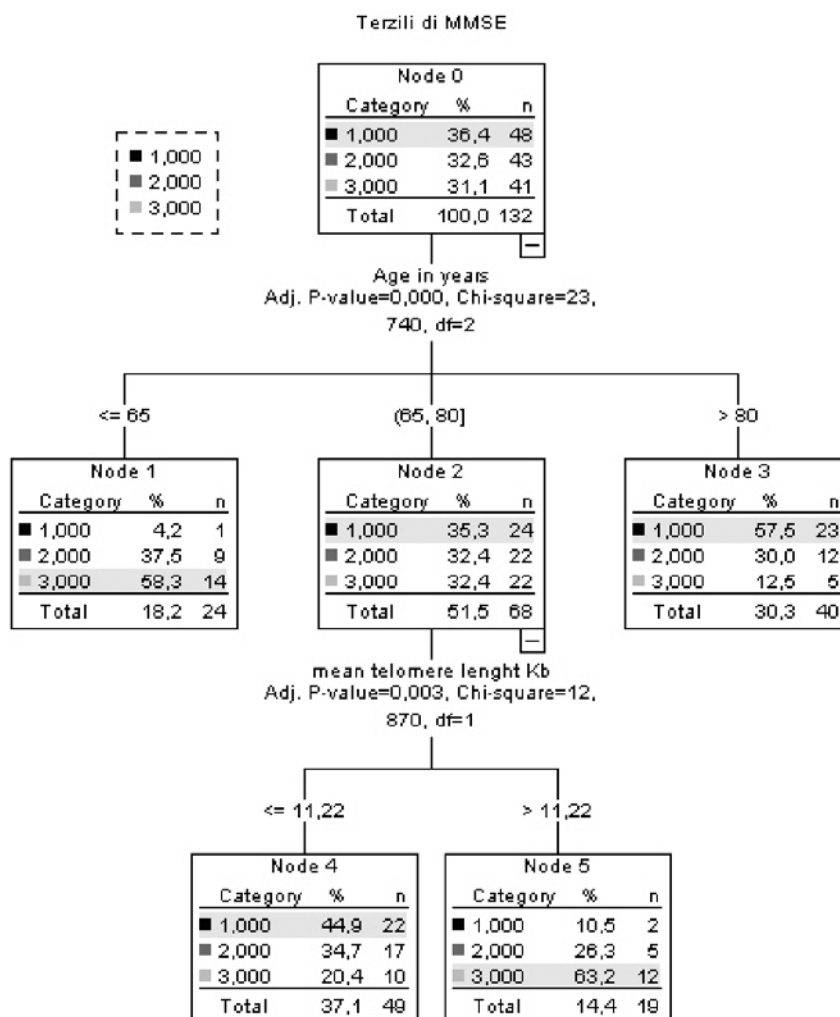
Fig. 1. Albero decisionale.

Dopo la suddivisione del MMSE in terzili, la percentuale dei soggetti anziani da 60 a 97 anni di età con indebolimento cognitivo severo (A), leggero (B) o normale (C) è simile (Nodo 0). Quando vengono suddivisi per classi di età, MMSE normale è presente nella grande maggioranza dei soggetti (58,3%) con età ≤ 65 anni (Nodo 1), mentre è presente nella minoranza dei soggetti (12,5%) con età > 80 anni, la maggioranza (57,5%) dei quali invece ha un indebolimento cognitivo severo (A) (Nodo 3). La percentuale dei soggetti di età compresa tra 65 e 80 anni è invece simile nei tre terzili del MMSE (Nodo 2). La successiva suddivisione in questa classe di età per la lunghezza dei telomeri (≤ 11,22 kb e > 11,22 kb) evidenzia che l'accorciamento dei telomeri (≤ 11,22 kb) e severo indebolimento cognitivo (A) sono presenti nel 44,9% dei soggetti anziani (Nodo 4). Per converso, la lunghezza dei telomeri (> 11,22 kb) associata ad una normale performance cognitiva (C) è presente nel 63,2% dei soggetti anziani (Nodo 5), suggerendo che un accorciamento dei telomeri è associato ad un indebolimento cognitivo in tutte le classi di età considerate.

1,000 = A = indebolimento cognitivo severo

2,000 = B = indebolimento cognitivo leggero

3,000 = C = funzione cognitiva normale



Risultati. L'accorciamento dei telomeri che si osserva con l'avanzare dell'età si correla positivamente con il declino cognitivo (MMSE), in particolare nella classe di età compresa tra 65 e 80 ($r = 0,267$; $p < 0,05$) (includendo sia maschi che femmine) dove alla lunghezza telomerica di $\leq 11,22$ kb si associa un indebolimento cognitivo severo nel 44,9%.

Conclusioni. L'accorciamento dei telomeri testato nei leucociti potrebbe riflettere quello che si verifica a livello cerebrale e come tale potrebbe essere un ulteriore utile strumento associato al test di screening MMSE per stabilire il declino cognitivo.

Parole chiave: Telomeri • Indebolimento cognitivo • Invecchiamento

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Fillit HM, Butler RN, O'Connell AW, Albert MS, Birren JE, Cotman CW, et al. *Achieving and maintaining cognitive vitality with aging.* Mayo Clin Proc 2002;77:681-96.
- ² Harman D. *Role of free radicals in aging and disease* Ann N Y Acad Sci 1992;673:126-41.
- ³ Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. *Neurodegenerative diseases and oxidative stress.* Nat Rev Drug Discov 2004;3:205-14.
- ⁴ Tapia-Arancibia L, Aliaga E, Silhol M, Arancibia S. *New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease.* Brain Res Rev 2008;59:201-20.
- ⁵ Von Zglinicki T. *Oxidative stress shortens telomeres.* Trends Biochem Sci 2002;27:339-44.
- ⁶ Saretzki G, Von Zglinicki T. *Replicative aging, telomeres, and oxidative stress.* Ann N Y Acad Sci 2002;959:24-9.
- ⁷ Shawi M, Autexier C. *Telomerase, senescence and ageing.* Mech Ageing Dev 2008;129:3-10.
- ⁸ Martin-Ruiz C, Dickinson HO, Keys B, Rowan E, Kenny RA, Von Zglinicki T. *Telomere length predicts poststroke mortality, dementia, and cognitive decline.* Ann Neurol 2006;60:174-80
- ⁹ Canela A, Vera E, Klatt P, Blasco MA. *High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies.* Proc Natl Acad Sci 2007;104:5300-5.
- ¹⁰ Marcellini F, Giuli C, Papa R, Malavolta M, Mocchegiani E. *Psychosocial aspects and zinc status: is there a relationship with successful aging?* Rejuvenation Res 2006;9:333-7.
- ¹¹ Schmidt R, Kienbacher E, Benke T, Dal-Bianco P, Delazer M, Ladurner G, et al. *Sex differences in Alzheimer's disease.* Neuropsychiatr 2008;22:1-15.
- ¹² Lorenz M, Saretzki G, Sitte N, Metzkwow S, von Zglinicki T. *BJ fibroblasts display high antioxidant capacity and slow telomere shortening independent of hTERT transfection.* Free Radic Biol Med 2001;31:824-31.
- ¹³ Vaziri H, Schächter F, Uchida I, Wei L, Zhu X, Effros R, et al. *Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes.* Am J Hum Genet 1993;52:661-7.
- ¹⁴ Das JP, Divis B, Alexander J, Parrila RK, Naglieri JA. *Cognitive decline due to aging among persons with Down syndrome.* Res Dev Disabil 1995;16:461-78.
- ¹⁵ Cipriano C, Tesesi S, Malavolta M, Giacconi R, Muti E, Costarelli L, et al. *Accumulation of senescent cells with short telomeres is associated with impaired zinc homeostasis and inflammation in old hypertensive subjects.* J Gerontol Biol Sci 2009;106:4360-5.