

Сорокина
Анна Григорьевна

**Связь жесткости артериальных сосудов с биомаркерами накопления сенесцентных
клеток у пациентов высокого и очень высокого сердечно-сосудистого риска**

3.1.20. Кардиология

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва - 2023

Работа выполнена на базе научного отдела возраст-ассоциированных заболеваний Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» обособленного подразделения Медицинского научно-образовательного центра Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научные руководители:

Орлова Яна Артуровна, доктор медицинских наук

Ефименко Анастасия Юрьевна, кандидат медицинских наук

Официальные оппоненты:

Метельская Виктория Алексеевна – д.б.н., профессор, главный научный сотрудник Лаборатории изучения биохимических факторов риска хронических неинфекционных заболеваний Отдела фундаментальных и прикладных аспектов ожирения Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Сафарова Айтен Фуадовна – д.м.н., профессор кафедры внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики имени академика В.С. Моисеева Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» 2023г. в ____ час. ____ мин. На заседании диссертационного совета ПДС 0300.004 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (117292, г. Москва, ул. Вавилова, д. 61, ГБУЗ «ГКБ им. В. В. Виноградова ДЗМ»)

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале УНИБЦ (научная библиотека) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117292, г. Москва, ул. Вавилова, д. 61, ГБУЗ «ГКБ им. В.В. Виноградова ДЗМ»

Автореферат разослан «__» 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, к.м.н.,
доцент А.А. Шаваров

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются причиной высокой смертности и инвалидизации в мире и в Российской Федерации в частности. За последние 20 лет число случаев смерти от ССЗ достигло 16% от всех случаев смерти и продолжает неуклонно расти. Артериальная жесткость признана основным фактором патогенеза ССЗ, а скорость пульсовой волны (СПВ) широко используется в качестве неинвазивного маркера при оценке артериальной жесткости. Неоднократно показано, что жесткость сосудистой стенки является независимым фактором риска смерти от сердечно-сосудистых событий, ишемической болезни сердца и фатального инсульта, признана сильным фактором риска ССЗ у пациентов с почечной недостаточностью.

В основе этих атеросклеротических изменений сосудистой стенки лежит хроническое воспаление, и при снижении интенсивности воспаления риски сердечно-сосудистых событий снижаются. В настоящее время накоплено достаточно данных о связи хронического воспаления с накоплением в тканях так называемых сенесцентных клеток (лат. «senex» – старение). Сенесцентные клетки – это клетки, которые необратимо останавливаются в клеточном цикле, накапливают дисфункциональные молекулы, но при этом не уходят в апоптоз и продуцируют в окружающую среду комплекс провоспалительных факторов, которые входят в состав так называемого секреторного фенотипа, ассоциированного с клеточным старением (senescence-associated secretory phenotype, SASP). Возможность активного влияния на процессы воспаления в сосудистой стенке через воздействие на число таких клеток может привести к снижению биологического возраста сосудов, уменьшению вероятности развития и прогрессирования ССЗ. Детекция сенесцентных клеток затруднительна, поскольку специфических маркеров этих клеток не существует, а наиболее перспективные показатели, отражающие накопление сенесцентных клеток, определяются инвазивно на тканевом и клеточном уровнях и не могут оцениваться в рутинной практике.

Для успешной трансляции в клинику подходов, направленных на регуляцию содержания сенесцентных клеток в различных тканях с целью снижения воспаления и профилактики развития ССЗ, необходимо изучение взаимосвязей между установленными клиническими биомаркерами старения сосудистой стенки и биомаркерами стареющих клеток на тканевом и клеточном уровнях.

Степень разработанности темы исследования

Несмотря на значительную историю изучения патогенеза возраст-ассоциированных изменений сердечно-сосудистой системы, вопросы взаимосвязей различных изменений, связанных с накоплением сенесцентных клеток, на системном,

тканевом и клеточном уровнях у пациентов с высоким и очень высоким сердечно-сосудистым риском остаются неуточненными, что и определило цели и задачи настоящего исследования.

Цель: изучить взаимосвязи между жесткостью артериальных сосудов и биомаркерами накопления сенесцентных клеток у пациентов высокого и очень высокого сердечно-сосудистого риска.

Задачи:

1. Создать коллекцию биологических образцов разных типов, полученных от пациентов высокого и очень высокого сердечно-сосудистого риска, с целью выявления взаимосвязей между клиническими, тканевыми и клеточными биомаркерами накопления сенесцентных клеток.

2. Оценить связь скорости пульсовой волны с традиционными факторами сердечно-сосудистого риска и биомаркерами репликативного клеточного старения у пациентов высокого и очень высокого сердечно-сосудистого риска.

3. Изучить связь жесткости магистральных сосудов с биомаркерами накопления сенесцентных клеток в плазме крови.

4. Изучить связь жесткости артериальных сосудов с тканевыми и клеточными биомаркерами накопления сенесцентных клеток.

5. Изучить связь между биомаркерами накопления сенесцентных клеток на тканевом и клеточном уровнях.

Научная новизна

Впервые в клиническом исследовании на созданной коллекции биообразцов оценивали возрастные изменения сосудов, связанные с накоплением сенесцентных клеток, на молекулярном, клеточном, тканевом и организменном уровнях. Установлены взаимосвязи между показателем жесткости магистральных артерий – скоростью пульсовой волны – и плазменными биомаркерами накопления сенесцентных клеток (содержание IGF1, FGF-21, VCAM), тканевым биомаркером (экспрессия p16), показателями пролиферации выделенных в культуру стромальных клеток и секреции ими компонентов SASP. Определены взаимосвязи между системными и тканевыми маркерами накопления сенесцентных клеток. Выведена зависимость для прогностической оценки уровня классического показателя накопления сенесцентных клеток – экспрессии p16 в тканях – от паспортного возраста и неинвазивно определяемых показателей, уровня VCAM и содержания CD34+клеток в периферическом кровотоке.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработан алгоритм и на его основе создана коллекция биологических образцов 7 разных типов, полученных от каждого пациента, позволяющая изучать возраст-ассоциированные изменения на разных уровнях. Сформированная дорожная карта с разработанными стандартными протоколами для всех участников исследования, удобной и доступной системой аннотирования и хранения биологических образцов может применяться при создании других типов коллекций биообразцов.

Результаты анализа взаимосвязей между показателем жесткости магистральных артерий и тканевыми и клеточными биомаркерами накопления сенесцентных клеток дают возможность рассматривать СПВ в качестве претендента на включение в панель параметров для оценки и мониторинга биологического возраста при проведении сенолитической и геропротекторной терапии.

Выявленные закономерности позволяют в дальнейшем разрабатывать и внедрять в клиническую практику подходы, направленные на неинвазивную оценку уровня сенесцентных клеток и регуляцию их содержания в различных тканях.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Скорость пульсовой волны у пациентов высокого и очень высокого сердечно-сосудистого риска демонстрирует значимую связь с системными, тканевыми и клеточными биомаркерами накопления сенесцентных клеток.
2. Тканевой биомаркер сенесцентных клеток, уровень экспрессии белка p16, демонстрирует связь с биомаркерами накопления сенесцентных клеток на плазменном и клеточном уровнях, независимо от паспортного возраста.

Степень достоверности результатов исследования

Достоверность полученных результатов основана на достаточном объеме выборки пациентов, включенных в работу, использовании современных методов исследования и адекватных методов статистической обработки полученных данных с помощью пакетов прикладных программ SPSS и Microsoft Excel 2016. Применены методы описательной статистики (сравнение показателей несвязанных выборок выполнялось с использованием U-критерия Манна-Уитни и критерия хи-квадрат), корреляционный анализ с использованием коэффициента корреляции Пирсона, а также многофакторный регрессионный анализ и факторный анализ.

Апробация работы

Основные результаты исследования представлены в виде докладов на российских и международных конференциях и конгрессах: на IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019), на всероссийском конгрессе по геронтологии и гериатрии с международным участием (онлайн-формат, 2021), ESGCT Collaborative

Virtual Congress 2021, (Бельгия, 2021), на всероссийском конгрессе «Кардиология на марше 2022» (Москва, 2022), V Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2022).

Внедрение результатов исследования

Результаты, полученные в ходе выполнения исследования, используются в клинической практике специалистов Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова. Материалы исследования использованы при подготовке программ дополнительного образования, представлены на конгрессах, конференциях, в отчетах по Госзаданию с 2019 по 2021 гг.

Личный вклад соискателя

Личный вклад соискателя заключается в непосредственном участии во всех этапах подготовки диссертационной работы. Автором, совместно с научными руководителями, были сформулированы цель и задачи, исходя из них составлен дизайн исследования. Автор лично выполняла набор больных в исследование, сбор клинических и анамнестических данных, забор крови для лабораторных анализов, регистрацию информации в индивидуальных картах, проводила исследование по оценке жесткости магистральных артерий. Самостоятельно осуществляла наблюдение за пациентами во время госпитализации. Проводила поиск и анализ научной литературы по изучаемой проблеме. Автором проведена статистическая и аналитическая обработка результатов исследования, интерпретированы полученные данные, подготовлены к публикации результаты научной работы, сформулированы главные выводы и положения диссертации, разработаны практические рекомендации. Диссертантом в соавторстве подготовлены к печати публикации по теме работы.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности: 3.1.20. «Кардиология» по тематике, методам исследования и научным положениям, поскольку освещает фундаментальные аспекты изменения жесткости магистральных артерий, современные инвазивные и неинвазивные диагностические технологии у пациентов с сердечно-сосудистой патологией.

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности: 1.5.4. «Биохимия» по тематике, методам исследования и научным положениям, поскольку освещает вопросы молекулярных механизмов интеграции клеточного метаболизма, связей биохимических процессов, вовлеченных в клеточное старение, с деятельностью органов и тканей, с жизнедеятельностью организма для решения задач сохранения здоровья человека, выяснения причин различных возраст-ассоциированных болезней и изыскания путей их эффективного лечения.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, главы с описанием полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Общий объем диссертации изложен на 145 страницах, из них 121 страница текста, включая 7 рисунков и 23 таблицы. Список литературы включает 335 источников, в том числе 27 отечественных, 261 зарубежную публикацию.

Публикации по теме диссертации

По результатам диссертационного исследования опубликовано 4 работы, в том числе 4 – в журналах, индексируемых в международных базах данных (WOS, Scopus).

Материалы и методы

Одномоментное когортное исследование проводилось в соответствии с правилами Качественной Клинической Практики Международной Конференции по Гармонизации (ICH GCP), этическими принципами, изложенными в Директиве Европейского Союза 2001/20/ЕС и требованиями национального Российского законодательства и было одобрено локальным этическим комитетом Медицинского научно-образовательного центра МГУ (протокол №09/17 от 29 октября 2018 года).

Контингент и структура исследования

В исследование включали 80 пациентов мужского и женского пола в возрасте 65 лет и старше, с высоким и очень высоким сердечно-сосудистым риском и отвечающих критериям включения и исключения. Сердечно-сосудистый риск оценивался по объединенной шкале SCORE-2 и SCORE-OP.

Всем пациентам проводили оценку традиционных факторов риска ССЗ, жесткости артериальной стенки (СПВ оценивали прибором «BPLab» (ООО «Петр Телегин», Россия) в комплексе с программой Vasotens Office версии 06.04.03). Во время оперативного вмешательства осуществлялся забор биоматериалов (периферическая кровь, кожа, подкожная жировая клетчатка), из которых затем выделяли различные типы клеток и проводили подготовку образцов тканей для гистологического анализа с целью оценки различных биомаркеров сенесцентных клеток.

Критерии включения и невключения

Критерии включения

- Пациенты мужского и женского пола в возрасте 65 лет и старше, с высоким и очень высоким сердечно-сосудистым риском, способные понимать цели настоящего исследования и соблюдать требования протокола.
- Наличие подписанного пациентом информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии невключения

- Острый инфаркт миокарда или острое нарушение мозгового кровообращения в анамнезе в предшествующие 6 месяцев перед включением.
- Перемежающаяся хромота, фибрилляция предсердий и другие состояния, не позволяющие корректно выполнить измерение скорости пульсовой волны.
- Хроническая сердечная недостаточность III-IVФК.
- Онкологические или системные заболевания в анамнезе.
- Психические, физические и прочие причины, не позволяющие адекватно оценивать свое поведение и правильно выполнять условия протокола исследования.
- Неспособность/нежелание пациента предоставить подписанное информированное согласие на участие в исследовании.
- Противопоказания для проведения оперативного лечения на момент включения.
- Острые и хронические инфекционные заболевания.

Работа по созданию коллекции была разделена на несколько этапов. В рамках преаналитического этапа спроводилось планирование исследования с учетом ресурсов медицинского центра.

При поступлении в приемное отделение пациент проходил процедуру скрининга, получал информированное согласие (ИС), врач-терапевт отвечал на все возникающие вопросы и в дальнейшем поддерживал контакт с пациентом на протяжении всего участия в исследовании. После подписания ИС осуществляли забор периферической крови у пациента (до 20 мл), в условиях клинического отделения проводили неинвазивное исследование жесткости артерий. В процессе хирургического вмешательства (герниопластика, замена крупных суставов) в асептических условиях операционной забирали образцы биоматериала (подкожная жировая ткань в количестве 1-5 мл и участок кожи 3-5 кв.мм) для гистологического анализа и выделения клеток.

В лабораторных подразделениях (клинико-диагностическая лаборатория и отдел патоморфологии) проводили первичную обработку поступивших образцов биоматериалов и внутреннюю маркировку с использованием штрих-кодирования. В научном подразделении (Институт регенеративной медицины МНОЦ) проводили выделение и культивирование клеток по отработанным ранее протоколам. Далее выполняли клинический анализ крови, исследование биохимических показателей крови, оценивали уровень известных биомаркеров клеточного старения непосредственно в тканях и их взаимосвязи с другими предположительными биомаркерами сенесцентных клеток на разных уровнях организации.

Измерение САД, ДАД, ЧСС, СПВ осциллометрическим методом в положении сидя или лежа производилось с помощью диагностической системы VPLab Vasotens.

Измерения СПВ были проведены в соответствии с международными протоколами.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета статистических программ IBM SPSS Statistics. Уровнем статистической значимости было принято считать $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Характеристика исследуемой группы

С 2018г. по 2020г. скрининг прошли 166 человек. В исследование вошло 80 пациентов (21 мужчина и 59 женщин в возрасте от 65 до 90 лет (медиана 71 год), соответствующих критериям включения/невключения и давших добровольное ИС на участие. У 38 пациентов удалось осуществить забор тканей (жировая ткань и ткань кожи). Значения основных характеристик пациентов представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Клиническая характеристика пациентов при включении в исследование (n=80)

Показатель	Группа пациентов с забором крови (n=42)	Группа пациентов с забором тканей и крови (n=38)	p
Возраст (лет)	74,0±4,2	70,0±4,9	0,352
Мужчин (n/%)	5/12	16/42	0,027
Курение (n/%)	12/29	5/13	0,043
ИМТ (кг/м ²)	27,4±5,6	30,5±5,4	0,425
Ожирение (n/%)	38/90	31/82	0,122
САД (мм рт.ст.)	132,5 ± 21,2	137,0 ± 26,3	0,521
ДАД (мм рт.ст.)	76,7 ± 9,2	77,5 ± 9,2	0,743
ПАД (мм рт.ст.)	62,2 ± 9,2	59,1 ± 7,5	0,363
ОХС (ммоль/л)	5,0 ± 1,3	5,73 ± 2,7	0,102
ХС ЛНП (ммоль/л)	3,1 ± 0,9	3,85 ± 1,3	0,215
ХС ЛВП (ммоль/л)	1,2 ± 0,3	1,78 ± 0,5	0,092
ТГ (ммоль/л)	1,19 ± 0,7	1,21 ± 0,4	0,639
SCORE2&SCORE-OP (балл)	28 ± 4,7	24 ± 3,4	0,155

ИМТ – индекс массы тела, САД – систолическое артериальное давление, ДАД – диастолическое артериальное давление, ПАД – пульсовое артериальное давление, ОХС – общий холестерин, ХС ЛНП – холестерин, липопротеины низкой плотности, ХС ЛВП – холестерин, липопротеины высокой плотности, ТГ – триглицериды.

У всех включенных в исследование пациентов диагностирована АГ, у всех пациентов целевые цифры АД были достигнуты на фоне медикаментозной терапии и/или скорректированного образа жизни. Средняя длительность диагноза АГ в исследовательской группе составила $4,8 \pm 1,3$ лет ($4,6 \pm 1,2$ для группы с забором крови, $4,9 \pm 1,0$ для группы с забором тканей и крови, $p > 0,05$). При оценке возраст-ассоциированных заболеваний статистически значимой разницы между группами по сопутствующим заболеваниям не было выявлено. Также в исследуемой группе проводилась сравнительная оценка по показателям сердечно-сосудистого риска и СПВ в разных возрастных группах исследуемой когорты.

Для подтверждения возможности экстраполяции данных на популяцию и выявления возможных особенностей характеристик у отобранной выборки пациентов проводилась сравнительная оценка по основным показателям с контрольной группой пациентов. В контрольную группу последовательно включались пациенты высокого и очень высокого сердечно-сосудистого риска, отвечающие критериям включения и невключения, пришедшие на плановый амбулаторный кардиологический прием.

Создание коллекции биологических образцов разного типа, полученных от пациентов высокого и очень высокого сердечно-сосудистого риска

Для формирования коллекции была организована работа четырех подразделений, в том числе четырех клинических отделений и трех лабораторных подразделений. За каждым подразделением, помимо специализированных опций, были закреплены дополнительные функции для поддержания системной работы исследования. В результате работы были сформированы информированные согласия и протоколы действий, заполнение электронной базы данных было распределено между всеми участниками исследования, контроль соответствия и своевременности заполнения, а также устранение технических нестыковок осуществляли сотрудники научного отдела. Для обеспечения удобства доступа к базе данных и в то же время сохранения их конфиденциальности была разработана система кодирования биообразцов. В рамках исследования сформированы основные рекомендации по информированию пациентов о клиническом исследовании, рекомендации предоставления информации в информированных согласиях. Разработана дорожная карта передачи образцов, их отслеживания и маркирования, а также сформированы рекомендации по контролю качества исследовательской деятельности при создании коллекции с задействованием мультидисциплинарной команды.

На основании проведенных инструментальных и лабораторных исследований, а также по результатам выделения и культивирования клеток из образцов биоматериалов, получены характеристики исследуемых биомаркеров сенесцентных клеток (Таблица 2).

Таблица 2 – Изучаемые биомаркеры накопления сенесцентных клеток в организме

Биомаркеры накопления сенесцентных клеток	Описательная статистика
СПВ, м/с	14,15±2,52
Системный кровоток (n=80)	
Длина теломер_МНК, п.о.	538,40±226,00
Содержание CD34+клеток, %	0,06±0,03
p16 мРНК_МНК, отн.ед.	220±33,50
p21 мРНК_МНК, отн.ед.	140±29,60
IGF-1, нг/мл	152,80±46,40
FGF-21, нг/мл	150,80 [137,28; 164,32]
VCAM-1, нг/мл	32,56 [29,32; 35,80]
Остеопрогерин, нг/мл	5,51 [4,23; 6,79]
Ферритин, нг/мл	107,71 [93,51; 121,91]
Ткани (n=38)	
p16INK, кл. на ед. площади ткани	4,61±1,96
Клетки (n=38)	
МСК_лаг-фаза, ч	27,50±5,39
МСК_прирост за 96ч	63,00±13,22
Длина теломер МСК	854,69 [827,13; 882,25]
Активность теломеразы МСК	4,12±0,26
Экспрессия p21 МСК	44,15±4,11
Экспрессия H2AX МСК	39,86±3,55
Активность бета-галактозидазы МСК	0,58±0,07
ФБ_лаг-фаза, ч	24,00±5,83
ФБ_прирост за 96ч	78,00±13,00
Длина теломер ФБ	1405,30 [1198,06; 1612,54]
Активность теломеразы ФБ	5,36±0,58
Экспрессия p21 ФБ	49,29±13,32
Активность бета-галактозидазы ФБ	0,39±0,02
Экспрессия H2AX ФБ	50,29±7,23

Продолжение таблицы 2

SASP (n=38)	
IL-6_МСК, нг/мл	29,40 [22,64; 36,71]
МСР-1_МСК, нг/мл	124,12 [120,5; 127,74]
РАI-1_МСК, нг/мл	5,48 [4,86; 6,10]
ON_МСК, нг/мл	6,16 [5,38; 6,94]
РЕDF_МСК, нг/мл	43,05 [41,17; 43,05]
IL-6_ФБ, нг/мл	57,45 [44,25; 70,65]
МСР-1_ФБ, нг/мл	224,57 [184,37; 264,77]
РАI-1_ФБ, нг/мл	3,72 [2,94; 4,50]
ON_ФБ, нг/мл	9,51 [8,14; 10,88]
РЕDF_ФБ, нг/мл	44,82 [34,72; 54,92]

Количественные переменные представлены как среднее стандартное отклонение для нормального распределения данных или как медиана [Q1;Q3] для отличного от нормального распределения данных в обеих группах. СПВ – скорость пульсовой волны, МНК – мононуклеарные клетки крови, мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота, IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1, FGF21 – фактор роста фибробластов 21, VCAM-1 – молекула адгезии сосудистых клеток, МСК – мезенхимные стволовые/стромальные клетки, ФБ – фибробласты, IL-6 – интерлейкин-6, МСР-1 – белок хемоаттрактант моноцитов 1 типа.

Оценка связи СПВ с традиционными факторами риска повышения артериальной жесткости и биомаркерами репликативного клеточного старения

На следующем этапе работы была оценена связь СПВ с традиционными факторами риска повышения артериальной жесткости и биомаркерами репликативного клеточного старения в нашей выборке.

СПВ значимо связана с возрастом (коэффициент корреляции Пирсона $r=0,556$, $p<0,001$), САД (коэффициент корреляции Пирсона $r=0,334$, $p<0,05$), ИМТ ($r=0,421$, $p<0,05$) и курением на уровне тенденции ($r=-0,315$, $p=0,056$) (Таблица 3).

При этом медиана СПВ составила $14,15\pm 2,52$ м/с и оказалась выше нормы на 4,15 м/с при нормальном уровне САД и ДАД, что, вероятнее всего, связано со значительным превышением биологического возраста над паспортным за счет высокого процента пациентов с АГ и ожирением – у 66 пациентов (82,5%) в нашей выборке.

Таблица 3 – Корреляция СПВ с традиционными факторами риска

Параметр	Коэффициент корреляции r-Пирсона	p
Возраст	0,556	<0,001
САД	0,334	0,048
ИМТ	0,421	0,005
Глюкоза	-0,026	0,824
ОХС	-0,150	0,192
Курение	-0,315	0,056

(СПВ – скорость пульсовой волны, САД – систолическое аортальное давление, ИМТ – индекс массы тела, ОХС – общий холестерин)

Была также обнаружена отрицательная корреляция между показателем абсолютной длины теломер в клетках, выделенных из периферической крови пациентов ($r = -0,244$, $p < 0,001$), а также из выделенных в культуру ФБ ($r = -0,381$, $p = 0,022$), МСК ($r = -0,382$, $p = 0,046$) и возрастом. Многие крупные эпидемиологические исследования подтвердили связь между длиной теломер периферических лейкоцитов и ССЗ: поскольку ССЗ и укорочение теломер имеют много общих факторов риска, включая сахарный диабет, гипертоническую болезнь, ожирение и курение, активный окислительный стресс и хроническое воспаление являются ключевыми факторами, способствующими укорочению теломер и развитию ССЗ.

Изучение связи параметра жесткости магистральных сосудов с биомаркерами накопления сенесцентных клеток в плазме крови

С помощью корреляционного анализа были выделены наиболее значимые показатели, отражающие накопление сенесцентных клеток на системном, тканевом и клеточном уровнях (с учетом нормального распределения использовался коэффициент корреляции Пирсона $r > 0,3$, при $p < 0,05$), демонстрировавшие положительные и отрицательные корреляции с СПВ.

На основании факторного анализа показатели, отражающие накопление сенесцентных клеток у пациентов исследуемой выборки, объединены в группы, где тенденции на их динамическое изменение сходны (КМО=0,68, приемлемая адекватность). Так первую группу попали: p16, показатели клеточной пролиферации и SASP (MCP-1, ON). В другую группу попали СПВ, длина теломер в лейкоцитах, содержание CD34+ клеток, VCAM-1 и IGF-1 в периферической крови, также показатели клеточной пролиферации и SASP (IL-6, PAI-1).

По результатам двух методов в качестве наиболее перспективных изучаемых биомаркеров старения в плазме крови были отобраны следующие показатели: IGF-1,

FGF-21, VCAM-1, при этом выявлена значимая отрицательная корреляционная связь между СПВ и уровнем IGF-1. Более высокий уровень IGF-1 определялся у пациентов с СПВ менее 14м/с (т.е. с менее жесткими сосудами). IGF-1 участвует в эндокринной, аутокринной и паракринной регуляции процессов роста, развития и дифференцировки клеток и тканей организма. Точная роль IGF-1 в возраст-ассоциированных заболеваниях до конца не определена. Так, низкий уровень IGF-1 в сыворотке является предиктором долголетия, а уровень IGF-1 снижается с возрастом, что продемонстрировано и в нашем исследовании. В то же время известно, что терапия с использованием IGF-1 может улучшать состояние при некоторых возраст-ассоциированных заболеваниях.

Если рассматривать более высокий показатель IGF-1 как характеристику организма с более низким биологическим возрастом, то тенденция к увеличению СПВ отражает естественный процесс старения – повышение жесткости сосудистой стенки – на фоне снижения IGF-1 с возрастом и позволяет рассматривать СПВ как характеристику биологического возраста.

Многофакторный регрессионный анализ подтвердил также связь СПВ и показателя фактора роста VCAM-1 независимо от возраста (Таблица 4). Привлечение и адгезия моноцитов к эндотелию играют решающую роль в инициации атеросклероза. VCAM-1 косвенно отражает степень повреждения сосудистой стенки, и в исследованиях показана взаимосвязь уровня VCAM и ICAM с СПВ.

Таблица 4 – Связь СПВ с возрастом и фактором роста - молекулой адгезии сосудистых клеток. Данные многофакторного регрессионного анализа

	S_{β}	t	p
Возраст	-0,030	-0,691	0,501
IGF-1, нг/мл	0,082	0,304	0,766
FGF-21, нг/мл	0,186	0,821	0,429
VCAM-1, нг/мл	0,819	2,209	0,049

Согласно литературным данным, FGF21, наряду с IGF-1 и VCAM, рассматриваются сегодня в панели биомаркеров, отражающих «старческую хрупкость» организма и изучаются в рамках теории сенесцентности. Так, FGF21 рассматривают в качестве биомаркера здорового старения, поскольку отмечено его повышение у пожилых пациентов без ожирения и сахарного диабета, а на животных моделях продемонстрировано, что гиперпродукция FGF21 в данном случае не связана с нечувствительностью тканей к фактору роста. Уровень VCAM и ICAM повышается у

пациентов пожилого возраста вне зависимости от наличия или отсутствия факторов сердечно-сосудистого риска.

Перспективным маркером старения в крови считается уровень CD34+клеток, представляющих собой популяцию стволовых клеток гемопоэтического ряда. Истощение гемопоэтических стволовых клеток, а также снижение числа и функции эндотелиальных прогениторных клеток является независимым маркером раннего субклинического атеросклероза у здоровых людей и может дать дополнительную информацию о возраст-ассоциированных изменениях сосудистой стенки даже без учета влияния классических факторов риска и воспалительных маркеров.

Отсутствие прямых корреляций между СПВ, уровнем p16, длиной теломер и содержанием CD34+клеток в нашей работе можно объяснить наличием нескольких параллельных процессов инициации и поддержки старения в организме. Это предположение подтверждается распределением в факторном анализе.

Изучение связи жесткости сосудов с тканевыми и клеточными биомаркерами накопления сенесцентных клеток

Среди тканевых биомаркеров ожидаемо продемонстрировал положительную корреляционную связь с уровнем СПВ ключевой биомаркер накопления сенесцентных клеток в тканях – p16: $r=0,394$ ($p<0,05$). Средней силы корреляция выявлена с параметрами МСК-прирост 96ч и ФБ-прирост 96ч, а также слабая корреляция с IL-6, как элементом SASP.

При изучении результатов многофакторного регрессионного анализа продемонстрировано, что показатель жесткости артериальной стенки СПВ связан с уровнем экспрессии p16 в тканях независимо от паспортного возраста.

При оценке ряда биомаркеров накопления сенесцентных клеток в подгруппах СПВ выше и ниже медианы также выявлены статистически значимые различия. Паспортный возраст в подгруппах не различался (Таблица 5).

Таблица 5 – Изучаемые параметры в группах с показателем СПВ выше и ниже медианы, M±SD

	СПВ≥14 м/с (n=41)	СПВ<14 м/с(n=39)	p
Возраст, лет	70,170±6,340	73,420±5,250	0,154
SCORE2&SCORE-OP (балл)	26,400±3,310	27,100±2,840	0,124
Ткани (n=41)			
p16INK, кл/мм ²	5,046±1,909	3,815±1,865	0,049

Продолжение таблицы 5

Клетки (n=41)			
МСК-Лагфаза, ч	30,363±5,753	26,143±3,613	0,020
МСК-прирост 96ч	54,333±15,622	61,667±6,221	0,096
ФБ_Лаг-фаза, ч	27,714±6,126	21,534±4,130	0,045
ФБ-прирост 96ч	67,214±12,534	82,636±7,406	0,001
IL-6, нг/мл_МСК	45,693±36,192	28,289±18,316	0,070

МСК – мезенхимные стволовые/стромальные клетки, ФБ – фибробласты, IL-6 – интерлейкин-6

Белок p16 ингибирует цикл клеточного деления и тем самым участвует в переходе клетки в стареющую, являясь одним из самых достоверных биомаркеров сенесцентных клеток на сегодня. Уровень белка p16 может быть определен и в системном кровотоке путем оценки уровня экспрессии p16 (в виде белка или мРНК) в CD3+ фракции Т-лимфоцитов периферической крови, и этот показатель статистически значимо коррелирует как с возрастом пациентов, так и с рядом факторов риска возраст-ассоциированных заболеваний.

В нашей работе продемонстрирована независимая положительная связь уровня p16 в тканях у пациентов высокого и очень высокого сосудистого риска с СПВ, при этом статистически значимо различаются показатели уровня p16 в группах с низкой и высокой СПВ. По результатам факторного анализа показано, что плазменные показатели старения, p16 и СПВ можно рассматривать как параметры, отражающие биологический возраст организма, независимо от его паспортного возраста.

В рамках исследования мы выделяли в культуру МСК и ФБ из тканей пациентов и исследовали выраженность биомаркеров сенесцентных клеток в этих популяциях. В качестве маркеров использовали показатели продолжительность лаг-фазы, т.е. время до начала деления клеток, когда они закрепляются на субстрате и готовятся к делению, а также оценивали количество клеток через равные промежутки времени 48, 72 и 96ч. Согласно литературным данным, для стареющих клеток характерно увеличение продолжительности лаг-фазы в связи со снижением их репликативных и адаптивных свойств и снижение количества делений, что полностью согласуется с полученными данными. И для МСК, и для ФБ продемонстрировано значимое различие по этим параметрам у пациентов с СПВ больше и меньше 14м/с. При сравнении удлинение лаг-фазы и меньшее количество клеток через 96ч было характерно для пациентов с СПВ больше 14м/с (с более жесткими артериями), т.е. «возраст» клеток от пациентов с СПВ > 14м/с больше «возраста» клеток пациентов с менее жесткими артериями. Параметр

«ФБ-прирост через 96 часов» продемонстрировал независимую от возраста связь с СПВ при множественном регрессионном анализе.

Мы оценили содержание компонентов SASP в секрете выделенных клеток. Уровень IL-6 статистически значимо коррелирует с СПВ ($r=0,364$ $p=0,032$), однако, при оценке содержания других факторов SASP достоверных корреляций с СПВ не было получено. Не определено тенденций в характере изменений уровня компонентов SASP в зависимости от высокой или низкой СПВ, что может быть связано с недостаточным объемом выборки и вариабельностью показателей SASP.

Изучение связи между биомаркерами накопления сенесцентных клеток на тканевом и клеточном уровнях

Уровень экспрессии p16 является наиболее перспективным маркером накопления сенесцентных клеток. В исследовании уже продемонстрировано ранее, что он связан с показателем жесткости сосудистой стенки независимо от возраста, поэтому было важно установить связи других биомаркеров накопления сенесцентных клеток с этим ключевым тканевым маркером (Рисунки 1,2). Так, корреляционная связь продемонстрирована для него и для показателя клеточной пролиферации (Таблица 6).

Таблица 6 – Связь p16 с возрастом и показателем пролиферации клеток. Данные многофакторного регрессионного анализа

	B	S_{β}	t	p
Возраст	0,186	0,093	1,859	0,049
ФБ-прирост 96 ч	-0,091	0,045	-2,063	0,048
МСК-прирост 96ч	-0,064	0,036	1,790	0,089

Независимо от паспортного возраста с тканевым биомаркером старения – экспрессией белка p16 – значимую связь показали и компоненты SASP выделенных в культуру клеток: IL-6, MCP-1, на уровне тенденции – PAI-1 (Таблица 7).

Таблица 7 – Связь p16 с возрастом и показателями SASP. Данные многофакторного регрессионного анализа, скорректированный R^2 0,724

	B	S_{β}	t	p
Возраст	0,197	0,072	2,756	0,015
IL-6, нг/мл_ФБ	0,028	0,009	3,145	0,007
MCP-1, нг/мл_ФБ	-0,004	0,002	-2,302	0,049
PAI-1, нг/мл_ФБ	0,074	0,108	0,685	0,504

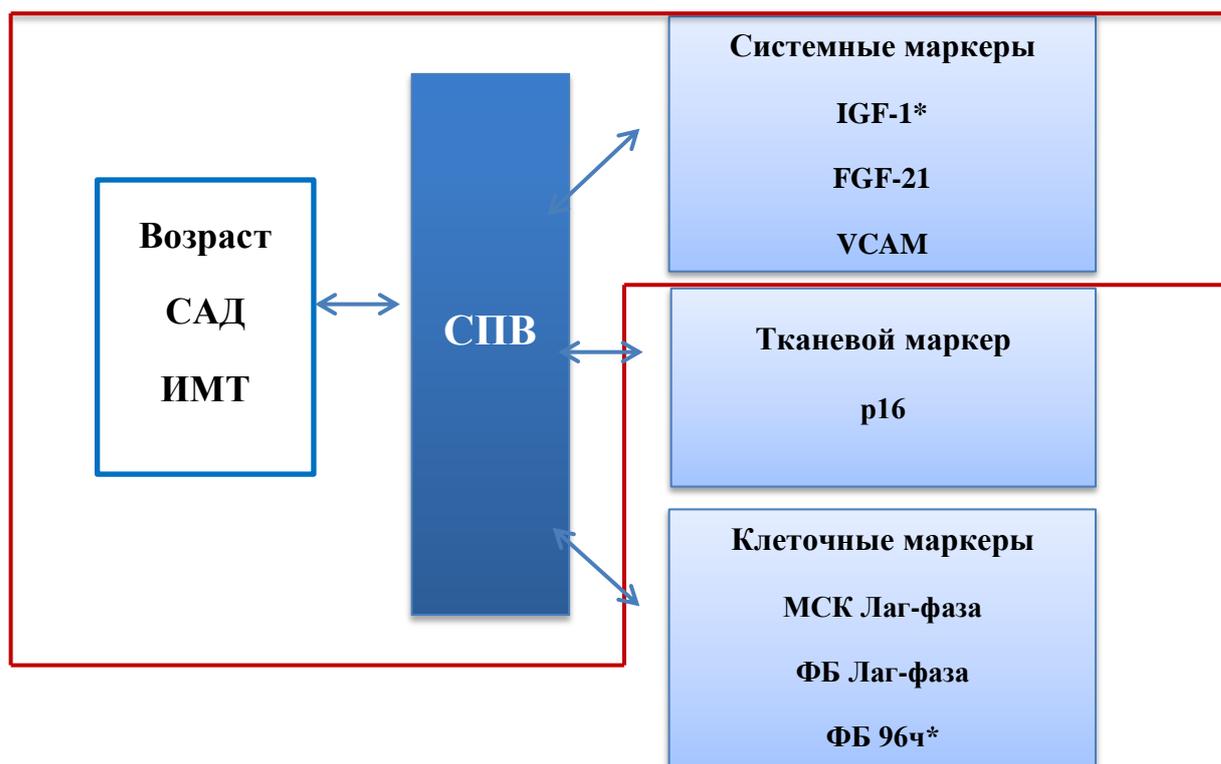


Рисунок 1 Корреляции между клиническим биомаркером сосудистого старения СПВ и биомаркерами накопления сенесцентных клеток на плазменном, тканевом и клеточном уровнях (* – отрицательная связь, в красной рамке показатели, определяемые малоинвазивно (забор крови) или неинвазивно)

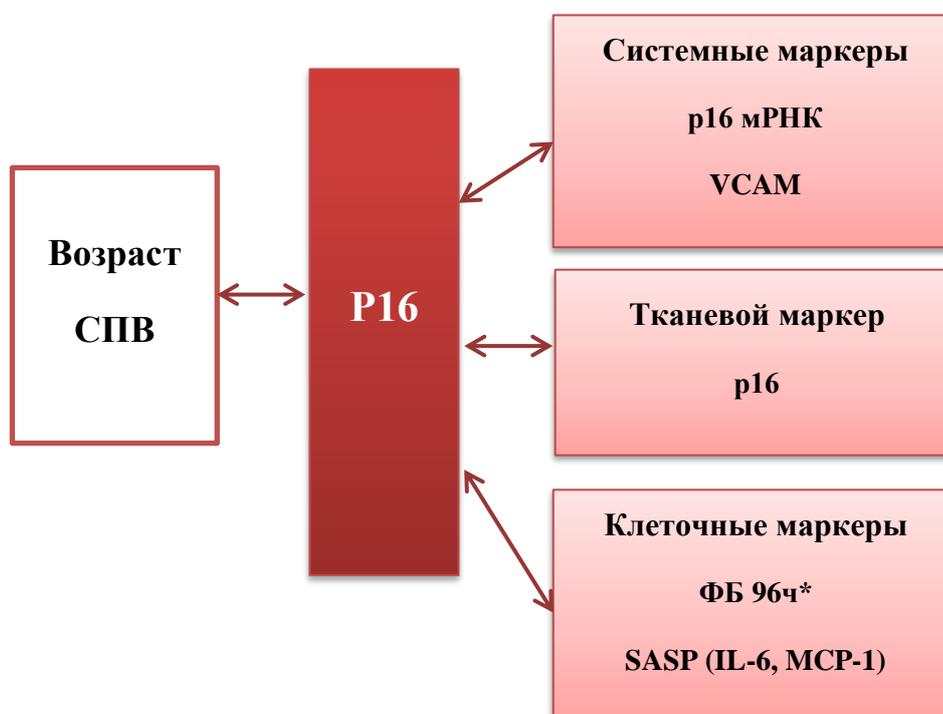


Рисунок 2 Корреляции между тканевым биомаркером сосудистого старения p16 и биомаркерами накопления сенесцентных клеток на клиническом, плазменном и клеточном уровнях (* – отрицательная связь).

При анализе связей между отдельными параметрами, потенциально отражающими накопление сенесцентных клеток в организме, ожидаемо получена значимая корреляция средней силы между уровнем p16 в тканях и содержанием мРНК p16 в крови ($r=0,380$, $p<0,05$), что подтверждает возможность использования этого показателя в качестве клинического биомаркера накопления сенесцентных клеток.

В качестве биомаркеров сенесценции на уровне клеточной популяции мы рассматривали показатели пролиферативного потенциала клеток, уровень бета-галактозидазы, а также в МСК и ФБ второго пассажа в экспоненциальной стадии роста проводили иммуноцитохимическое выявление ингибитора клеточного цикла p21 и гистона H2AX, фосфорилированного по S139 (гамма-H2AX), как признанных биомаркеров раннего клеточного старения и нарушений в системе репарации ДНК.

И для МСК ($r=-0,569$, $p<0,001$), и для ФБ ($r=-0,546$, $p=0,006$) площадь культурального пластика, заполненная за 96ч делящимися клетками, выраженно коррелировала с уровнем p16 в тканях, а для МСК было продемонстрировано статистически значимое увеличение времени от момента прикрепления клетки к субстрату до начала деления клетки ($r=0,433$, $p=0,008$).

Проллиферативный клеточный потенциал ожидаемо снижается у пожилых пациентов, и мы показали корреляцию этих параметров с уровнем тканевого биомаркера сенесцентных клеток. Данные линейной регрессии также подтвердили, что показатели клеточной пролиферации связаны с уровнем p16 независимо от возраста. Аналогичная связь показана для них и с уровнем CD34+ клеток в периферическом кровотоке.

Зафиксирована повышенная активность ассоциированной со старением β -галактозидазы в культуре сенесцентных клеток и определены корреляции между p16 и активностью β -галактозидазы в ФБ ($r=0,380$, $p=0,051$) и МСК ($r=0,280$, $p=0,098$) на уровне тенденции.

При изучении SASP в нашем исследовании были выявлены средней силы корреляции между уровнем экспрессии p16 в тканях и секрецией IL-6 МСК ($r=0,485$, $p=0,004$) и ФБ ($r=0,658$, $p=0,001$), что подтвердилось и при построении линейной регрессии.

С целью построения модели для определения такого параметра, как уровень экспрессии p16 в тканях, по уровню других биомаркеров клеточного старения мы использовали множественную регрессионную модель. При последовательном включении в модель параметров возраста, СПВ, уровня факторов роста (VCAM), показателей клеточной пролиферации и SASP (IL-6) статистически значимо ($p<0,005$) в модели отражали уровень p16 только показатели клеточной пролиферации по приросту

клеток и показатель секреции клетками IL-6 как ключевого компонента SASP (Таблица 8).

Таблица 8 – Связь экспрессии p16 с показателями клеточной пролиферации и уровнем SASP (IL-6). Данные многофакторного регрессионного анализа

	B	S _β	t	p
Прирост 96ч	-0,114	-0,809	-6,147	<0,001
IL-6, нг/мл_	0,021	0,438	-3,178	0,005

Данная модель позволяет вывести следующую формулу расчета уровня p16 (R² 0,753, скорректированный R² 0,727):

Уровень экспрессии p16 в тканях = -0.71*показатель клеточной пролиферации за 96ч + 0,021*уровень IL-6

При построении альтернативной модели мы добавили такой независимый параметр, как содержание CD34+клеток в периферической крови. С помощью компьютерного моделирования после нормирования признаков определена формула прогностического определения уровня экспрессии p16 в тканях (скорректированный R² 0,344):

Уровень экспрессии p16 в тканях = (Возраст пациента - 65)*(-0,14) + (CD34+% - 0,04)*(-2,27) + (2*VCAM в плазме крови - 22,95)*(-0,02) + (VCAM в плазме крови ^4 - 277415,52)*(2,15*10^(-7)) + 6,27

Таким образом, данная формула позволяет предсказывать уровень экспрессии p16 в тканях, опираясь только на неинвазивно определяемые показатели.

ВЫВОДЫ

1. В рамках формирования коллекции разработан методический алгоритм создания коллекции биологических образцов семи разных типов (периферическая кровь, образцы тканей, фиксированные в формалине и заключенные в парафиновые блоки, образцы нескольких типов клеток, выделенных из периферической крови, кожи и жировой ткани, образцы ДНК и РНК, кондиционированные среды для анализа секрета клеток), полученных от каждого пациента, связанной с электронным каталогом, объединяющим информацию, ассоциированную с образцами.

2. Жесткость магистральных артерий была ассоциирована с уровнем АД (r=0,334, p=0,048), индексом массы тела (r=0,421, p=0,005) и паспортным возрастом (r=0,556,

$p < 0,001$). Связи скорости пульсовой волны с длиной теломер мононуклеарных клеток, фибробластов, МСК у пациентов высокого и очень высокого сердечно-сосудистого риска выявлено не было.

3. При разделении исследуемой группы по уровню сосудистой жесткости подгруппы с показателями скорости пульсовой волны выше и ниже медианы (14м/с) были сопоставимы по паспортному возрасту ($p=0,154$) и значимо различались по уровню ряда плазменных биомаркеров накопления сенесцентных клеток: IGF-1 ($p=0,015$), FGF-21 ($p=0,027$), VCAM-1 ($p=0,006$).

4. Жесткость артериальных сосудов была связана с уровнем экспрессии p16 в тканях ($p=0,042$), показателями клеточной пролиферации по приросту клеток ($p=0,012$) и секрецией интерлейкина-6 ($p=0,032$). При введении поправки на паспортный возраст скорость пульсовой волны сохранила значимую связь только с уровнем экспрессии p16 ($p=0,048$).

5. Уровень экспрессии белка p16 в образцах кожи и подкожной жировой клетчатки независимо от паспортного возраста демонстрировал связь с показателями клеточной пролиферации ($p=0,048$) и секреции компонентов SASP выделенными в культуру стромальными клетками - интерлейкина-6 ($p=0,007$), белка хемоаттрактантом моноцитов 1 типа ($p=0,049$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Использование сформированной дорожной карты с разработанными алгоритмами действий для всех участников исследования, удобной и доступной системой аннотирования и хранения образцов может позволить создавать коллекции биологических образцов от одного пациента, полученных на различных уровнях, что открывает новые возможности для исследований в области персонифицированной медицины и изучения механизмов развития сердечно-сосудистых и других ассоциированных с возрастом заболеваний.

2. Комплексная оценка скорости пульсовой волны и плазменных биомаркеров сенесцентных клеток может быть использована для косвенного определения накопления сенесцентных клеток в тканях.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Сорокина А.Г. Создание коллекции биологических образцов разного типа, полученных от пожилых пациентов, для изучения взаимосвязей клинических, системных, тканевых и клеточных биомаркеров накопления сенесцентных клеток при старении / **Сорокина А.Г.**, Орлова Я.А., Григорьева О.А., Новоселецкая Е.С., Басалова Н.А., Александрюшкина Н.А., Виговский М.А., Кириллова К.И., Стражеско И.Д., Орлов

А.В., Балацкий А.В., Самоходская Л.М., Данилова Н.В., Дьячкова У.Д., Акопян А.А., Какоткин В.В., Асратян Д.А., Акопян Ж.А., Ефименко А.Ю. и др. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2021. – Т. 20. – № 8. – С.164-175.

2. Сорокина А.Г. Declined adipogenic potential of senescent MSCs due to shift in insulin signaling and altered exosome cargo / Voynova E., Kulebyakin K., Grigorieva O., Novoseletskaya E., Basalova N., Alexandrushkina N., Arbatskiy M., Vigovskiyy M., **Sorokina A.** // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2022. – V. 10.

3. Сорокина А.Г. Взаимосвязь жесткости магистральных сосудов и биомаркеров накопления сенесцентных клеток у пожилых пациентов / **Сорокина А.Г.**, Ефименко А.Ю., Григорьева О.А., Новоселецкая Е.С., Басалова Н.А., Александровская Н.А., Виговский М.А., Кириллова К.И., Стражеско И.Д., Орлов А.В., Балацкий А.В., Самоходская Л.М., Данилова Н.В., Дьячкова У.Д., Акопян А.А., Какоткин В.В., Асратян Д.А., Акопян Ж.А., Орлова Я.А. // *Кардиология*. – 2022. – Т. 62. – № 6. – С. 15-22.

4. Сорокина А.Г. Correlations between biomarkers of senescent cell accumulation at the systemic, tissue and cellular levels in elderly patients. / **Sorokina A.**, Orlova Y., Grigorieva O., Novoseletskaya E., Basalova N., Alexandrushkina N., Vigovskiyy M., Kirillova K., Balatsky A., Samokhodskaya L., Danilova N., Dyachkova U., Kakotkin V., Asratyan D., Akopyan Z., Efimenko A. // *Experimental Gerontology*. – 2023. – V. 177.

Список сокращений

ДАД – диастолическое артериальное давление	FGF21 – фактор роста фибробластов 21 (fibroblast growth factor 21)
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота,	MCP-1 – белок хемоаттрактант моноцитов 1 типа (monocyte chemoattractant protein-1)
ИБС – ишемическая болезнь сердца	ON – остеоонектин (osteonectin)
ИС – информационное согласие	PAI-1 – ингибитор активатора плазминогена 1 типа (plasminogen activator inhibitor-1)
МСК – мезенхимные стволовые/стромальные клетки	PEDF – фактор, полученный из пигментного эпителия (pigment epithelium-derived factor)
ОХС – общий холестерин	SASP – специфический секреторный фенотип, ассоциированный со старением (senescence-associated secretory phenotype)
РНК – рибонуклеиновая кислота	VCAM-1 – молекула адгезии сосудистых клеток (vascular cell adhesion molecule)
САД – систолическое артериальное давление	
СПВ – скорости распространения пульсовой волны	
ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания	
ФБ – фибробласты	
ICAM-1 – молекула клеточной адгезии (inter-cellular adhesion molecule 1)	
IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1 (insulin-like growth factor 1)	
IL-6 – интерлейкин-6 (interleukin-6)	

Сорокина Анна Григорьевна (Российская Федерация)
Связь жесткости артериальных сосудов с биомаркерами накопления
сенесцентных клеток у пациентов высокого и очень высокого сердечно-
сосудистого риска

В работе продемонстрирована ассоциация между бременем сенесцентных клеток как одним из источников хронического воспаления и показателем жесткости артериальной стенки, предиктором развития ССЗ. Получены новые данные о взаимосвязях между СПВ и системными показателями сосудистого старения, в частности факторами роста и VCAM-1. Выявлена связь СПВ с классическим тканевыми биомаркером накопления сенесцентных клеток (уровнем экспрессии белка p16) и с клеточными биомаркерами сенесцентных клеток (показателями клеточной пролиферации и компонентами SASP). Определены возможности малоинвазивного определения показателей накопления сенесцентных клеток у пациентов высокого и очень высокого сердечно-сосудистого риска.

Результаты диссертационной работы открывают новые возможности для контроля эффективности сенолитической терапии, когда на основании показателя жесткости сосудистой стенки и ряда системных показателей, определяемых в крови, становится возможным оценить уровень накопления сенесцентных клеток. Также успешно разработан методический алгоритм создания коллекции биологических образцов семи различных типов, полученных от каждого пациента. Полученный опыт и рекомендации возможно применять в мультидисциплинарных командах для создания и хранения других типов коллекций биологических образцов.

Sorokina Anna Grigorevna (Russian Federation)
Correlations between biomarkers of senescent cell accumulation at the systemic,
tissue and cellular levels in high and very high cardiovascular risk patients

The research demonstrates an association between the burden of senescent cells as one of the sources of chronic inflammation and an indicator of arterial wall stiffness, a predictor of CVD. New data have been obtained on the relationship between PWV and systemic indicators of vascular aging, in particular growth factors and VCAM-1. PWV was found to be associated with the tissue biomarker of senescent cell accumulation (p16 protein expression level) and with cellular biomarkers of senescent cells (indicators of cell proliferation and SASP components). The possibilities of minimally invasive determination of indicators of accumulation of senescent cells in patients with high and very high cardiovascular risk were determined.

The results of the research can give new possibilities for monitoring the effectiveness of senolytic therapy, when, based on the stiffness of the vascular wall and a number of systemic indicators determined in the blood, it becomes possible to assess the level of accumulation of senescent cells. A methodical algorithm for creating a collection of biological samples of seven different types obtained from each patient has also been successfully developed. The experience and recommendations gained can be applied in multidisciplinary teams to create and maintain other types of biological collections.