

# Ассоциация укорочения длины теломер с состоянием вегетативной нервной и антиоксидантной систем у пациентов пожилого возраста с церебральным атеросклерозом и сахарным диабетом 2-го типа

М.С. Черская<sup>1</sup>,  
В.Е. Кондратюк<sup>2</sup>,  
В.М. Кухарский<sup>3</sup>,  
Д.С. Красненков<sup>3</sup>,  
В.Г. Гурьянов<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца

<sup>3</sup>ГУ «Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева НАМН Украины»

**Резюме.** Количество теломер, потерянных во время каждого деления клеток, варьируется у разных людей. Предыдущие исследования показали, что увеличение окислительного стресса и хронического воспаления связаны с ускоренным укорочением теломер, однако механизм, лежащий в основе объединения укорочения длины теломер с этими факторами риска, остается гипотетическим. **Целью** данного исследования было определение взаимосвязи длины теломер с показателями оксидативного стресса и вариабельности ритма сердца у пациентов с церебральным атеросклерозом на разных стадиях, в том числе перенесших ишемический атеротромботический инсульт, а также выявление влияния вышеуказанных факторов на прогноз укорочения длины теломер у данной категории пациентов. **Материал и методы.** В комплексном клинико-инструментальном исследовании приняли участие 84 пациента с церебральным атеросклерозом (ЦА) 1-3-й степени и сахарным диабетом 2-го типа (СД). Все пациенты проходили общепринятое клиническое, лабора-

\* Адреса для листування (Correspondence): ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна. E-mail: zdovado@ukr.net

© М.С. Черская, В.Е. Кондратюк, В.М. Кухарский, Д.С. Красненков, В.Г. Гурьянов

торное и инструментальное обследование (электрокардиография (ЭКГ), МРТ головного мозга). **Результаты.** Пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от относительной длины теломер. Медиана относительной длины теломер составила 2,848. Доля мужчин составила 21,2% в 1-й и 52,0% во 2-й группах. Для выявления связи показателей использовали метод построения логистических моделей регрессии. Установлена статистически значимая положительная связь риска укорочения теломер с индексом вегетативной регуляции ритма сердца (НЧ/ВЧ) и концентрацией тиобарбитурореактивных веществ (ТВАРс). **Выводы.** Изменения ВРС и ТВАРс у пациентов с ЦА и СД связаны с длиной теломер — маркером клеточного старения. Длина теломер может стать ранним маркером ослабления автономной регуляции сердечной деятельности и отражать истинный биологический возраст ВНС.

**Ключевые слова:** длина теломер, вегетативная нервная система, оксидативный стресс, церебральный атеросклероз, сахарный диабет 2-го типа.

## 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. Гипоперфузия 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 первично-

му 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.

Изменение функции и структуры сердечной мышцы в ответ на острую и хроническую ишемию головного мозга уже много лет рассматривают в рамках церебро-кардиального синдрома — сложного комплекса метаболических, структурных и электрофизиологических сдвигов, возникающих в миокарде в ответ на острую или хроническую ишемию головного мозга [3]. Доказано, что ишемическое повреждение мозга играет важную роль в развитии электрической нестабильности миокарда, одним из проявлений которой является снижение вариабельности ритма сердца (ВРС), используемое для прогнозирования тяжести и исхода заболевания [1, 9, 11]. Острое и/или хроническое нарушение мозгового кровообращения приводит к изменению автономной регуляции сердечно-сосудистой системы, нарушению ВРС, повышению уровня катехоламинов в плазме и увеличению случаев кардиальных аритмий, что в свою очередь может обусловить увеличение вероятности внезапной смерти [1, 2, 5, 7, 12].

Известно, что в последние годы среди сосудистых болезней мозга увеличивается доля ишемических форм. С учетом прогрессирую-

## Оригінальні дослідження

щего 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/антиокислители. Установлено, что механизмы антиоксидантной защиты универсальны для всех живых [14]. По мере развития современных представлений становится все более понятной роль окислительного стресса, представляющего собой дисбаланс между проокислителями и антиоксидантными защитными механизмами организма как центрального звена патогенеза ряда острых и хронических состояний и заболеваний, таких как атеросклероз, СД, ишемия и др. [14]. В конечном итоге все эти воздействия могут приводить к напряжению и последующей декомпенсации механизмов антиоксидантной защиты организма и развитию окислительного стресса, проявляющегося на клеточном, тканевом и органном уровнях.

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 их укорочением [10, 12]. Несколько общих фак-

торов риска для сердечно-сосудистых заболеваний, таких как курение, сахарный диабет, гиперхолестеринемия, гипертензия, ожирение, низкая физическая активность, потребление алкоголя и психосоциальные проблемы, были связаны с короткой длиной теломер. Однако механизм, лежащий в основе объединения укорочения длины теломер с этими факторами риска, остается гипотетическим.

**Целью** данного исследования было определение взаимосвязи длины теломер с показателями окислительного стресса и вариабельности ритма сердца у пациентов с церебральным атеросклерозом на разных стадиях, в том числе перенесших ишемический атеротромботический инсульт, а также выявление влияния вышеуказанных факторов на прогноз укорочения длины теломер у данной категории пациентов.

### Материал и методы

В комплексном клинико-инструментальном исследовании приняли участие 84 пациента с церебральным атеросклерозом (ЦА) 1-3-й степени и СД. 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 некорригируемым артериальным давлением (АД) >160/90 мм рт. ст., другими 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.

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

Протокол исследования одобрен комитетами по этике 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.

Образцы крови отбирали в вакутайнеры, содержащие ЭДТА. На протяжении 30 минут после забора крови производили выделение мононуклеарных клеток периферической крови на градиенте (1,077 г/см<sup>3</sup>). После выделения клетки замораживали и хранили в жидком азоте при -196 °С. Выделение ДНК производили из размороженных клеток, используя метод фенол-хлороформной очистки [14]. Контроль чистоты, концентрации и целостности ДНК проводили с помощью спектрофотометрии и агарозного гель-электрофореза.

Относительные длины теломер (ОДТ) измеряли с помощью мультиплексной количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (RT-qPCR — кПЦР-РВ) [4]. Реакционная смесь для ПЦР была приготовлена 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, приводится ниже в **таблице 1**.

**Таблица 1.** Список праймеров, использованных для количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (кПЦР-РВ)

Название праймера	Последовательность нуклеотидов праймера
TS	5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'
ACX	5'-GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACCC-3'
Telg	5'-ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTG GGTTTGGTTAGTGT-3'
Telc	5'-TGTTAGGTATCC STATCCCTATCCCTATCCCTATC CCTAACA-3'
Albu	5'-CGGCGGCGGGCGGCGGCTGGGGCGGAA ATGCTGCACAGAATCCTTG-3'

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 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 построены 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.

Теломеразную активность определяли с помощью протокола амплификации тандемных повторов с детекцией в реальном времени (ПАТП-РВ) [2]. 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 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 минут. Последующее центрифугирование проводили при 16400 g в течение 20 мин. при +4 °С. 180 мкл супернатанта переносили в свежую пробирку. Измерение концентрации белка

## Оригінальні дослідження

проводили с помощью набора для анализа белка Pierce™ BCA (Thermo Scientific) согласно протоколам производителя.

Реакционную смесь для кПЦР-РВ готовили на основе Luna Universal qPCR и RT-qPCR (New England Biolabs) с добавлением EGTA до конечной концентрации 5 мМ, конечная концентрация праймеров была 400 нМ для АСХ и 400 нМ для ТS. 2 мкл лизата добавляли к 23 мкл смеси ПАТП-РВ и инкубировали в течение 30 мин. при 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 были количественно определены с помощью Chromo4 (Bio-Rad) и проанализированы в программном обеспечении Opticon Monitor v3.1. Клетки НЕК293 использовали для генерации стандартной кривой, построенной на точках пяти вариантов разведений.

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, С9322). 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 тетраметилэтилендиамина [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 ингибиции 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, S9697). 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 по 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 по 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 °С в течение 6 недель.

Исследование ВРС проводили на аппарате Schiller AT-10 plus (Швейцария) с использованием статистического анализа временной области и спектрального анализа короткой (пятиминутной) последовательности электрокардиографических интервалов R–R в состоянии покоя. Определяли следующие показатели временного анализа: стандартное отклонение (SDNN, мс), стандартное отклонение разностей продолжительности соседних

интервалов R–R (RMSSD, мс). При выполнении спектрального анализа определяли: общую мощность спектра ритма сердца ( $tP$ ,  $мс^2$ ), мощности в диапазоне 0,00–0,04 Гц ( $Vlf$ ,  $мс^2$ ), 0,04–0,15 Гц ( $lf$ ,  $мс^2$ ), 0,15–0,4 Гц ( $hf$ ,  $мс^2$ ) и соотношение  $lf/hf$ . Спектральные составляющие  $lf$  и  $hf$  анализировали как в абсолютных значениях, так и в производных от них нормализованных единицах (н.е.), которые автоматически рассчитывались по формулам:  $l_{norm} = lf / (tP - Vlf) \times 100\%$  и  $hf_{norm} = hf / (tP - Vlf) \times 100\%$ . Определяли также структуру спектра в процентном соотношении составляющих: %Vlf, %lf, %hf.

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.

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 ( $Q_I$ ) 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 использовали  $t$ -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. Критический уровень значимости во всех случаях —  $p < 0,05$ .

При проведении анализа связи факторных признаков с риском укорочения длины теломер использован метод построения и анализа моделей логистической регрессии [10]. Для оценки адекватности моделей использован метод анализа кривых операционных характеристик (ROC-кривые), рассчитывали площадь под кривой (AUC) и ее 95% доверительный

интервал (95% ДИ). Для оценки направления и силы связи факторных признаков с риском укорочения длины теломер рассчитывали показатель отношения шансов (OR) и соответствующий 95% ДИ. Статистический анализ выполнен в программе MedCalc v. 19.1.3 (MedCalcSoftwareInc., Broekstraat, Бельгия, 1993–2019) [10].

## Результаты и обсуждение

Пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от относительной длины теломер (табл. 2). Медиана относительной длины теломер составила 2,848. Все пациенты со значением длины теломер ниже этого показателя были отнесены к группе коротких теломер (I), а те, у которых этот показатель превышал данное значение — к группе длинных теломер (II). Доля мужчин составила 21,2% в 1-й и 52,0% во 2-й группах.

Для выявления связи показателей, представленных в таблице 2, с укорочением длины теломер использовали метод построения логистических моделей регрессии. Важно учитывать и тот факт, что именно комбинация факторов риска, а не каждый фактор риска по отдельности, может приводить к укорочению теломер [16]. Для отбора совокупности значимых факторов риска использовали метод пошагового включения/исключения признаков (Stepwise при пороге исключения  $p > 0,2$  и пороге включения  $p < 0,1$ ). На выделенных значимых факторах риска была построена многофакторная модель логистической регрессии, в которую вошли показатели, представленные в таблице 3. Факторы, которые не представлены в таблице, в данную модель не вошли. Была установлена статистически значимая положительная связь риска укорочения теломер с индексом вегетативной регуляции ритма сердца (НЧ/ВЧ) и концентрацией TBARs.

Выявлена хорошая согласованность выделенных факторных признаков с риском укорочения теломер — AUC=0,65 (95% ДИ 0,69–0,96) (рис.), что может указывать на полноту модели и предикторов укорочения длины теломер, рассмотренных в данном исследовании. Все представленные в таблице 3 показатели являются весомыми в общей многофакторной модели.

## Оригинальні дослідження

**Таблиця 2.** Основные клинические характеристики и маркеры оксидативного стресса в зависимости от относительной длины теломер

Показатель	I (n=42)	II (n=43)	p
Возраст	64,3±9,6	67,1±9,8	0,182
Каталаза (CAT)	564±159	502±138	0,061
Глутатион (GSH)	3,45 (3,38-3,53)	3,492 (3,388-3,61)	0,447
Супероксиддисмутаза (SOD)	8,389 (7,948-8,83)	8,509 (8,028-9,312)	0,428
Тиобарбитуро-реактивные вещества (TBARs)	17,61 (16,24-19,16)	17,29 (15,628-18,325)	0,187
Конечные продукты гликирования (AGE)	30,1±7,7	31,4±7,2	0,471
Активность теломеразы	2,875 (2,13-4,09)	3,320 (2,463-4,26)	0,262
Индекс HRV	7 (5-9)	8 (6-1)	0,209
Триангулярный индекс	104 (72-136)	104 (9-166)	0,174
ОНЧ	300,5 (44-484)	394 (121,75-797,25)	0,217
НЧ	83,5 (27-245)	195 (61-634,5)	0,056
ВЧ	-4,43 (-56,64-132)	80 (-46,728-535,5)	0,038
НЧ/ВЧ	-44,35 (-113,11-1,63)	0,39 (-99,968-1,262)	0,482

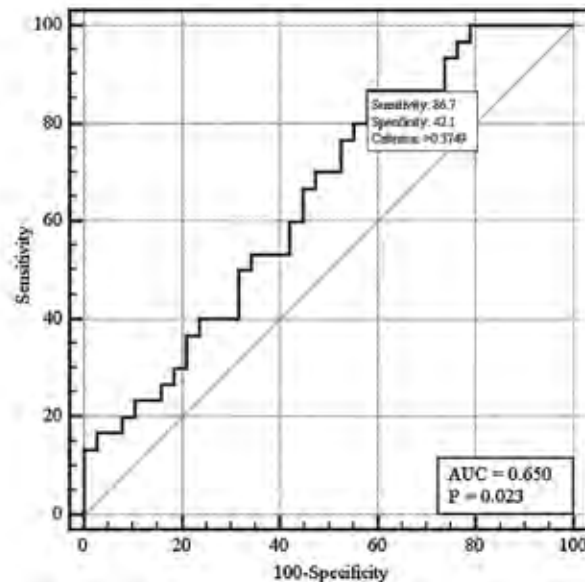
Примечание: приведено среднее значение ±SD в случае нормального закона распределения, Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>) в случае закона распределения, отличного от нормального.

**Таблиця 3.** Многофакторный анализ прогнозирования укорочения длины теломер с показателями оксидативного стресса, ВРС, длины теломер и активности теломеразы (модель логистической регрессии)

Независимые переменные	Коэффициент регрессии, b±m	p	OR (95% ДИ)
TBARs	0,17±0,09	0,063	1,19 (0,99-1,43)
НЧ/ВЧ%	-0,0027±0,0016	0,087	1,00 (0,99-1,00)

Примечание: p<0,05 — отличие коэффициента модели от 0 статистически значимо.

Многочисленные исследования подтвердили высокую прогностическую значимость определения спектральных показателей ВРС: НЧ/ВЧ отражает общую мощность спектра воздействия обоих отделов вегетативной нервной системы, ВЧ — изменения тонуса парасимпатической нервной системы, НЧ — симпато-парасимпатическое влияние, ОНЧ — гуморальную регуляцию. Достоверно более низкие значения ВЧ в группе пациентов с более короткой длиной теломер свидетельствует о преобладании симпатического тонуса у данной категории пациентов, что характерно для состояния стресса и неблагоприятно

**Рис.** ROC-кривая 2-факторной модели прогнозирования риска укорочения теломер, AUC=0,65 (95% ДИ 0,69-0,96)

гоприятно сказывается на деятельности сердечно-сосудистой системы [2, 3]. В поисках причин связи ВРС с относительной длиной теломер мы рассмотрели клеточное старение. В 1961 г. Hayflick L. экспериментально установил, что способность соматических клеток человека к пролиферации ограничена. После прекращения деления в клетках происходят необратимые изменения, ведущие к ее гибели. Старение клетки, основанное на лимите Hayflick L., получило название репликативного. Укорочение теломер стало одной из теорий, объясняющих процесс репликативного старения. Когда длина теломер достигает критического размера, клетка переходит в терминальное неделяющееся состояние — клеточное старение [9].

Существует предположение, что длина теломер как маркер биологического возраста связана с возрастными изменениями вегетативной регуляции ритма сердца. По результатам настоящего исследования прогноз укорочения длины теломер ассоциирован с общей мощностью спектра воздействия обоих отделов вегетативной нервной системы. Механизмом связи длины теломер с НЧ/ВЧ может быть репликативное старение нейронов ВНС и кардиомиоцитов.

Клинические работы по изучению взаимосвязи длины теломер с показателями ВРС немногочисленны. Было обнаружено, что у мужчин с меньшей длиной теломер отмечается замедленное восстановление временных

параметров ВРС и САД в ответ на стресс по сравнению с группой мужчин с более длинными теломерами [14].

Ученые выявили, что у детей 5-6 лет с короткими теломерами в ответ на задания (стресс) отмечалась более высокая симпатическая и низкая парасимпатическая активность. Эти данные дают основания предполагать, что реакция ВНС в ответ на стресс генетически predetermined and связана с длиной теломер [15].

## Выводы

1. ВРС и ТВАРs у пациентов с церебральным атеросклерозом и сахарным диабетом связаны с длиной теломер — маркером клеточного старения.
2. Длина теломер может стать ранним маркером ослабления автономной регуляции сердечной деятельности и отражать истинный биологический возраст ВНС.

## Список использованной литературы

1. Banerjee P, Jagadeesh S. Non-Radioactive Assay Methods for the Assessment of Telomerase Activity and Telomere Length. *Methods in Molecular Biology* 2009; 1: 383-394.
2. Bekaert S, De Meyer T, Rietzschel ER, et al. Telomere length and cardiovascular risk factors in a middle-aged population free of overt cardiovascular disease. *Aging Cell*. 2007; 6: 639-647.
3. Benetos A, Kark JD, Susser E, et al. Tracking and fixed ranking of leukocyte telomere length across the adult life course. *Aging Cell*. 2013; 12: 615-621.
4. Benetos A, Toupane S, Gautier S, et al. Short Leukocyte Telomere Length Precedes Clinical Expression of Atherosclerosis. *Circulation Research*. 2018; 122: 616-623.
5. Cawthon R. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Research*. 2009; 37: e21-e21.
6. Belsky D, Moffitt T, Cohen A, et al. Eleven Telomere, Epigenetic Clock, and Biomarker-Composite Quantifications of Biological Aging: Do They Measure the Same Thing? *Am J Epidemiol*. 2018; 187(6):1220-1230.
7. Das BK, Sun TX, Akhtar NJ, et al. Fluorescence and immunochemical studies of advanced glycation-related lens pigments. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998; 39: 2058-2066.
8. De Meyer T, Nawrot T, Bekaert S, et al. Telomere Length as Cardiovascular Aging Biomarker: JACC Review Topic of the Week. 2018. *JACC*; 72: 805-813.
9. De Meyer T, Rietzschel ER, De Buyzere ML et al. Systemic telomere length and preclinical atherosclerosis: the Asklepios Study. *Eur Heart J*. 2009; 30: 3074-3081.
10. Fiorenza Magi, Ivan Dimauro, Fabrizio Margheritini et al. Telomere length is independently associated with age, oxidative biomarkers, and sport training in skeletal muscle of healthy adult males. *Free Radic. Res*. 2018; 52:639-647.
11. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta*. 1991; 196: 143-151.
12. José Santiago Ibáñez-Cabellosa, Giselle Pérez-Machadob, Marta Seco-Cerveraa, et al. Acute telomerase components depletion triggers oxidative stress as an early event previous to telomeric shortening. *Redox Biology*. 2018; 14:398-408.
13. Koriath M, Müller C., Pfeiffer N, et al. Relative Telomere Length

- and Cardiovascular Risk Factors. *Biomolecules*. 2019; 9:192.
14. Kostyuk VA, Potapovich AI. Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. *Biochem Int*. 1989; 19:1117-1124.
  15. Mokrasch LC, Teschke EJ. Glutathione content of cultured cells and rodent brain regions: a specific fluorometric assay. *Anal Biochem*. 1984; 140: 506-509.
  16. Nettle D, Andrews C, Reichert S, et al. Early-life adversity accelerates cellular ageing and affects adult inflammation: experimental evidence from the European starling. *Sci. Rep*. 2017. 7: 40794.
  17. Reichert S, Stier A, Zahn S, et al. Increased brood size leads to persistent eroded telomeres. *Front. Ecol. Evol*. 2014; 2: 10114.
  18. Sambrook J, Russell D. Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol: Chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2006; 1: pdb.prot4455.
  19. Toupane S, Labat C, Temmar M, et al. Short telomeres, but not telomere attrition rates, are associated with carotid atherosclerosis. *Hypertension*. 2017; 70: 420-425.
  20. Tüközkan, Nurten, Hüsametlin Erdamar. Measurement of Total Malondialdehyde in Plasma and Tissues by High-Performance Liquid Chromatography and Thiobarbituric Acid Assay. *Firat Tip Dergisi*. 2006; 11: 88-92.
  21. 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; 39: 2522-2526.

(Надійшла до редакції 12.05.2020 р.)

## Асоціація вкорочення довжини теломер зі станом вегетативної нервової та антиоксидантної систем у пацієнтів похилого віку з церебральним атеросклерозом і цукровим діабетом 2-го типу

М.С. Черська<sup>1</sup>, В.Є. Кондратюк<sup>2</sup>, В.М. Кухарський<sup>3</sup>,  
Д.С. Красненко<sup>3</sup>, В.Г. Гур'янов<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця

<sup>3</sup>ДУ «Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України»

**Резюме.** Кількість теломер, втрачених під час кожного поділу клітин, варіює в різних людей. Попередні дослідження показали, що збільшення окисного стресу та хронічного запалення пов'язано з прискореним вкороченням теломер, проте механізм, що складає підґрунтя поєднання вкорочення довжини теломер з цими чинниками ризику, залишається гіпотетичним. **Метою** даного дослідження було визначення взаємозв'язку довжини теломер з показниками оксидативного стресу та варіативності ритму серця в пацієнтів із церебральним атеросклерозом (ЦА) і цукровим діабетом 2-го типу (ЦД) на різних стадіях, у тому числі в тих, які перенесли ішемічний атеротромботичний інсульт, а також виявлення впливу вищевказаних чинників на прогноз вкорочення довжини теломер у даної категорії пацієнтів. **Матеріал і методи.** У комплексному клініко-інструментальному дослідженні взяли участь 84 пацієнти із ЦА 1-3-го ступенів та СД. Усі пацієнти проходили загальноприйняте клінічне, лабораторне та інструментальне обстеження (електрокардіографія (ЕКГ), МРТ головного мозку).



## Оригінальні дослідження

**Результати.** Пацієнтів розподілили на 2 групи залежно від відносної довжини теломер. Медіана відносної довжини теломер склала 2,848. Частка чоловіків склала 21,2% в 1-й і 52,0% у 2-й групах. Для виявлення зв'язку показників використовували метод побудови логістичних моделей регресії. Встановлено значущий позитивний зв'язок ризику вкорочення теломер з індексом вегетативної регуляції ритму серця (НЧ/ВЧ) і концентрацією тіобарбітурореактивних речовин (ТВАР). **Висновки.** Зміни ВРС і ТВАР у пацієнтів із ЦА та ЦД пов'язано з довжиною теломер — маркером клітинного старіння. Довжина теломер може стати раннім маркером ослаблення автономної регуляції серцевої діяльності та відображати істинний біологічний вік ВНС.

**Ключові слова:** довжина теломер, вегетативна нервова система, оксидативний стрес, церебральний атеросклероз, цукровий діабет 2-го типу.

### Association of telomere shortening with the state of the autonomic nervous and antioxidant systems in elderly patients with cerebral atherosclerosis and type 2 diabetes

M.S. Cherska<sup>1</sup>, V.E. Kondratiuk<sup>2</sup>, V.M. Kukharsky<sup>3</sup>,  
D.S. Krasnienkov<sup>3</sup>, V.G. Guryanov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>SI «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

<sup>2</sup>Bogomolets National Medical University

<sup>3</sup>SI «D. F. Chebotarev Institute of Gerontology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

**Abstract.** The number of telomeres lost during each cell division varies from person to person. Previous studies have shown that in-

creased oxidative stress and chronic inflammation are associated with accelerated telomere shortening, but the mechanism underlying the combination of telomere shortening with these risk factors remains hypothetical. **The objectives** of the study was: to determine the relationship of telomere length with indicators of oxidative stress and heart rate variability in patients with cerebral atherosclerosis at different stages, including those who underwent ischemic atherothrombotic stroke; revealing the influence of the above factors on the prognosis of shortening the telomere length in this category of patients. **Material and methods.** A comprehensive clinical and instrumental study involved 84 patients with grade 1-3 CA and type 2 diabetes mellitus (DM). All patients underwent conventional clinical, laboratory and instrumental studies (electrocardiography (ECG), brain MRI). **Results.** Patients were divided into 2 groups depending on the relative length of the telomeres. The median of the relative length of the telomeres was 2.848. The proportion of men was 21.2% in the 1st and 52% in the 2nd group. To identify the relationship of indicators, the method of constructing logistic regression models was used. A statistically significant positive association of the risk of telomere shortening with the index of autonomic regulation of heart rhythm (LF/HF) and the concentration of thiobarbituroreactive substances (TBARs) was established. **Conclusions.** Changes in HRV and TBARs in patients with CA and DM are associated with telomere length, a marker of cell aging. Telomere length can be an early marker of weakened autonomic regulation of cardiac activity and reflect the true biological age of the ANS.

**Keywords:** telomere length, autonomic nervous system, oxidative stress, cerebral atherosclerosis, type 2 diabetes mellitus.