

УДК 616.379-008.64:616.13-004.6:575.1
DOI: [https://doi.org/10.31612/2616-4868.4\(10\).2019.06](https://doi.org/10.31612/2616-4868.4(10).2019.06)

СВЯЗЬ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР, АКТИВНОСТИ ТЕЛОМЕРАЗЫ И МАРКЕРОВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА У ПАЦИЕНТОВ С ЦЕРЕБРАЛЬНЫМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ И САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА

М. С. Егорова¹, Д. С. Красненков², В. Г. Гурьянов³, В. Е. Кондратюк³, В. М. Кухарский²

¹ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ имени В. П. Комисаренко НАМН Украины», г. Киев, Украина

²ГУ «Институт геронтологии имени Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины», г. Киев, Украина

³«Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца», г. Киев, Украина

Резюме

Цель работы – определение взаимосвязи длины теломер и активности теломеразы с показателями оксидативного стресса у пациентов с церебральным атеросклерозом (ЦА) 1-3-й стадий и сахарным диабетом 2-го типа (СД2).

Материалы и методы. В комплексном клинико-инструментальном исследовании приняли участие 161 пациент с ЦА 1-3-й стадий. Теломеразную активность определяли с помощью протокола амплификации тандемных повторов с детекцией в реальном времени. Относительные длины теломер измеряли с помощью мультиплексной количественной полимеразой цепной реакции в реальном времени.

Результаты исследования и их обсуждение. В результате сравнительного анализа выявлено, что у пациентов с ЦА 1-3-й стадий с длинными теломерами был значимо более высокий уровень каталазы, чем в группе с короткими теломерами, а в группе с высокой активностью теломеразы уровень каталазы и СОД – значимо ниже, чем в группе с низкой активностью теломеразы. При проведении корреляционного анализа были выявлены значимые прямые связи длины теломер с такими маркерами оксидативного стресса, как каталаза и СОД ($r=0,23$ и $r=0,21$ соответственно), и активности теломеразы с GSH ($r=0,48$). Также выявлена обратная связь длины теломер с СД2 ($r= -0,21$). С другими маркерами оксидативного стресса длина теломер и активность теломеразы не коррелировали.

Выводы. У пациентов с ЦА 1-3-й стадий выявлена ассоциация некоторых маркеров оксидативного стресса (каталаза, СОД, глутатион) с длиной теломер и активностью теломеразы вне зависимости от наличия сопутствующего СД2. У пациентов с ЦА 1-3-й стадий с более длинными теломерами уровень каталазы был статистически значимо выше, чем у пациентов с короткими теломерами. Для пациентов с ЦА 1-3-й стадий, имеющих более высокую активность теломеразы, характерны статистически значимо более низкие уровни каталазы и СОД по сравнению с показателями пациентов с более низкой активностью теломеразы. Наиболее устойчивая прямая корреляционная связь у данной категории пациентов обнаружена между GSH и активностью теломеразы ($r=0,48$), что может свидетельствовать о ключевой роли GSH в скорости укорочения теломер и развития атеросклероза.

Ключевые слова: длина теломер, активность теломеразы, оксидативный стресс, церебральный атеросклероз

ВВЕДЕНИЕ

Хроническая ишемия мозга (ХИМ) – медленно прогрессирующая недостаточность кровоснабжения мозга, приводящая к постепенному нарушению его

функционирования с развитием многоочагового или диффузного ишемического поражения вследствие хронической гипоперфузии церебральных структур и проявляющаяся комплексом неврологических

и нейропсихологических нарушений. Термин «ХИМ» введен в Международную классификацию болезней десятого пересмотра (МКБ-10): Рубрика 167.8 – ишемия мозга хроническая (Other specified cerebrovascular diseases: Cerebral ischaemia (chronic)). В нашей стране этот термин используется вместо более широкого определения, включающего в том числе последствия острых сосудистых мозговых нарушений – «дисциркуляторная энцефалопатия». Развитие современных методов нейровизуализации показало, что существует возможность оценки снижения мозгового кровотока и метаболизма, и подтвердило правомерность выделения ХИМ.

Механизмы, по которым формируется хроническое ишемическое поражение головного мозга, включают элементы нейродегенерации и воспаления преимущественно в белом веществе мозга. Гиперфузия сопровождается вовлечением в патологический процесс коры больших полушарий в относительно меньшей степени. Таким образом, ключевая роль в ряде изменений вследствие ХИМ у подавляющего большинства больных принадлежит не первичному поражению тех или иных корковых зон или систем, а нарушению связей между различными корковыми отделами и корковыми образованиями и субкортикальными структурами, приводящему к их разобщению. Выяснение механизмов биохимических изменений при развитии цереброваскулярных заболеваний является одной из главных проблем современной медицины.

Известно, что в последние годы среди сосудистых болезней мозга отмечается увеличение ишемических форм. С учетом прогрессирующего старения населения планеты проблема цереброваскулярных заболеваний обещает оставаться актуальной и в будущем. В условиях хронической церебральной ишемии запускается каскад биохимических реакций в ткани головного мозга, приводящий к внутриклеточному накоплению свободных радикалов, активации процессов перекисного окисления липидов, избыточной генерации активных форм кислорода и, как следствие, гибели нейронов. Как и в других тканях, в мозге есть антиоксидантная система (супероксиддисмутаза – СОД, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатион – GSH), которая защищает его от свободных радикалов. Церебральная ткань восприимчива к окислительному стрессу из-за ее высокой потребности в кислороде. Система GSH необходима для защиты нейронов в условиях окислительного стресса [15, 17].

У пациентов старшей возрастной группы хроническая ишемия мозга часто развивается на фоне сахарного диабета (СД) 2-го типа, который является одним из наиболее распространенных заболеваний во всем мире. Число больных СД стремительно растет. По прогнозам экспертов ВОЗ, к 2025 году общее число

больных может достичь 380 миллионов. При сочетании ХИМ и СД нарушается баланс в системе окислители/антиоксиданты. Установлено, что механизмы антиоксидантной защиты универсальны для всех живых [14]. По мере развития современных представлений становится все более понятной роль оксидативного стресса, представляющего собой дисбаланс между прооксидантами и антиоксидантными защитными механизмами организма, как центрального звена патогенеза ряда острых и хронических состояний и заболеваний, таких как атеросклероз, СД, ишемия и др. [14]. Прооксидантные элементы включают все факторы, которые играют активную роль в повышенном образовании свободных радикалов или других активных форм кислорода (АФК). В этих процессах могут участвовать как клеточные механизмы (дефекты в митохондриальном дыхании, специфические ферменты), так и экзогенные. Одним из важнейших последствий образования АФК является избыточная и неконтролируемая активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Избыточная активация ПОЛ может возникать вследствие резких изменений кислородного режима клетки. При том, что гипероксия является причиной временного усиления процессов ПОЛ, стойкая гипоксия приводит к лавинообразному накоплению токсичных продуктов перекисного окисления. Продукция АФК и, соответственно, интенсивность процессов ПОЛ в клетках резко возрастают под действием на организм различных стрессорных факторов химической, физической и биологической природы [14]. В конечном итоге все эти воздействия могут приводить к напряжению и последующей декомпенсации механизмов антиоксидантной защиты организма и развитию оксидативного стресса, проявляющегося на клеточном, тканевом и органном уровнях.

Для большинства заболеваний оксидативный стресс является следствием основной патологии; неконтролируемое распространение токсичных радикалов вызывает больше клеточных повреждений, чем основное заболевание. Оксидативный стресс участвует в возникновении генерализованных изменений проницаемости капилляров и тканевой диффузии, что характерно для полиорганной недостаточности. АФК и продукты ПОЛ оказывают прямое деструктивное действие на внутренние органы и приводят к развитию полиорганной недостаточности после тяжелых травм и обширных ожогов. Многочисленные публикации обзорного и экспериментального характера, а также клинические исследования свидетельствуют о фундаментальном значении АФК и ПОЛ в патогенезе различных заболеваний.

Главным механизмом антиоксидантной защиты в естественных условиях является фермент СОД, окислительность которой позволяет инактивировать свободные радикалы в месте образования, не допуская их диффузии. Еще одним биохимическим звеном

антиокислительной системы является разложение с помощью каталазы и ферментов семейства глутатионпероксидаз перекиси водорода до нетоксичных метаболитов и воды. Одним из ферментов антиоксидантной системы организма человека, имеющих высокую концентрацию в эритроцитах, служит каталаза. Каталаза метаболизирует пероксид водорода, предотвращая его накопление в клетке, с образованием воды и кислорода. Каталаза и СОД защищают микроорганизмы от экзогенных и эндогенных окислительных стрессов, нейтрализуя свободные кислородные радикалы. Основным внутриклеточным антиоксидантом с мощным детоксикационным действием является GSH. Важнейшая роль GSH как антиоксиданта объясняется высоким восстановительным потенциалом молекулы и высокой внутриклеточной концентрацией (миллимолярный уровень). Система GSH связывает свободные радикалы, восстанавливает перекиси, а также продукты перекисного окисления липидов, фосфолипидов мембран, белков, нуклеиновых кислот и выводит их из организма в виде нетоксичных конъюгатов. Синтез и метаболизм GSH изменяется при церебральном атеросклерозе и СД. Увеличение количества активных форм кислорода в условиях гипергликемии приводит к разрушению клеток. Установлено снижение концентрации GSH в эритроцитах и плазме крови пациентов с СД, что связано с увеличением количества активных форм кислорода. Причины усиления свободнорадикального окисления при СД 2-го типа (СД2) многочисленны, важнейшими из них являются гипергликемия, гликирование белков и активация сорбитолового пути. Снижение уровня глутатиона и антиоксидантных ферментов является одним из ведущих факторов в развитии процессов хронической церебральной ишемии и СД2, а также старения.

Одной из причин разной скорости старения сердца и сосудов у пациентов с СД2 является изначально разная генетическая защищенность от воздействия внешних факторов. Длина теломер и активность теломеразы могут претендовать на роль генетических маркеров биологического возраста сосудов. Теломеры — это концевые участки линейной молекулы ДНК, постепенно укорачивающиеся при каждом делении клеток. Как только длина теломерной ДНК становится угрожающе низкой, запускается P53/P21-индуцированное старение клетки при сохранении ее метаболической активности [17, 24]. Имеются данные, что длина теломер в лейкоцитах отражает длину теломер в стволовых клетках и соответствует их длине в эндотелиальных прогениторных клетках, что позволяет рассматривать данный параметр как биомаркер старения сосудов. Теломераза человека отвечает за поддержание и удлинение теломер и состоит из теломеразного РНК-компонента (TERC) и теломеразной обратной транскриптазы (TERT), каталитического компонента. TERT использует TERC в качестве шаблона для

синтеза новых теломерных повторений ДНК при одноцепочечном повторении для поддержания длины теломер. Некоторые клетки (стволовые, кроветворные клетки-предшественники, активированные лимфоциты и большинство раковых клеток) имеют высокий уровень деятельности теломеразы для того, чтобы укорачивать теломеры и поддерживать безграничное деление клетки. Однако соматические клетки вообще имеют низкий или «undetectable» уровень деятельности теломеразы с лимитированной долговечностью. Теломера и ее целостность регулируются через взаимодействие теломеразы и определенных белков [4].

Активность теломеразы снижается с возрастом, но заметно увеличивается в ответ на повреждение [3]. Количество теломер, потерянных во время каждого деления клеток, варьируется у разных людей. Предыдущие исследования показали, что увеличение окислительного стресса и хронического воспаления связаны с более высокой потерей теломер и ускоренным укорочением теломер. Несколько общих факторов риска для сердечно-сосудистых заболеваний, такие как курение, СД, гиперхолестеринемия, гипертензия, ожирение, низкая физическая активность, потребление алкоголя и психосоциальные проблемы, были связаны с короткой длиной теломер. Однако механизм, лежащий в основе объединения укорочения теломер с этими факторами риска, остается гипотетическим.

Цель работы: определение взаимосвязи длины теломер и активности теломеразы с показателями окислительного стресса у пациентов с церебральным атеросклерозом (ЦА) 1-3-й стадий и СД2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В комплексном клинико-инструментальном исследовании приняли участие 161 пациент с ЦА 1-3-й степени. Диагноз «церебральный атеросклероз» формулировался в соответствии с классификацией атеросклероза ВОЗ 2015 года и подтверждался данными лабораторных и инструментальных исследований (ультразвуковая доплерография церебральных артерий, магнитно-резонансная томография (МРТ) головного мозга).

Дизайн исследования: простое, проспективное, нерандомизированное, с последовательным включением пациентов.

В исследование не включали пациентов со всеми формами фибрилляции предсердий, с некорректируемым артериальным давлением (АД) >160/90 мм рт. ст., другими нарушениями ритма, требующими проведения антиаритмической терапии, снижением ФВ <40% по данным двухмерной эхокардиографии (ЭхоКГ), клинически выраженной сердечной недостаточностью, значительно выраженными нарушениями функции почек и печени, с наркотической или алкогольной

зависимостью, перенесенными острыми воспалительными заболеваниями в течение предшествующего месяца. Также в исследовании не принимали участие пациенты, перенесшие реваскуляризацию, с нестабильной стенокардией или инфарктом миокарда и ревматическими пороками сердца.

Все пациенты проходили общепринятое клиническое, лабораторное (общий анализ крови и мочи, определение липидного профиля, уровня креатинина, мочевины, глюкозы, аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, билирубина) и инструментальное исследование (трансторакальная ЭхоКГ, электрокардиография (ЭКГ), ультразвуковая доплерография сосудов головы и шеи, МРТ головного мозга).

ЭТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Протокол исследования одобрен этическими комиссиями ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ имени В. П. Комиссаренко НАМН Украины» и ГУ «Институт геронтологии имени Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины». Все участники дали письменное информированное согласие. Хельсинкская декларация (2000 г.) и применимые национальные стандарты, касающиеся их участия в исследованиях, были учтены.

Сбор и хранение образцов крови. Образцы крови отбирали в вакуутайнеры, содержащие ЭДТА. На протяжении 30 минут после забора крови производили выделение мононуклеарных клеток периферической крови на градиенте (1.077 г/см³). После выделения клетки замораживали и хранили в жидком азоте при –196 °С. Выделение ДНК проводили из размороженных клеток, используя метод фенол-хлороформной очистки [22]. Контроль чистоты, концентрации и целостности ДНК проводили с помощью спектрофотометрии и агарозного гель-электрофореза.

Измерение длины теломер (ДТ). Относительную длину теломер (ОДТ) измеряли с помощью мультиплексной количественной полимеразой цепной реакцией в реальном времени (RT-qPCR – кПЦР-РВ) [5]. Реакционную смесь для ПЦР готовили с использованием коммерческого набора реагентов Luna® Universal qPCR и RT-qPCR (New England Biolabs) с добавлением бетаина (Sigma-Aldrich) до конечной концентрации 1 М. Для мультиплексной кПЦР пара теломерных праймеров telg и telc (конечные концентрации каждого – 450 нмоль) была объединена с парой праймеров альбумина albu и albd (конечные концентрации каждого – 250 нмоль) в мастер-микс. Список праймеров, используемых для анализа кПЦР-РВ, приведен в таблице 1.

Таблица 1

Список праймеров, использованных для количественной полимеразой цепной реакции в реальном времени (кПЦР-РВ)

Название праймера	Последовательность нуклеотидов праймера
TS	5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'
ACX	5'-GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACCC-3'
Telg	5'-ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGTTTGGGTTAGTGT-3'
Telc	5'-TGTTAGGTATCC CTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAACCA-3'
Albu	5'-CGGCGGCGGGCGGCGGGCTGGGCGGAA ATGCTGCACAGAATCCTTG-3'
Albd	5'-GCCCCGCCCCGCCGCG CCCGTCCCGCCGAAAAGCATGGTTCGCCTGTT-3'

Профиль термоциклирования был следующим: 95 °С – 15 мин.; 2 цикла: 94 °С – 15 с и 49 °С – 15 с; 3 цикла: 94 °С – 15 с, 62 °С – 10 с, 74 °С – 15 с и с получением сигнала, 84 °С – 10 с, 88 °С – 15 с и с получением сигнала. Для формирования калибровочной кривой ПЦР проводили для четырех концентраций эталонной ДНК (в двух экземплярах), которые охватывают диапазон 27-кратных серийных разведений.

Все образцы ДНК были проанализированы в триплетах. Кривые амплификации были сгенерированы программным обеспечением Opticon Monitor 3. Для этого после термоциклирования и сбора исходных данных с помощью программного обеспечения Opticon Monitor 3 для каждой постановки были по-

строены две стандартные кривые: для теломерно-го сигнала и для гена сигнала однокопийного гена альбумина. ОДТ были выражены в виде отношения T/S, где T – число теломерных повторов, а S – число повторов гена альбумина.

Измерение активности теломеразы. Теломеразную активность определяли с помощью протокола амплификации tandemных повторов с детекцией в реальном времени (ПАТП-РВ) [1]. Мононуклеарные клетки периферической крови и клетки НЕК293 (положительный контроль) обрабатывали буфером для лизиса NP-40 от Invitrogen (50 ммоль Трис, рН 7,4, 250 ммоль NaCl, 5 ммоль ЭДТА, 50 ммоль NaF, 1 ммоль Na₃VO₄, 1% Nonidet™ P40 (NP40) 0,02% NaN₃) с 1 ммоль PMSF

(Sigma-Aldrich) и 10 мкл/мл (об./об.) раствора с ингибитором протеаз (Sigma-Aldrich) на льду в течение 30 минут. Последующее центрифугирование проводили при 16400 g в течение 20 мин. при +4 °C. 180 мкл супернатанта переносили в свежую пробирку. Измерение концентрации белка производили с помощью набора для анализа белка Pierce™ BCA (Thermo Scientific) согласно протоколам производителя.

Реакционную смесь для ПАТП-РВ готовили на основе Luna Universal qPCR и RT-qPCR (New England Biolabs) с добавлением EGTA до конечной концентрации 5мМ, конечная концентрация праймеров была 400 нМ для ACX и 400 нМ для TS. 2 мкл лизата добавляли к 23 мкл смеси ПАТП-РВ и инкубировали в течение 30 мин. при 30 °C. Затем проводили ПЦР при следующих условиях: 95 °C — 1 мин.; 40 циклов: из 95 °C — 15 с, 60 °C — 1 мин. и с получением сигнала. ПЦР-продукты количественно определяли с помощью Chromo4 (Bio-Rad) и анализировали в программном обеспечении Opticon Monitor v. 3.1. Клетки НЕК293 использовали для генерации стандартной кривой, построенной на точках пяти вариантов разведений.

Измерение активности каталазы, супероксид-дисмутазы, глутатиона и других маркеров оксидативного стресса. Для определения активности каталазы использовали гемолизат крови, который получали путем осмотического гемолиза цельной крови с дистиллированной водой и одного цикла замораживания с последующим центрифугированием. Разведенный гемолизат крови инкубировали с раствором гидрогена пероксида и спектрофотометрически определяли активность каталазы по количеству продукта реакции остаточного гидрогена пероксида с молибдатом аммония [13]. Для создания калибровочного графика использовали раствор коммерчески доступной каталазы (Sigma, C9322). Результаты выражали в единицах активности фермента на 1 мл крови.

Активность СОД (КФ 1.1.15.1.) в плазме крови определяли непрямым спектрофотометрическим методом на основе реакции супероксид-зависимого окисления кверцетина, в щелочной среде, в присутствии тетраметилетилендиамина [17]. Реакция сопровождается обесцвечиванием рабочего раствора в области пропускания с максимумом при 406 нм. Фермент СОД перехватывает супероксид-радикалы и подавляет окисление кверцетина. При времени инкубации 20 мин. степень ингибции строго количественно зависит от концентрации СОД. Содержание фермента в биологическом материале рассчитывается с помощью калибровочного графика, полученного на основании измерения активности коммерчески доступной СОД (Sigma, S 9697). Активность СОД выражали в единицах активности на 1 мл плазмы.

Концентрацию ТБК-активных продуктов (МДА) определяли, используя реакцию нагревания малонового диальдегида с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК)

в кислой среде с образованием окрашенного триметинового комплекса с максимумом флуоресцентного излучения при $\mu=530$ нм при условиях возбуждения светом из $\mu=484$ нм [25, 26]. Плазму крови инкубировали с ТБК в присутствии трихлоруксусной кислоты при нагревании. После охлаждения образцов проводили экстракцию ТБК-активных продуктов н-бутанолом. Интенсивность флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре. Концентрацию ТБК-активных продуктов (МДА) рассчитывали за калибровочной кривой, созданной с использованием коммерческого МДА (Sigma, 63287) и выражали в мкМ/л.

Содержание GSH в плазме крови определяли спектрофлуориметрическим методом с использованием ортофталевого альдегида, в результате реакции которого с GSH образуются высокофлуоресцентные продукты, которые возбуждаются излучением при 350 нм и имеют четко выраженный пик флуоресценции при 420 нм [18]. Концентрацию GSH рассчитывали за калибровочной кривой, созданной с использованием коммерческого GSH (Синбиас, Украина) и выражали в мкМ/л. Интенсивность флуоресценции гликированных протеинов в плазме крови измеряли при возбуждении 370 нм и эмиссии 440 нм с помощью спектрофлуорометра Varioscан и выражали в мкМ/л [7]. Для создания калибровочной кривой был приготовлен условный гликированный белок — bsa-глюкоза. Смесь BSA и d-глюкозы в фосфатном буфере инкубировали при 37 °C в течение 6 недель.

Измерение базовых характеристик. Систолическое артериальное давление (САД) и диастолическое артериальное давление (ДАД) (мм рт. ст.) измеряли дважды с помощью стандартного сфигмоманометра в положении пациента сидя после не менее 10 мин. отдыха. Уровни глюкозы в плазме определяли стандартным глюкозооксидазным методом.

Статистический анализ. Для представления результатов в случае количественных переменных рассчитывали среднее значение показателя и его среднеквадратическое отклонение ($\pm SD$) в случае нормального закона распределения либо медианное значение показателя (Me) и значения первого (Q_1) и третьего (Q_{III}) квартилей в случае закона распределения, отличного от нормального. Проверку распределения на нормальность проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для представления качественных признаков рассчитывали их частоту (%). При проведении сравнения количественных показателей в двух группах использованы t-критерий (в случае нормального закона распределения), критерий Манна-Уитни (в случае закона распределения, отличного от нормального). При проведении сравнения качественных показателей использован точный критерий Фишера. Порог значимости во всех случаях был установлен на уровне $p < 0,05$. Статистический ана-

лиз выполнен в программе MedCalc v. 18.10 (MedCalc Software Inc., Broekstraat, Бельгия, 1993-2018) [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Пациентов распределяли дважды на 2 группы в зависимости от относительной длины теломер и активности теломеразы (табл. 1 и 2). Медиана относительной длины теломер составила 2,61. Пациентов со длиной теломер ниже этого показателя относили к группе коротких теломер, а тех, у которых этот показатель превышал данное значение – к группе длинных теломер (табл. 1). Аналогичным образом были выделены группы пациентов с низкой и высокой актив-

ностью теломеразы. Медиана активности теломеразы составила 3,16. Доли мужчин и женщин, количество пациентов с ишемическим инсультом (ИИ) и ЦА 1-2-й стадии и СД2 были сопоставимы в обеих группах. В результате сравнительного анализа выявлено, что у пациентов с ЦА 1-3-й стадий с длинными теломерами был значимо более высокий уровень каталазы, чем в группе с короткими теломерами, а в группе с высокой активностью теломеразы уровень каталазы и СОД – значимо ниже, чем в группе с низкой активностью теломеразы. Необходимо отметить, что пациенты с длинными и короткими теломерами были сопоставимы по возрасту, а возраст пациентов с низкой активностью теломеразы был значимо большим.

Таблица 1

Основные клинические характеристики и маркеры оксидативного стресса в зависимости от относительной длины теломер

Показатель	Длинные теломеры (n=56)	Короткие теломеры (n=30)	p
Каталаза (ед.)	599,68 (526,662-637,987)	532,645 (324,36-554,195)	0,023
GSH (мкМ/л)	3,52±0,2	3,58±0,19	0,481
СОД (ед.)	8,51 (8,03-9,33)	8,03 (7,87-8,51)	0,301
Тиобарбитурореактивные вещества (мкМ/л)	17,61 (16,4-18,827)	16,585 (15,94-19,06)	0,664
Конечные продукты гликирования (AGE)	31,1±7,6	32,4±7,5	0,683
Возраст (лет)	65,8±10,9	61,7±9,2	0,079
Пол, ж/м (%)	69,6/30,4	70,0/30,0	0,99
Кол-во пациентов с ИИ (%)	51,8	33,3	0,11
Кол-во пациентов с СД (%)	28,6	33,3	0,81

Примечание: приведено среднее значение ± SD в случае нормального закона распределения, Me (Q_I-Q_{III}) в случае закона распределения, отличного от нормального.

Таблица 2

Основные клинические характеристики и маркеры оксидативного стресса в зависимости от активности теломеразы

Показатель	Высокая активность теломеразы (n=56)	Низкая активность теломеразы (n=30)	p
Каталаза (ед.)	549,405 (369,85-590,1)	604,47 (544,615-699,038)	0,026
GSH (мкМ/л)	3,59±0,19	3,46±0,18	0,134
СОД (ед.)	8,03 (7,75-8,37)	9,23 (8,55-9,79)	0,002
Тиобарбитурореактивные вещества (мкМ/л)	16,97 (16,02-18,775)	17,81 (16,355-19,165)	0,727
Конечные продукты гликирования (AGE)	32±6,8	31,1±9,1	0,772
Возраст (лет)	61 (57-70)	66 (61-79)	0,021
Пол, ж/м (%)	67,9/32,1	73,3/26,7	0,63
Кол-во пациентов с ИИ (%)	44,6%	46,7%	0,99
Кол-во пациентов с СД (%)	30,4%	30,0%	0,99

Примечание: приведено среднее значение ± SD в случае нормального закона распределения, Me (Q_I-Q_{III}) в случае закона распределения, отличного от нормального.

В дальнейшем при проведении корреляционного анализа были выявлены значимые прямые связи длины теломер с такими маркерами оксидативного стресса, как каталаза и СОД ($r=0,23$ и $r=0,21$ соответственно),

и активности теломеразы с GSH ($r=0,48$). Также выявлена обратная связь длины теломер с СД2 ($r=-0,21$). С другими маркерами оксидативного стресса длина теломер и активность теломеразы не коррелировали.

Теломеры являются концевыми ДНК-белковыми комплексами, которые действуют как «защитные колпачки» линейных хромосом [4]. Теломеры укорачиваются с возрастом, а длина теломер необходима, как предполагают некоторые исследователи, чтобы предсказать оставшуюся продолжительность жизни [3]. Другие авторы считают, что длина теломер лейкоцитов ассоциируется с окислительным стрессом и воспалением даже у здоровых людей [2], что позволяет предположить, что связанный с сердечнососудистым риском системный окислительный стресс и воспаление может ускорить укорочение теломер, тем самым смягчая воздействие наследственного компонента ДТ [8, 9]. Кроме того, учитывая системное воздействие окислительного стресса и воспаления и сходные показатели укорочения ДТ в соматических тканях [6], можно сказать, что скорость укорочения ДТ в клетке крови отражает это в сосудистой ткани. Эта теория подразумевает, что скорость укорочения ДТ может служить клиническим биомаркером сердечно-сосудистой смертности. Однако обнаружено, что изменение скорости укорочения теломер лейкоцитов у взрослых слишком низкое, чтобы существенно изменить ДТ по сравнению с наследованием [3]. Поскольку вариация слишком мала, чтобы существенно модулировать связь между ДТ и клиническим атеросклерозом, этот результат предполагает, что более высокая скорость укорочения ДТ в крови является скорее эпифеноменом.

В последнее время отсутствие взаимосвязи между скоростью укорочения лейкоцитарных теломер и атеросклерозом также продемонстрирована в небольшом лонгитудинальном исследовании [23]. В тоже время считают, что укорочение теломер не является основной причиной окислительного стресса, и, скорее всего, окислительный стресс будет являться потенциальной причиной укорочения теломер при тех заболеваниях, при которых нарушена теломеразная активность [15].

Выявление механизмов укорочения теломер на данный момент представляет особый интерес, потому что это может способствовать выявлению физиологических процессов, лежащих в основе изменения в здоровье и продолжительности жизни. Механизмы укорочения теломер хорошо изучены в культуре кле-

ток, где показано, что окислительный стресс является ключевым фактором, который ускоряет истощение теломер [11, 15]. Тем не менее, клеточные культуры не являются организмами, и уровни окислительного стресса в пробирке трудно масштабировать до окислительного стресса в целом организме. В связи с этим возникает вопрос, является ли окислительный стресс также фактором укорочения теломер *in vivo*. Нам известно о шести недавних исследованиях связи между окислительным стрессом и укорочением теломер *in vivo* с противоречивыми результатами, но размеры выборки были скромными, и исследования включали мало параметров окислительного стресса, которые были измерены после того, как укорочение теломер уже произошло, т.е. не в период между базовой линией и последующим ростом теломер [12, 19, 20, 21, 27]. В связи с этим можно сказать, что роль окислительного стресса в укорочении теломер *in vivo* в настоящее время не ясна, и требуются более масштабные исследования.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с церебральным атеросклерозом 1-3-й стадий выявлена ассоциация некоторых маркеров окислительного стресса (каталаза, СОД, GSH) с длиной теломер и активностью теломеразы вне зависимости от наличия сопутствующего сахарного диабета 2-го типа.
2. У пациентов с церебральным атеросклерозом 1-3-й стадий с более длинными теломерами уровень каталазы статистически значимо выше, чем у пациентов с короткими теломерами.
3. Для пациентов с церебральным атеросклерозом 1-3-й стадий, имеющих более высокую активность теломеразы, характерны значимо более низкие уровни каталазы и СОД по сравнению с показателями пациентов с более низкой активностью теломеразы.
4. Наиболее устойчивая прямая корреляционная связь у данной категории пациентов обнаружена между GSH и активностью теломеразы ($r=0,48$), что может свидетельствовать о ключевой роли GSH в скорости укорочения теломер и развития атеросклероза.

Конфликт интересов: отсутствует.

ЛИТЕРАТУРА

1. Banerjee P., Jagadeesh S. Non-Radioactive Assay Methods for the Assessment of Telomerase Activity and Telomere Length. *Methods in Molecular Biology*. 2009. Vol. 1. P. 383-394.
2. Bekaert S., De Meyer T., Rietzschel E. R. et al. Telomere length and cardiovascular risk factors in a middle-aged population free of overt cardiovascular disease. *Aging Cell*. 2007. Vol.6. P. 639-647.
3. Benetos A., Kark J. D., Susser E. et al. Tracking and fixed ranking of leukocyte telomere length across the adult life course. *Aging Cell*. 2013 Vol. 12. P. 615-621.

4. Benetos A., Toupance S., Gautier S., Labat C., Kimura M., Rossi P., Settembre N., Hubert J., Frimat L., Bertrand B., Boufi M., Flecher X., Sadoul N., Eschwege P., Kessler M., Tzanetakou I., Doulamis I., Konstantopoulos P., Tzani A., Korou M., Gkogkos A., Perreas K., Menenakos E., Samanidis G., Vasiloglou-Gkanis M., Kark J., Malikov S., Verhulst S., Aviv A. Short Leukocyte Telomere Length Precedes Clinical Expression of Atherosclerosis. *Circulation Research*. 2018. Vol. 122(4). P. 616-623.
5. Cawthon R. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Research*. 2009. Vol. 37(3). e21-e21.
6. Das B. K., Sun T. X., Akhtar N. J., Chylack L. T., Liang J. J. Fluorescence and immunochemical studies of advanced glycation-related lens pigments. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998. Vol. 39(11). P. 2058-2066.
7. De Meyer et al. Telomere Length as Cardiovascular Aging Biomarker: JACC Review Topic of the Week. 2018. *JACC*. Vol. 72(7). P. 805-813.
8. De Meyer T., Rietzschel E. R., De Buyzere M. L., et al. Systemic telomere length and preclinical atherosclerosis: the Asklepios Study. *Eur Heart J*. 2009. Vol. 30. P. 3074-3081.
9. Fiorenza Magi, Ivan Dimauro, Fabrizio Margheritini, Guglielmo Duranti, Neri Mercatelli, Cristina Fantini. Telomere length is independently associated with age, oxidative biomarkers, and sport training in skeletal muscle of healthy adult males. *Free Radic. Res*. 2018. Vol. 52(6). P. 639-647 <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1459043>
10. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta*. 1991. Vol. 196(2-3). P. 143-151.
11. José Santiago Ibáñez-Cabellosa, Giselle Pérez-Machado, Marta Seco-Cerveraa, Ester Berenguer-Pascualb, José Luis García-Giménez, Federico V. Pallardóa. Acute telomerase components depletion triggers oxidative stress as an early event previous to telomeric shortening. *Redox Biology*. 2018. Vol. 14. P. 398-408. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.004>
12. Koriath, M., Müller, C., Pfeiffer, N., Nickels, S., Beutel, M., Schmidtman, I., Rapp, S., Münzel, T., Westermann, D., Karakas, M., Wild, P., Lackner, K., Blankenberg, S. and Zeller, T. Relative Telomere Length and Cardiovascular Risk Factors. *Biomolecules*. 2019. Vol. 9(5). P. 192.
13. Kostyuk V. A., Potapovich A. I. Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. *Biochem Int*. 1989. Vol. 19(5). P. 1117-1124.
14. Mokrasch L. C., Teschke E. J. Glutathione content of cultured cells and rodent brain regions: a specific fluorometric assay. *Anal Biochem*. 1984. Vol. 140(2). P. 506-509.
15. Nettle D., Andrews C., Reichert S., Bedford T., Kolenda C., Parker C., Martin-Ruiz C., Monaghan P., Bateson M. Early-life adversity accelerates cellular ageing and affects adult inflammation: experimental evidence from the European starling. *Sci. Rep*. 2017. 7. 40794. doi:10.1038/srep40794
16. Reichert S., STIER A., Zahn S., Arrive' M., Bize P., Masseurin S., Criscuolo F. Increased brood size leads to persistent eroded telomeres. *Front. Ecol. Evol*. 2014. Vol. 2. 10114. doi:10.3389/fevo.2014.00009
17. Sambrook J., Russell D. Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol: Chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2006. 1. pdb.prot4455.
18. Toupance S., Labat C., Temmar M. et al. Short telomeres, but not telomere attrition rates, are associated with carotid atherosclerosis. *Hypertension*. 2017. Vol. 70. P. 420-425.
19. Tüközkán Nurten, Hüsametdin Erdamar. Measurement of Total Malondialdehyde in Plasma and Tissues by High-Performance Liquid Chromatography and Thiobarbituric Acid Assay. *Fırat Tıp Dergisi*. 2006. Vol. 11(2). P. 88-92.
20. Wasowicz W., Nève J., Peretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem*. 1993. Vol. 39(12). P. 2522-2526.

REFERENCES

1. Banerjee, P. and Jagadeesh, S. (2009). Non-Radioactive Assay Methods for the Assessment of Telomerase Activity and Telomere Length. *Methods in Molecular Biology*, 1, 383-394.
2. Bekaert S, De Meyer T, Rietzschel ER et al. (2007). Telomere length and cardiovascular risk factors in a middle-aged population free of overt cardiovascular disease. *Aging Cell*, 6, 639-647.
3. Benetos A., Kark J. D., Susser E. et al. (2013). Tracking and fixed ranking of leukocyte telomere length across the adult life course. *Aging Cell*, 12, 615-621.
4. Benetos A., Toupance S., Gautier S., Labat C., Kimura M., Rossi P., Settembre N., Hubert J., Frimat L., Bertrand B., Boufi M., Flecher X., Sadoul N., Eschwege P., Kessler M., Tzanetakou I., Doulamis I., Konstantopoulos P., Tzani A., Korou M., Gkogkos A., Perreas K., Menenakos E., Samanidis G., Vasiloglou-Gkanis M., Kark J., Malikov S., Verhulst S., Aviv A. (2018). Short Leukocyte Telomere Length Precedes Clinical Expression of Atherosclerosis. *Circulation Research*, 122(4), 616-623.
5. Cawthon R. (2009). Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Research*, 37(3), e21-e21.
6. Das B. K., Sun T. X., Akhtar N. J., Chylack L. T. Jr, Liang J. J. (1998). Fluorescence and immunochemical

- studies of advanced glycation-related lens pigments. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 39(11), 2058-2066.
7. De Meyer et al. (2018). Telomere Length as Cardiovascular Aging Biomarker: JACC Review Topic of the Week. *JACC*, 72(7), 805-813.
 8. De Meyer T., Rietzschel E. R., De Buyzere M. L., et al. (2009). Systemic telomere length and preclinical atherosclerosis: the Asklepios Study. *Eur Heart J*, 30, 3074-3081.
 9. Fiorenza Magi, Ivan Dimauro, Fabrizio Margheritini, Guglielmo Duranti, Neri Mercatelli, Cristina Fantini (2018). Telomere length is independently associated with age, oxidative biomarkers, and sport training in skeletal muscle of healthy adult males. *Free Radic. Res.*, 52 (6), 639-647 <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1459043>
 10. Góth L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta.*, 196(2-3), 143-151.
 11. José Santiago Ibáñez-Cabellosa, Giselle Pérez-Machadob, Marta Seco-Cerveraa, Ester Berenguer-Pascualb, José Luis García-Giméneza, Federico V. Pallardóa (2018) Acute telomerase components depletion triggers oxidative stress as an early event previous to telomeric shortening. *Redox Biology*, 14, 398-408. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.004>
 12. Koriath M., Müller C., Pfeiffer N., Nickels S., Beutel M., Schmidtman I., Rapp S., Münzel T., Westermann D., Karakas M., Wild P., Lackner K., Blankenberg S., Zeller, T. (2019). Relative Telomere Length and Cardiovascular Risk Factors. *Biomolecules*, 9(5), 192.
 13. Kostyuk V. A., Potapovich A. I. (1989). Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. *Biochem Int.*, 19(5), 1117-1124.
 14. Mokrasch L. C., Teschke E.J. (1984). Glutathione content of cultured cells and rodent brain regions: a specific fluorometric assay. *Anal Biochem.*, 140(2), 506-509.
 15. Nettle D., Andrews C., Reichert S., Bedford T., Kolenda C., Parker C., Martin-Ruiz C., Monaghan P., Bateson M. (2017). Early-life adversity accelerates cellular ageing and affects adult inflammation: experimental evidence from the European starling. *Sci. Rep.* 7, 40794. doi:10.1038/srep40794
 16. Reichert S., STIER A., Zahn S., Arrive' M., Bize P., Massemin S., Criscuolo F. (2014). Increased brood size leads to persistent eroded telomeres. *Front. Ecol. Evol.* 2, 10114. doi:10.3389/fevo.2014.00009.
 17. Sambrook J., Russell D. (2006). Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol: Chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*, 1, pdb.prot4455.
 18. Toupance S., Labat C., Temmar M., et al. (2017). Short telomeres, but not telomere attrition rates, are associated with carotid atherosclerosis. *Hypertension*, 70, 420-425.
 19. Tüközkán, Nurten, Hüsamettin Erdamar (2006). Measurement of Total Malondialdehyde in Plasma and Tissues by High-Performance Liquid Chromatography and Thiobarbituric Acid Assay. *Fırat Tıp Dergisi*, 11(2), 88-92.
 20. Wasowicz W., Nève J., Peretz A. (1993). Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem.*, 39(12), 2522-2526.

*Резюме***ЗВ'ЯЗОК ДОВЖИНИ ТЕЛОМЕР, АКТИВНОСТІ ТЕЛОМЕРАЗИ ТА МАРКЕРІВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ В ПАЦІЄНТІВ ІЗ ЦЕРЕБРАЛЬНИМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ І ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2-ГО ТИПУ**
М. С. Єгорова¹, Д. С. Красненков², В. Г. Гур'янов³, В. Є. Кондратюк³, В. М. Кухарський²

¹ГУ «Інститут ендокринології і обміну речовин імені В. П. Комисаренко НАМН України», г. Київ, Україна

²ГУ «Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарева НАМН України», г. Київ, Україна

³«Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца», г. Київ, Україна

Мета роботи – визначення взаємозв'язку довжини теломер й активності теломерази з показниками оксидативного стресу в пацієнтів із церебральним атеросклерозом (ЦА) 1-3-ї стадій і цукровим діабетом 2-го типу (ЦД2).

Матеріали і методи. У комплексному клініко-інструментальному дослідженні взяли участь 161 пацієнт із ЦА 1-3-ї стадій. Теломеразну активність визначали за допомогою протоколу ампліфікації тандемних повторів із детекцією в режимі реального часу. Відносні довжини теломер вимірювали за допомогою мультиплексної кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.

Результати дослідження та їх обговорення. У результаті порівняльного аналізу виявлено, що в пацієнтів із ЦА 1-3-ї стадій із довгими теломерами був значуще вищим рівень каталази, ніж у групі з короткими теломерами, а в групі з високою активністю теломерази рівні каталази та СОД – значуще нижчими, ніж у групі із низькою активністю теломерази. За результатами кореляційного аналізу виявлено значущі прямі зв'язки довжини теломер із такими маркерами оксидативного стресу, як каталаза та СОД ($r=0,23$ і $r=0,21$ відповідно), й активності теломерази з глутатіоном ($r=0,48$). Також виявлено зворотний зв'язок довжини теломер із ЦД2 ($r=-0,21$). З іншими маркерами оксидативного стресу довжина теломер й активність теломерази не корелювали.

Висновки. У пацієнтів із ЦА 1-3-ї стадій виявлено асоціацію деяких маркерів оксидативного стресу (каталаза, супероксиддисмутаза, глутатіон) із довжиною теломер й активністю теломерази незалежно від наявності супутнього ЦД2. У пацієнтів із ЦА 1-3-ї стадій із довшими теломерами рівень каталази є значуще вищим, ніж у пацієнтів із короткими теломерами. Для пацієнтів із ЦА 1-3-ї стадій, які мають більшу активність теломерази, характерними є значуще нижчі рівні каталази та супероксиддисмутази порівняно з показниками пацієнтів із нижчою активністю теломерази. Найстійкіший прямий кореляційний зв'язок у даній категорії пацієнтів виявлено між глутатіоном й активністю теломерази ($r=0,48$), що може свідчити про ключову роль глутатіону в швидкості укорочення теломер і розвитку атеросклерозу.

Ключові слова: довжина теломер, активність теломерази, оксидативний стрес, церебральний атеросклероз

Summary

THE CORRELATION BETWEEN TELOMERE LENGTH, TELOMERASE ACTIVITY, AND OXIDATIVE STRESS MARKERS IN PATIENTS WITH CEREBRAL ATHEROSCLEROSIS AND TYPE 2 DIABETES MELLITUS

M. S. Yehorova¹, D. S. Krasnienkov², V. G. Gurianov³, V. Ye. Kondratiuk³, V. M. Kuharskiy²

¹State Institution «V. P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National academy of medical science of Ukraine», Kyiv, Ukraine

²«Dmitry F. Chebotarev Institute of Gerontology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv, Ukraine

³«Bogomolets National Medical University», Kyiv, Ukraine

Aim. The determination of the correlation between telomere length and telomerase activity with indicators of oxidative stress in patients with stage 1-3 cerebral atherosclerosis and type 2 diabetes.

Materials and methods. A total clinical and instrumental study involved 161 patients with grade 1-3 CA. Telomerase activity was determined using a tandem repeat amplification protocol with real-time detection. The relative telomere lengths were measured using real-time multiplex quantitative polymerase chain reaction.

Results. A comparative analysis revealed that patients with stage 1-3 CA with long telomeres had a significantly higher catalase level than in the short telomere group, and the catalase and SOD levels in the group with high telomerase activity were significantly lower than in the group with low telomerase activity. A correlation analysis revealed significant direct relationships between telomere length and oxidative stress markers such as catalase and SOD ($r = 0.23$ and $r = 0.21$, respectively) and telomerase activity with GSH ($r = 0.48$). An inverse correlation between the telomere length and T2DM ($r = -0.21$) was also revealed. Telomere length and telomerase activity were not correlated with other markers of oxidative stress.

Conclusion. In patients with stage 1-3 cerebral atherosclerosis, an association of some markers of oxidative stress (catalase, SOD, GSH) with telomere length and telomerase activity, regardless of the presence of concomitant type 2 diabetes mellitus, was revealed. In patients with stage 1-3 cerebral atherosclerosis with longer telomeres, catalase levels are statistically significantly higher than in patients with short telomeres. Stage 1-3 cerebral atherosclerosis patients with higher telomerase activity are characterized by statistically significantly lower levels of catalase and SOD compared with patients with lower telomerase activity. The most stable direct correlation in this category of patients was found between GSH and telomerase activity ($r = 0.48$), which may indicate the key role of GSH in the rate of telomere shortening and the intensity of atherosclerosis.

Keywords: telomere length, telomerase activity, oxidative stress, cerebral atherosclerosis

Інформація про авторів знаходиться на сайті <http://www.cp-medical.com>.

Дата надходження до редакції – 23.04.2019