

# Исследование диагностической значимости длины теломер и активности теломеразы у пациентов с церебральным атеросклерозом и сахарным диабетом 2-го типа



**М. С. Егорова<sup>1</sup>, Д. С. Красненков<sup>2</sup>, В. Г. Гурьянов<sup>3</sup>,  
В. Е. Кондратюк<sup>3</sup>, Н. Д. Тронько<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ имени В. П. Комиссаренко НАМН Украины», Киев

<sup>2</sup>ГУ «Институт геронтологии имени Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины», Киев

<sup>3</sup>Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, Киев

Цереброваскулярные заболевания — одна из важнейших причин заболеваемости и смертности среди взрослого населения. Наиболее часто основой поражения сосудистой системы мозга, приводящей к развитию острых и хронических форм нарушений мозгового кровообращения, является генерализованный атеросклероз [7]. Сахарный диабет (СД) сопровождается ускоренными изменениями сосудов, что делает его также ведущей причиной сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и смертности. Ключевые звенья данных изменений — гипергликемия, инсулинорезистентность, накопление конечных продуктов гликирования. Гиперинсулинемия и гипергликемия, как и физиологическое старение, активируют процессы хронического воспаления и оксидантного стресса [6, 8]. В стареющем организме, как и в организме пациентов с СД, повышаются уровни различных маркеров воспаления и активность пероксидного окисления липидов. Все это приводит к нарушению синтеза белков, апоптозу клеток и развитию дегенеративных процессов [8].

Одной из причин разной скорости старения сердца и сосудов у пациентов с СД 2-го типа является изначально разная генетическая защищенность от воздействия внешних факторов. Длину теломер (ДТ) и активность теломеразы можно рассматривать как

генетические маркеры 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 [2, 11]. Имеются данные, что ДТ в лейкоцитах отражает ДТ 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 с целью синтеза новых теломерных повторов ДНК при одноцепочечном повторении для поддержания ДТ. Стволовые клетки, 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 «неопределяемый»

Егорова Марія Сергіївна, к. мед. н., зав. консультативно-діагностичного відділення. E-mail: emariya83@gmail.com. 030580000-0002-3689-2683; Красненков Дмитро Сергійович, наук співр. лабораторії епігенетики E-mail: krasnenkovd@gmail.com; Гур'янов Віталій Григорович, к. фіз.-мат. н., доцент кафедри менеджменту охорони здоров'я. E-mail: i\_@ukr.net; Кондратюк Віталій Євгенович, д. мед. н., професор, зав. кафедри пропедевтики внутрішніх хвороб № 2. E-mail: kondratiuk\_v@ukr.net; Тронько Микола Дмитрович, д. мед. н., академік НАМН України, директор ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин імені В. П. Комісаренка НАМН України», 04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 69

уровень деятельности теломеразы с лимитированной долговечностью. Теломера и ее целостность регулируются с помощью взаимодействия теломеразы и определенных белков [2]. Активность теломеразы снижается с возрастом, но заметно возрастает в ответ на повреждение [2].

У людей теломеры состоят из сотен и тысяч повторяющихся последовательностей TTAGGG на хромосомных концах для поддержания геномной целостности [2, 12]. Поскольку репликация ДНК асимметрична вдоль двойной нити, с каждой репликации ДНК и деления клеток последовательности в 3'-гидроксильных концах теряют 30—200 нуклеотидов [2]. Теломеры обеспечивают повторяющуюся последовательность на 3'-гидроксильном конце, чтобы предотвратить потерю критической генетически зашифрованной информации во время репликации. Кроме того, теломеры покрыты комплексом из таких шести белков: фактор 1 (TRF1), фактор 2 (TRF2), репрессор-активатор протеина 1 (Rap1), TRF1 и TRF2 взаимодействия ядерных белков 2 (TIN2), трипептидил-пептидаза 1 (TPP1) и защита теломер 1, также известных белков [11], которые упакованы в компактную структуру Т-петли для предотвращения ошибок репликации. Поэтому теломеры были предложены как митотические часы, которые измеряют, сколько раз клетка разделилась. Количество теломер, потерянных во время каждого деления клеток, у разных людей варьирует. По данным ранее проведенных исследований установлено, что усиление оксидантного стресса и хронического воспаления связано с более высокой потерей теломер и ускоренным их укорочением. С короткой длиной теломер ассоциировано несколько общих факторов риска для ССЗ, таких как курение, СД, гиперхолестеринемия, артериальная гипертензия, ожирение, низкая физическая активность, потребление алкоголя, а также наличие психосоциальных проблем. Однако механизм, лежащий в основе объединения укорочения теломер с этими факторами риска, по-прежнему не уточнен.

**Цель работы** — определить взаимосвязь ДТ и активности теломеразы с показателями липидного спектра, структурно-функционального состояния сердца и церебральных сосудов, а также вариабельности ритма сердца (BPC) у пациентов с ЦА 1—3-й степени и СД 2-го типа.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В комплексном клинико-инструментальном исследовании принял участие 161 пациент с ЦА 1—3-й степени. Диагноз ЦА формулировали в со-

ответствии с классификацией атеросклероза Всемирной организации здравоохранения (2015 г.) и подтверждали данными лабораторных и инструментальных методов исследования (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, некорригуемым уровнем артериального давления (АД) > 160/90 мм рт. ст., нарушениями ритма, требующими проведения антиаритмической терапии, снижением фракции выброса (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.

Всем пациентам проводили общепринятое клиническое, лабораторное (общий анализ крови и мочи, определение липидного профиля, уровня креатинина, мочевины, глюкозы, аспартатамино-трансферазы, аланинаминотрансферазы, билирубина) и инструментальное исследования (трансторакальная эхоКГ, электрокардиография (ЭКГ), ультразвуковая доплерография сосудов головы и шеи, МРТ головного мозга).

## Этические аспекты

Протокол исследования был одобрен комитетами по этике ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ имени В. П. Комиссаренко» и ГУ «Институт геронтологии имени Д. Ф. Чеботарева» (оба являются членами Национальной Академии медицинских наук Украины). Все участники дали письменное информированное согласие. Также были учтены Хельсинкская Декларация (2000 г.) и национальные стандарты, касающиеся участия пациентов в исследованиях.

## Сбор и хранение образцов крови

Образцы крови отбирали в вакутайнеры, содержащие ЭДТА. На протяжении 30 мин после забора крови выделяли мононуклеарные клетки перифе-

рической крови на градиенте (1,077 г/см<sup>3</sup>). После выделения клетки замораживали и хранили в жидком азоте при температуре -196 °С. ДНК выделяли из размороженных клеток, используя метод фенол-хлороформной очистки [13]. Чистоту, концентрацию и целостность ДНК контролировали с помощью спектрофотометрии и агарозного гель-электрофореза.

### Измерение ДТ

Относительные длины теломер (ОДТ) измеряли с помощью мультиплексной количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (RT-qPCR — кПЦР-РВ) [4]. 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 достижения конечной концентрации 1 М. Для мультиплексной кПЦР пару теломерных праймеров telg и telc (конечные концентрации каждого — 450 нмоль) объединяли с парой праймеров альбумина albu и albd (конечные концентрации каждого — 250 нмоль) в мастер-микс. Список праймеров, использованных для анализа кПЦР-РВ, приведен в табл. 1.

Профиль термоциклирования был следующим: 95 °С — 15 мин; 2 цикла: 94 °С — 15 с и 49 °С — 15 с; 32 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 анализировали в триплетах. Кривые амплификации были сгенерированы с применением программного обеспечения Opticon Monitor 3. Для этого после термоциклирования и сбора исходных данных с помощью программного обеспечения Opticon Monitor 3 для каждой постановки строили две стандартные кривые: для теломерного 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.

### Определение активности теломеразы

Теломеразную активность определяли с помощью протокола амплификации тандемных повторов с детекцией в реальном времени (ПАТП-РВ) [3]. Мононуклеарные клетки периферической крови и

клетки HEK293 (положительный контроль) обрабатывали буфером для лизиса NP-40 от Invitrogen (50 ммоль Трис, pH 7,4, 250 ммоль NaCl, 5 ммоль ЭДТА, 50 ммоль NaF, 1 ммоль Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 % Nonidet™ P40 (NP40) 0,02 % NaN<sub>3</sub>) с 1 ммоль PMSF (Sigma—Aldrich) и 10 мкл/мл (об./об.) раствора с ингибитором протеаз (Sigma-Aldrich) на льду в течение 30 мин. Последующее центрифугирование выполняли при 16 400 g в течение 20 мин при температуре 4 °С. В свежую пробирку переносили 180 мкл супернатанта. Концентрацию белка измеряли 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 достижения конечной концентрации 5 ммоль. Конечная концентрация праймеров составила 400 нмоль для ACX и 400 нмоль для TS. К 23 мкл смеси ПАТП-РВ добавляли 2 мкл лизата и инкубировали в течение 30 мин при температуре 30 °С. Затем проводили ПЦР при следующих условиях: 95 °С — 1 мин; 40 циклов: из 95 °С — 15 с, 60 °С — 1 мин и с получением сигнала. ПЦР-продукты количественно определяли с помощью Chromo4 (Bio-Rad) и анализировали с использованием программного обеспечения Opticon Monitor v3.1. Клетки HEK293 применяли для генерации стандартной кривой, построенной на точках пяти вариантов разведений.

### Измерение базовых характеристик

Уровень систолического и диастолического АД (САД и ДАД, мм рт. ст.) измеряли дважды с помощью стандартного сфигмоманометра в положении сидя после отдыха в течение не менее 10 мин. Уровень глюкозы в плазме крови определяли с помощью стандартного метода глюкозооксидазы, а общего холестерина (ХС), ЛПВП, ЛПНП, ЛПОНП и триглицеридов (ТГ) — с использованием автоматического анализатора GBG ChemWell 2910 (Awareness Tech. Inc., США) и соответствующих наборов (Global Scientific T5532-1000 и H-7545-320).

### Статистический анализ

Для представления результатов в случае количественных переменных рассчитывали среднее значение показателя и его среднеквадратическое отклонение ( $\pm$  SD) в случае нормального закона

Список праймеров, использованных для кПЦР-РВ

Праймер	Последовательность нуклеотидов праймера
TS	5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'
ACX	5'-GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACCC-3'
telg	5'-ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTG GGTGGGTTAGTGT-3'
telc	5'-TGTTAGGTATCC STATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAACCA-3'
albu	5'-CGGCGGCGGGCGGCGGGCTGGGCGGAA ATGCTGCACAGAATCCTTG-3'
albd	5'-GCCCGGCCCGCCGCG CCCGTCCCGCCGAAAAGCATGGTTCGCTGTT-3'

распределения либо медианное значение показателя (Me) и значения первого (QI) и третьего (QIII) 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 сравнении количественных показателей в двух группах использовали t-критерий (в случае нормального закона распределения) и критерий Манна—Уитни (в случае закона распределения, отличного от нормального). Сравнение качественных показателей проводили с помощью точного критерия Фишера.

Для анализа связи показателя T/S (зависимая переменная) с факторными признаками применяли метод построения и анализа логистических моделей регрессии. Показатель отношения шансов (OR) и его 95 % доверительный интервал (95 % CI) рассчитывали с целью оценки степени связи между зависимой и независимыми переменными [1]. Для анализа адекватности моделей регрессии проводили ROC-анализ [1] и определяли площадь под кривой операционных характеристик (AUC). Порог значимости во всех случаях был установлен на уровне  $p < 0,05$ .

Статистический анализ выполняли с использованием MedCalc v.18.10 (MedCalc Software Inc., Broekstraat, Бельгия, 1993—2018).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Пациентов разделили на две группы: 1-ю — с ЦА 1—2-й степени, 2-ю — с ЦА 3-й степени (перенесшие ИИ) (табл. 2). Средний возраст пациентов —  $(65,1 \pm 10,5)$  и  $(65,4 \pm 9,1)$  года соответственно. Доля мужчин составила 21,2 % в 1-й и 52 % во 2-й группе. Количество пациентов с СД 2-го типа и средним уровнем глюкозы натощак было сопоставимым в обеих группах.

По данным анализа выявлено, что в группе пациентов с ЦА 1—2-й степени уровень общего ХС и ЛПНП был статистически значимо выше ( $p < 0,05$ ), а ЛПВП — ниже, чем в группе пациентов, перенесших ИИ. Величина КИМ с обеих сторон была значимо ( $p < 0,05$ ) больше у пациентов 2-й группы. При этом пациенты двух групп не различались по показателям структурно-функционального состояния сердца: ФВ, ММЛЖ, КДО и показатели диастолической функции сердца были сопоставимы. Показатель НЧ/ВЧ отражает состояние симпатопарасимпатического баланса ВНС. Более высокие значения этого показателя свидетельствуют о преобладании тонуса симпатического отдела ВНС, что статистически значимо наблюдалось у пациентов 1-й группы, при этом триангулярный индекс и индекс HRV, применяемые для оценки общей ВРС, были сопоставимы в обеих группах и превышали нормальные международные значения. Обе группы были сопоставимы по значениям ДТ и активности теломеразы ( $p > 0,05$ ).

Для выявления факторов, влияющих на размер теломер, как маркер раннего старения [1, 2] использовали метод построения логистических моделей регрессии с помощью таких категорий: более короткая ДТ —  $T/S < 2,61$  (низкий и средний тертили); более длинная ДТ —  $T/S > 2,61$ .

При проведении однофакторного регрессионного анализа выявлена одна статистически значимая ( $p = 0,02$ ) связь ДТ с показателем ДД Е/А (табл. 3).

Важно учитывать и тот факт, что именно комбинация факторов риска, а не каждый из них отдельно может приводить к укорочению теломер [16]. Для отбора совокупности значимых факторов риска использовали метод пошагового включения/исключения признаков (Stepwise при пороге исключения  $p > 0,15$  и пороге включения  $p < 0,03$ ). На выделенных значимых факторах риска была построена многофакторная модель логистической регрессии, в кото-



Клинико-инструментальная и лабораторная характеристика пациентов

Показатель	1-я группа (n = 86)	2-я группа (n = 75)	Уровень значимости различия, p
Активность теломеразы	3.22 (2.423; 4.23)	2.85 (1.823; 4.627)	0,485
ДТ	2.51 (2.133; 3.298)	2.66 (2.2; 3.52)	0,325
Возраст, годы	65,1 ± 10,5	65,4 ± 9,1	0,83
Пол (м)	18 (21,2%)	39 (52%)	0,001
СД 2-го типа	19 (22,1%)	13 (17,3%)	0,58
ХС, ммоль/л	5.7 (5.2; 6.5)	5.3 (4.4; 6.475)	0,017
ТГ, ммоль/л	1.31 (1.06; 2.38)	1.55 (1.15; 2.54)	0,156
ЛПВП, ммоль/л	1.54 (1.38; 1.687)	1.5 (1.33; 1.54)	0,035
ЛПНП, ммоль/л	3.345 (2.73; 4.32)	2.73 (2.253; 4.13)	0,011
ЛПОНП, ммоль/л	0.585 (0.47; 1.07)	0.69 (0.51; 1.14)	0,167
Глюкоза натощак, ммоль/л	5,1 ± 0,6	5,0 ± 0,7	0,88
ИА	2.7 (2.37; 3.4)	2.7 (2.06; 3.33)	0,739
КИМ_справа, см	1.00 (0.90; 1.02)	1.00 (1.00; 1.10)	0,018
КИМ_слева, см	1.00 (0.90; 1.10)	1.00 (1.00; 1.20)	0,016
Индекс_HRV	8 (6; 9)	7 (5; 9)	0,524
Триангулярный_индекс	112 (88.; 152.)	96 (80.; 134.)	0,233
НЧ/ВЧ	-49.275 (-183.25; 1.89)	0.39 (-61.39; 3.242)	0,012
КДО, мл	106 (89.6; 134.)	101 (89.6; 125.3)	0,302
ФВ, %	62,0 ± 4,2	61,9 ± 4,2	0,91
ММЛЖ	193 (152; 244)	173 (137.5; 221.25)	0,211
Е/А	0.82 (0.7; 1.14)	0.83 (0.722; 1.13)	0,943
Е/Е'	8 (6; 8)	7 (6; 8.)	0,185

Примечание. Приведено среднее значение ± SD в случае нормального закона распределения; Me (QI; QIII) — в случае закона распределения, отличного от нормального.

рию вошли показатели, представленные в табл. 4. Также установлена статистически значимая положительная связь ДТ с Е/А и ЛПОНП, а также отрицательная — с ФВ и КИМ справа.

Выявлена хорошая согласованность выделенных факторных признаков с риском укорочения ДТ — AUC 0,79 (CI 0,69—0,87) (рис. 1), что может указывать на полноту модели и предикторов ДТ, рассмотренных в данном исследовании. Все представленные в табл. 4 показатели являются весомыми в общей многофакторной модели, хотя статистической значимости для некоторых из них не получено. Вероятно, необходим больший размер выборки.

Для выявления факторов, влияющих на активность теломеразы [1, 2], использовали метод построения логистических моделей регрессии с помощью таких категорий: более низкая актив-

ность теломеразы — T/S < 3,16 (низкий и средний тертили); более высокая активность теломеразы — T/S > 3,16.

При проведении однофакторного регрессионного анализа выявлена статистически значимая (p = 0,02) связь активности теломеразы с мужским полом (табл. 5). Для отбора совокупности значимых факторов риска использовали метод пошагового включения/исключения признаков (Stepwise при пороге исключения p > 0,15 и пороге включения p < 0,03). На выделенных значимых факторах риска была построена многофакторная модель логистической регрессии, в которую вошли показатели, представленные в табл. 6. Также установлена статистически значимая положительная связь активности теломеразы с индексом HRV, отрицательная — с ИА.

Выявлена хорошая согласованность выделенных факторных признаков с риском снижения активнос-

Однофакторный регрессионный анализ показателей липидного обмена, ВРС и структурно-функционального состояния сердца и ДТ

Независимая переменная	Коэффициент регрессии, $b \pm m$	Уровень значимости отличия коэффициента от 0, p	OR (95 % CI)
ИИ, лет	-0,47 ± 0,44	0,28	0,6 (0,3—1,5)
СД 2-го типа, лет	0,67 ± 0,48	0,16	2,0 (0,8—5,0)
Возраст, годы	-0,022±0,021	0,30	0,97 (0,94—1,02)
Пол (м)	0,00 ± 0,47	1,00	1,0 (0,4—2,5)
ХС, ммоль/л	-0,16 ± 0,21	0,45	0,9 (0,6—1,3)
ТГ, ммоль/л	0,31 ± 0,27	0,24	1,4 (0,8—2,3)
ЛПВП, ммоль/л	0,11 ± 1,05	0,92	1,1 (0,1—8,6)
ЛПНП, ммоль/л	-0,25 ± 0,21	0,24	0,8 (0,5—1,2)
ЛПОНП, ммоль/л	0,70 ± 0,59	0,23	2,0 (0,6—6,4)
ИА	-0,23 ± 0,25	0,35	0,8 (0,5—1,3)
КИМ_справа, см	-1,82 ± 1,59	0,25	0,16 (0,01—3,7)
КИМ_слева, см	-1,94 ± 1,51	0,20	0,14 (0,01—2,8)
Индекс_HRV	0,035 ± 0,061	0,56	1,0 (0,9—1,2)
Триангулярный индекс	0,0021 ± 0,0040	0,59	1,00 (0,99—1,01)
НЧ_ВЧ	-0,00021 ± 0,00050	0,67	1,000 (0,999—1,001)
КДО, мл	-0,0022 ± 0,0073	0,76	1,00 (0,98—1,01)
ФВ, %	-0,025 ± 0,052	0,63	0,98 (0,88—1,08)
ММЛЖ	-0,0037 ± 0,0041	0,37	1,00 (0,99—1,00)
Е/А	1,56 ± 0,68	0,02	4,8 (1,3—17,8)
Е/Е'	0,13 ± 0,11	0,25	1,1 (0,9—1,4)

ти теломеразы — AUC 0,73 (CI 0,63—0,83) (рис. 2), что может указывать на полноту модели и предикторов активности теломеразы, рассмотренных в данном исследовании. Все представленные в табл. 6 показатели являются весомыми в общей многофакторной модели, хотя статистической значимости для некоторых не получено. Вероятно, необходим больший размер выборки.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Вопрос о взаимосвязи атеросклероза, в том числе липидного обмена (ЛПОНП), КИМ и биологии теломер в настоящее время окончательно не решен. Одни исследователи считают, что не существует связи между проявлениями субклинического атеросклероза и ДТ, подчеркивая, что более короткие теломеры не связаны с атеросклерозом [10, 12]. Существует ряд работ, в которых получены противоположные результаты. Высказано предположение о том, что взаимосвязь ДТ с развитием ССЗ может быть опосредована влиянием так называемых модулирующих факторов, которые определяют

выраженность оксидантного стресса и хронического воспаления. Ускоренное укорочение теломер может приводить к старению эндотелия и возникновению атеросклероза с дальнейшим развитием ССЗ [9, 12].

Клинических работ, в которых изучали взаимосвязь ДТ со структурно-функциональным состоянием миокарда и диастолической функцией ЛЖ, мало [5, 12]. В исследовании «New castle 85+» с участием людей в возрасте ≥ 85 лет не было обнаружено взаимосвязи ДТ с гипертрофией миокарда и увеличением ИММ ЛЖ, в то время как выявлена значимая связь с ФВ ЛЖ [12]. Следует отметить, что в данном исследовании принимали участие лица с различными ССЗ.

В недавно проведенном популяционном исследовании Asclepios с участием здоровых лиц без явных ССЗ (> 2500 человек в возрасте 35—55 лет) после поправки на пол, возраст и факторы сердечно-сосудистого риска связь ДТ лимфоцитов с параметрами структуры, такими как ИММ ЛЖ и КДР, не обнаружена [5].

Многофакторный анализ показателей липидного обмена, ВРС и структурно-функционального состояния сердца и ДТ

Независимая переменная	Коэффициент регрессии, $b \pm m$	Уровень значимости отличия коэффициента от 0, $p$	OR (95 % CI)
СД 2-го типа	$1,09 \pm 0,57$	0,055	3,0 (1,0—9,1)
ЛПОНП	$2,02 \pm 0,78$	0,01	7,5 (1,6—34,9)
ИА	$-0,52 \pm 0,29$	0,08	0,6 (0,3—1,1)
КИМ_справа	$-4,68 \pm 2,10$	0,03	0,009 (0,002—0,57)
КДО	$-0,017 \pm 0,010$	0,10	0,98 (0,96—1,00)
ФВ	$-0,17 \pm 0,08$	0,04	0,85 (0,72—0,99)
Е/А	$2,75 \pm 0,94$	0,004	15,6 (2,5—98,6)

Иные результаты получены во Фремингемском исследовании с участием 850 человек, в котором ДТ лейкоцитов оказалась прямо связана с ММ ЛЖ и ФВ ЛЖ. Следует отметить, что такая взаимосвязь обнаружена только для лиц с артериальной гипертензией, в то время как в группе нормотоников она была недостоверна.

В нашем исследовании была установлена отрицательная связь ДТ с КИМ. Объяснить это можно тем, что в клинической практике ДТ определяется в лимфоцитах и по существу отражает ДТ в стволовых и прогениторных клетках. Эти клетки, участвуя в репарации повреждения и процессах дифференциации тканей, играют важную роль в поддержании тканевого гомеостаза, в том числе в стенке сосуда, обеспечивая сохранность

эндотелиальной функции. Но так как жесткость сосудов в большей степени определяется состоянием внеклеточного матрикса, возможно, существуют клетки и в матриксе, репликативная активность которых определяет сосудистую жесткость. Или, вероятно, более медленное укорочение теломер влияет на состояние матрикса не через репликативную активность. Несмотря на то что накапливается все больше доказательств того, что укорочение теломер лимфоцитов является ключевым компонентом уменьшения резервов стволовых клеток и возраст-ассоциированной дегенерации тканей, в частности повышения сосудистой жесткости, объяснение этого факта пока нет, что свидетельствует о необходимости проведения дальнейших исследований.

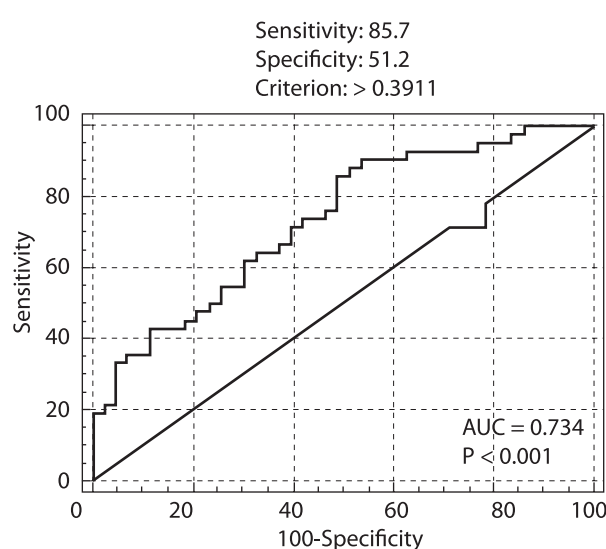
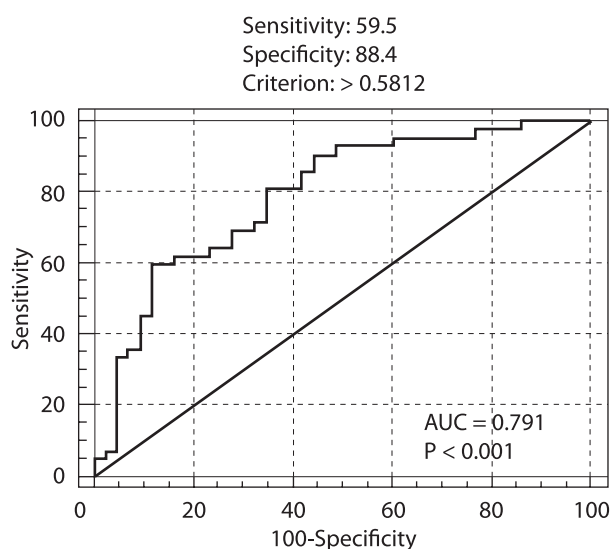


Рис. 1. ROC-кривая 7-факторной модели прогнозирования риска снижения ДТ AUC 0,79 (95 % CI 0,69—0,87)

Рис. 2. ROC-кривая 7-факторной модели прогнозирования риска снижения активности теломеразы AUC 0,73 (95 % CI 0,63—0,83)

Таблиця 5

## Однофакторный регрессионный анализ показателей липидного обмена, ВРС, структурно-функционального состояния сердца и активности теломеразы

Независимая переменная	Коэффициент регрессии, $b \pm m$	Уровень значимости отличия коэффициента от 0, p	OR (95 % CI)
ИИ	0,28 ± 0,43	0,52	0,8 (0,3—1,8)
СД 2-го типа	0,44 ± 0,47	0,35	0,6 (0,3—1,6)
Возраст	-0,0049 ± 0,0030	0,10	1,00 (0,99—1,00)
Пол (м)	7,5 ± 2,5	0,02	1790 (3,5—911000)
ХС	-0,42 ± 0,41	0,31	0,7 (0,3—1,5)
ТГ	-0,10 ± 0,13	0,44	0,9 (0,7—1,2)
ЛПВП	0,073 ± 0,061	0,23	1,07 (0,95—1,21)
ЛПНП	-0,021 ± 0,021	0,31	0,98 (0,94—1,02)
ЛПОНП	0,22 ± 0,47	0,63	1,2 (0,5—3,1)
ИА	-0,40 ± 0,22	0,07	0,67 (0,43—1,03)
КИМ_справа	-0,38 ± 0,27	0,16	0,7 (0,4—1,2)
КИМ_слева	0,61 ± 1,05	0,56	1,8 (0,2—14,4)
Индекс_HRV	-0,30 ± 0,21	0,16	0,7 (0,5—1,1)
Триангулярный индекс	-0,84 ± 0,59	0,16	0,4 (0,1—1,4)
НЧ_ВЧ	-0,52 ± 0,28	0,06	0,60 (0,35—1,02)
ҚДО	-0,01 ± 1,55	0,99	0,99 (0,04—20,5)
ФВ	-0,83 ± 1,47	0,57	0,43 (0,02—7,8)
ММЛЖ	0,094 ± 0,064	0,14	1,10 (0,97—1,24)
Е/А	0,0038 ± 0,0040	0,33	1,00 (0,99—1,01)
Е/Е'	-0,00030 ± 0,00051	0,56	1,000 (0,999—1,001)

Таблиця 6

## Многофакторный анализ показателей липидного обмена, ВРС, структурно-функционального состояния сердца и активности теломеразы

Независимая переменная	Коэффициент регрессии, $b \pm m$	Уровень значимости отличия коэффициента от 0, p	OR (95 % CI)
ЛПОНП	-1,07 ± 0,66	0,11	0,3 (0,1—1,3)
ИА	-0,76 ± 0,35	0,03	0,5 (0,2—0,9)
Индекс HRV	0,54 ± 0,24	0,03	1,7 (1,1—2,8)
Триангулярный индекс	-0,028 ± 0,015	0,07	0,97 (0,94—1,00)
Е/Е'	-0,28 ± 0,13	0,03	0,75 (0,58—0,98)
ЛПОНП	-1,07 ± 0,66	0,11	0,3 (0,1—1,3)

## ВЫВОДЫ

1. ДТ и активность теломеразы сопоставимы у лиц пожилого возраста с ЦА 1—2-й степени и перенесших ИИ, в том числе с СД 2-го типа.

2. На основании многофакторного регрессионного анализа выявлено наличие связи ДТ с ЛПОНП, КИМ, ФВ и диастолической функцией ЛЖ у пациен-

тов с ЦА разной степени, в том числе с СД 2-го типа (AUC 0,79; CI 0,69—0,87).

3. На основании многофакторного регрессионного анализа обнаружена связь активности теломеразы с ИА и HRV у пациентов с ЦА разной степени, в том числе с СД 2-го типа (AUC 0,73; 95 % CI 0,63—0,83).



Ни грантов, ни государственного финансирования не было.

**Конфликта интересов нет.**

**Участие авторов:** поиск литературы, дизайн исследования, сбор, анализ и интерпретация данных, написание статьи — М. С. Егорова; выполнение лабораторных исследований — Д. С. Красненков; статистическая обработка данных — В. Г. Гурьянов; анализ и рецензирование данных — В. Е. Кондратюк; рецензирование данных — Н. Д. Тронько.

## ЛІТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Гур'янов ВГ, Лях ЮЄ, Парій ВД та ін. Посібник з біостатистики. Аналіз результатів медичних досліджень у пакеті EZR (R-statistics). ОВ. Короткий, ОВ. Чалий, КО Чалий, ЯВ Цехмістер: Навч. посібник. К.: Вістка, 2018:208.
2. Koliada AK, Krasnenkov DS, Vaiserman AM. Telomeric aging: mitotic clock or stress indicator? *Frontiers in genetics*. 2015;6(82):24.
3. Banerjee, Partha P., Shankar Jagadeesh. Non-radioactive assay methods for the assessment of telomerase activity and telomere length. *Methods in molecular biology* (Clifton N.J.). 2009;523:383-394.
4. Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic. Acids Res*. 2009;361(9355):1-7.
5. Denil SL, Rietzschel ER, De Buyzere ML et al. On cross-sectional associations of leukocyte telomere length with cardiac systolic, diastolic and vascular function: the Asklepios study. *PLoS One*. 2014;9(12):e115071.
6. Krasnenkov DS, Khalangot MD, Kravchenko VI et al. Additional Impact of Glucose Tolerance on Telomere Length in Persons With and Without Metabolic Syndrome in the Elderly Ukraine Population. Hyperglycemia attenuates the association between telomere length and age in Ukrainian population. *Experimental gerontology*. 2018;110:247-252.
7. Ellehoj H, Bendix L, Osler M. Leucocyte Telomere length and risk of cardiovascular disease in a cohort of 1,397 danish men and women. *Cardiology*. 2016;133:173177. [PubMed]
8. Khalangot M, Krasnenkov D, Vaiserman A et al. Leukocyte telomere length is inversely associated with post-load but not with fasting plasma glucose levels. *Experimental Biology and Medicine*. 2017;242(7):700-708.
9. Lehrer PM, Gevirtz R. Heart rate variability biofeedback: how and why does it work? *Front Psychol*. 2014;5:756.
10. Gielen M, Hageman GJ, Antoniou EE et al. Body mass index is negatively associated with telomere length: a

collaborative cross-sectional meta-analysis of 87 observational studies. *The American journal of clinical nutrition*. 2018;108(3):453-475.

11. Khalangot M, Krasnenkov D, Vaiserman A et al. Leukocyte telomere length is inversely associated with post-load but not with fasting plasma glucose levels. *Experimental Biology and Medicine*. 2017; 242(7):700-708.
12. Plohova EV, Akasheva DU, Tkacheva ON et al. Age-related remodeling of the left ventricle: is there a connection to the cellular aging? *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2015;14(2):52-7.
13. Sambrook J, Russell DW. Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform. *CSH Protoc*. 2006;1:16-22.

## РЕЗЮМЕ

**Исследование диагностической значимости длины теломер и активности теломеразы у пациентов с церебральным атеросклерозом и сахарным диабетом 2-го типа**

**М. С. Егорова<sup>1</sup>, Д. С. Красненков<sup>2</sup>, В. Г. Гурьянов<sup>3</sup>, В. Е. Кондратюк<sup>3</sup>, Н. Д. Тронько<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ имени В. П. Комиссаренко НАМН Украины», Киев

<sup>2</sup>ГУ «Институт геронтологии имени Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины», Киев

<sup>3</sup>Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, Киев

Цереброваскулярные заболевания — одна из важнейших причин заболеваемости и смертности среди взрослого населения.

**Цель работы** — определить взаимосвязь длины теломер (ДТ) и активности теломеразы с показателями липидного спектра крови, структурно-функционального состояния сердца и церебральных сосудов, а также вариабельности ритма сердца у пациентов с церебральным атеросклерозом (ЦА) I—III степени и сахарным диабетом (СД) 2-го типа.

**Материалы и методы.** В комплексном клинико-инструментальном исследовании принял участие 161 пациент с ЦА I—III степени. Теломеразную активность определяли в соответствии с протоколом амплификации тандемных повторов с детекцией в реальном времени. Относительные ДТ измеряли с помощью мультиплексной количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени.

**Результаты и обсуждение.** Пациентов разделили на две группы: 1-ю — с ЦА I—II степени, 2-ю — с ЦА III степени (перенесшие ишемический атеротромботический инсульт — ИИ). Средний возраст больных —  $(65,1 \pm 10,5)$  и  $(65,4 \pm 9,1)$  года соответственно. Доля мужчин составила 21,2 % в 1-й группе и 52 % во 2-й. Для выявления факторов, влияющих на размер теломер как маркер раннего старения, использовали метод построения логистических моделей регрессии по таким категориям: более короткая ДТ —  $T/S < 2,61$  (низкий и средний тертили); более длинная ДТ —  $T/S$  — выше 2,61. Для отбора совокупности значимых факторов риска применяли метод пошагового включения/исключения признаков (Step wise при пороге исключения  $p > 0,15$  и пороге включения  $p < 0,03$ ). На выделенных значимых факторах риска строили многофакторную модель логистической регрессии. Установлена статистически значимая положительная связь ДТ с показателем диастолической функции сердца E/A и липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП), а также отрицательная связь с фракцией выброса (ФВ) и комплексом интима — медиа (КИМ) справа. Для выявления факторов, влияющих на активность теломеразы, использовали метод построения логистических моделей регрессии. Для этого применяли такие категории: более низкая активность теломеразы —  $T/S < 3,16$  (низкий и средний тертили) и более высокая активность теломеразы —  $T/S$  выше 3,16. Установлена статистически значимая положительная связь активности теломеразы с индексом общего напряжения вегетативной регуляции (HRV), а также отрицательная — с индексом атерогенности (ИА).

**Выводы.** ДТ и активность теломеразы сопоставимы у больных пожилого возраста с ЦА I—II степени и перенесших ИИ, в том числе с СД 2-го типа. На основании многофакторного регрессионного анализа выявлено наличие связи ДТ с ЛПОНП, КИМ, ФВ и диастолической функцией ЛЖ у пациентов с ЦА разной степени, в том числе с СД 2-го типа (AUC 0,79; CI 0,69—0,87). По данным многофакторного регрессионного анализа установлено наличие связи активности теломеразы с ИА и HRV у пациентов с ЦА разной степени, в том числе с СД 2-го типа (AUC 0,73; 95 % CI 0,63—0,83).

**Ключевые слова:** церебральный атеросклероз, сахарный диабет 2-го типа, относительная длина теломер, активность теломеразы.

## РЕЗЮМЕ

**Дослідження діагностичної значущості довжини теломер та активності теломераз у пацієнтів із церебральним атеросклерозом і цукровим діабетом 2-го типу**

**М. С. Єгорова<sup>1</sup>, Д. С. Красенков<sup>2</sup>, В. Г. Гур'янов<sup>3</sup>, В. Є. Кондратюк<sup>3</sup>, М. Д. Тронько<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин імені В. П. Комісаренка НАМН України», Київ

<sup>2</sup> ДУ «Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова НАМН України», Київ

<sup>3</sup> Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ

Цереброваскулярні захворювання — одна з найважливіших причин захворюваності і смертності серед дорослого населення.

**Мета роботи** — визначити взаємозв'язок довжини теломер (ДТ) і активності теломераз з показниками ліпідного спектра, структурно-функціонального стану серця, церебральних судин та варіабельності ритму серця у пацієнтів із церебральним атеросклерозом (ЦА) 1—3-го ступеня і цукровим діабетом (ЦД) 2-го типу.

**Матеріали та методи.** У комплексному клініко-інструментальному дослідженні узяв участь 161 пацієнт з ЦА 1—3-го ступеня. Теломеразну активність визначали за допомогою протоколу ампліфікації тандемних повторів з детекцією в режимі реального часу. Відносні ДТ вимірювали за допомогою мультиплексної кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.

**Результати та обговорення.** Пацієнтів розділили на дві групи: 1-шу — з ЦА 1—2-го ступеня, 2-гу — з ЦА 3-го ступеня (які перенесли ішемічний атеротромботичний інсульт — ІІ). Середній вік хворих —  $(65,1 \pm 10,5)$  і  $(65,4 \pm 9,1)$  року відповідно. У 1-й групі частка чоловіків становила 21,2 %, у 2-й — 52 %. Для виявлення чинників, що впливають на розмір ДТ як маркер раннього старіння, використовували метод побудови логістичних моделей регресії із застосуванням таких категорій: коротша ДТ —  $T/S < 2,61$  (низький і середній тертили); довша ДТ —  $T/S > 2,61$ . Для відбору сукупності значущих чинників ризику використовували метод покрокового включення/виключення ознак (Stepwise при порозі виключення  $p > 0,15$  і порозі включення  $p < 0,03$ ). На виділених значущих чинниках ризику побудована багатофакторна модель логістичної регресії. Встановлений статистично значущий позитивний зв'язок ДТ з показником діастолічної функції серця E/A і рівнем ліпопротеїдів дуже низької щільності (ЛПДНЩ), а також негативний — із фракцією викиду (ФВ) і комплексом інтима — медиа (КИМ) право-

руч. Для виявлення чинників, що впливають на активність теломерази, використовували метод побудови логістичних моделей регресії за такими категоріями: більш низька активність теломерази —  $T/S < 3,16$  (низький і середній тертили); більш висока активність теломерази —  $T/S > 3,16$ . Виявлено статистично значущий позитивний зв'язок активності теломерази з індексом загального напруження вегетативної регуляції (HRV), а також негативний зв'язок з індексом атерогенності (IA).

**Висновки.** ДТ і активність теломерази можна порівняти у пацієнтів літнього віку з ЦА 1—2-го ступеня, які перенесли ІІ, у тому числі з ЦД 2-го типу. На підставі багатофакторного регресійного аналізу виявлено наявність зв'язку ДТ з ЛПДНЩ, КІМ, ФВ та діастолічною функцією ЛШ у пацієнтів з ЦА різного ступеня, у тому числі з ЦД 2-го типу (AUC 0,79; CI 0,69—0,87). На підставі багатофакторного регресійного аналізу встановлено наявність зв'язку активності теломерази з ІА і HRV у пацієнтів з ЦА різного ступеня, у тому числі з ЦД 2-го типу (AUC 0,73; 95 % CI 0,63—0,83).

**Ключові слова:** церебральний атеросклероз, цукровий діабет 2-го типу, відносна довжина теломер, активність теломерази.

## SUMMARY

### Study of the diagnostic significance of telomere length and telomerase activity in patients with cerebral atherosclerosis and type 2 diabetes mellitus

*M. S. Yehorova*<sup>1</sup>, *D. S. Krasnenkov*<sup>2</sup>, *V. G. Gurianov*<sup>3</sup>, *V. Ye. Kondratiyk*<sup>3</sup>, *N. D. Tronko*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Endocrinology and Metabolism named after V. P. Komisarenko of the NAMS of Ukraine, Kyiv*

<sup>2</sup>*Institute of Gerontology named after D. F. Chebotarev NAMS of Ukraine, Kyiv*

<sup>3</sup>*O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv*

Cerebrovascular diseases are amongst the most important causes of morbidity and mortality in adult population.

**Objective** — to determine the relationship between telomere length and telomerase activity with lipid spectrum, structural and functional status of the heart and cerebral vessels and heart rate variability in patients with cerebral atherosclerosis (CA) of stages 1—3 and type 2 diabetes mellitus.

**Materials and methods.** In a comprehensive clinical and instrumental study, 161 patients with CA 1—3 stages were included. Telomerase activity was determined using a

real-time tandem repeat amplification protocol. The relative lengths of telomeres were measured using multiplex quantitative polymerase chain reaction in real time.

**Results and discussion.** Patients were divided into 2 groups: 1 — with CA of stage 1-2, 2 — with CA of stage 3 (with history of ischemic atherothrombotic stroke — AS). Mean age =  $65.1 \pm 10.5$  and  $65.4 \pm 9.1$  years, respectively. The percentage of men was 21.2 % in group 1 and 52 % in the group 2. To identify factors that influence telomere size as a marker of early aging, the method of constructing logistic regression models was used. In building the models, the following categories were used: shorter telomere length —  $T/S < 2.61$  (lowest and middle tercile); longer telomere length —  $T/S$  over 2.61. For selection of a set of significant risk factors, the method of step-by-step inclusion/exclusion of signs was used with exclusion threshold  $p > 0.15$  and inclusion threshold  $p < 0.03$ . A multivariate logistic regression model was built on the identified significant risk factors. A statistically significant positive relationship was established between the telomere length and the E/A (diastolic function of the heart) and LPVLD, as well as negative relationships with the EF and the intima-media complex (IMC) on the right. To identify factors affecting telomerase activity, the method of constructing logistic regression models was used. In building the models, the following categories were used: lower telomerase activity —  $T/S < 3.16$  (lowest and middle terciles); higher telomerase activity —  $T/S$  above 3.16. A statistically significant positive correlation of telomerase activity with the total stress index of the vegetative regulation HRV was also established, as well as a negative correlation with the atherogenic index.

**Conclusions.** Telomere length and telomerase activity are comparable in elderly patients with CA of stage 1—2 and history of ischemic atherothrombotic stroke, including type 2 diabetes mellitus. Based on a multifactor regression analysis, the relationship between telomeres length and LPVLD, IMC, EF and LV diastolic function was detected in patients at different stages of CA, including type 2 diabetes (AUC 0.79; CI 0.69—0.87). Based on multivariate regression analysis the association of telomerase activity with atherogenic index and total stress index of vegetative regulation of heart rhythm was revealed in patients at different stages of CA, including type 2 diabetes (AUC 0.73; 95 % CI 0.63—0.83).

**Key words:** cerebral atherosclerosis, type 2 diabetes mellitus, relative telomere length, telomerase activity.

Дата надходження до редакції 24.10.2019 р.