

Длина теломер, активность теломеразы и механизмы их изменения у пациентом с сахарным диабетом 2-го типа

К.м.н. Н.В. БРАИЛОВА^{1*}, к.м.н. Е.Н. ДУДИНСКАЯ¹, д.м.н. О.Н. ТКАЧЕВА¹, член-корр. РАН М.В. ШЕСТАКОВА², к.м.н. И.Д. СТРАЖЕСКО¹, к.м.н. Д.У. АКАШЕВА¹, Е.В. ПЛОХОВА¹, В.С. ПЫХТИНА¹, В.А. ВЫГОДИН¹, проф. С.А. БОЙЦОВ¹

¹ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины», Москва, Россия; ²ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России, Москва, Россия

Цель исследования — изучение взаимосвязи хронического воспаления, окислительного стресса и биологии теломер у лиц с сахарным диабетом 2-го типа (СД2).

Материал и методы. В исследование включены 50 пациентов с СД2 без клинических проявлений сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и 139 человек контрольной группы. Оценивали состояние углеводного обмена, степень окислительного стресса (малоновый диальдегид — МДА) и хронического воспаления (фибриноген, С-реактивный белок — СРБ, интерлейкин-6 — ИЛ-6), измеряли длину лимфоцитарных теломер и активность теломеразы.

Результаты. У пациентов с СД2 длина теломер оказалась короче ($p=0,031$), активность теломеразы ниже ($p=0,039$), а степень воспаления (уровни СРБ и фибриногена) выше, чем в группе контроля. Все пациенты были разделены по длине теломер. Среди пациентов с СД2 уровни СРБ и фибриногена были выше у лиц с «короткими» теломерами ($p=0,02$). При сравнении групп с «длинными» теломерами не выявлено различий в уровне СРБ ($p=0,93$). У пациентов с СД2 и «низкой» активностью теломеразы выраженность хронического воспаления была наибольшей. У пациентов с СД2 выявлена зависимость между длиной теломер и уровнем СРБ ($r=-0,40$; $p=0,004$).

Заключение. Хроническое воспаление и старение клеток у пациентов с СД2 выражены значительно, чем в контроле. Однако у пациентов с «длинными» теломерами признаки хронического воспаления мало отличались от таковых у здоровых людей. Возможно, «длинные» теломеры защищают пациентов с СД2 от повреждающего действия хронического воспаления.

Ключевые слова: длина теломер, активность теломеразы, сахарный диабет, хроническое воспаление, окислительный стресс.

Telomere length, telomerase activity and mechanisms change in patients with type 2 diabetes mellitus

N.V. BRAILOVA¹, E.N. DUDINSKAYA¹, O.N. TKACHEVA¹, M.V. SHESTAKOVA², I.D. STRAZHESKO¹, D.U. AKASHEVA¹, E.V. PLOCHOVA¹, V.S. PYKHTINA¹, V.A. VYGODIN¹, S.A. BOYTSOV¹

¹National Research Centre for Preventive Medicine, Moscow, Russia; ²Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia

Aim. To study the association of chronic inflammation, oxidative stress with telomere biology in people with type 2 diabetes mellitus (T2DM).

Material and Methods. A total 50 patients with T2D and without cardiovascular disease (CVD) and 139 people from control group were included in the study. All subjects were measured for carbohydrate metabolism; oxidative stress (malondialdehyde (MDA)); inflammation (C-reactive protein — CRP, fibrinogen, interleukin-6); lymphocyte telomere length, telomerase activity.

Results. In diabetic patients telomeres were shorter than in controls (9.59 ± 0.54 and 9.76 ± 0.47 ; $p=0.031$), telomerase activity was lower (0.47 ± 0.40 and 0.62 ± 0.36 ; $p=0.039$), inflammation (CRP, elevated fibrinogen) was higher. All patients were divided by telomere length. In T2DM group CRP was higher in patients with «short» telomeres (7.39 ± 1.47 and 3.59 ± 0.58 mg/L; $p=0.02$). There were no significant differences in the level of chronic inflammation and oxidative stress in «long» telomeres group: CRP 3.59 ± 0.58 and 3.66 ± 0.50 mg/L ($p=0.93$), MDA 2.81 ± 0.78 and 3.24 ± 0.78 mmol/l ($p=0.08$). Diabetic patients in «short» telomeres group had greater chronic inflammation: CRP 7.39 ± 1.47 and 4.03 ± 0.62 mg/L ($p=0.046$), increased fibrinogen, 0.371 and 0.159 ($p=0.022$). All patients were divided by telomerase activity. Severity of chronic inflammation was greatest in T2DM and the «low» activity of telomerase. There were relationship between telomere length and CRP in T2DM patients ($r=-0.40$; $p=0.004$).

Conclusions. Chronic inflammation and cell aging were more pronounced in patients with T2DM. However, despite diabetes, signs of chronic inflammation were minimal in patients with «long» telomeres compared to healthy people. Perhaps long telomeres protect diabetic patients from the damaging effect of chronic inflammation.

Keywords: telomere length, telomerase activity, diabetes mellitus, chronic inflammation, oxidative stress.

doi: 10.14341/probl201662116-24

Окислительный стресс и хроническое воспаление как основа биологического старения

Сахарный диабет (СД) сопровождается ускоренными изменениями сосудов, что делает его ведущей причиной развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и смертности. Ключевое звено данных

изменений — гипергликемия, инсулинорезистентность, накопление конечных продуктов гликирования (КПГ). Гиперинсулинемия и гипергликемия, как и физиологическое старение, активируют процессы хронического воспаления и окислительного стресса [1]. В стареющем организме, как и в орга-

низме пациента с СД, повышается уровень различных маркеров воспаления [С-реактивный белок (СРБ), ИЛ-18, ФНО- α] («инфламэйджинг» [2]), увеличивается активность перекисного окисления липидов с образованием малонового диальдегида (МДА) и активных форм кислорода (АФК). Все это приводит к нарушению синтеза белков, апоптозу клеток и развитию дегенеративных процессов [3].

Биология теломер у лиц с СД2

Одной из причин разной скорости старения сосудов у пациентов с СД2 является изначально разная «генетическая защищенность» от воздействия внешних факторов. Длина теломер и активность теломеразы могут претендовать на роль генетических маркеров биологического возраста сосудов. Теломеры — это концевые участки линейной молекулы ДНК, постепенно укорачивающиеся при каждом делении клеток. Как только длина теломерной ДНК становится угрожающе низкой, запускается P53/P21 — индуцированное старение клетки при сохранении ее метаболической активности [4]. Имеются данные, что длина теломер в лейкоцитах отражает длину теломер в стволовых клетках и соответствует их длине в эндотелиальных прогениторных клетках, что позволяет рассматривать данный параметр как биомаркер старения сосудов. Получены первые указания на укорочение теломер у лиц с СД2 и нарушенной толерантностью к глюкозе [5]. Укорочение теломер может быть связано с развитием СД2, ССЗ и старением сосудов [6].

Вторым генетическим маркером биологического возраста может быть активность теломеразы. Теломераза — фермент, добавляющий особые повторяющиеся последовательности ДНК к 3'-концу цепи ДНК и включающий в себя теломеразную обратную транскриптазу (TERT) и теломеразную РНК (TERC) [7]. В большинстве соматических клеток активность теломеразы достаточно низка. Хотя теломераза не играет важной роли в гомеостазе длины теломер в пожилом возрасте, предполагается, что этот фермент обладает важными нетеломерными функциями по снижению апоптоза, контролю пролиферации клеток и активности митохондрий в клетках человека [8].

Роль хронического воспаления и окислительного стресса в изменениях длины теломер и активности теломеразы у лиц с СД2

Основными пусковыми механизмами патологических процессов, связанных со старением, на клеточном уровне считаются окислительный стресс и хроническое воспаление, вызывающие нерепликативное укорочение ДНК [9]. Теломеры чувствитель-

ны к окислительному повреждению молекулы ДНК [10]. АФК *in vitro* уменьшают содержание в эндотелиальных клетках ядерного белка hTERT и соответственно активность теломеразы. Теломераза может защищать лейкоциты от окислительного стресса, не влияя на длину теломер [8]. Повышенная воспалительная активность ускоряет укорочение теломер как за счет активации размножения клеток, так и за счет высвобождения АФК [9]. Прогрессирующее укорочение теломер с увеличением продолжительности СД2 может быть связано с хроническим воспалением и окислительным стрессом [5]. Взаимосвязь активности теломеразы и хронического воспаления неоднозначна. Хроническое воспаление на ранней стадии через различные сигнальные пути (с участием NF- κ B, протеинкиназы С или Akt-киназы) посредством фосфорилирования или транскрипции hTERT способно активировать теломеразу, что, ве-

Сведения об авторах:

Браилова Наталия Васильевна — м.н.с. отд. изучения процессов старения и профилактики возраст-ассоциированных заболеваний ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины», Москва, Россия, e-mail: n.kokshagina@mail.ru;

Дудинская Екатерина Наильевна — к.м.н., в.н.с. отд. изучения процессов старения и профилактики возраст-ассоциированных заболеваний ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины», Москва, Россия;

Ткачева Ольга Николаевна — д.м.н., проф., рук. отд. изучения процессов старения и профилактики возраст-ассоциированных заболеваний ФГБУ Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины, Москва, Россия;

Шестакова Марина Владимировна — член-корр. РАН, директор Института диабета, зам. дир. по научной работе ФГБУ

«Эндокринологический научный центр», Москва, Россия; *Стражеско Ирина Дмитриевна* — к.м.н., в.н.с. отд. изучения процессов старения и профилактики возраст-ассоциированных заболеваний ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины», Москва, Россия;

Акашева Дарига Уайдинична — к.м.н., в.н.с. отд. изучения процессов старения и профилактики возраст-ассоциированных заболеваний ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины», Москва, Россия;

Плохова Екатерина Владимировна — к.м.н., н.с. отд. изучения процессов старения и профилактики возраст-ассоциированных заболеваний ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины», Москва, Россия;

Пыхтина Валентина Сергеевна — лаб. отд. изучения процессов старения и профилактики возраст-ассоциированных заболеваний ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины», Москва, Россия;

Выгодин Владимир Анатольевич — ст.н.с. лаб. биостатистики ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины», Москва, Россия;

Бойцов Сергей Анатольевич — д.м.н., проф., рук. отд. кардиологии и молекулярной генетики, директор ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины», Москва, Россия

роятно, компенсирует ускоренное укорочение теломер [11]. Однако на поздних этапах вялотекущего воспаления активность теломеразы снижается, что приводит к укорочению теломер [12].

Цель исследования — изучить взаимосвязи хронического воспаления и окислительного стресса с биологией теломер у лиц с СД2.

Материал и методы

В одномоментное исследование включены пациенты с СД2, прошедшие амбулаторное обследование в ФГБУ ГНИЦПМ в 2012—2013 гг. Основную группу составили пациенты в возрасте от 45 до 75 лет с длительностью заболевания не более 12 мес и содержанием HbA_{1c} от 6,5 до 9,0%. В группу контроля включали лиц без СД2, не имеющих клинических проявлений ССЗ, обратившихся в центр для профилактического консультирования.

Критерии исключения: СД1 и другие специфические типы СД, артериальная гипертония (АГ) 3-й степени (АД >180/100 мм рт.ст.), регулярный прием гипотензивных препаратов, регулярный прием сахароснижающих препаратов, тяжелые диабетические микроангиопатии (препролиферативная и пролиферативная диабетическая ретинопатия, хроническая болезнь почек 3б, 4 и 5 стадии), ССЗ (хроническая сердечная недостаточность II—IV классов (NYHA), клапанные пороки сердца), хроническая печеночная недостаточность, онкологические заболевания, беременность, лактация.

Всеми пациентами было подписано информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «ГНИЦПМ» Минздрава России. Протокол заседания ЛЭК №8 от 29.11.11.

На этапе скрининга всем пациентам проводилось стандартное клиническое обследование: сбор анамнеза, клинический осмотр, в том числе измерение массы тела и роста с расчетом индекса массы тела (ИМТ), измерение систолического (САД) и диастолического артериального давления (ДАД) на калиброванном приборе с использованием плечевой манжеты (HEM-7200 M3, «Omron Healthcare», Япония). АД измеряли после 10-минутного отдыха на правой руке в положении сидя 3 раза через 2 мин; в анализ включали среднее из трех измерений. Проводили забор крови для лабораторных анализов (клинический и биохимический), регистрацию ЭКГ и пробу с физической нагрузкой [тредмил-тест по протоколу BRUCE (Intertrack, SCHILLER)]. Из 250 пациентов, прошедших скрининг, 189 соответствовали критериям включения. У всех их оценивали состояние углеводного обмена, определяли длину теломер и активность теломеразы, регистрировали выраженность окислительного стресса и хронического воспаления.

Оценка углеводного обмена

Концентрацию глюкозы в плазме определяли глюкозооксидазным методом на анализаторе SAPHIRE-400 с использованием диагностических наборов DiaSys. Уровень HbA_{1c} регистрировали методом жидкостной хроматографии на анализаторе Sapphire 400 («Niigata Mechatronics», Япония) по стандартной методике производителя.

Измерение длины теломер

Измерение относительной длины теломер периферических лимфоцитов проводилось на геномной ДНК [13]. В ходе анализа методом ПЦР в реальном времени оценивали количество ДНК с теломерной последовательностью в геноме. Параллельно проводили ПЦР в реальном времени к однокопийному участку геномной ДНК. Исходили из пропорциональности отношения количеств теломерной и однокопийной матриц длине теломер.

Измерение активности теломеразы

Для определения теломеразной активности использовали методику [14] с некоторыми модификациями. Активность фермента исследовали в выделенной моноцитарной фракции клеток крови (примерно 10 000 клеток на анализ). Клетки моноцитов лизировали буфером с мягким детергентом, отделяя экстракт. С экстрактом проводили теломеразную полимеразную реакцию; полученные продукты амплифицировали с помощью ПЦР в реальном времени. Количество продуктов теломеразной реакции пропорционально активности теломеразы (амплификатор Mastercycler («Eppendorf», Германия)).

Оценка окислительного стресса

Для оценки выраженности окислительного стресса исследовали концентрацию МДА методом люминолзависимой хемилюминисценции в цельной крови.

Оценка хронического воспаления

Для оценки выраженности хронического воспаления исследовали концентрацию фибриногена, высокочувствительного С-реактивного белка (СРБ) (иммунотурбодиметрический метод с использованием анализатора SAPHIRE-400), ИЛ-6 (иммуноферментный метод).

Соответствие нормам этики биомедицинских исследований

Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской Декларации. Протокол исследования был одобрен Этическими комитетами всех участвующих клинических центров. До включения в исследова-

ние у всех участников было получено письменное информированное согласие.

Статистический анализ

Использовали пакет прикладных статистических программ SAS 9.1 (Statistical Analysis System, «SAS Institute Inc.», США). Все данные вводили в табличный процессор, после чего проводили разведочный анализ на предмет выявления ошибок ввода и пропущенных значений. Для количественных параметров применяли тест асимметрии и эксцесса, который выявил нормальное распределение большинства параметров. Количественные данные представлены в виде средних значений и средних квадратичных отклонений ($M \pm SD$). Средние значения клинических параметров сравнивали в двух группах с использованием одномоментного анализа для непрерывных переменных и критерия χ^2 для категориальных переменных. Для частотных показателей применяли модифицированный t -критерий Стьюдента с учетом \arcsin -преобразования Фишера. Для выявления меры линейной связи между параметрами проводили корреляционный анализ (ранговые корреляции Спирмена). Для оценки независимых взаимосвязей между параметрами использовали многомерные регрессионные уравнения и множественный линейный регрессионный анализ. После измерения длины теломер проводили дополнительное деление пациентов на ранги в зависимости от значений параметра. В группу первого ранга вошли пациенты с очень малой длиной теломер: от минимального значения в общей группе до границы первой четверти (т.е. ниже 25% границы распределения). В группу второго ранга вошли пациенты с длиной теломер от медианы распределения до нижних четвертей. В группу третьего ранга вошли пациенты с длиной теломер от медианы распределения до 75% границы распределения. В группу четвертого ранга были отнесены лица с очень большой длиной теломер, составляющей верхнюю четверть распределения. Нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$.

Результаты

Всего в исследование включены 189 пациентов (64 мужчины и 125 женщин), которых объединяли в две группы: с СД2 ($n=50$) и без СД ($n=139$). Длительность СД2 составила $0,9 \pm 0,089$ года. Средний возраст пациентов группы СД2 составил $58,4 \pm 7,9$ года, а группы контроля — $57,45 \pm 8,14$ года ($p=0,48$). В группе СД2 САД равнялось $131,76 \pm 14,7$ мм рт.ст., а в группе контроля — $127,78 \pm 16,5$ мм рт.ст. ($p=0,13$). Уровень МДА в группе СД2 составил $3,193 \pm 0,98$ мкмоль/л, в группе контроля — $3,195 \pm 0,82$ мкмоль/л ($p=0,98$). Средний уровень ИЛ-6 в группе СД2 равнялся $3,37 \pm 1,14$ пг/мл, в группе контроля — $5,07 \pm 0,87$ пг/мл ($p=0,27$).

В группе диабета доля мужчин была выше, чем в группе здоровых лиц (46 % против 29%) ($p=0,013$). Соотношение мужчины/женщины в группе СД2 составило 46/54% против 29/71% в группе контроля ($p=0,013$). ИМТ пациентов группы СД2 был значительно выше, чем у здоровых лиц: $30,28 \pm 5,42$ против $27,68 \pm 4,60$ кг/м² ($p=0,002$). ДАД в группе СД2 составляло $83,02 \pm 11,3$ мм рт.ст. против $78,6 \pm 9,3$ мм рт.ст. в группе контроля ($p=0,015$). У пациентов с СД2 длина лимфоцитарных теломер оказалась существенно короче ($p=0,031$), а активность теломеразы существенно ниже ($p=0,039$), чем у здоровых лиц. В группе СД2 уровень глюкозы плазмы натощак (ГПН) и HbA_{1c} был значительно выше, чем в группе контроля ($p < 0,001$). У пациентов с СД2 значительно выше оказалась и активность маркеров хронического воспаления: СРБ — $6,34 \pm 1,06$ против $3,82 \pm 0,41$ мг/л ($p=0,031$), наличие повышенного фибриногена — $0,30 \pm 0,04$ против $0,11 \pm 0,03$ ($p=0,004$). Основные характеристики пациентов представлены в табл. 1.

Медиана относительной длины теломер составила 9,75. Все пациенты со значением длины теломер ниже этого показателя были отнесены к группе «коротких» теломер, а те, у которых этот показатель превышал данное значение — к группе «длинных» теломер.

Уровень СРБ у пациентов с СД2 и «короткими» теломерами был значительно повышен ($p=0,02$). Не выявлено значимой разницы в уровнях МДА, фибриногена и ИЛ-6 между двумя группами ($p=0,09$). У лиц с СД2 и «короткими» теломерами уровень ГПН был значительно более высоким ($p=0,02$). Активность теломеразы не различалась между группами; однако у пациентов с СД2 и «короткими» теломерами чаще встречались низкие показатели активности теломеразы (менее общей медианы). В группе

Таблица 1. Характеристики исследуемых групп

Параметр	СД2+ ($n=50$)	СД2- ($n=139$)	p
Возраст, годы	$58,4 \pm 7,9$	$57,45 \pm 8,14$	0,48
Мужчины, число (%)	23 (46)	41 (29)	0,013
ИМТ, кг/м ²	$30,28 \pm 5,42$	$27,68 \pm 4,60$	0,001
САД, мм рт.ст.	$131,76 \pm 14,7$	$127,78 \pm 16,5$	0,13
ДАД, мм рт.ст.	$83,02 \pm 11,3$	$78,6 \pm 9,3$	0,015
Длительность СД2, годы	$0,9 \pm 0,089$		
HbA _{1c} , %	$7,27 \pm 0,69$	$5,21 \pm 0,49$	<0,001
ГПН, ммоль/л	$8,2 \pm 1,72$	$5,3 \pm 0,53$	<0,001
Относительная длина теломер	$9,59 \pm 0,54$	$9,76 \pm 0,47$	0,031
Активность теломеразы	$0,47 \pm 0,40$	$0,62 \pm 0,36$	0,039
МДА, мкмоль/л	$3,19 \pm 0,98$	$3,20 \pm 0,82$	0,98
ИЛ-6, пг/мл	$3,37 \pm 1,14$	$5,07 \pm 0,87$	0,27
СРБ, мг/л	$6,34 \pm 1,06$	$3,82 \pm 0,41$	0,031
Фибриноген, г/л	$3,57 \pm 0,87$	$3,41 \pm 0,54$	0,23
Наличие повышенного фибриногена	$0,30 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,03$	0,004

Таблица 2. Показатели углеводного обмена, окислительного стресса, хронического воспаления, длины теломер и активности теломеразы в зависимости от наличия СД2

Параметр	СД2+ (n=50)		p	СД2- (n=139)		p
	длинные теломеры (n=15)	короткие теломеры (n=35)		длинные теломеры (n=76)	короткие теломеры (n=63)	
HbA _{1c} , %	11,54±3,57	13,48±3,24	0,072	10,98±1,83	11,59±2,03	0,075
ГПН, ммоль/л	0,83±0,13	0,95±0,17	0,02	0,76±0,16	0,78±0,14	0,59
МДА, мкмоль/л	2,81±0,78	3,35±1,04	0,09	3,24±0,78	3,14±0,87	0,58
СРБ, мг/л	3,59±0,58	7,39±1,47	0,02	3,66±0,50	4,07±0,68	0,63
Фибриноген, г/л	3,39±0,55	3,70±0,91	0,15	3,38±0,53	3,44±0,55	0,50
Наличие повышенного фибриногена	0,143	0,371	0,09	0,069	0,159	0,09
ИЛ-6, пг/мл	5,95±3,89	2,43±0,51	0,39	5,70±1,31	4,41±1,08	0,45
Активность теломеразы	0,51±0,09	0,47±0,08	0,78	0,60±0,05	0,66±0,07	0,42
«Низкая» активность теломеразы	0,417	0,710	0,09	0,512	0,474	0,73

Таблица 3. Показатели окислительного стресса, хронического воспаления и активности теломеразы в зависимости от относительной длины теломер

Параметр	Длинные теломеры		p	Короткие теломеры		p
	СД2+ (n=15)	СД2- (n=76)		СД2+ (n=35)	СД2- (n=63)	
МДА, мкмоль/л	2,81±0,78	3,24±0,78	0,08	3,35±1,04	3,14±0,87	0,35
СРБ, мг/л	3,59±0,58	3,66±0,50	0,93	7,39±1,47	4,03±0,62	0,046
Фибриноген, г/л	3,39±0,55	3,38±0,53	0,95	3,70±0,91	3,44±0,55	0,135
Наличие повышенного фибриногена	0,143	0,069	0,40	0,371	0,159	0,022
ИЛ-6, пг/мл	5,94±3,89	5,70±1,31	0,94	2,43±0,51	4,41±1,08	0,10
Активность теломеразы	0,51±0,09	0,60±0,05	0,36	0,47±0,08	0,62±0,07	0,063
«Низкая» активность теломеразы	0,512	0,417	0,56	0,710	0,474	0,049

Таблица 4. Показатели углеводного обмена, окислительного стресса, хронического воспаления, длины теломер и активности теломеразы (АТ) в зависимости от наличия СД2

Параметр	СД2 +		p	СД2-		p
	высокая АТ	низкая АТ		высокая АТ	низкая АТ	
HbA _{1c} , %	7,19±0,60	7,36±0,80	0,45	5,19±0,58	5,35±0,41	0,16
ГПН, ммоль/л	7,55±1,40	8,47±1,79	0,09	5,17±0,51	5,33±0,44	0,14
МДА, мкмоль/л	2,93±0,90	3,23±1,01	0,34	3,06±0,93	3,34±0,72	0,25
ИЛ-6, пг/мл	2,98±1,01	3,91±2,03	0,68	3,77±1,00	6,37±1,80	0,21
СРБ, мг/л	5,34±1,40	7,12±1,76	0,43	4,14±0,78	2,55±0,26	0,06
Фибриноген, г/л	3,62±0,70	3,66±0,85	0,87	3,60±0,50	3,37±0,43	0,034
Наличие повышенного фибриногена	0,375	0,259	0,43	0,205	0,075	0,09
Относительная длина теломер	9,77±0,50	9,43±0,42	0,02	9,81±0,51	9,70±0,45	0,33

здоровых пациентов между лицами с «короткими» и «длинными» теломерами значимых различий по показателям углеводного обмена, выраженности окислительного стресса и хронического воспаления выявлено не было (табл. 2).

У пациентов с СД2 и «короткими» теломерами был значимо выше уровень СРБ и чаще встречался повышенный фибриноген. Различий в уровнях МДА, фибриногена, ИЛ-6 выявлено не было. Активность теломеразы была несколько ниже у пациентов с СД2 и «короткими» теломерами (p=0,063). «Низкие» же показатели активности теломеразы встречались у пациентов с СД2 и «короткими» теломерами значимо чаще (p=0,049).

У лиц с «длинными» теломерами маркеры хронического воспаления и окислительного стресса, как и активность теломеразы, практически не зависели от наличия СД2 (табл. 3).

Медиана активности теломеразы составила 0.50. Все пациенты с меньшим значением этого показателя были отнесены к группе «низкой» активности теломеразы, а те, у которых активность теломеразы превышала это значение, — к группе «высокой» активности теломеразы. У пациентов с СД2 состояние углеводного обмена, активность маркеров окислительного стресса и хронического воспаления не различались между этими группами, за исключением более коротких теломер в группе с «низкой» актив-

ностью теломеразы ($p=0,02$). В группе контроля также не было выявлено зависимости уровней окислительного стресса, СРБ и ИЛ-6 от активности теломеразы, однако у лиц с «высокой» активностью теломеразы обнаруживались более высокие показатели фибриногена (табл. 4).

У пациентов с СД2 и «низкой» активностью теломеразы был выше уровень СРБ, чаще встречался повышенный фибриноген, короче была длина теломер. Уровень ИЛ-6, МДА и фибриногена в группе «низкой» активности теломеразы не зависели от наличия СД2. В группе «высокой» активности теломеразы лица с СД2+ и СД2– не различались по состоянию окислительного стресса, хронического воспаления и длине теломер (табл. 5).

У пациентов с СД2 найдены ассоциации между относительной длиной теломер и ГПН, СРБ, «низкой» активностью теломеразы, но не выявлено корреляций с возрастом, АД, ИМТ, HbA_{1c} , МДА, фибриногеном и ИЛ-6 (табл. 6).

В группе СД2+ обнаружена положительная корреляция только между активностью теломеразы и очень большой длиной теломер. В группе контроля активность теломеразы оказалась положительно связанной с САД, ДАД, уровнями СРБ и фибриногена (табл. 7).

В дальнейшем был проведен множественный линейный регрессионный анализ, где в качестве зависимой переменной использовалась относительная длина теломер, а в качестве независимых — возраст, ГПН, СРБ, «низкая» активность теломеразы. Выяснилось, что с длиной теломер независимо связаны лишь ГПН и СРБ (табл. 8).

При использовании активности теломеразы в качестве зависимой переменной, а в качестве независимых — возраст, ДАД, ГПН, СРБ, фибриноген, выяснилось, что в группе СД2– независимо связанными с активностью теломеразы оказались лишь ДАД (обратная связь) и фибриноген (прямая связь) (табл. 9). В группе же СД2+ не было выявлено независимой связи изучаемых параметров с активностью теломеразы (табл. 10).

Обсуждение

Мы нашли, что у пациентов с СД2 длина теломер в среднем короче, чем у здоровых людей. Это

Таблица 6. Связь относительной длины теломер с другими параметрами в исследуемых группах (ранговые корреляции Спирмена)

Показатель	СД2+ (n=50)	СД2– (n=139)
	длина теломер	длина теломер
Возраст, годы	-0,09; $p=0,52$	-0,18; $p=0,035$
САД, мм рт.ст.	-0,036; $p=0,81$	-0,14; $p=0,09$
ДАД, мм рт.ст.	0,066; $p=0,65$	-0,03; $p=0,75$
ИМТ, кг/м ²	-0,025; $p=0,87$	-0,13; $p=0,13$
ГПН, ммоль/л	-0,42; $p=0,0027$	-0,16; $p=0,05$
HbA_{1c} , %	-0,23; $p=0,12$	-0,03; $p=0,69$
МДА, мкмоль/л	-0,17; $p=0,24$	0,07; $p=0,55$
СРБ, мг/л	-0,40; $p=0,004$	-0,05; $p=0,57$
Фибриноген, г/л	-0,18; $p=0,22$	-0,04; $p=0,65$
ИЛ-6, пг/мл	-0,034; $p=0,82$	-0,04; $p=0,68$
Активность теломеразы	0,15; $p=0,33$	0,03; $p=0,78$
«Низкая» активность теломеразы	-0,32; $p=0,035$	-0,06; $p=0,61$

Таблица 7. Связь активности теломеразы с другими параметрами в исследуемых группах (ранговые корреляции Спирмена)

Показатель	Активность теломеразы	
	СД2+ (n=50)	СД2– (n=139)
Возраст, годы	0,15; $p=0,35$	0,07; $p=0,52$
САД, мм рт.ст.	0,12; $p=0,44$	0,20; $p=0,08$
ДАД, мм рт.ст.	0,14; $p=0,37$	0,33; $p=0,003$
ИМТ, кг/м ²	-0,07; $p=0,65$	-0,04; $p=0,72$
ГПН, ммоль/л	-0,14; $p=0,38$	-0,17; $p=0,14$
HbA_{1c} , %	-0,08; $p=0,64$	-0,08; $p=0,47$
МДА, мкмоль/л	-0,064; $p=0,69$	-0,11; $p=0,47$
СРБ, мг/л	0,056; $p=0,73$	0,11; $p=0,35$
Наличие повышенного СРБ	0,03; $p=0,89$	0,35; $p=0,002$
Фибриноген, г/л	-0,086; $p=0,59$	0,28; $p=0,01$
ИЛ-6, пг/мл	-0,006; $p=0,97$	-0,19; $p=0,12$
Относительная длина теломер	0,15; $p=0,33$	0,03; $p=0,78$
Очень большая длина теломер	0,40; $p=0,0095$	0,14; $p=0,22$

согласуется с результатами других авторов [15]. Однако в исследовании М. Sampson и соавт. [17] не было выявлено связи между укорочением длины лимфоцитарных теломер и показателями углеводного обмена (возможно, по причине малочисленно-

Таблица 5. Показатели окислительного стресса, хронического воспаления и относительной длины теломер в зависимости от активности теломеразы (АТ)

Параметр	Низкая АТ		p	Высокая АТ		p
	СД2+	СД2–		СД2+	СД2–	
МДА, мкмоль/л	3,23±1,01	3,34±0,72	0,68	2,93±0,90	3,06±0,93	0,68
ИЛ-6, пг/мл	3,91±2,03	6,37±1,80	0,37	2,98±1,01	3,77±1,00	0,62
СРБ, мг/л	7,12±1,76	2,55±0,26	0,016	5,34±1,40	4,14±0,78	0,44
Фибриноген, г/л	3,66±0,85	3,37±0,43	0,11	3,62±0,70	3,60±0,50	0,90
Наличие повышенного фибриногена	0,259	0,075	0,043	0,375	0,205	0,21
Относительная длина теломер	9,43±0,42	9,70±0,45	0,016	9,77±0,50	9,81±0,51	0,80

Таблица 8. Зависимость длины теломер от возраста, ГПН, СРБ, пониженной активности теломеразы как независимых переменных у пациентов с СД2

Параметр	B	Стандартная ошибка	p
Возраст, годы	-0,0008	-0,008	0,92
ГПН, ммоль/л	-0,076	0,036	0,004
СРБ, мг/л	-0,018	0,007	0,020
«Низкая» активность теломеразы	-0,201	0,125	0,116

Таблица 9. Зависимость активности теломеразы от возраста, ДАД, ГПН, СРБ, фибриногена, ГПН как независимых переменных в группе контроля

Параметр	B	Стандартная ошибка	p
Возраст, годы	-0,003	0,005	0,534
ДАД, мм рт.ст.	-0,010	0,004	0,012
ГПН, ммоль/л	-0,105	0,081	0,20
СРБ, мг/л	0,019	0,010	0,073
Фибриноген, г/л	0,205	0,080	0,013

Таблица 10. Зависимость активности теломеразы от возраста, ДАД, ГПН, СРБ, фибриногена, ГПН как независимых переменных в группе пациентов с СД2

Параметр	B	Стандартная ошибка	p
Возраст, годы	0,002	0,008	0,74
ДАД, мм рт.ст.	-0,0001	0,006	0,98
ГПН, ммоль/л	-0,006	0,039	0,15
СРБ, мг/л	0,007	0,009	0,45
Фибриноген, г/л	-0,009	0,089	0,91

сти группы). В нашем исследовании выявлены значимые различия в HbA_{1c} и ГПН у пациентов с СД2 с «длинными» и «короткими» теломерами, а также обнаружена отрицательная связь между длиной теломер и ГПН. Можно утверждать, что у пациентов с СД2 более короткие теломеры ассоциированы с неудовлетворительным контролем диабета, а гипергликемия в свою очередь может оказывать повреждающее действие на показатели репликативного старения.

Мы нашли, что активность теломеразы у пациентов с СД2 ниже, чем у здоровых людей, что согласуется с имеющимся немногочисленным данными [17]. Роль теломеразы в процессе нормального старения неоднозначна и изучена недостаточно. Нами не было выявлено связи активности теломеразы с длиной теломер, что согласуется с мнением о незначительной роли теломеразы в поддержании гомеостаза длины теломер в пожилом возрасте [8].

Повреждающее действие гипергликемии на биологию теломер, в том числе в клетках эндотелия, реализуется через механизм окислительного стресса [16] и хронического воспаления [9]. Однако значи-

мые различия в уровне МДА между группами СД2+ и СД2- отсутствовали (вероятно, в силу небольшой длительности СД и отсутствия выраженной хронической гипергликемии, так как именно длительная гипергликемия связана с развитием выраженного и стойкого окислительного стресса). Возможно, необходимо применение более точных показателей окислительного стресса, таких как мочевая экскреция 8-изо-простагландина F2α. Мы нашли более высокие уровни воспалительных маркеров у пациентов с СД2, чем у лиц контрольной группы. Еще один воспалительный маркер, ИЛ-6, как недавно выяснилось, обладает множественными эффектами, являясь не только цитокином, но и миокином, стимулируя миогенез и благотворно влияя на энергетический метаболизм [18]. Возможно, поэтому уровень ИЛ-6 в контроле оказался несколько более высоким, что, однако, требует дальнейшего изучения.

Хроническое воспаление приводит к преждевременному старению клеток, укорочению теломер посредством активации размножения лимфоцитарных клеток и активации высвобождения АФК, вызывающих окислительное повреждение концевой части ДНК [10]. В 2012 г. было показано, что прогрессирующее укорочение теломер с увеличением продолжительности СД2 может быть связано с параллельно увеличивающимся окислительным стрессом и хроническим воспалением [5]. Наши результаты согласуются с данными ранее проведенных исследований. Мы обнаружили более высокие уровни СРБ и несколько повышенные уровни МДА у пациентов с СД2 и короткими теломерами, чем у пациентов с длинными теломерами. Имела место отрицательная связь между длиной лимфоцитарных теломер и классическим маркером хронического воспаления — СРБ, что указывает на участие хронического воспаления в укорочении теломер у пациентов с СД2. В группе контроля связь между СРБ и длиной теломер отсутствовала, что согласуется с результатами других исследований [19]. Отсутствие связи между ИЛ-6, фибриногеном и длиной теломер в обеих группах можно объяснить малой изменчивостью этих показателей. К тому же, опираясь только на уровень циркулирующих цитокинов, можно недооценить степень местного воспаления в тканях.

Данные литературы [12] о связи хронического воспаления с активностью теломеразы противоречивы. Длительное хроническое воспаление приводит к истощению теломеразы, что мы и наблюдали у пациентов с СД2. При менее выраженном и менее длительном хроническом воспалении, как это имеет место при метаболическом синдроме или умеренном атеросклерозе, напротив, наблюдается увеличение активности теломеразы [20], что, вероятно, носит компенсаторный характер, замедляя уменьшение длины теломер в активно делящихся клетках

под влиянием воспалительных цитокинов. Действительно, в группе контроля нами была обнаружена положительная связь между активностью теломеразы и маркерами хронического воспаления.

Важно подчеркнуть, что, согласно нашим данным, уровень окислительного стресса, хронического воспаления и активность теломеразы у пациентов с СД2 и «длинными» теломерами значимо не отличались от соответствующих показателей у здоровых лиц. Можно предположить, что при небольшой длительности СД2 генетически обусловленная большая длина теломер защищает пациентов от повреждающего действия окислительного стресса и хронического воспаления, обеспечивая более качественное и быстрое восстановление поврежденных тканей, в том числе сосудов. Напротив, у пациентов с СД2 и «короткими» теломерами, даже при небольшой длительности заболевания, выраженность хронического воспаления и степень снижения активности теломеразы были более значительными. Следует иметь в виду, что пациенты группы СД2 и контроля были сравнимы по возрасту.

Накапливается все больше доказательств, что укорочение теломер является ключевым компонентом уменьшения резервов стволовых клеток и ассоциированной с возрастом дегенерации тканей. Связь СД2 с процессами клеточного старения и выраженностью хронического воспаления и окислительного стресса может объяснить более высокую частоту развития ССЗ при этом заболевании. Дальнейшие исследования позволят сформировать с учетом длины теломер среди пациентов с СД2 группу лиц, нуждающихся в более агрессивном контроле углеводного обмена, что обеспечит более персонализированный подход к лечению заболевания.

Выводы

1. У пациентов с СД2 длина теломер в среднем короче, а активность теломеразы ниже, чем у здоровых людей. Не выявлено значения активности теломеразы в изменении длины теломер.

2. Уровень МДА у пациентов с СД2 и здоровых лиц практически одинаковы. Хроническое воспаление более выражено у пациентов с СД2, чем у здоровых лиц аналогичного возраста. Хроническое воспаление играет ведущую роль в укорочении теломер и повышении активности теломеразы.

3. У пациентов с СД2 и «длинными» теломерами выраженность окислительного стресса и хронического воспаления не отличаются от соответствующих показателей у здоровых лиц

4. У пациентов с СД2 «короткие» теломеры ассоциированы с неудовлетворительным контролем диабета и более выраженным хроническим воспалением.

5. «Длинные» теломеры защищают пациентов с СД от повреждающего действия окислительного стресса и хронического воспаления.

Конфликт интересов отсутствует.

Исследование было проведено в рамках Государственного задания «Изучение молекулярных механизмов атерогенеза в целях разработки методов ранней диагностики доклинического атеросклероза как основного патофизиологического механизма развития сердечно-сосудистых заболеваний и их осложнений».

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — Е.Н. Дудинская, О.Н. Ткачева, И.Д. Стражеско, Е.В. Акашева.

Сбор и обработка материала — Н.В. Браилова, Е.В. Плохова, В.С. Пыхтина.

Статистическая обработка данных — В.А. Выгодин. Написание текста — Н.В. Браилова.

Редактирование — Е.Н. Дудинская, О.Н. Ткачева, М.В. Шестакова, С.А. Бойцов.

Благодарности

Коллектив авторов благодарит А.С. Кругликову, И.Н. Озерову, Н.В. Гомыранову (ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины» МЗ РФ) и Д.А. Скворцова (Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского ГБОУ ВПО МГУ им. М.В. Ломоносова) за помощь в проведении исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci.* 2013;9(10):1057-1069. doi: 10.7150/ijbs.7502.
2. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* 2011;192(4):547-556. doi: 10.1083/jcb.201009094.
3. Inoguchi T, Li P, Umeda F, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes.* 2000;49(11):1939-1945. doi: 10.2337/diabetes.49.11.1939.
4. Benetos A, Gardner JP, Zureik M, et al. Short Telomeres Are Associated With Increased Carotid Atherosclerosis in Hypertensive Subjects. *Hypertension.* 2004;43(2):182-185. doi: 10.1161/01.HYP.0000113081.42868.f4.
5. Murillo-Ortiz B, Albarrán-Tamayo F, Arenas-Aranda D, et al. Telomere length and type 2 diabetes in males, a premature aging syndrome. *The Aging Male.* 2015;15(1):54-58. doi: 10.3109/13685538.2011.593658.
6. Shah AS, Dolan LM, Kimball TR, et al. Influence of Duration of Diabetes, Glycemic Control, and Traditional Cardiovascular Risk Factors on Early Atherosclerotic Vascular Changes in Adolescents

- and Young Adults with Type 2 Diabetes Mellitus. *J Clin Endocr Metab.* 2009;94(10):3740-3745.
doi: 10.1210/jc.2008-2039.
7. Зверева М.Э., ЩербакOVA Д.М., Донцова О.А. Теломераза: структура, функции и пути регуляции активности. // Успехи биологической химии. - 2010. — Т. 50. - С. 155–202. [Zvereva ME, Shcherbakova DM, Dontsova OA. Telomerase: struktura, funktsii i puti regulyatsii aktivnosti. *Uspekhi biologicheskoi khimii.* 2010;50:155-202. (In Russ.)].
 8. Morgan G. Telomerase regulation and the intimate relationship with aging. *Research and Reports in Biochemistry.* 2013;3:71-78.
doi: 10.2147/rrbc.s28603.
 9. Effros RB. Telomere/telomerase dynamics within the human immune system: Effect of chronic infection and stress. *Exp Gerontol.* 2011;46(2-3):135-140.
doi: 10.1016/j.exger.2010.08.027.
 10. Ludlow AT, Ludlow LW, Roth SM. Do Telomeres Adapt to Physiological Stress? Exploring the Effect of Exercise on Telomere Length and Telomere-Related Proteins. *BioMed Research International.* 2013;2013:1-15.
doi: 10.1155/2013/601368.
 11. Ghosh A, Saginc G, Leow SC, et al. Telomerase directly regulates NF- κ B-dependent transcription. *Nat Cell Biol.* 2012;14(12):1270-1281.
doi: 10.1038/ncb2621.
 12. Qi Nan W, Ling Z, Bing C. The influence of the telomere-telomerase system on diabetes mellitus and its vascular complications. *Expert Opin Ther Targets.* 2015;19(6):849-864.
doi: 10.1517/14728222.2015.1016500.
 13. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(10):47e-47.
doi: 10.1093/nar/30.10.e47.
 14. Kim N, Piatyszek M, Prowse K, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994;266(5193):2011-2015.
doi: 10.1126/science.7605428.
 15. Huang Q, Zhao J, Miao K, et al. Association between Telomere Length and Type 2 Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2013;8(11):e79993.
doi: 10.1371/journal.pone.0079993.
 16. Sampson MJ, Winterbone MS, Hughes JC, et al. Monocyte Telomere Shortening and Oxidative DNA Damage in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2006;29(2):283-289.
doi: 10.2337/diacare.29.02.06.dc05-1715..
 17. Kuhlow D, Florian S, von Figura G, et al. Telomerase deficiency impairs glucose metabolism and insulin secretion. *Aging (Albany NY).* 2010;2(10):650-658.
 18. Pal M, Febbraio MA, Whitham M. From cytokine to myokine: the emerging role of interleukin-6 in metabolic regulation. *Immunol Cell Biol.* 2014;92(4):331-339.
doi: 10.1038/icb.2014.16.
 19. Lichterfeld M, O'Donovan A, Pantell MS, et al. Cumulative Inflammatory Load Is Associated with Short Leukocyte Telomere Length in the Health, Aging and Body Composition Study. *PLoS One.* 2011;6(5):e19687.
doi: 10.1371/journal.pone.0019687.
 20. Federici M, Rentoukas E, Tsarouhas K, et al. Connection between Telomerase Activity in PBMC and Markers of Inflammation and Endothelial Dysfunction in Patients with Metabolic Syndrome. *PLoS One.* 2012;7(4):e35739.
doi: 10.1371/journal.pone.0035739.