

## Исследование диагностической значимости длины теломер у пациентов с церебральным атеросклерозом

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

<sup>1</sup>ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ имени В. П. Комисаренко НАМН Украины», г. Киев, <sup>2</sup>ГУ «Институт геронтологии имени Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины», г. Киев, <sup>3</sup>Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, г. Киев, Украина

А – концепция и дизайн исследования; В – сбор данных; С – анализ и интерпретация данных; D – написание статьи; Е – редактирование статьи; F – окончательное утверждение статьи

### Ключевые слова:

длина теломер, активность теломеразы, церебральный атеросклероз.

Запорожский медицинский журнал. 2020. Т. 22, № 3(120). С. 296-302

### \*E-mail:

emariya83@gmail.com

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

**Цель работы** – определение взаимосвязи длины теломер с показателями липидного спектра, структурно-функционального состояния сердца и церебральных сосудов и вариабельности ритма сердца у пациентов с церебральным атеросклерозом (ЦА) 1–3 стадий.

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

**Результаты.** Пациентов поделили на 2 группы: I – с ЦА 1–2 степени, II – с ЦА 3 степени (перенесшие ишемический атеротромботический инсульт – ИИ). Средний возраст – 65,1 ± 10,5 и 65,4 ± 9,1 года соответственно. Доля мужчин составила 21,2 % в первой группе, 52 % – во второй. Для определения факторов, влияющих на размер теломер как маркера раннего старения, использовали метод построения логистических моделей регрессии. При построении моделей использовали такие категории: более короткая длина теломер – T/S < 2,61 (низкий и средний тертили); более длинная длина теломер – T/S выше 2,61. 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 построена многофакторная модель логистической регрессии. Установлена статистически значимая положительная связь длины теломер с показателем диастолической функции сердца E/A и ЛПОНП, а также отрицательные связи с ФВ и комплексом интима-медиа (КИМ) справа.

**Выводы.** Длина теломер сопоставима у пожилых пациентов с ЦА 1–2 стадий и перенесших ишемический атеротромботический инсульт. На основании многофакторного регрессионного анализа отмечено наличие связи длины теломер с ЛПОНП, КИМ, ФВ и диастолической функцией левого желудочка у пациентов на разных стадиях ЦА, в том числе с СД 2 типа (AUC = 0,79 (CI 0,69–0,87)).

### Ключові слова:

довжина теломер, активність теломераз, церебральний атеросклероз.

Запорізький медичний журнал. 2020. Т. 22, № 3(120). С. 296-302

## Дослідження діагностичного значення довжини теломер у пацієнтів із церебральним атеросклерозом

М. С. Єгорова, Д. С. Красненков, В. Г. Гурьянов, В. Є. Кондратюк

Цереброваскулярні захворювання – одна з найважливіших причин захворюваності та смертності серед дорослого населення.

**Мета роботи** – визначення взаємозв'язку довжини теломер з показниками ліпідного спектра, структурно-функціонального стану серця і церебральних судин і вариабельності ритму серця в пацієнтів з церебральним атеросклерозом (ЦА) 1–3 стадій.

**Матеріали та методи.** У комплексному клініко-інструментальному дослідженні взяли участь 161 пацієнт із ЦА 1–3 ступенів. Теломеразну активність визначали за допомогою протоколу ампліфікації tandemних повторів із детекцією в режимі реального часу. Відносні довжини теломер вимірювали за допомогою мультиплексної кількісної полімерази ланцюгової реакції в реальному часі.

**Результати.** Пацієнтів поділили на 2 групи: I – із ЦА 1–2 ступеня, II – із ЦА 3 ступеня (які мали в анамнезі ішемічний атеротромботичний інсульт – ІІ). Середній вік становив 65,1 ± 10,5 і 65,4 ± 9,1 року відповідно. Частка чоловіків становила 21,2 % у першій, 52 % – у другій групі. Для виявлення факторів, що впливають на розмір довжини теломер як маркера раннього старіння, використовували метод побудови логістичних моделей регресії. Під час побудови моделей використовували такі категорії: коротша довжина теломер – T/S < 2,61 (низький і середній тертили); довша довжина теломер – T/S понад 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 значущих факторах ризику, які визначили, побудована багатофакторна модель логістичної регресії. Встановили статистично значущий позитивний зв'язок довжини теломер із показником діастолічної функції серця E/A і ЛПДНЦ, а також негативний зв'язок із ФВ і комплексом інтима-медіа (КИМ) справа.

**Висновки.** Довжина теломер зів'язана у літніх пацієнтів із ЦА 1–2 стадії і тих, хто мав ішемічний атеротромботичний інсульт. На підставі багатофакторного регресійного аналізу встановили наявність зв'язку довжини теломер із ЛПДНЦ, КИМ, ФВ і діастолічною функцією лівого шлуночка в пацієнтів на різних стадіях, зокрема і з ЦД 2 типу ЦА (AUC = 0,79 (CI 0,69–0,87)).

## Study of the diagnostic significance of telomere length in patients with cerebral atherosclerosis

M. S. Yehorova, D. S. Krasnienkov, V. H. Hurianov, V. Ye. Kondratiuk

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

**Aim** – to determine the relationship between telomere length and lipid spectrum, structural and functional state of the heart and cerebral vessels and heart rate variability in patients with 1–3 degree cerebral atherosclerosis (CA).

**Materials and methods.** In a comprehensive clinical and instrumental study, 161 patients with 1–3 degree CA were enrolled. Telomerase activity was determined using a real-time tandem repeat amplification protocol. The relative lengths of telomeres were measured by multiplex quantitative polymerase chain reaction in real time.

**Results.** Patients were divided into 2 groups: I – with CA of 1–2 degree, II – with CA of 3 degree (who had suffered an ischemic atherothrombotic stroke (AS)). Mean age was  $65.1 \pm 10.5$  and  $65.4 \pm 9.1$  years, respectively. The proportion of men was 21.2 % in group I and 52 % in group II. To identify the 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 (low and medium tertiles); longer telomere length – T/S over 2.61.

For a set of significant risk factors selection, the method of step-by-step inclusion / exclusion of signs was used (stepwise exclusion threshold value of  $P > 0.15$  and inclusion threshold value of  $P < 0.03$ ). A multivariate logistic regression model was developed based on the identified significant risk factors. A statistically significant positive relationship was found between the telomere length and both the E/A index (diastolic function of the heart) and LPVLD, as well as negative relationship with both the EF and the intima-media complex (IMC) on the right.

**Conclusions.** Telomere length is comparable in elderly patients with 1–2 degree CA and those who suffered an ischemic atherothrombotic stroke. Based on the multifactor regression analysis, the relationship between telomere 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)).

### Key words:

telomere length, telomerase activity, cerebral atherosclerosis

Zaporozhye medical journal  
2020; 22 (3), 297-302

Цереброваскулярные заболевания (ЦВЗ) – 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 (НМК), является генерализованный атеросклероз [7]. Сахарный диабет (СД) сопровождается ускоренными изменениями сосудов, что делает его также ведущей причиной развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и смертности. Ключевое звено таких изменений – гипергликемия, инсулинорезистентность, накопление конечных продуктов гликирования. Гиперинсулинемия и гипергликемия, как и физиологическое старение, активируют процессы хронического воспаления и окислительного стресса [9]. В стареющем организме, как и в организме пациента с СД, повышается уровень различных маркеров воспаления, увеличивается активность перекисного окисления липидов. Все это приводит к нарушению синтеза белков, апоптозу клеток и развитию дегенеративных процессов [13].

Одна из причин разной скорости старения сердца и сосудов у пациентов с СД 2 типа (СД2) – изначально разная генетическая защищенность от воздействия внешних факторов. Длина теломер и активность теломеразы могут претендовать на роль генетических маркеров биологического возраста сосудов. Теломеры – 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. Опубликованы данные, что длина теломер в лейкоцитах отражает длину теломер в стволовых клетках и соответствует их длине в эндотелиальных прогениторных клетках, что позволяет рассматривать этот параметр как биомаркер старения сосудов.

Получены первые указания на укорочение теломер у лиц с СД2 и нарушенной толерантностью к глюкозе [9]. Укорочение теломер может быть связано с развитием СД2, ССЗ и старением сосудов [3].

У людей теломеры состоят из сотен и тысяч повторяющихся последовательностей TTAGGG на хромосомных концах для поддержания геномной целостности [10,12]. Поскольку репликация ДНК асимметрична вдоль двойной нити, последовательности в 3'-гидроксильных концах теряет 30–200 нуклеотидов с каждой репликации ДНК и делением клеток. Теломеры обеспечивают повторяющуюся noncoding последовательность на 3' конце для того, чтобы предотвратить потерю критической генетически зашифрованной информации во время репликации. Кроме того, теломеры покрыты комплексом из 6 белков (Telomere Repeat Factor 1 (TRF1), Telomere Repeat Factor 2 (TRF2), репрессора активатора протеина 1 (Rap1), TRF1 и TRF2 взаимодействия ядерных белков 2 (TIN2), трипептидил-пептидазы 1 (TRP1), защиты теломер 1 (POT1)), а также известных белков [12], которые упакованы в компактную структуру Т-петли, чтобы предотвратить от ошибок репликации. Поэтому теломеры предложены как митотические часы, которые измеряют, сколько раз клетка разделилась.

Количество теломер, потерянных во время каждого деления клеток, варьирует у разных людей. Предыдущие исследования показали, что увеличение окислительного стресса и хронического воспаления связаны с более высокой потерей теломер и ускоренным укорочением теломер [10,12]. Несколько общих факторов риска для сердечно-сосудистых заболеваний (курение, сахарный диабет, гиперхолестеринемия, гипертонии, ожирение, низкая физическая активность, употребление алкоголя, психосоциальные проблемы) 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 с показателями липидного спектра, структурно-функционального состояния сердца и церебральных сосудов и вариабельности ритма сердца у пациентов с церебральным атеросклерозом 1–3 стадий.

### Материалы и методы исследования

В комплексном клинико-инструментальном исследовании приняли участие 161 пациент с церебральным атеросклерозом (ЦА) 1–3 степени. Диагноз церебральный атеросклероз сформулирован в соответствии с классификацией атеросклероза Всемирной организации здравоохранения от 2015 г., подтвержден 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).

Протокол исследования одобрен комитетами по этике ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ имени В.П. Комиссаренко» и ГУ «Институт геронтологии имени Д. Ф. Чеботарева» (оба являются частью Национальной академии медицинских наук Украины). Все участники дали письменное информированное согла-

сие. Хельсинкская декларация (2000 г.) и применимые национальные стандарты, касающиеся их участия в исследованиях, были учтены.

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

Относительные длины теломер (ОДТ) измеряли с помощью мультиплексной количественной полимеразой цепной реакции в реальном времени (RT-qPCR – кПЦР-РВ) [4]. Реакционная смесь для ПЦР приготовлена с использованием коммерческого набора реагентов Luna® Universal qPCR и RT-qPCR (New England Biolabs) с добавлением бетаина (Sigma-Aldrich) до конечной концентрации 1М. Для мультиплексной кПЦР пара теломерных праймеров *telg* и *telc* (конечные концентрации каждого – 450 нмоль) объединены с парой праймеров альбумина *albu* и *albd* (конечные концентрации каждого – 250 нмоль) в мастер-микс. Список праймеров, используемых для анализа кПЦР-РВ, представлен в таблице 1.

Профиль термоциклирования: 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 4 концентраций эталонной ДНК (в двух экземплярах), которые охватывают диапазон 27-кратных серийных разведений.

Все образцы ДНК проанализированы в триплетах. Кривые амплификации сгенерированы программным обеспечением Opticon Monitor 3. Для этого после термоциклирования и сбора исходных данных с помощью программного обеспечения Opticon Monitor 3 для каждой постановки построены две стандартные кривые: для теломерного сигнала и для гена сигнала однокопийного гена альбумина. ОДТ выражены в виде отношения T/S, где T – число теломерных повторов, а S – число повторов гена альбумина.

Теломеразную активность определяли с помощью протокола амплификации tandemных 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. Концентрацию белка измеряли 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)

**Таблица 1.** Список праймеров, использованных для количественной полимеразой цепной реакции в реальном времени

Название праймера	Последовательность нуклеотидов праймера
TS	5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'
ACX	5'-GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACCC-3'
telg	5'-ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTG GGTGGGTTAGTGT-3'
telc	5'-TGTTAGGTATCC STATCCATCCATCCATCCATCCCTAACCA-3'
albu	5'-CGGCGGCGGGCGGCGGGCTGGCGGAAATGCTGCACAGAAATCCTTG-3'

с добавлением EGTA до конечной концентрации 5 мМ, конечная концентрация праймеров – 400 нМ для АСХ и 400 нМ для TS. 2 мкл лизата добавляли к 23 мкл смеси ПАТП-РВ и инкубировали в течение 30 мин при 30 °С. Затем проводили ПЦР в таких условиях: 95 °С – 1 мин; 40 циклов: при 95 °С – 15 с, 60 °С – 1 мин и с получением сигнала. ПЦР-продукты 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 5 вариантов разведений.

Для представления результатов в случае количественных переменных рассчитывали среднее значение показателя и его среднеквадратическое отклонение ( $\pm$ SD) при нормальном законе распределения; медианное значение показателя (Me) и значения первого ( $Q_1$ ) и третьего ( $Q_3$ ) квартилей – в случае закона распределения, отличного от нормального. Распределение проверяли на нормальность с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для представления качественных признаков рассчитывали их частоту (%). При проведении сравнения количественных показателей в 2 группах использован 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.

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

Статистический анализ выполнен в программе MedCalc v.18.10 (MedCalc Software Inc., Broekstraat, Бельгия, 1993–2018).

## Результаты

Пациентов поделили на 2 группы: I – с ЦА 1–2 степени, II – с ЦА 3 степени (перенесшие ишемический атеротромботический инсульт – ИИ) (табл. 2). Средний возраст составил  $65,1 \pm 10,5$  и  $65,4 \pm 9,1$  года соответственно. Доля мужчин составила 21,2 % в первой, 52 % – во второй группе. Количество пациентов с СД 2 типа и средний уровень глюкозы натощак были сопоставимы в группах.

В результате анализа установлено, что в группе пациентов с ЦА 1–2 стадии уровень общего холестерина и ЛПНП был статистически значимо выше ( $p < 0,05$ ), а уровень ЛПВП ниже, чем в группе пациентов, перенесших ИИ. Величина КИМ с обеих сторон была значимо ( $p < 0,05$ ) больше у пациентов II группы. Пациенты двух групп не отличались по показателям структурно-функционального состояния сердца – ФВ, ММЛЖ, КДО и показатели диастолической функции сердца были сопоставимы. Показатель НЧ/ВЧ отражает

**Таблица 2.** Клинико-инструментальная и лабораторная характеристика пациентов

Показатель, единицы измерения	Группа I (n = 86)	Группа II (n = 75)	Уровень значимости различия, p
Активность теломеразы	3,22 (2,423; 4,230)	2,85 (1,823; 4,627)	0,485
Длина теломер	2,51 (2,133; 3,298)	2,66 (2,2; 3,52)	0,325
Возраст, лет	$65,1 \pm 10,5$	$65,4 \pm 9,1$	0,83
Пол (м)	18 (21,2 %)	39 (52 %)	0,001
Сахарный диабет 2 типа	19 (22,1 %)	13 (17,3 %)	0,58
Холестерин, 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	$5,1 \pm 0,6$	$5,0 \pm 0,7$	0,88
Индекс атерогенности	2,7 (2,37; 3,40)	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 (-183,250; 1,890)	0,39 (-61,390; 3,242)	0,012
КДО, мл	106 (89,6; 134,0)	101 (89,6; 125,3)	0,302
ФВ, %	$62,0 \pm 4,2$	$61,9 \pm 4,2$	0,91
ММЛЖ	193 (152; 244)	173 (137,5; 221,25)	0,211
Е/А	0,82 (0,70; 1,14)	0,83 (0,722; 1,130)	0,943
Е/Е'	8 (6; 8)	7 (6; 8)	0,185

Приведено среднее значение  $\pm$ SD в случае нормального закона распределения, Me ( $Q_1$ ;  $Q_3$ ); в случае закона распределения, отличного от нормального;  $p < 0,05$ : статистически значимые различия; КИМ: комплекс интима-медиа; индекс HRV: индекс вариабельности ритма сердца; НЧ/ВЧ: соотношение низкочастотного спектра с высокочастотным; КДО: конечно-диастолический объем; ФВ: фракция выброса; ММЛЖ: масса миокарда левого желудочка; Е/А и Е/Е': показатели диастолической функции левого желудочка.

**Таблица 3.** Однофакторный регрессионный анализ показателей липидного обмена, ВРС и структурно-функционального состояния сердца и длины теломер

Независимые переменные	Кoeffициент регрессии, $b \pm m$	Уровень значимости отличия коэффициента от 0, p	OR (95 % CI)
Инсульт	$-0,47 \pm 0,44$	0,28	0,6 (0,3–1,5)
Сахарный диабет	$0,67 \pm 0,48$	0,16	2,0 (0,8–5,0)
Возраст	$-0,022 \pm 0,021$	0,30	0,97 (0,94–1,02)
Пол «м»	$0,00 \pm 0,47$	1,00	1,0 (0,4–2,5)
Холестерин	$-0,16 \pm 0,21$	0,45	0,9 (0,6–1,3)
ТГ	$0,31 \pm 0,27$	0,24	1,4 (0,8–2,3)
ЛПВП	$0,11 \pm 1,05$	0,92	1,1 (0,1–8,6)
ЛПНП	$-0,25 \pm 0,21$	0,24	0,8 (0,5–1,2)
ЛПОНП	$0,70 \pm 0,59$	0,23	2,0 (0,6–6,4)
ИА	$-0,23 \pm 0,25$	0,35	0,8 (0,5–1,3)
КИМ справа	$-1,82 \pm 1,59$	0,25	0,16 (0,01–3,7)
КИМ слева	$-1,94 \pm 1,51$	0,20	0,14 (0,01–2,8)
Индекс HRV	$0,035 \pm 0,061$	0,56	1,0 (0,9–1,2)
Триангулярный индекс	$0,0021 \pm 0,0040$	0,59	1,00 (0,99–1,01)
НЧ/ВЧ	$-0,00021 \pm 0,00050$	0,67	1,000 (0,999–1,001)
КДО	$-0,0022 \pm 0,0073$	0,76	1,00 (0,98–1,01)
ФВ	$-0,025 \pm 0,052$	0,63	0,98 (0,88–1,08)
ММЛЖ	$-0,0037 \pm 0,0041$	0,37	1,00 (0,99–1,00)
Е/А	$1,56 \pm 0,68$	0,02	4,8 (1,3–17,8)
Е/Е'	$0,13 \pm 0,11$	0,25	1,1 (0,9–1,4)

$p < 0,05$ : статистически значимые различия

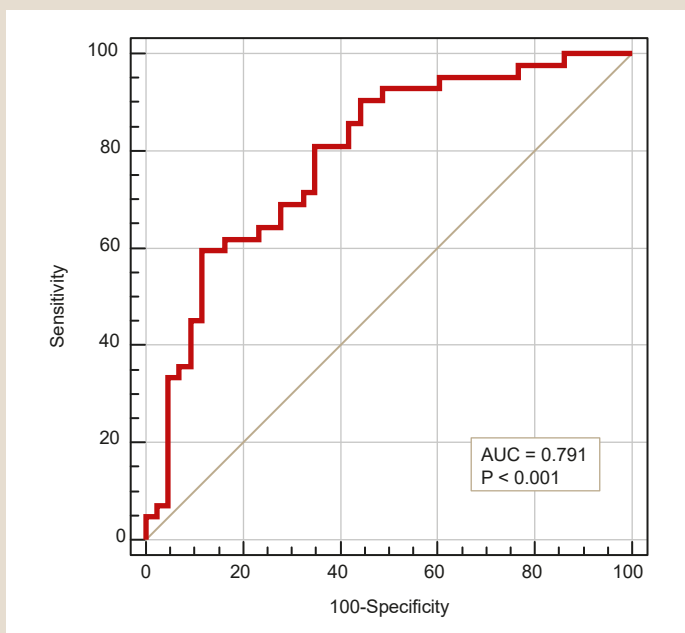


Рис. 1. ROC-кривая 7-факторной модели прогнозирования риска снижения длины теломер AUC = 0,79 (95 % CI 0,69–0,87).

Таблица 4. Многофакторный анализ показателей липидного обмена, ВРС и структурно-функционального состояния сердца

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

$P < 0,05$  – статистически значимые различия

состояние симпато-парасимпатического баланса ВНС. Большие значения этого показателя свидетельствуют о преобладании тонуса симпатического отдела ВНС, что определено на уровне статистической значимости у пациентов I группы. Триангулярный индекс и индекс HRV, применяемые для оценки общей ВРС, сопоставимы в обеих группах и выше нормальных международных значений. Группы сопоставимы по значениям длины теломер и активности теломеразы ( $p > 0,05$ ).

Для установления факторов, влияющих на размер теломер как маркера раннего старения [1,2], использован метод построения логистических моделей регрессии. При построении моделей использовали такие категории: более короткая длина теломер – T/S < 2,61 (низкий и средний тертили); более длинная длина теломер – T/S выше 2,61.

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

Важно учитывать, что именно комбинация факторов риска (а не каждый отдельный фактор риска по отдельности) может приводить к укорочению теломер

[16]. Для отбора совокупности значимых факторов риска использован метод пошагового включения/исключения признаков (Stepwise при пороге исключения  $p > 0,15$  и пороге включения  $p < 0,03$ ). На выделенных значимых факторах риска построена многофакторная модель логистической регрессии, в которую вошли показатели, представленные в таблице 4. Установлена статистически значимая положительная связь длины теломер с Е/А и ЛПОНП, отрицательные связи с ФВ и КИМ справа.

Установлена хорошая согласованность выделенных факторных признаков с риском укорочения длины теломер – AUC = 0,79 (CI 0,69–0,87) (рис. 1), что может указывать на полноту модели и предикторов ДТ, рассмотренных в этом исследовании. Все представленные в таблице 4 показатели – весомые в общей многофакторной модели, хотя для некоторых не получена статистическая значимость. Вероятно, необходим больший размер выборки.

### Обсуждение

Вопрос о взаимосвязи атеросклероза, в том числе липидного обмена (ЛПОНП), КИМ и биологии теломер до конца не решен. Одни исследователи считают, что не существует связи между проявлениями субклинического атеросклероза и длиной теломер, подчеркивая, что более короткие теломеры не связаны с атеросклерозом [6]. С другой стороны, существует ряд работ, в которых получены противоположные результаты [13,16]. Можно предположить, что взаимосвязь длины теломер с развитием ССЗ может быть опосредована влиянием так называемых модулирующих факторов, определяющих выраженность окислительного стресса и хронического воспаления. Ускоренное укорочение теломер может приводить к старению эндотелия и возникновению атеросклероза с дальнейшим развитием ССЗ.

Клинических работ, изучающих взаимосвязь длины теломер со структурно-функциональным состоянием миокарда и диастолической функцией левого желудочка (ЛЖ), мало. В исследовании «Newcastle 85+» с участием людей в возрасте  $\geq 85$  лет не установлена взаимосвязь длины теломер с гипертрофией миокарда и увеличением ИММ ЛЖ, но показана значимая связь с ФВ ЛЖ [8]. Следует отметить, что в данном исследовании были пациенты с различными ССЗ.

В недавнем популяционном исследовании Asclepios у здоровых людей без явных ССЗ (>2500 человек в возрасте 35–55 лет) после поправки на пол, возраст и факторы ССР связь ДТЛ с параметрами структуры (ИММ ЛЖ и КДР) не обнаружена [5].

Иные результаты получены во Фремингемском исследовании с участием 850 человек, в котором ДТЛ оказалась прямо связана с ММ ЛЖ и ФВ ЛЖ [15]. Следует отметить, что такая взаимосвязь получена только для больных АГ, а в группе нормотоников она была недостоверна.

В нашем исследовании установлена отрицательная связь длины теломер с КИМ. Объяснением может быть то, что в клинической практике длина теломер определяется в лимфоцитах, и по существу она отражает длину теломер в стволовых и прогениторных клетках. Эти клетки, участвуя в репарации повреждения и про-

цессах дифференциации тканей, играют важную роль в поддержании тканевого гомеостаза, в том числе в стенке сосуда, обеспечивая сохранную эндотелиальную функцию. Но так как жесткость сосудов в большей степени определяется состоянием внеклеточного матрикса, возможно, и в нем существуют клетки, репликативная активность которых определяет сосудистую жесткость. Или, вероятно, более медленное укорочение теломер влияет на состояние матрикса не через репликативную активность. Накапливается все больше доказательств, что укорочение теломер лимфоцитов – ключевой компонент уменьшения резервов стволовых клеток и возраст-ассоциированной дегенерации тканей, в частности повышения сосудистой жесткости [13,16]. Факты установлены, но объяснение пока отсутствует, что и обуславливает актуальность дальнейших исследований.

## Выводы

1. Длина теломер сопоставима у пожилых пациентов с ЦА 1–2 стадии и перенесших ишемический атеротромботический инсульт, в том числе и с СД 2 типа.
2. На основании многофакторного регрессионного анализа установлено наличие связи длины теломер с ЛПОНП, КИМ, ФВ и диастолической функцией ЛЖ у пациентов на разных стадиях ЦА, в том числе с СД 2 типа (AUC = 0,79 (CI 0,69–0,87)).

**Конфликт интересов:** отсутствует.

**Conflicts of interest:** authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 15.07.2019  
Після доопрацювання / Revised: 06.10.2019  
Прийнято до друку / Accepted: 10.10.2019

## Сведения об авторах:

Егорова М. С., канд. мед. наук, зав. консультативно-диагностическим отделением, ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ имени В. П. Комисаренко НАМН Украины», г. Киев.  
ORCID ID: 0000-0002-3689-2683  
Красненков Д. С., научный сотрудник лаборатории эпигенетики, ГУ «Институт геронтологии имени Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины», г. Киев.  
Гурьянов В. Г., канд. физ.-мат. наук, доцент каф. менеджмента здравоохранения, Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, г. Киев, Украина.  
Кондратюк В. Е., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. пропедевтики внутренних болезней № 2, Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, г. Киев, Украина.

## Відомості про авторів:

Егорова М. С., канд. мед. наук, зав. консультативно-діагностичним відділення, ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин імені В. П. Комисаренка НАМН України», м. Київ.  
Красненков Д. С., науковий співробітник лабораторії епігенетики, ДУ «Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова НАМН України», м. Київ.  
Гур'янов В. Г., канд. фіз.-мат. наук, доцент каф. менеджменту охорони здоров'я, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.  
Кондратюк В. Є., д-р мед. наук, професор, зав. каф. пропедевтики внутрішніх хвороб № 2, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

## Information about authors:

Yehorova M. S., MD, PhD, Head of the Consultative and Diagnostic Department, SI "V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv.  
Krasniukov D. S., Scientific Researcher of the Epigenetic Laboratory, SI "Institute of Gerontology named after D. F. Chebotarev of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv.  
Huriyanov V. H., PhD, Associate Professor of the Department of Health Management, O. O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.  
Kondratiuk V. Ye., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Internal Medicine Propedeutics No. 2, O. O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

## Список литературы

- [1] Petrie A., Sabin C. Medical statistics at a glance. 3rd ed. Wiley-Blackwell, 2009. 180 p.
- [2] Banerjee P. P., Jagadeesh S. Non-Radioactive Assay Methods for the Assessment of Telomerase Activity and Telomere Length. *Chromatin Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* / ed. S. Chellappan. 2nd ed. Humana Press. 2009. Vol. 523. P. 383-394. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-190-1\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-190-1_25)
- [3] Short Leukocyte Telomere Length Precedes Clinical Expression of Atherosclerosis / A. Benetos et al. *Circulation Research*. 2018. Vol. 122. Issue 4. P. 616-623. <https://doi.org/10.1161/circresaha.117.311751>
- [4] Cawthon R. M. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Research*. 2009. Vol. 37. Issue 3. P. e21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1027>
- [5] On Cross-Sectional Associations of Leukocyte Telomere Length with Cardiac Systolic, Diastolic and Vascular Function: The Asklepios Study / S. L. I. J. Denil et al. *PLOS ONE*. 2014. Vol. 9. Issue 12. P. e115071. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115071>
- [6] 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*. 2015. Vol. 133. Issue 3. P. 173-177. <https://doi.org/10.1159/000441819>
- [7] Relationship between short telomere length and stroke / X. Jin et al. *Medicine*. 2018. Vol. 97. Issue 39. P. e12489. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000012489>
- [8] The Newcastle 85+ study: biological, clinical and psychosocial factors associated with healthy ageing: study protocol / J. Collerton et al. *BMC Geriatrics*. 2007. Vol. 7. P. 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2318-7-14>
- [9] Leukocyte telomere length is inversely associated with post-load but not with fasting plasma glucose levels / M. Khalangot et al. *Experimental Biology and Medicine*. 2017. Vol. 242. Issue 7. P. 700-708. <https://doi.org/10.1177/1535370217694096>
- [10] Laina A., Stellos K., Stamatiopoulos K. Vascular ageing: Underlying mechanisms and clinical implications. *Experimental Gerontology*. 2018. Vol. 109. P. 16-30. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.06.007>
- [11] Lehrer P. M., Gevirtz R. Heart rate variability biofeedback: how and why does it work? *Frontiers in Psychology*. 2014. Vol. 5. P. 756. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00756>
- [12] Relative Telomere Length and Cardiovascular Risk Factors / M. Koriath et al. *Biomolecules*. 2019. Vol. 9. Issue 5. P. 192. <https://doi.org/10.3390/biom9050192>
- [13] Возрастные изменения вариабельности ритма сердца и их связь с длиной теломер лейкоцитов / Л. И. Стрельцова и др. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2017. Т. 16. № 1. С. 54-60. <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2017-1-54-60>
- [14] Sambrook J., Russell D. W. Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2006. Vol. 2006. Issue 1. P. 169-170. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4455>
- [15] Association Between Leukocyte Telomere Length and the Risk of Incident Atrial Fibrillation: The Framingham Heart Study / L. Staerk et al. *Journal of the American Heart Association*. 2017. Vol. 6. Issue 11. P. e006541. <https://doi.org/10.1161/jaha.117.006541>
- [16] Short Telomeres, but Not Telomere Attrition Rates, Are Associated With Carotid Atherosclerosis / S. Toupan et al. *Hypertension*. 2017. Vol. 70. Issue 2. P. 420-425. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.117.09354>

## References

- [1] Petrie, A., & Sabin, C. (2009). *Medical statistics at a glance* (3rd ed.). Wiley-Blackwell.
- [2] Banerjee, P. P., & Jagadeesh, S. (2009). Non-Radioactive Assay Methods for the Assessment of Telomerase Activity and Telomere Length. In S. Chellappan (Ed.). *Chromatin Protocols. Methods in Molecular*

- Biology (Methods and Protocols)*, (2nd ed., Vol. 523, pp. 383-394). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-190-1\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-190-1_25)
- [3] Benetos, A., Toupance, S., Gautier, S., Labat, C., Kimura, M., Rossi, P. M., Settembre, N., Hubert, J., Frimat, L., Bertrand, B., Boufi, M., Flecher, X., Sadoul, N., Eschwege, P., Kessler, M., Tzanetakou, I. P., Doulamis, I. P., Konstantopoulos, P., Tzani, A., ... Aviv, A. (2018). Short Leukocyte Telomere Length Precedes Clinical Expression of Atherosclerosis. *Circulation Research*, 122(4), 616-623. <https://doi.org/10.1161/circresaha.117.311751>
- [4] Cawthon, R. M. (2009). Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Research*, 37(3), Article e21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1027>
- [5] Denil, S. L. I. J., Rietzschel, E. R., De Buyzere, M. L., Van daele, C. M., Segers, P., De Bacquer, D., Van Criekinge, W., Bekaert, S., Gillebert, T. C., & De Meyer, T. (2014). On Cross-Sectional Associations of Leukocyte Telomere Length with Cardiac Systolic, Diastolic and Vascular Function: The Asklepios Study. *PLOS ONE*, 9(12), Article e115071. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115071>
- [6] Ellehoj, H., Bendix, L., & Osler, M. (2015). Leucocyte Telomere Length and Risk of Cardiovascular Disease in a Cohort of 1,397 Danish Men and Women. *Cardiology*, 133(3), 173-177. <https://doi.org/10.1159/000441819>
- [7] Jin, X., Pan, B., Dang, X., Wu, H., & Xu, D. (2018). Relationship between short telomere length and stroke. *Medicine*, 97(39), Article e12489. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000012489>
- [8] Collerton, J., Barrass, K., Bond, J., Eccles, M., Jagger, C., James, O., Martin-Ruiz, C., Robinson, L., von Zglinicki, T., & Kirkwood, T. (2007). The Newcastle 85+ study: biological, clinical and psychosocial factors associated with healthy ageing: study protocol. *BMC Geriatrics*, 7, Article 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2318-7-14>
- [9] Khalangot, M., Krasnienkov, D., Vaiserman, A., Avilov, I., Kovtun, V., Okhrimenko, N., Koliada, A., & Kravchenko, V. (2017). Leukocyte telomere length is inversely associated with post-load but not with fasting plasma glucose levels. *Experimental Biology and Medicine*, 242(7), 700-708. <https://doi.org/10.1177/1535370217694096>
- [10] Laina, A., Stellos, K., & Stamatelopoulou, K. (2018). Vascular ageing: Underlying mechanisms and clinical implications. *Experimental Gerontology*, 109, 16-30. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.06.007>
- [11] Lehrer, P. M., & Gevirtz, R. (2014). Heart rate variability biofeedback: how and why does it work? *Frontiers in Psychology*, 5, Article 756. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00756>
- [12] Koriath, M., Müller, C., Pfeiffer, N., Nickels, S., Beutel, M., Schmidtman, I., Rapp, S., Münzel, T., Westermann, D., Karakas, M., Wild, P. S., Lackner, K. J., Blankenberg, S., & Zeller, T. (2019). Relative Telomere Length and Cardiovascular Risk Factors. *Biomolecules*, 9(5), Article 192. <https://doi.org/10.3390/biom9050192>
- [13] Streltsova, L. I., Tkacheva, O. N., Plokhova, E. V., Akasheva, D. U., Strajesko, I. D., Dudinskaya, E. N., & Boytsov, S. A. (2017). Vozrastnye izmeneniya variabel'nosti ritma serdtsa i ikh svyaz' s dlinoi telomer leukotsitov [Age-related changes in heart rate variability and their relation with leucocyte telomere length]. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*, 16(1), 54-60. <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2017-1-54-60> [in Russian].
- [14] Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), 169-170. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4455>
- [15] Staerk, L., Wang, B., Lunetta, K. L., Helm, R. H., Ko, D., Sherer, J. A., El-linor, P. T., Lubitz, S. A., McManus, D. D., Vasani, R. S., Benjamin, E. J., & Trinquart, L. (2017). Association Between Leukocyte Telomere Length and the Risk of Incident Atrial Fibrillation: The Framingham Heart Study. *Journal of the American Heart Association*, 6(11), Article e006541. <https://doi.org/10.1161/jaha.117.006541>
- [16] Toupance, S., Labat, C., Temmar, M., Rossignol, P., Kimura, M., Aviv, A., & Benetos, A. (2017). Short Telomeres, but Not Telomere Attrition Rates, Are Associated With Carotid Atherosclerosis. *Hypertension*, 70(2), 420-425. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.117.09354>