

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

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

диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители

доктор медицинских наук

Я.А. Орлова,

кандидат медицинских наук

А.Ю. Ефименко

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Жесткость сосудистой стенки как фактор риска развития сердечно-сосудистых заболеваний	12
1.1.1. Ключевые термины и эпидемиологические данные	13
1.1.2. Факторы, влияющие на жесткость сосудистой стенки	15
1.1.2.2. Концепция раннего сосудистого старения.....	19
1.1.2.3. Роль сенесцентных клеток в развитии и прогрессировании жесткости сосудистой стенки.....	21
1.1.3. Биомаркеры старения и особенности их рутинной детекции.....	24
1.1.3.1. Блокаторы клеточного цикла.....	25
1.1.3.2. Морфологические изменения в клетках.....	26
1.1.3.3. Устойчивость к апоптозу	26
1.1.3.4. Экспрессия генов.....	27
1.1.3.5. Ассоциированная со старением β -галактозидаза.....	29
1.1.3.6. Очаги гетерохроматина	30
1.1.3.7. Секреторный фенотип, ассоциированный со старением (SASP).....	31
1.1.3.8. Особенности детекции сенесцентных клеток	32
1.2. Снижение жесткости артерий как механизм улучшения прогноза сердечно-сосудистых заболеваний.....	34
1.2.1. Классические механизмы снижения жесткости сосудистой стенки	36
1.2.2. Нефармакологические вмешательства для снижения жесткости артерий ..	38
1.2.3. Фармакологические вмешательства для снижения жесткости артерий.....	39

1.3.	Экспериментальные исследования по снижению уровня сенесцентных клеток	44
1.3.1.	Достижения и перспективы применения сенолитической терапии	44
1.3.2.	Проблема отсутствия биомаркеров сенесцентных клеток, доступных для определения в клинической практике	50
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ		53
2.1.	Дизайн исследования	53
2.1.1.	Контингент и структура исследования	53
2.1.2.	Критерии включения и невключения.....	54
2.2.	Методы исследования.....	55
2.2.1.	Доклинические и клинические методы исследования	55
2.2.2.	Лабораторные методы исследования	56
2.2.3.	Инструментальные методы исследований.....	62
2.2.4.	Методы статистического анализа	63
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ		65
3.1.	Характеристика исследуемой группы.....	65
3.2.	Создание коллекции биологических образцов разного типа, полученных от пожилых пациентов, для определения показателей жесткости артериальных сосудов и биомаркеров накопления сенесцентных клеток на системном, тканевом и клеточном уровнях	69
3.3.	Оценка связи СПВ с традиционными факторами риска повышения артериальной жесткости и биомаркерами репликативного клеточного старения у пациентов высокого и очень высокого сердечно-сосудистого риска	73
3.5.	Изучение связи параметра жесткости сосудов (скорость пульсовой волны) с тканевыми и клеточными биомаркерами накопления сенесцентных клеток	79

3.6. Изучение связи между биомаркерами накопления сенесцентных клеток на тканевом и клеточном уровнях	84
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	91
ВЫВОДЫ.....	108
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	109
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	112

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной 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 [1]. Артериальная жесткость признана основным фактором патогенеза ССЗ, а скорость пульсовой волны (СПВ) широко используется в качестве неинвазивного маркера при оценке артериальной жесткости [2]. Неоднократно показано, что жесткость сосудистой стенки является независимым фактором риска смерти от сердечно-сосудистых событий [2; 3], ишемической болезни сердца и фатального инсульта [4], признана сильным фактором риска ССЗ у пациентов с почечной недостаточностью [5; 6].

В основе этих атеросклеротических изменений сосудистой стенки лежит хроническое воспаление, и при снижении интенсивности воспаления, риски сердечно-сосудистых событий снижаются [7]. 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) [8]. 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 крайне 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 накопления 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 пожилых пациентов 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 риска повышения артериальной жесткости 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 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 оценены 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 биомаркерами 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.

Практическая и теоретическая значимость

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, 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).

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 развития, роста и функционирования миокарда и сосудистой стенки, 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.

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 2022 гг.

Личное участие автора в получении научных результатов

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.

Публикации по теме диссертации

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

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 страниц текста, включая 7 рисунков и 23 таблицы. Список литературы включает 335 источников, в том числе 27 отечественных, 261 зарубежную публикацию.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Жесткость сосудистой стенки как фактор риска развития сердечно-сосудистых заболеваний

С возрастом и при развитии ряда заболеваний сосудистая стенка артерий становится более жесткой. Об этом явлении было известно еще до того, как появилась тонометрия, и были установлены какие-либо сердечно-сосудистые факторы риска. Только на основании наблюдений признавалась прогностическая роль жесткости сосудов в развитии сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). Неблагоприятный прогноз, связанный с повышением жесткости артерий, подтверждался аутопсией. Первое прямое измерение жесткости артерий с помощью СПВ провели в 1920-х годах – в своей публикации Брамвелл и Хилл в журнале *Lancet* подтвердили влияние возраста и ряда заболеваний на этот параметр [9]. Однако в первых работах измерялась каротидно-лучевая СПВ, отражающая в основном жесткость артерий плеча, а не крупных эластичных артерий. При этом основной эластичной артерией является аорта, и, поскольку жесткость аорты тесно связана со старением, увеличение ее жесткости считается признаком раннего сосудистого старения [10-12].

С физиологической точки зрения во время сердечных сокращений кровь выбрасывается в аорту во время систолы порциями, в то же время кровотока в органах должен быть непрерывным. Эластичные артерии усиливают эффект сердечного сокращения во время диастолы: они сохраняют потенциальную энергию при эластическом растяжении во время систолы и используют ее для усиления кровотока во время диастолы. Такое свойство артериальной стенки приводит к тому, что, во-первых, относительные изменения давления оказываются меньше при сердечных ударах (это приводит к снижению систолического (САД) и пульсового (ПД) артериального давления (АД) и повышению диастолического АД), таким образом, чрезмерная пульсация по ходу артериального дерева снижается к

микроциркуляторному руслу. Во-вторых, снижается постнагрузка левого желудочка (ЛЖ), что способствует снижению травматического воздействия на него.

1.1.1. Ключевые термины и эпидемиологические данные

Под термином «артерия» подразумевают сосуды с мышечной стенкой, гасящие пульсацию: от аорты (диаметром 3 см) до прекапиллярных артериол (50 микрометров). Артерии, расположенные ближе к сердцу (включая аорту, а также сонные и шейные артерии) считаются крупными или эластичными артериями (до 5 мм), с микроструктурой, богатой эластином, и играют основную роль в накоплении энергии во время систолы. Крупные артерии часто еще называют центральными артериями. Далее следуют средние, или мышечные, артерии (5–2 мм), которые богаче гладкомышечными клетками и коллагеном, но бедны эластином. Роль этих артерий заключается в грубой регуляции кровотока посредством вазоактивности. Мелкие артерии (2 мм–150 микрометров) вносят еще меньший вклад в податливость и больше в резистентность, тем самым способствуя местной регуляции кровотока; они также богаты гладкомышечными клетками. Артерии менее 150 микрометров в диаметре называются артериолами и в основном играют роль сопротивления, регулируя кровотоки в соответствии с локальными метаболическими потребностями.

Жесткость характеризует взаимосвязь между механической нагрузкой, приложенной к твердому материалу, и возникающей при этом деформацией. В одном случае жесткость материала представляет собой отношение между напряжением (силой на единицу площади поверхности) и деформацией (нормализованная деформация) и, таким образом, является внутренней характеристикой твердого тела, в данном случае ткани артериальной стенки. Поскольку артерии представляют собой сложные композитные материалы,

отдельные их составляющие вносят свой вклад в эту внутреннюю жесткость, а макроскопические свойства ткани являются результатом сложной суммы индивидуальных вкладов и взаимосвязей. Таким образом, артерия в целом может иметь разные механические свойства, несмотря на сходные свойства внутренней ткани. Например, толстостенные артерии структурно жестче, чем тонкостенные, даже если строение их одинаково. Из-за сложной макро- и микроструктуры артериальной стенки жесткость артерий изменяется нелинейно при повышении давления.

В крупных когортных исследованиях продемонстрированы устойчивые взаимосвязи между возрастом и различными компонентами кривой АД. Так, показано, что среднее АД значительно повышается в среднем возрасте и незначительно в пожилом возрасте. Напротив, ПД умеренно снижается у молодых людей, а затем значительно увеличивается с возрастом, особенно у женщин. Каротидно-феморальная СПВ умеренно увеличивается у молодых людей к среднему возрасту, и вчетверо увеличивается СПВ независимо от среднего АД в пожилом возрасте [13; 14]. Предполагается, что по мере достижения среднего возраста происходит ремоделирование аорты [13; 15-17], при этом у женщин этот процесс в дальнейшем завершается быстрее, чем у мужчин [18].

В среднем возрасте, по мере увеличения СПВ, изменяется продолжительность и форма отраженной волны [19], что приводит к большему перекрытию между прямой и отраженной волной. Этим объясняется появление позднего систолического пика на кривой давления у пациентов среднего возраста. Постепенно нарастает с возрастом показатель аугментации, когда СПВ еще не изменяется, а ПД снижается [20; 21].

После выявления корреляции между давлением растяжения сосудистой стенки и жесткостью, исследователи начали активно обсуждать вопрос влияния артериальной гипертензии (АГ) на ригидность сосудистой стенки. Повышенное среднее АД действительно ускоряет повреждение стенки аорты за счет травмирующего действия на эластические волокна, то

есть жесткость предлагалось рассматривать как следствие длительной АГ, и, соответственно, АГ считать одной из форм ускоренного старения. Однако последующие исследования выявили недостатки в этой парадигме. При изучении средних значений АД за годы до развития изолированной или систолической гипертензии, которая на сегодняшний день является самой частой формой гипертензии, преобладающим фактором, влияющим на жесткость, являлось как раз нормальное АД [22-24]. В продолжительных наблюдательных исследованиях изучали изменения жесткости аорты повышением АД и развитием АГ. Было показано, что изолированная систолическая АГ не являлась следствием расстройства диастолической функции, а возникала *de novo* [25-28]. В двух крупных исследованиях продемонстрировано, что прогрессирование жесткости аорты не было связано с исходным АД [25; 27]. Таким образом, АГ может усугублять, но не инициировать повышение жесткости сосудистой стенки, в то время как жесткость напрямую влияет на уровень АД.

Следует обратить внимание, что в пожилом возрасте растет риск ошибок при измерении АД, в то время как показатели СПВ могут быть более объективными.

1.1.2. Факторы, влияющие на жесткость сосудистой стенки

1.1.2.1. Классические факторы, влияющие на жесткость сосудистой стенки

Факторы риска и механизмы их влияния на ригидность аорты до сих пор изучены не до конца. Основным фактором, способствующим более высокой артериальной жесткости, является возраст. Вероятно, в большей степени это связано с повторяющимися циклами нагрузки на стенку, что приводит фактически к износу и потере эластичности материала. Тем не менее, существуют группы людей, у которых сохраняется низкая жесткость аорты и в пожилом возрасте, ПД и СПВ у этих пациентов не изменяются с

возрастом, что позволяет предполагать: жесткость – это просто результат механической усталости структурных элементов в стенке аорты [29, 30]. Остальные факторы вносят низкий вклад в развитие артериальной жесткости.

Китайские исследования показали, что жизнь в городской среде и высокое потребление натрия демонстрировали корреляции с более крутым наклоном зависимости СПВ от возраста [31].

Различные исследования у взрослых и детей выявили небольшую, но устойчивую связь ожирения с увеличением СПВ [32]. Анализ данных Национального исследования здоровья и питания выявил увеличение ПД у детей с ожирением [33]. В исследовании ALSPAC (Avon Longitudinal Study of Parents and Children) оценивались значения различных показателей ожирения у детей с течением времени и связанные тенденции ожирения с СПВ в возрасте 17 лет [34]. У детей со стойким или нарастающим ожирением была выявлена более высокая СПВ, особенно в случае отклонений в кардиометаболическом профиле (более высокое САД, триглицериды или уровень глюкозы или более низкий уровень липопротеинов высокой плотности (ЛПВП)). При этом при снижении индекса массы тела (ИМТ) СПВ становилась идентична траектории СПВ детей без ожирения. Это позволило предположить, что неблагоприятное влияние ожирения на жесткость аорты у детей обратимо [35].

Связь ожирения с показателями жесткости сосудистой стенки также ожидаема. Функциональные эластические волокна в аорте образуются только в раннем возрасте. В результате у каждого человека имеется фиксированный пул эластических волокон, которого должно хватить на всю жизнь. Ожирение способствует ремоделированию аорты до большего диаметра. Поскольку масса эластических волокон фиксирована, ремоделирование до увеличенного диаметра может уменьшить эффективную толщину эластических волокон, тем самым увеличивая связанное с ними напряжение и деформацию и ускоряя износ. Однако часть

повышенного напряжения передается более жесткому коллагену, что приводит к большей пассивной жесткости и увеличению СПВ и ПД.

Кальцификация и жесткость аорты коррелировали в поперечном исследовании [36], хотя осталось неясно, является кальцификация причиной или следствием аномальной жесткости аорты. Возрастные соотношения показывают, что значительная ригидность возникает к среднему возрасту, когда кальцификация все еще встречается редко, что позволяет предположить, что кальцификация может быть поздним последствием повреждения аорты, которое ускоряет ригидность, снова приводя к порочному кругу прогрессирующей ригидности и кальцификации [27].

Частота сердечных сокращений (ЧСС) играет двойную роль в прогрессировании артериальной жесткости. Повторяющееся растяжение вызывает усталость материала стенки и повышает его износ, в то же время ЧСС сама по себе увеличивает жесткость за счет вязкоупругого эффекта из-за состава стенки [37].

Влияние стандартных факторов риска ССЗ на изменения жесткости аорты достаточно скромны [38]. Во Фрамингемском исследовании САД снижалось в течение всего периода наблюдения, тогда как жесткость увеличилась. Исходный уровень и изменения ИМТ [39; 40], уровня липидов и глюкозы в крови [41; 42] влияли на уровень жесткости, и эти факторы риска сейчас являются потенциальными целями для вмешательства [43]. Действительно, увеличение массы тела после прекращения курения было связано с ростом СПВ, что подчеркивает важность снижения веса [44]. Более высокие уровни активности от умеренной до высокой связаны с более медленным прогрессированием нарастания СПВ независимо от других факторов риска [45].

Внешняя среда также может способствовать раннему старению сосудов [46]. Недавние исследования показали, что факторы, связанные с загрязнением воздуха [47] и социальной поддержкой (уход, обеспечение питания, водного баланса, психоэмоциональной стабильности) [48], также

могут оказывать важное влияние на функцию сосудов.

Изменения, объясняемые исходным уровнем или сдвигами факторов риска, являются умеренно-низкими.

Изменения жесткости артерий являются кумулятивными и сохраняются на протяжении всей жизни, и поэтому, если фактор риска интенсивно изменяется и широко распространен, его влияние на жесткость артерий может быть сильным (как в данном случае АД), но также есть вероятность замедлить процесс за счет вмешательств в эпидемиологию (например, контроль АД, профилактика и борьба с ожирением и воспалительными заболеваниями).

В дополнение к вышеупомянутым факторам окружающей среды существует умеренный вклад генетических факторов в повышение жесткости артерий. Расчетная наследуемость высокой СПВ составляет $\approx 40\%$, в то время как наследуемость высокого ПД составляет $\approx 35\%$ [49]. Наследуемость высоких показателей жесткости также высока [50]. Полиморфизм рецептора ангиотензина II типа 1 связан с ускоренным увеличением СПВ [51]. Дети родителей- гипертоников даже при отсутствии у них гипертонии имеют высокую жесткость аорты [52]. Крупнейший метаанализ полногеномных ассоциативных исследований продемонстрировал сильные ассоциации в некодирующем участке дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) на хромосоме 14, которая содержит модуляторы экспрессии BCL11B [53]. Этот локус также связан с более высоким риском сердечной недостаточности, болезни коронарных артерий, высокой СПВ. Белок BCL11B представляет собой multifunctional фактор транскрипции, который регулирует функцию Т-клеток [54], развития нейронов и кардиомиоцитов во время эмбриогенеза [55; 56]. Уровень экспрессии BCL11B коррелирует с жесткостью сонных артерий у женщин, однако, роль BCL11B в сердечно-сосудистой системе взрослых малоизучена.

1.1.2.2. Концепция раннего сосудистого старения

В свете существования множества возможных факторов, каждый из которых вносит скромный, но важный вклад в повышение жесткости артерий, недавние исследования были сосредоточены на комплексных показателях общего состояния сосудов. Данные Фрамингемского исследования сердца показали, что здоровое старение сосудов возможно, но редко встречается и сопровождается минимальным количеством факторов риска [57; 58].

В последних работах все больше внимания уделяется концепции сосудистого возраста, выраженного в годах, согласно которой у некоторых людей имеются выраженные аномалии сосудистой структуры и функции *early vascular aging* - EVA, в то время как другие имеют нормальную или даже сверхнормальную сосудистую структуру и функцию, несмотря на сопоставимый хронологический возраст и воздействие факторов риска (SUPERNOVA).

На основании Фрамингемского исследования сосудистый возраст выражается как возраст человека с таким общим сердечно-сосудистым риском, у которого все факторы риска находятся в пределах нормы [59].

Nilsson et al. [60] предложили концепцию EVA, основанную на рассмотрении средних возрастных изменений СПВ. Сосудистый возраст в этой парадигме также выражается как возраст, в котором измеренное значение СПВ у пациента представляло собой среднее или медианное значение, основанное на возрастных отношениях в контрольной выборке. При последующем уточнении выявлено, что всегда сосудистый возраст был значительно ниже хронологического возраста [61]. Таким образом, EVA представляет случаи с соотношением СПВ выше среднего отношения СПВ к возрасту, а сверхнормальное сосудистое старение (SUPERNOVA) представляет людей, которые находятся ниже среднего соотношения возраста.

Гибридный сосудистый возраст, который учитывает бремя факторов

риска и СПВ, был протестирован в многочисленных исследованиях, где вычислялось несоответствие в сосудистом возрасте и развитии сердечно-сосудистых событий путем регрессионного анализа. Использование этой модели позволило выделить раннее сосудистое старение, нормальный сосудистый возраст и «стойко молодые сосуды» или супернормальное сосудистое старение. Модель здорового сосудистого старения, основанная только на СПВ, без учета факторов риска, при этом не продемонстрировала преимуществ по сравнению с моделью, скорректированной с учетом факторов риска.

Таким образом, большая часть теорий, изучающих влияние факторов риска на СПВ, показывает, что возраст является наиболее значимым фактором риска развития жесткости сосудистой стенки. Во многом это объясняется структурными изменениями за счет надрывов эластина и повышенного отложения коллагена или образования поперечных связей, но часть теорий объясняет клеточные процессы старения на молекулярном уровне. В последнее время все большее признание получает клеточная теория старения, охватывающая проблемы обновления и восстановления тканей после повреждения, особенности среды и элемент случайности [62; 63]. Такая теория подчеркивает необходимость систематического и комплексного анализа процесса старения с учетом изменений, происходящих в том числе на тканевом, клеточном и молекулярном уровнях.

Многие факторы риска в принципе пока не рассматривались в качестве точек приложения для влияния на жесткость артерий, и они должны стать предметом интенсивного исследования в свете бремени болезни, потенциально связанной с жесткостью аорты в стареющем обществе.

1.1.2.3. Роль сенесцентных клеток в развитии и прогрессировании жесткости сосудистой стенки

Изучение клеточного старения в настоящее время является одним из наиболее быстро развивающихся направлений биомедицины. Благодаря открытиям в этой сфере появляются большие перспективы для эффективного лечения возраст-ассоциированных заболеваний и увеличения продолжительности жизни человека. Однако, поскольку эта область еще достаточно молодая, существует много путаницы в отношении патофизиологических характеристик клеточного старения и его места в старении организма в целом.

Термин «сенесцентность» (лат. «senex» – старение) в контексте культур клеток млекопитающих связан с открытием Хейфлика и Мурхеда в 1961 г. [64]. В своей статье авторы описали, что клетки имеют конечную продолжительность жизни при культивировании *in vitro*, в отличие от онкологических клеток, которые делятся без ограничений.

В настоящее время термин «клеточное старение» обычно используется для обозначения необратимой остановки клеточного цикла, связанной, среди прочего, с изменениями клеточной морфологии, секреторного профиля и эпигенетическими изменениями [65; 66]. В контексте длительно культивируемых клеточных культур, где клетки постоянно стимулируются к пролиферации (репликации), максимальное количество удвоений популяции, которого может достичь культура клеток, называется «пределом Хейфлика», необратимая остановка клеточного цикла называется «репликативной сенесцентностью», а весь процесс — «репликативным старением» [67]. В отличие от первоначальных результатов [66], более поздние исследования показывают, что клеточное старение связано с повышением устойчивости ряда клеток к запуску клеточной гибели, прежде всего, к апоптозу, а не только связано с ограниченными возможностями в количестве делений [68].

Сегодня, когда говорят о сенесцентности, подразумевают обязательную постоянную остановку клеточного цикла. Другими словами, даже если в клетке произошли существенные изменения, она не считается стареющей до тех пор, пока не будет достигнута постоянная остановка клеточного цикла. Обязательность такого условия обусловлена тем, что многие признаки клеточного старения появляются только при полной остановке клеточного цикла [69]. Однако, поскольку изменения в клетках происходят постепенно и непрерывно задолго до остановки клеточного цикла, используется еще один термин, чтобы охватить как эти ранние изменения, так и то, что происходит после начала постоянной остановки клеточного цикла. Таким образом, в литературе термин «клеточное старение» описывает постепенное снижение клеточных функций и увеличение вероятности гибели клеток; термин «репликативное старение» относится к делящимся клеткам до индукции старения, а «клеточная сенесцентность» представляет собой клеточную программу, инициированную остановкой клеточного цикла, которая усиливает хроническое воспаление и предотвращает пролиферацию клеток [70].

Сенесцентные клетки – это клетки, которые под воздействием повреждающих стимулов (например, нарушений в структуре ДНК, укорочения и/или дисфункции теломер, онкогенного стресса) необратимо остановились в росте и больше не делятся, но и не уходят в апоптоз. Это морфологически измененные клетки с изменениями экспрессии генов и структуры хроматина, экспрессией ассоциированной со старением β -галактозидазы и приобретенным ассоциированным со старением секреторным фенотипом SASP (senescence-associated secretory phenotype). SASP определяет способность стареющих клеток экспрессировать и секретировать различные внеклеточные модуляторы. Роль SASP зависит от контекста. С одной стороны, SASP ускоряет вход в остановку клеточного цикла окружающих клеток, стимулирует иммуноопосредованный клиренс потенциально онкогенных клеток,

ограничивает избыточное фиброзирование и способствует заживлению ран и регенерации тканей. С другой стороны, при длительной персистенции сенесцентных клеток в тканях SASP может опосредовать хроническое воспаление и стимулировать рост и выживание опухолевых клеток. Регуляция SASP происходит на нескольких уровнях, включая ремоделирование хроматина, активацию специфических факторов транскрипции, таких как C/EBP и NF- κ B, контроль трансляции мРНК и внутриклеточное движение. На сегодня идентифицировано несколько модуляторов SASP, что закладывает основу для будущих исследований их клинического применения [71]. Как правило, SASP подразумевает секрецию клетками провоспалительных интерлейкинов (interleukin (IL-1 α , IL-1 β и IL-6)), хемокинов (IL-8), факторов роста (фактор роста фибробластов 2 и фактор роста гепатоцитов), металлопротеиназ (интерстициальная коллагеназа, также известная как MMP1, стромелизин 1 или MMP3, и коллагеназа 3 или MMP13) и других нерастворимых белков и компонентов внеклеточного матрикса [72]. Эти секреторные молекулы в основном действуют паракринно и могут способствовать развитию клеточного старения в соседних клетках, но некоторые из растворимых медиаторов высвобождаются в кровоток и, вероятно, способствуют общему хроническому воспалению [73].

На молекулярном уровне провоспалительные цитокины и хемокины SASP накапливаются в артериальной стенке; на клеточном уровне сосудистые клетки фенотипически смещаются к гетерогенным фенотипам: часть эндотелиальных клеток становятся стареющими, другая часть активно пролиферирует с инвазией/миграцией в соседний слой сосудистой стенки, становятся секреторно активным; во внеклеточном матриксе активируется фиброз, эластолиз, кальцификация, отложение амилоида и гликооксидация. Наконец, на тканевом уровне факторы SASP способствуют увеличению интимально-медиального утолщения артерий, дисфункции эндотелия, и, как результат, повышению жесткости артерий и

повышению АД. Эти изменения на уровне тканей иногда называют «провоспалительным синдромом жесткости артерий», и рассматривают как клиническое изменение, которое не обязательно, но может приводить к ССЗ. Ингибирование возрастного провоспалительного процесса может быть новым подходом к поддержанию здоровой сосудистой системы и сдерживанию эпидемии ССЗ у стареющего населения [74].

Известно, что количество сенесцентных клеток растет экспоненциально с возрастом. Продемонстрировано накопление биомаркеров сенесцентных клеток в коже, инсулинпродуцирующих β -клетках поджелудочной железы, почках, висцеральном жире, суставном хряще, печени, а также в эндотелии и миокарде [75-81].

Поскольку хроническое воспаление является как фактором риска, так и патогенетическим механизмом для развития ССЗ, количество сенесцентных клеток и активность SASP могут вносить существенный вклад в развитие и прогрессирование ССЗ. Более того, воспаление является патогенетическим звеном других хронических заболеваний, не связанных с сердечно-сосудистыми болезнями: анемией, онкозаболеваниями, сахарным диабетом 2 типа, деменцией, остеопорозом, саркопенией, хронической болезнью почек и депрессией, и тогда ССЗ в пожилом возрасте часто развиваются в контексте полиморбидности на фоне уже имеющейся дисфункции организма [82].

1.1.3. Биомаркеры старения и особенности их рутинной детекции

Как было описано выше, сенесцентность клеток — это состояние, вызванное стрессовыми воздействиями и определенными физиологическими процессами, характеризующееся длительной и необратимой остановкой клеточного цикла с секреторными особенностями, макромолекулярными повреждениями и измененным метаболизмом. Безусловно, эти явления влияют и усугубляют друг друга, но для ясности

выделения биомаркеров сенесцентных клеток все процессы описываются отдельно.

1.1.3.1. Блокаторы клеточного цикла

Обязательным условием сенесцентности является полная остановка клеточного цикла. Стареющие клетки останавливаются в фазе G1/S клеточного цикла, но при этом остаются метаболически активными. Эта остановка обусловлена активацией защитной системы от онкопроцессов в организме: p53/p21CIP1 и p16/Rb [83-86]. В отличие от временной остановки клеточного цикла, сенесцентную клетку невозможно вновь стимулировать к росту или делению какими-либо физиологическими стимулами, даже если создать максимально благоприятные условия роста [87; 88]. От полностью дифференцированных клеток сенесцентные клетки отличает то, что терминальная дифференцировка является результатом определенной программы развития, которая превращает недифференцированные предшественники в специализированные эффекторные клетки, а сенесцентными клетки в основном становятся в результате клеточной реакции на стресс [89-91].

В качестве основных блокаторов клеточного цикла рассматривают p53 и p16. После активации p53 регулирует сложную антипролиферативную программу транскрипции [93; 94]. Когда остановка цикла запускается кратковременным стрессом, индукция p53 может вызывать состояние покоя или гибернации, активируется процесс репарации ДНК [94; 95]. При этом клетки возобновляют цикл, когда стресс разрешается. А p16 активируется под воздействием постоянного стресса и приводит к длительной остановке клеточного цикла [96- 98].

Есть данные предполагать, что p21 индуцирует начало процесса старения клетки, тогда как p16 поддерживает блокировку цикла. На основании этого был сделан вывод о наличии различных регулируемых фаз

старения. Однако индукция p21, которая важна для инициации старения, не обязательно имеет постоянную экспрессию в стареющих клетках [99; 100]. В соответствии с этим, активация p21 (но не p53 или p16) является движущей силой онтогенетического старения: кратковременного «запрограммированного» типа клеточного старения, которое происходит во время эмбрионального развития млекопитающих [101]. Хотя p21 может быть ценным биомаркером старения, он также индуцируется во время временной остановки клеточного цикла или в ответ на повреждение ДНК, поэтому его следует использовать в качестве биомаркера старения только в сочетании с другими маркерами [102-106].

Чтобы обнаружить остановку клеточного цикла как биомаркер старения, можно использовать анализ скорости пролиферации клеток. Анализ пролиферации клеток представляет собой быстрый, простой и высокочувствительный метод оценки скорости деления клеток [107-110].

1.1.3.2. Морфологические изменения в клетках

Сенесцентные клетки значимо увеличены в размерах, ядра деформированы, цитоплазма избыточно вакуолизирована, а структура стенок аппарата Гольджи кажется неоднородной. На субстрате сенесцентные клетки кажутся уплощенными, беспорядочно разбросаны и произвольно ориентированы в чашке для культивирования [111-114]. Изменения в клеточной морфологии стареющих клеток связаны с накоплением различных белков в результате уменьшения его деградации протеосомно-опосредованными путями [115-118].

1.1.3.3. Устойчивость к апоптозу

Сенесцентные клетки чрезвычайно устойчивы к сигналу запуска гибели путем апоптоза. Эта особенность объясняет их стабильность в

культуре, а также накопление сенесцентных клеток в различных тканях с возрастом [119; 120]. Так, в исследованиях Monti оценивали склонность к апоптозу свежих мононуклеарных клеток периферической крови человека (РВМС) в различных возрастных группах, включая молодых людей (19–40 лет), пожилых людей (65–85 лет) и долгожителей. Выявлена обратная корреляция между возрастом доноров и предрасположенностью РВМС к апоптозу. В частности, РВМС из группы пожилого возраста показали большую устойчивость к апоптозу, чем из молодой группы. Таким образом, авторы доказывают, что сенесцентность характеризуется снижением склонности к апоптозу [121].

1.1.3.4. Экспрессия генов

С возрастом изменяется экспрессия генов, в том числе генов-регуляторов клеточного цикла. Ингибиторы клеточного цикла и ингибиторы циклинзависимой киназы (CDKI), включая p21 (CDKN1a) и p16, гиперэкспрессируются, а те гены, которые кодируют белки, стимулирующие клеточный цикл, репрессируются [122; 123]. В молодых клетках отсутствуют ингибиторы циклинзависимых киназ, поэтому экспрессия этих генов является распространенным биомаркером для выявления стареющих клеток [124; 125]. Белок ретинобластомы также сверхэкспрессируется во время старения и регулирует экспрессию остеонектина (ON (osteonectin)), фибронектина [126].

Сегодня p16 используют в качестве основного биомаркера клеточного старения. Показано, что более молодой биологический возраст связан с более низким уровнем p16-позитивных клеток в коже человека [127]. На модели преждевременного старения фибробластов кожи человека (HSF), вызванного УФ-излучением, также продемонстрировано увеличение

экспрессии белков p53, p21 и p16 (INK-4a). ПЦР в реальном времени для исследования экспрессии мРНК генов, связанных с p53, участвующих в остановке роста, апоптозе и онкогенезе, показал, что p53, p21, p19, Hdm2 и Вах активировались, а bcl, HIF-1alpha и VEGF подавлялись [128].

Также показано, что эктопическая экспрессия p16(INK4a) и другого ингибитора циклинзависимой киназы, p21(CIP1/WAF1), индуцирует старение без воздействия SASP, хотя появляются при этом другие признаки старения, включая стабильную остановку клеточного цикла. Фибробласты человека, в которых старение было запущено действием ионизирующего излучения, вырабатывали SASP независимо от того, экспрессировался ли p16(INK4a) или нет. Клетки, индуцированные к старению эктопической экспрессией p16(INK4a), не обладали паракринной активностью в отношении эпителиальных клеток, что согласуется с отсутствием функционального SASP. Тем не менее, экспрессия p16(INK4a) клетками, подвергающимися репликативному старению, ограничивает накопление повреждений ДНК и преждевременную секрецию цитокинов, что указывает на косвенную роль p16(INK4a) в подавлении SASP. Эти данные свидетельствуют о том, что p16(INK4a)-позитивные клетки не всегда могут содержать SASP *in vivo* и, кроме того, что SASP не является следствием активации или старения p16(INK4a) как такового, а скорее представляет собой ответ на повреждение, который является отделимым от остановки роста [129].

Для выявления корреляций экспрессии p16 в коже человека с возрастом донора, экспрессию p16 анализировали с помощью иммуногистохимии, также оценивали экспрессию репрессора p16 BMI1. В эксперимент включили образцы возрастных групп 0–20, 21–70 и 71–95 лет. Было установлено, что количество p16-позитивных клеток было значительно выше у лиц пожилого возраста по сравнению с более

молодыми возрастными группами. Количество p16-позитивных клеток увеличивается как в эпидермисе, так и в дерме – компартментах со строго различной пролиферативной активностью. Экспрессия гена VM11 снижалась с увеличением возраста донора. Авторы сделали вывод, что экспрессия p16 прямо коррелирует с хронологическим старением кожи человека *in vivo* и, следовательно, p16 может использоваться в качестве биомаркера старения человека *in vivo* [130].

1.1.3.5. Ассоциированная со старением β -галактозидаза

В 1995 г. Dimri и соавт. [131] обнаружили, что в дополнение к лизосомальной β -галактозидазе, обнаруживаемой при pH 4, стареющие клетки экспрессируют β -галактозидазу, обнаруживаемую при pH 6, называемую ассоциированной со старением β -галактозидазой (SA- β gal). С тех пор она стала наиболее широко используемым биомаркером для идентификации стареющих клеток *in vitro* и *in vivo* [132; 133]. Такое поведение фермента β -галактозидазы обусловлено увеличением количества и размера лизосом в стареющих клетках [134-136]. Активность SA- β gal тесно связана с сенесцентными клетками, поскольку она не обнаруживается в покоящихся или дифференцированных клетках [137; 138].

Увеличение размера и объема лизосом в сенесцентных клетках в основном связано с наличием липофусцина, который является клеточным биомаркером старения [139; 140]. Липофусцин представляет собой флуоресцентный пигмент, который с возрастом накапливается в лизосомах постмитотических клеток в нейронах, сердце и скелетных мышцах и ряде других тканей [141-143]. Учитывая, что липофусцины являются недеградируемыми веществами, они не распадаются и не экзоцитируются из клеток, а сохраняются в лизосомах [144; 145]. В пролиферирующих

клетках количество липофусцина разбавляется клеточным делением, однако в постмитотических клетках это невозможно. В отсутствие клеточных механизмов для эффективного устранения или удаления липофусцина из постмитотических клеток его содержание будет увеличиваться с течением времени как производного побочного продукта для поддержания клеточного гомеостаза. Увеличение лизосом происходит из-за расширения их просвета для размещения увеличивающихся количеств липофусцина, которые были перемещены из цитозоля аутофагосомами [146-149].

1.1.3.6. Очаги гетерохроматина

Старение запускает генерацию и накопление различных гетерохроматиновых структур, известных как ассоциированные со старением гетерохроматиновые фокусы (SAHF). Эти очаги видны под микроскопом и характеризуются конденсированными областями ДНК/хроматина [150-152]. Эта характеристика стареющих клеток была открыта Narita с соавторами в 2003 г., которые заметили, что ДНК стареющих клеток содержит точечные домены гетерохроматина, которые можно легко дифференцировать от хроматина нестареющих клеток [153]. SAHF можно обнаружить с помощью красителей ДНК, таких как 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI); наличием гистоновых меток, связанных с гетерохроматином, включая ди- и триметилирование Lys9 на гистоне H3 (H3K9Me2 и H3K9Me3); и белками, реорганизующими хроматин, включая гетерохроматиновый белок 1 HP-1 (HP1), HIRA (гистоновый репрессор A) и ASF1a (функция антимолчания-1a) для хроматина. В нестареющих клетках ДНК-красители демонстрируют однородные паттерны окрашивания, тогда как в стареющих клетках они демонстрируют точечные паттерны окрашивания [154- 157].

1.1.3.7. Секреторный фенотип, ассоциированный со старением (SASP)

Несмотря на остановку роста, сенесцентные клетки метаболически активны и могут влиять на свое микроокружение [158]. Секретом сенесцентных клеток видоизменен: активируется экспрессия различных белков, таких как цитокины, интерлейкины, хемокины, протеазы, факторов роста, ферментов деградации, таких как металлопротеазы матрикса (ММП) [159]. Этот фенотип позволяет сенесцентным клеткам взаимодействовать с соседними клетками, что называется SASP, или секретомом, передающим сообщения о старении (SMS) [160-162]. Основная функция SASP заключается в передаче сигналов о необходимости уничтожения стареющих клеток. Считается, что SASP развился как способ общения сенесцентных клеток с иммунной системой (потенциально для облегчения их собственной очистки), а также как способ межклеточной коммуникации, способствующий регенерации тканей посредством стимуляции близлежащих клеток-предшественников [163; 164]. При этом факторы SASP играют положительную роль во время эмбриогенеза, при заживлении ран, участвуя в амплификации и распространении стареющих клеток, во время подавления онкогенеза, способствуя элиминации стареющих клеток [165-167].

Исследовали SASP в клетках фибробластов человека и идентифицировали такие составляющие как лиганды семейства TGF- β , CCL2, VEGF и CCL20. Показано, что SASP может вызывать паракринное старение в окружающих тканях [168]. На животных было продемонстрировано, что хроническое слабовыраженное воспаление приводит к преждевременному старению у мышей. Более того, было показано, что хроническое воспаление усугубляет дисфункцию теломер и

клеточное старение, и приводит к снижению регенеративного потенциала многих тканей и ускоряет старение мышц [169].

1.1.3.8. Особенности детекции сенесцентных клеток

К наиболее перспективным биомаркерам сенесцентных клеток относят высокую экспрессию регулятора клеточного цикла, p16/INK4a, p21CIP1 и продукцию клетками факторов SASP (например, IL-6, IL-8, белок-1 хемоаттрактанта моноцитов, активированный плазминогеном ингибитор-1, и многие другие), повышенную активность β -галактозидазы, ассоциированной с клеточным старением, укорочение длины теломер, появление связанных со старением растяжений сателлитов (SADS) и связанных с теломерами очагов повреждения (TAF) и ряд других показателей, отраженных в Таблице 1.

Таблица 1 – Биомаркеры сенесцентных клеток [170]

Морфологические признаки	Увеличение размера, избыточная вакуолизированность
Блокаторы клеточного цикла	p16/INK4a; p21CIP1
Биомаркеры, обусловленные митохондриальной дисфункцией	Увеличение количества/размеров; Увеличение образования активных форм кислорода; Снижение проницаемости мембраны
Биомаркеры, обусловленные лизосомальной дисфункцией	Увеличение количества/размеров; Повышение активности β -галактозидазы; Накопление липофусцина

Продолжение Таблицы 1

Биомаркеры, обусловленные изменениями в ядре	Укорочение длины теломер Признаки повреждения ДНК (фосфорилированный H2AX) Возраст-ассоциированные очаги гемоматина Снижение репликативного потенциала ДНК
Другие показатели	SASP; Активация цитозольной ДНК/cGAS-STING

Однако определять их необходимо в первую очередь непосредственно в ткани с использованием инвазивных техник. Кроме того, ни один из этих биомаркеров не является полностью высокочувствительным или специфичным, поэтому необходимо использование их комбинации для того, чтобы сделать выводы о влиянии каких-либо состояний или вмешательств на количество сенесцентных клеток [171].

Важной задачей является разработка биомаркеров сенесцентных клеток для диагностики, прогноза и потенциального мониторинга терапии из легкодоступных тканей (таких как периферическая кровь), которые могут отражать специфические системные изменения.

Согласно данным ряда исследователей, p16/INK4a может быть определен 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 некоторыми распространенными факторами риска ССЗ, такими как курение, например [172].

Среди других распространенных биомаркеров клеточного старения используются активность фермента бета-галактозидазы как в клетках, так и в плазме крови [173], длина теломерных участков хромосом и активность теломеразы [174], факторы роста [175; 176], а также оценка содержания в среде культивирования ряда секретируемых клетками факторов, включая IL-6, белок хемоаттрактант моноцитов 1 типа (MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)), ингибитор активатора плазминогена 1 типа - PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), остеоонектин – ON, фактор, полученный из пигментного эпителия – PEDF (pigment epithelium-derived factor) и др. [177-179], но насколько достоверно каждый из этих показателей (или все вместе) могут отражать количество и/или активность сенесцентных клеток в тканях и в организме в целом остается неясным.

1.2. Снижение жесткости артерий как механизм улучшения прогноза сердечно-сосудистых заболеваний

Влияние артериальной жесткости на прогноз по ССЗ было неоднократно продемонстрировано сразу при нескольких состояниях. Так, установлено, что у пациентов с повышенными показателями жесткости сосудов число нежелательных сердечно-сосудистых событий выше, а инфаркт миокарда протекает тяжелее.

Показаны корреляции между жесткостью артерий и прогрессированием хронической болезни почек (ХБП) у пациентов с ССЗ и смертностью [180]. Существуют разногласия относительно того, вызывает ли артериальная жесткость ухудшение функции почек, почечная дисфункция приводит к повышению жесткости сосудистой стенки, или связь является реципрокной. Но в нескольких исследованиях, в которые включали пациентов из группы высокого риска, было показано, что такие биомаркеры жесткости сосудов, как ПД, центральное и периферическое давление, напрямую коррелируют с развитием ХБП [180]. Продемонстрирована связь между низкими показателями жесткости сосудистой стенки и

прогрессированием ХБП и общей смертностью.

Изучение взаимосвязи между жесткостью артерий и уровнем глюкозы в крови натощак показало, что СПВ статистически значимо коррелировала с риском развития диабета, при этом первично было повышение жесткости сосудистой стенки, а затем регистрировалось повышение тощачковой глюкозы [181].

При этом доказано, что попытки замедления прогрессирования жесткости сосудистой стенки значимо влияют на прогноз у пациентов с ССЗ.

В исследовании SPRINT было показано, что у пациентов с высоким риском развития осложнений ССЗ, но без СД, снижение САД до целевого уровня менее 120 мм рт.ст. по сравнению с целевым уровнем менее 140 мм рт.ст. приводило к снижению частоты развития смертельных и несмертельных тяжелых осложнений ССЗ, несмотря на статистически значимое увеличение частоты развития определенных нежелательных явлений. Влияние на АГ, как фактор риска, повышающий жесткость сосудистой стенки, оказывает влияние на смертность и развитием осложнений ССЗ [182].

Увеличение индекса аугментации и СПВ связано с более высокими показателями внутрибольничной летальности у пациентов с острым ишемическим инсультом. Клиническое улучшение у пациентов с ишемическим инсультом коррелировало со снижением СПВ [183].

Возможность снижения ЦАД и параметров жесткости артерий у пациентов с сахарным диабетом за счет использования дапаглифлозина, достоверно снижала частоту сердечной недостаточностью и смертность у данной группы пациентов [184].

1.2.1. Классические механизмы снижения жесткости сосудистой стенки

Учитывая патофизиологическое значение жесткости сосудистой стенки и ее связь с поражением органов-мишеней, клиническими проявлениями и смертностью, существует повышенный интерес к вопросу о том, можно ли ее предотвратить или обратить вспять.

Основополагающие исследования, проведенные Avolio et al., продемонстрировали ускоренное возраст-зависимое повышение жесткости аорты у городских жителей с более высоким уровнем потребления соли и уровнем АД по сравнению с сельскими жителями [185]. В другом исследовании при этом продемонстрировано, что повышение жесткости аорты можно замедлить за счет более здорового образа жизни и использования антигипертензивной терапии [186].

Большинство продольных исследований демонстрируют зависимость жесткости артерий от ЧСС [187]. Предполагается, что это связано с комбинированным влиянием механическим напряжением ЧСС и АД на податливость артериальной стенки, а контроль ЧСС может предотвратить развитие жесткости аорты [188]. Было показано, что более низкая ЧСС также снижает риск расслоения аорты, что частично связано с повышением ее жесткости.

Снижение АД, как уже упоминалось выше, также приводит к снижению жесткости артерий, но остается спорным вопрос о том, является ли это прямым влиянием снижения АД или остается косвенным эффектом. Как обсуждалось ранее, механика артериальной стенки сильно нелинейна, отчасти потому, что сильное растяжение переносит нагрузку с эластичных волокон на более жесткие коллагеновые волокна. Это приводит к зависимости СПВ и других показателей жесткости артерий от давления, вызывающего растяжение артериальной стенки. Таким образом, краткосрочные и, возможно, долгосрочные изменения АД могут приводить

к функциональным изменениям СПВ просто за счет модуляции растяжения артериальной стенки, а не за счет изменения внутренней жесткости стенки. Математические и экспериментальные методы использовались для оценки СПВ и других показателей жесткости при стандартизированном АД (изобарическая жесткость) иллюстрируют потенциальную важность того, как окружающее АД искажает интерпретацию показателей артериальной жесткости, включая СПВ [189-191]. Однако АД (и особенно ПД) относится к самым сильным факторам, ведущим к ремоделированию артериальной стенки [192]. Таким образом, вполне вероятно, что существует двунаправленная связь между артериальной жесткостью с АД. Любое увеличение ригидности ведет к увеличению пульсового АД, и, в свою очередь, повышение АД ведет к ремоделированию артериальной стенки.

Зависимость СПВ от давления может объяснить, почему антигипертензивные препараты, которые действуют в основном на микроциркуляторное русло, снижая ДАД и САД, имеют вторичный эффект, снижая САД за счет снижения волнового сопротивления. Зависимость СПВ от давления и, в меньшей степени, волнового сопротивления, являются критическими факторами, которые следует учитывать при оценке эффектов потенциальных вмешательств для снижения жесткости артерий. Большое количество исследований способов снижения жесткости как фармакологическими, так и немедикаментозными методами, не всегда проводятся как рандомизированные контролируемые клинические испытания. Одним из важных факторов, который необходимо учитывать, является продолжительность наблюдения в исследовании, поскольку изменения жесткости артерий могут проявиться через несколько месяцев или, возможно, через 1-2 года [193].

1.2.2. Нефармакологические вмешательства для снижения жесткости артерий

Немедикаментозные вмешательства, рекомендуемые в международных руководствах для снижения АД, включают снижение массы тела, уменьшение потребления соли и физические упражнения, каждое из которых также изучалось на предмет их влияния на снижение жесткости артерий [194-196]. Интенсивность и частота физических упражнений может влиять на жесткость артерий: существует кривая доза-реакция для упражнений на выносливость [197].

Было показано, что большинство вмешательств в образ жизни клинически значимо снижают СПВ. При этом на основании пилотных исследований и метаанализов был сделан вывод, что эти эффекты частично не зависят от снижения уровня АД. Действительно, физическая активность и снижение употребления соли оказывают сильное влияние на снижение симпатической активности, и есть косвенные доказательства того, что симпатическая активность имеет АД-независимый эффект на СПВ. Например, снижение объема циркулирующей крови, которое снижает АД и активирует симпатическую нервную систему и приводит к увеличению СПВ [198]. Модуляция симпатической активности оказывает непосредственное влияние на СПВ [199] и может быть механизмом, влияющим на снижение СПВ немедикаментозных вмешательств на снижение СПВ (примечательно, что большинство исследований имели относительно короткую продолжительность). Это может объяснить снижение жесткости артерий, наблюдаемое при успешном лечении обструктивного апноэ сна постоянным положительным давлением [200]. Однако в долгосрочных исследованиях также имеются данные о специфическом воздействии на артериальную стенку. Снижение веса, например, приводит к ремоделированию крупных артерий в течение нескольких лет [201]. Таким образом, вполне вероятно, что существуют как краткосрочные, так и долгосрочные независимые от

давления эффекты немедикаментозных вмешательств для снижения жесткости. Однако, поскольку, по крайней мере, некоторые из эффектов этих вмешательств зависят от давления, вполне вероятно, что независимые от давления эффекты будут умеренными, по крайней мере, в краткосрочной перспективе.

1.2.3. Фармакологические вмешательства для снижения жесткости артерий

Антигипертензивные препараты

Из-за зависимости СПВ и других показателей жесткости артерий от давления в большинстве исследований сравнивали эффекты отдельных антигипертензивных препаратов. Имеются данные о том, что ингибиторы АПФ (ангиотензинпревращающий фермент) и БРА (блокаторы рецепторов ангиотензина) снижают СПВ в большей степени, чем другие антигипертензивные средства, что свидетельствует об их специфическом воздействии на артериальную стенку, хотя дифференциальные эффекты являются скромными [202]. В частности, дозозависимый эффект олмесартана, сопровождающийся ремоделированием сонной артерии, был частично независимым от снижения АД [203]. Специфический эффект ингибитора АПФ/БРА мог быть обусловлен расслаблением гладкой мускулатуры в крупных эластических артериях по сравнению с таковым в микроциркуляторном русле, при этом индуцированная вазодилатация является общим механизмом действия большинства антигипертензивных препаратов. Также следует отметить, что антигипертензивные препараты различаются по своей селективности в отношении вазодилатирующего действия на микроциркуляторное русло [204]. В качестве альтернативы или в дополнения это связывают с влиянием на матрикс артериальной стенки. Например, ингибиторы АПФ и БРА обладают

противовоспалительным действием, что может повлиять на состав артериальной стенки, как обсуждается ниже. Toreano и соавт. [205] продемонстрировали, например, что высокие дозы ингибирования АПФ улучшают жесткость артерий независимо от АД у гипертоников с диабетом. Антагонисты минералокортикоидных рецепторов могут ингибировать фиброз в артериальной стенке, и одно хорошо контролируемое исследование, изучающее влияние спиронолактона на СПВ у пациентов с ранним хроническим заболеванием почек, продемонстрировало независимое от давления снижение СПВ [206].

Статины и другая гиполипидемическая терапия

Хотя генез жесткости артерий и генез атеросклероза различны, часть элементов патогенеза все же совпадают, а статины обладают плеiotропными эффектами, включая противовоспалительные и антиоксидантные эффекты, которые могут уменьшить жесткость артерий. Однако результаты рандомизированных клинических испытаний в отношении эффекта статинов несколько противоречивы. Так, два относительно недавних мета-анализа указывают на умеренное положительное снижение СПВ [207; 208]. В мета-анализе из 11 клинических исследований, где сравнивались методы лечения с и без статинотерапии, и включали 573 человека, наблюдалось умеренное снижение СПВ на 6,8% на статинах (95% ДИ, 1,8–11,7). Следует отметить, что исследования были гетерогенными, но в них всех эффект статинотерапии не зависел от изменения АД. Существует небольшая связь между СПВ и ЛПНП (холестерин липопротеинов низкой плотности) или отношением ЛПНП к ЛПВП в эпидемиологических исследованиях, а в интервенционных исследованиях со статинами не показано связи между изменением СПВ и ЛПНП. Это и позволяет предположить, что эффекты, скорее всего, связаны с плеiotропными эффектами статинов. В наблюдательном исследовании, в котором эзетимиб или ингибитор PCSK9

(пропротеинконвертазы субтилизин/кексин типа 9) добавляли к терапии высокими дозами статинов у пациентов с семейной гиперхолестеринемией [209], наблюдали широкий диапазон снижения ХС-ЛПНП. Изменения в показателях жесткости магистральных сосудов значимо коррелировали с изменением уровня ЛПНП. Таким образом, механизм, с помощью которого статины и другие гиполипидемические препараты могут снижать СПВ, остается до конца не изученным.

Противодиабетические препараты и ингибиторы гликозилирования конечных продуктов

Наличие сахарного диабета 2 типа достоверно ассоциировано с повышенной жесткостью артерий [210]. С подтверждением того, что противодиабетические препараты могут различаться по своему влиянию на сердечно-сосудистые исходы, возник интерес и к тому, влияют ли эти препараты на жесткость артерий. Однако все исследования в этой области были преимущественно поисковыми с небольшими размерами выборки (обычно <50 пациентов), и не все они были контролируемыми или рандомизированными. Так, мета-анализ показал, что ингибиторы ДПП-4 (дипептидилпептидазы-4) и ГПП-1 (агонисты рецептора глюкагоноподобного пептида-1) оказывают умеренное влияние на снижение СПВ [210]. Однако между исследованиями наблюдалась значительная гетерогенность. В рандомизированном контролируемом перекрестном исследовании селективный SGLT2i (ингибитор натрий-глюкозного котранспортера 2) эмпаглифлозин привел к небольшому, но значимому снижению СПВ, а также к снижению АД [211]. Этот результат подтвержден и в другом недавнем метаанализе [210].

АГ и сахарный диабет патогенетически связаны за счет накопления конечных продуктов гликирования, образующихся в результате неферментативных поперечных связей между глюкозой и аминокетонами белков. Эти продукты накапливаются во внеклеточном матриксе, повышая жесткость сосудистой стенки, а также связываются с рецепторами конечных

продуктов гликирования, вызывая окислительный стресс и воспаление.

Препараты, влияющие на метаболизм кальция

Кальцификация артериальной стенки с процессом, напоминающим формирование кости, хорошо известна в связи с повышением жесткости артерий, и модели кальцификации на животных предполагают, что она играет основную роль в повышении жесткости [212]. Ряд препаратов был исследован на предмет их способности замедлять или снижать кальцификацию сосудистой стенки, тем самым влияя на ее жесткость. В том числе изучались препараты, которые увеличивают плотность кости, в частности при ХПН. Артериальная кальцификация особенно распространена у пациентов с терминальной стадией почечной недостаточности, у которых наблюдается ускоренная ригидность, что является значимым предиктором неблагоприятного клинического исхода [213]. Она характеризуется низкими концентрациями витамина D в плазме, повышенным уровнем паратиреоидного гормона и гиперфосфатемией. В небольших когортных исследованиях, не все из которых были рандомизированными и контролируемые, не было представлено статистически значимых доказательств пользы от применения аналогов витамина D или кальцимитетиков [214].

Лечение гиперфосфатемии севеламером действительно замедляет прогрессирование кальцификации аорты у пациентов, находящихся на гемодиализе [215; 216], а одно небольшое когортное исследование показало, что севеламер снижает СПВ у пациентов, находящихся на гемодиализе, не влияя при этом на АД [217].

Большой интерес вызывают бифосфонаты, которые могут предотвращать кальцификацию сосудов, блокируя образование кристаллов апатита [218], ингибируя металлопротеиназы [219], и экспрессию TNF- α (фактор некроза опухоли- α), цитокина, который способствует остеобластной дифференцировке сосудистых клеток [220]. Они также могут метаболизироваться фагоцитами в негидролизуемые аденинсодержащие

аналоги АТФ [221], которые ингибируют транслоказу адениновых нуклеотидов, способствуя активации каспазы-3 и приводя к апоптозу макрофагов и остеокластов [222]. Было показано, что бисосфонаты замедляют кальцификацию сосудов у пациентов с терминальной ХПН, но при этом при исследовании жесткости артерий не было выявлено устойчивого влияния на СПВ [223].

Противовоспалительные препараты

Принимая во внимание данные о роли воспаления и воспалительных цитокинов в повышении жесткости артерий [224], очевиден большой интерес к биологической терапии воспаления, которая значимо эффективна в лечении воспалительных артритов, синдрома раздраженного кишечника и кожных воспалительных заболеваний. Исследования по изучению ригидности артерий проводились, главным образом, в когортах пациентов с показаниями к противовоспалительным препаратам: биологическим препаратам, ингибиторам TNF- α или различным интерлейкинам. Ранние исследования сообщали о положительных эффектах в неконтролируемых исследованиях [225], но более поздние рандомизированные клинические исследования (РКИ) продемонстрировали отсутствие каких-то корреляций. Недавний систематический обзор выявил 22 исследования, в которых сравнивали эффекты биотерапии на СПВ, но только 4 из них были РКИ, и все показали отсутствие взаимосвязи [226].

Из вышеизложенного становится очевидным, что несмотря на то, что было проведено много исследований по поиску медикаментозной терапии для снижения жесткости магистральных артерий, общими ограничениями являются небольшой размер когорты, короткая продолжительность лечения и отсутствие оценки эффектов, зависящих и не зависящих от АД. Учитывая естественный процесс повышения жесткости артерий на протяжении жизни, необходимы более длительные исследования для изучения вопроса о том, можно ли и в какой степени влиять на жесткость артерий, и насколько

сильно и целесообразно влиять при этом на АД.

1.3. Экспериментальные исследования по снижению уровня сенесцентных клеток

1.3.1. Достижения и перспективы применения сенолитической терапии

В настоящее время сенолитическая терапия предполагает избирательное уничтожение сенесцентных клеток сенолитическими агентами, усиление активности иммунных клеток, способных инициировать гибель сенесцентных клеток, или прямое ингибирование действия SASP [227]. Генетические подходы позволили избирательно индуцировать гибель сенесцентных клеток у трансгенных мышей и, таким образом, доказали, что элиминация стареющих клеток может быть терапевтическим подходом для лечения возраст-ассоциированных состояний [228].

Поиск синтетических и природных соединений, которые могут оказывать сходный эффект у человека – основная задача сегодняшней сенолитической терапии. При этом наиболее острыми остаются вопросы безопасности применения данных препаратов, в частности, неизвестно, как терапевтические средства могут влиять на старение неделящихся постмитотических клеток, и может ли сенолитическая терапия вызывать рецидивы онкологических заболеваний [229].

Разрабатываются стратегии для проведения клинических исследований сенолитической терапии и других препаратов, действие которых направлено на фундаментальные процессы старения [230]. Очевидно, что такие эффекты как влияние на среднюю или максимальную продолжительность жизни не могут быть проверены на людях. Но гипотетически можно считать сенолитик эффективным, если он оказывает влияние на возраст-ассоциированные заболевания и их биомаркеры [230; 231].

Сенотерапевтические препараты разделяют на сенолитики, избирательно уничтожающие сенесцентные клетки, сеноморфики, избирательно блокирующие SASP, и активаторы иммунной системы [232].

Основываясь на многообещающих результатах доклинических исследований, более 20 клинических испытаний сенолитической терапии успешно завершены, многие продолжаются или только планируются [232]. Поскольку побочные эффекты сенолитиков у человека еще не изучены, для максимизации соотношения пользы и риска, первые клинические испытания проходят у пациентов с тяжелыми заболеваниями диабетической нефропатии, болезни Альцгеймера, старческой хрупкостью и идиопатическим фиброзом легких [232].

Первыми заявленными сенолитиками были дазатиниб - ингибитор протеин- тирозинкиназы, и кверцетин - растительный флавоноид [233]. Сообщается еще о семи классах сенолитиков, включая ингибиторы семейства Bcl-2, природные соединения, ингибитор связывания p53, ингибиторы белка теплового шока 90 (HSP90), UBX0101 и ингибитор гистондеацетилазы (HDAC) [234]. В экспериментальных исследованиях комбинация дазатиниба и кверцетина улучшала физическую активность и увеличивала продолжительность жизни мышей [235]. Комбинированное введение дазатиниба и кверцетина улучшало показатели возраст-ассоциированных заболеваний, включая распространение атеросклероза [236], остеопороз [237] фиброз легких [238] , стеатоз печени [239] и болезнь Альцгеймера [240].

Устойчивость сенесцентных клеток к апоптозу, обусловленная активацией Bcl-2 и Bcl-xL, позволяет предположить, что ингибиторы этих антиапоптотических белков являются хорошими кандидатами в качестве сенолитиков. В связи с этим ряд средств (ABT-263, ABT-737, A1331852 и A1155463) были зарегистрированы в качестве сенолитических кандидатов как *in vitro*, так и *in vivo* [241; 242]. Так, внутрисуставная инъекция UBX0101 уменьшала количество сенесцентных клеток в суставном хряще и синовиальной оболочке и приводила к ослаблению развития посттравматического остеоартрита у возрастных мышей [243].

Результаты клинических исследований показали, что сенолитики улучшали физические функции у ослабленных пациентов [244]. В открытом пилотном исследовании 1 фазы у 9 пациентов с диабетической

нефропатией, 3-х дневный курс перорального D+Q показал снижение активности сенесцентных клеток в жировой ткани, уменьшение воспаления, уровня факторов SASP в течение как минимум 11 дней после последней дозы. Авторы предполагают, что у ряда пациентов прерывистый режим дозирования может быть наиболее эффективным [245]. Эти данные, безусловно, требуют оценки в более крупных рандомизированных, двойных слепых, плацебо-контролируемых исследованиях у пациентов старшей возрастной группы и с возраст-ассоциированными заболеваниями. Но, следует отметить, что фаза 2 исследования, где сенолитическим агентом был упомянутый выше ингибитор p53- дестабилизирующего белка MDM2, UBX0101 (также известный как nutlin-3a) — не достигла основной конечной точки уменьшения боли у пациентов с остеоартрозом коленных суставов при 12-недельном наблюдении. Nutlin-3a показал очень слабую сенолитическую активность, а в некоторых случаях наоборот стимулировал клеточное старение [246; 247].

Активно рассматриваются сенолитики конкретно для онкологических заболеваний. Panobinostat, одобренный FDA ингибитор HDAC, обладает сенолитической активностью в отношении индуцированного химиотерапией старения раковых клеток (немелкоклеточного рака легкого и плоскоклеточной карциномы головы и шеи) [244].

Сопутствующая элиминация стареющих клеток с помощью сенолитика Навитоклакс в различных формах приводит к достоверному снижению биомаркеров старения и кардиотоксичности вместе с восстановлением сердечной функции у мышей с последующей эхокардиографией. Эти результаты свидетельствуют о потенциальном клиническом использовании сенолитической терапии для снижения кардиотоксичности, вызванной химиотерапией [248].

Список кандидатов на сенолитики растет в геометрической прогрессии: большинство сенолитиков нацелено на белки p53, тирозинкиназу, HSP90, Bcl-2 и Bcl-xL, но открытие новых мишеней, специфичных для сенесцентных клеток, обещает еще более мощный толчок в развитии сенолитической терапии (Таблица 2).

К сеноморфным средствам, ингибирующим SASP, относят активатор теломеразы [249], низкокалорийные диеты [249], активаторы сиртуина [250], ингибиторы mTOR [251], антиоксиданты [252], активаторы аутофагии [253] и активаторы протеасом [254].

Также сенесцентные клетки в тканях могут активировать как врожденные, так и адаптивные иммунные ответы: иммунная система самостоятельно справляется с избыточным количеством сенесцентных клеток для поддержания гомеостаза ткани, главным образом, через контроль повреждения ДНК [255]. Удаление избытка сенесцентных клеток улучшает заживление ран [256], влияет на развитие фиброза печени [257] и развитие эмбриона/плаценты [258]. Тем не менее, было показано, что неэффективная в отношении контроля количества сенесцентных клеток иммунная система способствует их накоплению в различных тканях с возрастом, что приводит к старению всего организма и развитию возраст-ассоциированных заболеваний [255].

Таблица 2 – Сенолитики, которые проходят клинические испытания в настоящее время

Название исследования	Сенолитик	Дизайн исследования	Идентификатор	Статус
	D+Q	Фаза 1, рандомизированное, открытая этика	NCT02874989	Завершено
	D+Q	Фаза 2, рандомизированное, открытая этика	NCT02848131	Текущее
	D+Q	Рандомизированное, открытая этика	NCT02652052	Текущее
	D+Q	Фаза 1/2, открытая этика	NCT04785300	Текущее
	D+Q	Фаза 1/2, открытая	NCT04063124 и	Рассмотрение

Продолжение Таблицы 2

		этика, пилотное исследование; Фаза 2, рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое	NCT04685590	
	D+Q		Рассмотрение	Текущее
	D+Q; F	Фаза 2, рандомизированное, открытая этика	NCT04733534	Текущее
	D+Q; F	Фаза 2, рандомизированное, открытая этика	NCT04313634	Текущее
	Q	Фаза 2, рандомизированное, двойное слепое плацебо-контролируемое	NCT04907253	Текущее
	F	Фаза 1/2, рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое	NCT04815902	Текущее
	F	Фаза 1/2, рандомизированное, двойное слепое плацебо-контролируемое	NCT04210986	Текущее
	F	Фаза 2, рандомизированное, двойное слепое	NCT04476953	Текущее

Продолжение Таблицы 2

		плацебо- контролируемое		
	F	Фаза 2, рандомизированное, двойное слепое плацебо- контролируемое	NCT03430037 и NCT03675724	Текущее
	F	Фаза 2, рандомизированное, двойное слепое плацебо- контролируемое	NCT03325322	Текущее
	F	Фаза 2, рандомизированное, двойное слепое плацебо- контролируемое	NCT04771611	Текущее
		Фаза 2, рандомизированное, двойное слепое плацебо- контролируемое	NCT04537299	Текущее
	F	Фаза 1/2, рандомизированное, двойное слепое плацебо- контролируемое	NCT04770064	Текущее
	F	Фаза 1/2, рандомизированное, двойное слепое плацебо- контролируемое	NCT05025956	Текущее
	UBX0101 nutlin-3a	Фаза 2, рандомизированное,	NCT03513016 и NCT04349956	Завершено; не удалось

Продолжение Таблицы 2

		двойное слепое плацебо- контролируемое		достичь первичной точки
--	--	--	--	-------------------------------

1.3.2. Проблема отсутствия биомаркеров сенесцентных клеток, доступных для определения в клинической практике

Несмотря на внушительное количество исследований по сенолитической терапии, по-прежнему актуальным на сегодня остается вопрос поиска единого для всех биомаркера или комплекса биомаркеров - «золотого стандарта» - который отражал бы количество сенесцентных клеток в ткани в любой момент времени, а также позволял отслеживать эффективность применяемой сенолитической терапии. В настоящее время общепринятого определения биомаркера старения не существует. Безусловно, выделяют фенотипические отличительные признаки старения, но ученых в первую очередь интересуют биохимические биомаркеры, которые могут отражать механизмы, лежащие в основе возрастного статуса.

Идентификация и мониторинг бремени стареющих клеток *in situ*, особенно во время клинических испытаний для оценки безопасности и эффективности исследуемых методов, является крайне сложной задачей, основывающейся исключительно на данных биопсии ткани. Однако факторы SASP, клинические биомаркеры старения и биомаркеры других фундаментальных процессов старения (например, α -Klotho) можно определять в моче, слюне, крови или спинномозговой жидкости [259-265]. Кроме того, предпринимаются постоянные попытки определить специфические биомаркеры накопления сенесцентных клеток или целые панели таких биомаркеров, если они будут информативнее.

В клинической практике эти показатели важны в качестве диагностических инструментов и предикторов развития возраст-

ассоциированных заболеваний, а также как инструмент мониторинга эффективности проводимой терапии. Нужны индикаторы, которые будут легко воспроизводимы, доступны, надежны и недороги в измерении, и станут отражать не только биологический возраст, но и скоррелируют с клиническими показателями возрастных изменений.

Такие биомаркеры или панели биомаркеров сейчас в литературе называют геродиагностическими показателями, первыми примерами стали сводные показатели крови. Также предлагается концепция герокалькуляторов, то есть геродиагностических соотношений, где в числитель ставятся показатели клеточного старения (например, факторы SASP), а в знаменатель – оцифрованные системные показатели старения (α -Klotho, СПВ, длина теломер) [266].

Наиболее перспективной терапевтической стратегией для предупреждения, замедления и облегчения симптомов старения является элиминация сенесцентных клеток. Многообещающие результаты применения сенолитиков в доклинических исследованиях продемонстрировали широкие возможности для замедления полиморбидности и увеличения продолжительности жизни. Пока рандомизированные контролируемые клинические исследования пытаются определить безопасность и потенциал сенолитических стратегий, научные и нормативные проблемы следует рассматривать уже сейчас. Ключевым приоритетом должно стать выявление надежных, чувствительных и специфичных геродиагностических биомаркеров для количественной оценки сенесцентных клеток.

Все вмешательства, изменяющие активность SASP (в том числе те, которые специфически усиливают или подавляют тканеразрушающие факторы по сравнению с факторами роста) или местные сенолитические средства, те, которые элиминируют сенесцентные клетки с помощью проапоптотического SASP, могут ускорить заживление ран, но и стимулировать онкологические процессы. Их эффективность и безопасность необходимо экспериментально проверять и изучать корреляции с уровнями

биомаркеров старения.

Отсутствие в Международной классификации болезней ВОЗ (МКБ) кодов полиморбидности, саркопении, продолжительности здоровья и гериатрических синдромов представляет собой барьер для клинического развития и затрудняет получение разрешений регулирующими органами на проведение исследований, в том числе получение эпидемиологических данных, делает невозможным получение расходов для ЛПУ.

Тем не менее, результаты текущих и запланированных клинических испытаний дадут понимание роли клеточного старения как терапевтической мишени для возрастных изменений, что непременно позволит использовать эффективную и безопасную сенолитическую терапию в клинической практике в ближайшем будущем.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн исследования

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).

2.1.1. 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) [267]. 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 [268].

2.1.2. Критерии включения и невключения

- 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.
- Хроническая сердечная недостаточность III-IVФК.
- Онкологические или системные заболевания в анамнезе.
 - Перемежающаяся хромота, фибрилляция предсердий и другие состояния, не позволяющие корректно выполнить измерение скорости пульсовой волны.
- 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.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Доклинические и клинические методы исследования

Работа по созданию коллекции была разделена на несколько этапов. В рамках преаналитического этапа сотрудники научного и клинического отделов совместно проводили планирование исследования и организацию логистики с учетом ресурсов медицинского центра. На этом этапе были разработаны нормативно-правовые акты, в т.ч. информированные согласия для пациентов и протоколы действий для каждого этапа исследования, составлена дорожная карта движения материалов (Рисунок 1).

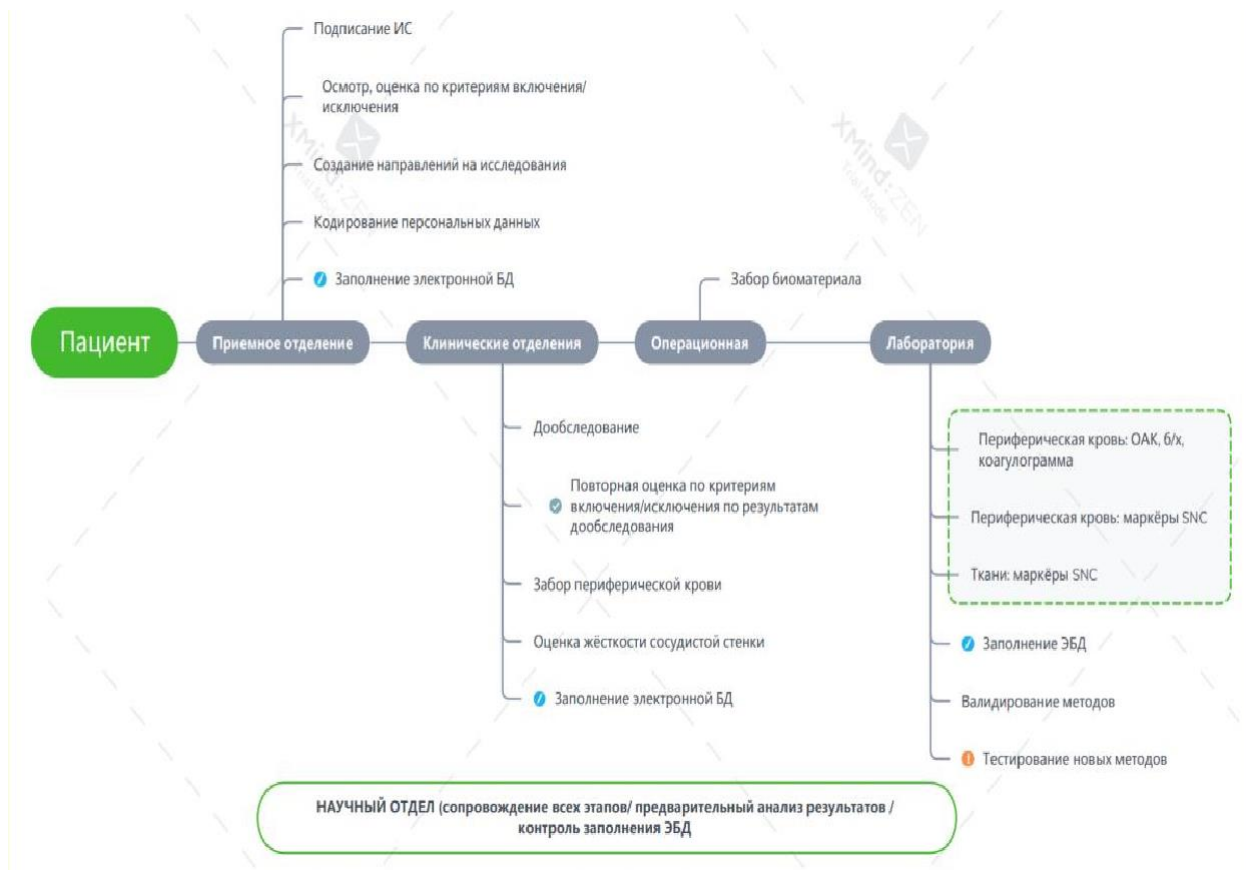


Рисунок 1 – Этапы получения биоматериалов от одного пациента и ассоциированных с ними данных для создания коллекции

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.

2.2.2. Лабораторные методы исследования

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. Все ассоциированные с биологическими образцами данные вводили в унифицированную электронную базу данных, включавшую как раздел с ограниченным доступом с идентификационными данными, объединяющими внутренние кодировки всех подразделений, участвующих в формировании коллекции, так и раздел с расширенным доступом с деперсонифицированными данными, характеризующими все полученные биологические образцы.

Клинический анализ крови выполняли на гематологическом анализаторе XN 2000 Sysmex Corporation, Япония. Исследование биохимических показателей крови выполняли на автоматическом

биохимическом анализаторе AU480 Beckman Coulter, Германия.

Далее в нашей работе мы определяли уровень известных биомаркеров клеточного старения непосредственно в тканях и их взаимосвязи с другими предположительными биомаркерами сенесцентных клеток на разных уровнях организации (Таблица 3).

Таблица 3 – Список исследуемых биомаркеров накопления сенесцентных клеток с указанием уровня идентификации

Уровень	КЛЕТОЧНЫЙ		ТКАНЕВОЙ		ОРГАНИЗМЕННЫЙ	
	Культура клеток	Ткань	Системный кровоток	Осмотр		
Возраст						+
СПВ						+
Факторы роста			+			
P16	+	+	+	(мРНК)		
P21	+		+	(мРНК)		
CD34+ клетки			+	(мононуклеары)		
Длина теломер	+		+			
Пролиферация клеток в культуре	+					
Активность деления ФБ	+					
Активность β -галактозидазы	+		+			
H2AX	+					
SASP	+					

Из периферической крови пациентов выделяли мононуклеарные клетки в градиенте плотности на фиколле (ПанЭко, Россия). Мононуклеары, выделенные по стандартному протоколу, меченные антителами против CD3, разделяли на проточном цитофлуориметре/сортере BD FACSAria III (BD BioSciences, США) для сортировки CD3+ субпопуляции клеток с целью оценки уровня мРНК ингибиторов клеточного цикла p16 и p21 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Часть выделенных клеток использовали для определения показателя длины теломер в лейкоцитах с использованием коммерческого набора Absolute Human Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit (ScienCell, #8918), согласно протоколам, рекомендованным производителем. С помощью окрашивания мононуклеаров крови флуоресцентно мечеными антителами к биомаркерным белкам субпопуляции прогениторных клеток CD34 и к изотипическому контролю (IgG) для CD34 (флуорофор APC) с дальнейшим анализом методом проточной цитометрии определяли процент CD34+ клеток.

Оставшиеся после выделения мононуклеарных клеток образцы плазмы использовали для определения показателей содержания в периферическом кровотоке ряда секретируемых стареющими клетками факторов: инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1 (insulin-like growth factor 1)), фактор роста фибробластов 21 (FGF-21 (fibroblast growth factor 21)), остеопоггерин, ферритин, растворимые молекулы адгезии сосудистых клеток (VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1), молекула клеточной адгезии ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) с помощью соответствующих коммерческих наборов для иммуноферментного анализа (R&D Systems, Biomedica, eBioscience).

Образцы кожи и подкожной жировой ткани, полученные от пациентов в ходе хирургических операций, разделяли на 2 части. Одна часть была

предназначена для определения в тканях содержания сенесцентных клеток, которые экспрессировали ингибитор клеточного цикла p16. Для этого образцы кожи и подкожной жировой ткани, полученные в ходе операции, фиксировали в 10% забуференном нейтральном формалине в течение 24-48 часов после забора материала. Гистологическая проводка осуществлялась по стандартной методике с использованием 8 смен изопропилового спирта (общая продолжительность - 5,5 часов, температура 37°C) и 3 смен парафина (общая продолжительность - 5 часов, температура 62°C). Затем препараты заливали в парафиновые блоки, которые длительно хранили при комнатной температуре. Далее с парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 3-4 мкм, которые монтировали на предметные стекла (Menzel GmbH&Co KG, Германия). Окрашивание производили по стандартной методике с использованием гематоксилина Майера и эозина (PanReac AppliChem, Испания). Для постановки иммуногистохимических реакций использовались моноклональные мышинные антитела к p16 (клон Е6Н4) в составе набора CINtec Histology Kit (Roche, Германия). Депарафинирование и регидратацию препаратов выполняли вручную, согласно инструкции производителя. Демаскировку антигена осуществляли при помощи Epitope Retrieval Solution, входящего в состав набора CINtec Histology Kit (Roche, Германия) при температуре 95–98°C в течение 10 минут в модуле предобработки (PT-Module). Постановку иммуногистохимических реакций проводили в автоматизированном режиме с помощью иммуностейнера Autostainer 480S (Thermo Fisher Scientific, США). Время инкубации составляло 30 минут. При постановке иммуногистохимических реакций использовали соответствующие положительные и отрицательные контроли. Препараты изучали под световым микроскопом Leica DM LB2. Для подсчета количества положительных клеток использовалась оригинальная методика. Готовые иммуногистохимические препараты сканировали при помощи сканера Leica SCN400. Затем при помощи встроенных морфометрических инструментов измеряли общую площадь срезов жировой

ткани и кожи, из которой вычитали площадь искусственных разрывов на срезах. В подсчет количества клеток включали все положительно окрашенные клетки вне зависимости от их локализации в коже (эпидермис, дерма, придатки кожи) и жировой ткани (фиброзные прослойки в жировой ткани). Положительной считалась ядерно-цитоплазматическая и цитоплазматическая экспрессия биомаркера любой интенсивности. Далее производили вычисление количества p 16-положительных клеток на 1 мм² жировой ткани и кожи.

Вторую часть полученных тканей использовали для выделения дифференцированных специализированных клеток – фибробластов (ФБ) и мезенхимных стволовых/стромальных клеток (МСК) по отработанным ранее в Институте регенеративной медицины МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова протоколам. Для оценки скорости роста и пролиферативного потенциала клеток МСК жировой ткани и ФБ кожи первого пассажа высаживали в 6-луночный планшет (100 тыс. клеток/луночку), после чего планшет помещали в автоматизированную систему IncuCyte® ZOOM Live Cell Analysis System (Essen Bioscience, США) для прижизненной съемки состояния клеточной культуры. Съемку осуществляли с периодичностью 1 раз/час в течение 96 часов (16 полей зрения/луночку). Встроенное программное обеспечение прибора позволяет оценивать площадь, занятую клетками, с помощью наложения «маски» на полученные изображения и таким образом вычислять процент конfluenceности клеточной культуры. Увеличение конfluenceности прямо коррелирует с увеличением числа клеток, что позволяет судить о скорости роста клеточной культуры по вычисляемым параметрам времени лаг-фазы и время прироста монослоя за 48, 72 и 96 часов. Лаг-фаза – период времени, необходимое клеткам для прикрепления к пластику и подготовки к митотическому делению. В это время клетки не пролиферируют. Быстрый переход клеток из лаг-фазы (короткий период времени) в фазу активного деления (экспоненциального роста) говорит о способности клеток к быстрой адаптации и высоким

пролиферативных свойствах. На полученных с помощью системы IncuCyte® ZOOM изображениях был проведен анализ пролиферативного потенциала клеточных культур. Для каждой клеточной линии была получена кривая пролиферации, отражающая увеличение плотности монослоя с течением времени.

В МСК жировой ткани и фибробластах второго пассажа в экспоненциальной стадии роста проводили иммуоцитохимическое выявление ингибитора клеточного цикла p21 и гистона H2AX, фосфорилированного по S139 (гамма-H2AX). Для иммуоцитохимического выявления ингибиторов прогрессии клеточного цикла клетки фиксировали в 4% формальдегиде в течение 5 минут, пермеабелизовали, инкубируя в течение 5 минут с 0,2% раствором Triton x100 в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). Для предотвращения неспецифического связывания препараты с клетками инкубировали в растворе ФСБ, содержащем 10% нормальной сыворотки неиммунизированного животного – донора вторых антител (козла) и 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) 1 час при комнатной температуре. Далее инкубировали образцы с первичными антителами кролика к p21 (2947S, Cell Signaling) или гамма-H2AX (AF2288, R&D) при +4°C в течение ночи. Для контроля неспецифического связывания антител параллельно инкубировали аналогичный образец с IgG неиммунизированного кролика в аналогичной концентрации. Для выявления первичных антител использовали флуоресцентно меченые вторые антитела козла против кролика AlexaFluor594(Invitrogen). Ядра метили DAPI (Sigma). Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM6000B с камерой Leica DFC 360FX или инвертированного флуоресцентного микроскопа Leica DMi8. Получали микрофотографии трех случайных полей зрения каждого образца с увеличением объектива x20. Параллельно получали изображения контрольных образцов, снятых с теми же настройками (экспозиция, усиление, мощность источника света и др.), что и опытные образцы. Уровень свечения в контрольных образцах считали

фоновым, с помощью программной обработки в ImageG отсекали неспецифический сигнал в опытных образцах. Для определения количества позитивных клеток в клеточной линии каждого пациента проводили подсчет числа ядер, в которых выявлялись анализируемые белки, и определяли их отношение к общему количеству ядер на микрофотографии. Вычисляли среднее по всем полям зрения с каждого образца.

С целью анализа секрета клеток получали образцы кондиционированной среды. Для этого МСК жировой ткани или ФБ 2 пассажа высаживали в чашку Петри диаметром 35мм, наращивали до получения 80-90% монослоя. Трижды промывали монослой с помощью раствора Хэнкса по 5 минут для удаления остатков сыворотки. После этого добавляли 2,2 мл соответствующей среды роста без сыворотки с добавлением 1% БСА и культивировали в течение 72 часов. Полученную кондиционированную среду собирали с чашки, центрифугировали при 500g 10 минут для удаления клеточного дебриса, собирали супернатант, добавляли коктейль ингибиторов протеаз. Образцы кондиционированной среды аликвотировали, замораживали и хранили при -80°C . Клетки снимали с чашки Петри и подсчитывали их число для дальнейшей нормировки количества секретированных в среду факторов на число клеток-продуцентов. Для анализа накопления сенесцентных клеток в популяциях выделенных из тканей пациентов клеток проводили оценку содержания в среде культивирования МСК жировой ткани и ФБ ряда секретлируемых клетками факторов, которые относят к SASP IL- 6, MCP-1, ON, PEDF, PAI-1. Для этого использовали коммерческие наборы для иммуноферментного анализа (R&D Systems, RayBiotech).

2.2.3. Инструментальные методы исследований

Измерение САД, ДАД, ЧСС, СПВ осциллометрическим методом в положении сидя и лежа производилось с помощью диагностической

системы VPLab Vasotens. СПВ рассчитывается в м/с по времени распространения отраженной волны. В программном обеспечении (ПО) VPLab для определения СПВ в аорте используется соотношение: $СПВ_{ао} = K \times (2 \times L) / ВРОВ$, где СПВ_{ао}

— СПВ в аорте; K — масштабный коэффициент для нормирования полученного значения СПВ; L — длина ствола аорты (в ПО VPLab за длину аорты принимается расстояние от верхнего края грудины до лонной кости); ВРОВ — время распространения отраженной волны. Временем распространения отраженной волны называется период между пиками ударной и отраженной волны на сфигмограмме, за длину пути принимается удвоенная длина ствола аорты. Измерения СПВ были проведены в соответствии с международными протоколами.

Соблюдались следующие условия: все измерения проводились в одном кабинете при одинаковой температуре и окружающей обстановке в одно время дня; у всех пациентов измерение производили на левой руке с помощью манжеты стандартного размера; во время измерений пациенту запрещалось двигаться и разговаривать, запрещалось принимать пищу, кофеин и курить менее чем за 3 ч до исследования; для каждого положения тела проводилось минимум 3 измерения, затем вычислялись средние значения; в случае разницы между измерениями в одном положении более 0,5 м/с проводилось контрольное (четвертое) измерение. Измерения проводили в следующем порядке: 3 (при необходимости 4) измерения в положении сидя — отдых в горизонтальном положении в течение 15 мин — 3 (при необходимости 4) измерения в положении лежа.

2.2.4. Методы статистического анализа

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета статистических программ IBM SPSS Statistics. Для каждой из непрерывных величин приведены: среднее (M) и стандартное отклонение

(SD) или медиана (Мед) и верхняя (ВКв) и нижняя квантили (НКв) распределения в зависимости от типа распределения исследуемой величины. Гипотезу о нормальном распределении изучаемого показателя проверяли с использованием критерия Шапиро-Вилка. Для статистического описания связи между различными параметрами вычисляли коэффициент корреляции Пирсона. При сравнении групп для оценки достоверности различий между переменными при нормальном распределении выборки использован парный критерий Стьюдента. При отличном от нормального распределении переменных для изучения различий между зависимыми выборками использовали критерий Вилкоксона, для независимых выборок был выбран критерий Манна–Уитни. Для поиска сходных тенденций у коррелирующих переменных и уменьшения их количества применяли факторный анализ по методу главных компонент с варимакс-вращением по методу Кайзера. Регрессионный анализ применяли для оценки наличия ассоциации $p16$ и различными биомаркерами накопления сенесцентных клеток. Уровнем статистической значимости было принято считать $p < 0,05$.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. 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 информированное согласие на участие. У 38 пациентов удалось осуществить забор тканей (жировая ткань и ткань кожи). Значения основных характеристик пациентов представлены в Таблице 4.

Таблица 4 – 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), M±SD	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), M±SD	27,4±5,6	30,5±5,4	0,425
Ожирение (n/%)	38/90	31/82	0,122
САД (мм рт.ст.), M±SD	132,5 ± 21,2	137,0 ± 26,3	0,521
ДАД (мм рт.ст.), M±SD	76,7 ± 9,2	77,5 ± 9,2	0,743
ПАД (мм рт.ст.), M±SD	62,2 ± 9,2	59,1 ± 7,5	0,363

Продолжение Таблицы 4

рт.ст.), M±SD			
ОХС (ммоль/л), M±SD	5,0 ± 1,3	5,7 ± 2,7	0,102
ХС ЛНП (ммоль/л), M±SD	3,1 ± 0,9	3,9 ± 1,3	0,215
ХС ЛВП (ммоль/л), M±SD	1,2 ± 0,3	1,8 ± 0,5	0,092
ТГ (ммоль/л), M±SD	1,2 ± 0,7	1,2 ± 0,4	0,639
SCORE2&SCORE- OP (балл) M±SD	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, ХСЛНП – холестерин, липопротеины низкой плотности, ХСЛВП – 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±1,3 лет (4,6±1,2 для группы с забором крови, 4,9±1,0 для группы с забором тканей и крови, p>0,05). При оценке возраст-ассоциированных заболеваний у 19 пациентов выявлена верифицированная стабильная ишемическая болезнь сердца (ИБС) (критерии диагностики в соответствии с клиническими рекомендациями, утвержденными Министерством здравоохранения от 2020г.), у 11 из них осуществлен забор тканей. Нарушениями углеводного обмена страдали 15 пациентов (9 пациентов с подтвержденным сахарным диабетом 2 типа, из них у 4 осуществлен забор тканей, 6 пациентов с нарушением толерантности к глюкозе, из них у 4 осуществлен забор

тканей). Статистически значимой разницы между группами по сопутствующим заболеваниям не было выявлено.

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. Значения основных характеристик пациентов представлены в Таблице 5.

Таблица 5 – Характеристика пациентов, включенных в исследование и пациентов группы контроля (n=320)

Показатель	Группа исследования (n=80)	Контрольная группа (n=240)	p
Возраст (лет), M±SD	71,0±5,9	73,1±3,2	0,356
Мужчин (n/%)	21/26	74/31	0,255
Курение (n/%)	17/21	63/26	0,331
ИМТ (кг/м ²), M±SD	28,7±5,2	30,7±5,2	0,136
Заболевания			
АГ (n/%)	80/100	227/95	0,096
Ожирение (n/%)	69/86	199/83	0,231
Нарушения углеводного Обмена (n/%)	15/19	64/27	0,112
ИБС (n/%)	19/24	91/38	0,069
Артриты и артрозы (n/%)	12/15	44/18	0,185

Продолжение Таблицы 5

Лабораторно-инструментальные показатели			
СПВ, м/с M±SD	14,15±2,52	14,36±3,17	0,296
САД (мм рт.ст.), M±SD	136,5 ± 22,3	143,5±23,2	0,655
ДАД (мм рт.ст.), M±SD	78,00 ± 9,25	74,10±5,16	0,354
ПАД (мм рт.ст.), M±SD	60,2 ± 12,2	56,0±12,5	0,277
ОХС (ммоль/л), M±SD	4,8 ± 1,5	5,1±1,1	0,104
ХСЛНП (ммоль/л), M±SD	3,2 ± 1,0	3,4±1,2	0,567
ХСЛВП (ммоль/л), M±SD	1,2 ± 0,3	1,1±0,3	0,425
ТГ (ммоль/л), M±SD	1,2 ± 0,7	1,3±0,8	0,235
Лекарственная терапия			
иАПФ/БРА/АРНИ (n/%)	56/70	172/72	0,422
Бета-блокаторы (n/%)	26/33	90/38	0,223
Статины (n/%)	19/23	87/36	0,065
НПВС (n/%)	22/27	97/40	0,048
Метформин (n/%)	7/8	15/6	0,119

ИМТ – индекс массы тела, АГ – артериальная гипертензия, ИБС – ишемическая болезнь сердца, СПВ – скорость пульсовой волны, САД – систолическое артериальное давление, ДАД – диастолическое артериальное давление, ПАД – пульсовое артериальное давление, ОХС – общий холестерин, ХСЛНП – липопротеины низкой плотности, ХСЛВП – липопротеины высокой плотности, ТГ – триглицериды.

Также проводилась сравнительная оценка по показателям сердечно-сосудистого риска и СПВ в разных возрастных группах исследуемой когорты (Таблица 6), статистически значимых различий выявлено не было.

Таблица 6 – Характеристика пациентов по сердечно-сосудистому риску в зависимости от возраста в исследуемой когорте (n=80), $p>0,05$

Показатель	Пожилой возраст 65-75 лет (n=59)	Преклонный и старческий возраст 75-90 лет (n=21)
SCORE2&SCORE- OP, балл M±SD	25±2,30	30,21±3,20
СПВ, м/с	13,22±3,23	16,30±4,42

Статистически значимые различия между группами с забором тканей и без выявлены только по полу и курению. В дальнейшем сравнение будет проводиться с учетом этой разницы. Между исследовательской группой и контрольной группой выявлены различия по частоте приема НПВС, по другим показателям группы допустимы к объединению.

3.2. Создание коллекции биологических образцов разного типа, полученных от пожилых пациентов, для определения показателей жесткости артериальных сосудов и биомаркеров накопления сенесцентных клеток на системном, тканевом и клеточном уровнях

Для формирования коллекции была организована работа четырех подразделений, в том числе, четырех клинических отделений и трех лабораторных подразделений (Рисунок 2). За каждым подразделением, помимо специализированных опций, были закреплены дополнительные функции для поддержания системной работы исследования. В результате работы были сформированы информированные согласия (ИС) 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. Ряд функций был распределен с учетом возможной взаимозаменяемости исполнителей.

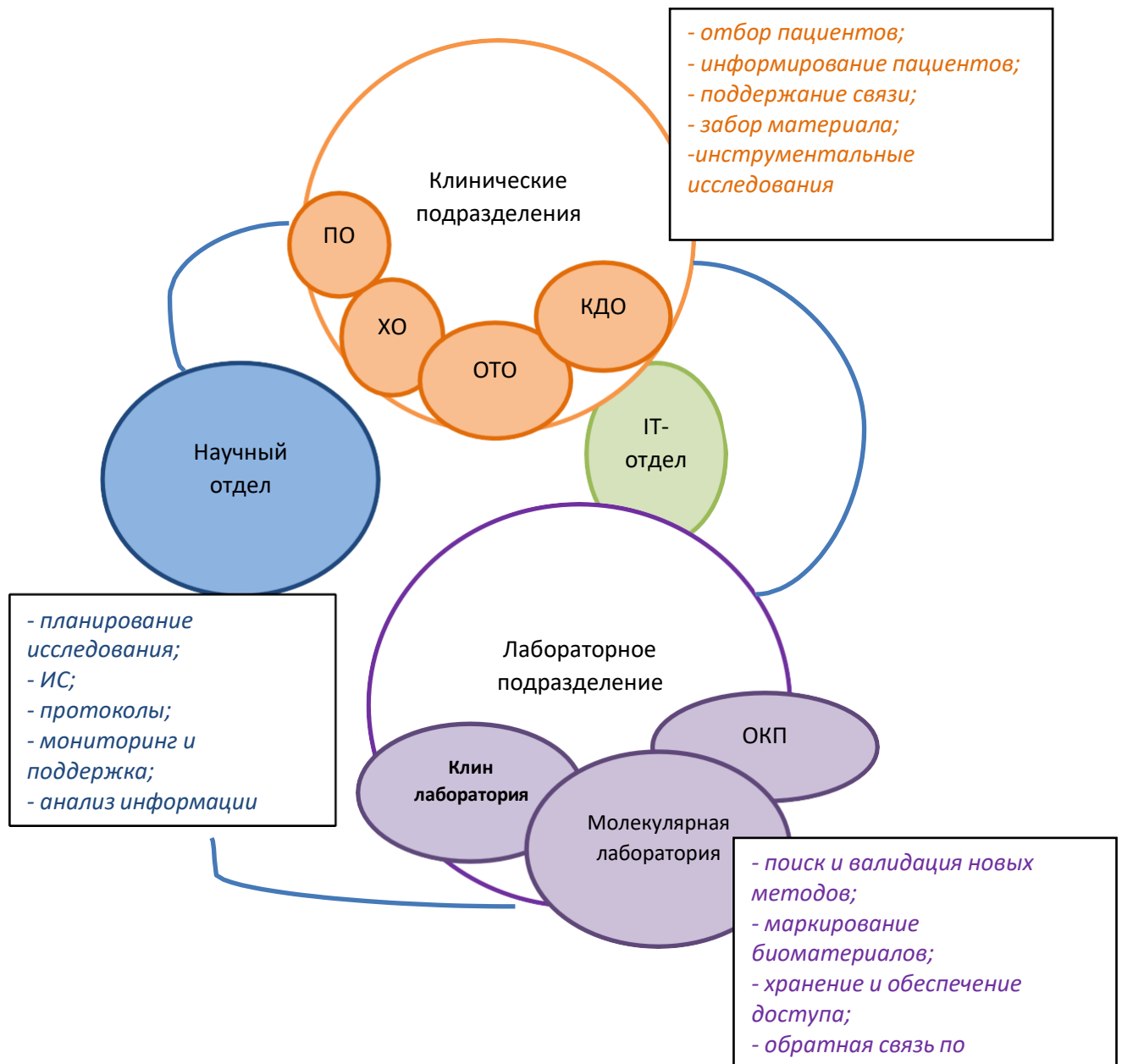


Рисунок 2 – Организация работы отделений в рамках исследования.

ПО – приемное отделение, ХО – хирургическое отделение, ОТО – отделение травматологии и ортопедии,
ОКП – отделение клинической патологии

На основании проведенных инструментальных и лабораторных исследований, а также по результатам выделения и культивирования клеток из образцов биоматериалов, взятых в процессе хирургических операций, получены характеристики исследуемых биомаркеров сенесцентных клеток (Таблица 7).

Таблица 7 – Изучаемые биомаркеры накопления сенесцентных клеток в организме

Биомаркер старения	Медиана
СПВ, м/с	14,15±2,52
Системный кровоток (n=80)	
Длина теломер_МНК, п.о.	538,40±226
Содержание CD34+клеток, %	0,06±0,03
p16 мРНК_МНК, отн.ед.	220,00±33,50
p21 мРНК_МНК, отн.ед.	140,00±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

Продолжение Таблицы 7

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
SASP (n=38)	
IL-6_МСК, нг/мл	29,40 [22,64; 36,71]
MCP-1_МСК, нг/мл	124,12 [120,50; 127,74]
PAI-1, _МСК, нг/мл	5,48 [4,86; 6,10]
ON, _МСК, нг/мл	6,16 [5,38; 6,94]
PEDF, _МСК, нг/мл	43,05 [41,17; 43,05]
IL-6_ФБ, нг/мл	57,45 [44,25; 70,65]
MCP-1_ФБ, нг/мл	224,57 [184,37; 264,77]
PAI-1_ФБ, нг/мл	3,72 [2,94; 4,50]
ON_ФБ, нг/мл	9,51 [8,14; 10,88]
PEDF_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 – моноклеарные 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, MCP-1 – белок хемоаттрактант моноцитов 1 типа.

3.3. Оценка связи СПВ с традиционными факторами риска повышения артериальной жесткости и биомаркерами репликативного клеточного старения у пациентов высокого и очень высокого сердечно-сосудистого риска

На следующем этапе работы была оценена связь СПВ с традиционными факторами риска повышения артериальной жесткости и биомаркерами репликативного клеточного старения в нашей выборке. Выявлена корреляция средней силы между возрастом и СПВ (коэффициент корреляции Спирмена - 0,551, $p < 0,001$).

При изучении зависимости СПВ с традиционными факторами риска выявлена связь с уровнем АД ($r=0,334$, $p < 0,05$), ИМТ ($r=0,421$, $p < 0,05$) и курением на уровне тенденции ($r=-0,315$, $p=0,056$), с уровнем глюкозы и липидным профилем значимых корреляций выявлено не было (Таблица 8).

Таблица 8 – 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 ($r = -0,381$, $p = 0,022$), и МСК ($r = -0,382$, $p = 0,046$), и возрастом. Результаты представлены на Рисунке 3.

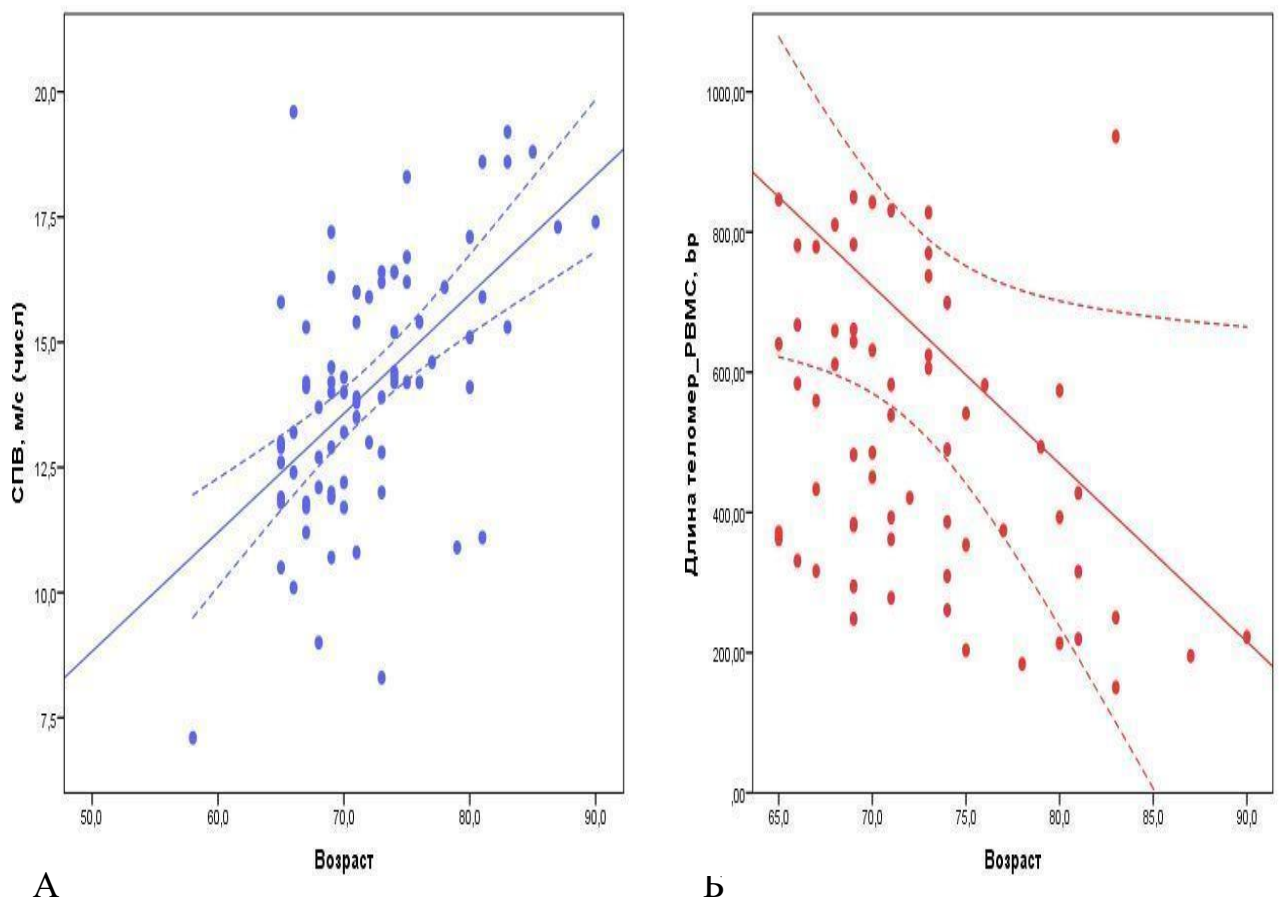


Рисунок 3 – Корреляция между показателями сосудистого старения (СПВ) (А) или длины теломер лейкоцитов (Б) и возраста пациентов, биологические образцы которых были включены в коллекцию

3.4. Изучение связи параметра жесткости магистральных сосудов (скорость пульсовой волны) 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 (Таблица 9).

В качестве изучаемых биомаркеров старения были отобраны следующие показатели в плазме крови: IGF-1, FGF-21, VCAM-1, при этом выявлена значимая отрицательная корреляционная связь между СПВ и уровнем IGF-1.

Таблица 9 – Корреляция СПВ с показателями, отражающими накопление сенесцентных клеток в плазме крови

Параметр	Коэффициент корреляции r-Пирсона	p
Системный кровоток		
IGF-1	-0,318	0,005
FGF-21	0,326	0,004
VCAM-1	0,451	<0,001
Остеопрогерин	0,141	0,231
Ферритин	0,15	0,932
Содержание CD34+ клеток	-0,126	-0,293
p16 мРНК_МНК	0,112	0,503
p21 мРНК_МНК	0,126	0,439

СПВ – скорость пульсовой волны, САД – систолическое аортальное давление, 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

Многофакторный регрессионный анализ подтвердил связь скорости пульсовой волны и показателя фактора роста VCAM-1 независимо от возраста (Таблица 10).

Таблица 10 – Связь СПВ с возрастом и фактором роста - молекулой адгезии сосудистых клеток. Данные многофакторного регрессионного анализа

	S_{β}	t	p
Возраст	-0,0298	-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

IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1, FGF21 – фактор роста фибробластов 21, VCAM-1 – молекула адгезии сосудистых клеток

Согласно нашим данным, изменение уровня VCAM-1 вносило существенный вклад в уровень другого биомаркера старения – длины теломер в лейкоцитах (Таблица 11): независимо от возраста уровень IGF-1 и VCAM-1 влияли на длину теломер в лейкоцитах.

Таблица 11 – Связь длины теломер с факторами роста. Данные многофакторного регрессионного анализа

	B	S _B	t	p
Возраст	3,360	9,464	0,170	0,497
IGF-1	1,767	1,002	0,355	0,089
FGF-21	0,082	0,161	1,764	0,613
ICAM-1	1,251	2,916	0,511	0,671
VCAM-1	-3,275	1,865	0,429	0,090
Остеопрогерин	7,264	18,275	-1,756	0,694
Ферритин	0,121	0,267	0,397	0,654

IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1, FGF21 – фактор роста фибробластов21, VCAM-1 – молекула адгезии сосудистых клеток

Системные биомаркеры сенесцентности (Таблица 12) не продемонстрировали значимых линейных зависимостей с показателями жесткости сосудистой стенки.

Таблица 12 – Связь СПВ с возрастом и биомаркерами сенесцентности в системном кровотоке. Данные многофакторного регрессионного анализа

	B	S _B	t	p
Возраст	0,216	0,478	2,438	0,023
Содержание CD34+клеток, %	-1,995	-0,026	-0,102	0,919
p16 мРНК_МНК, отн.ед.	-0,007	-0,100	-0,401	0,692
p21 мРНК_МНК, отн.ед.	0,011	0,142	0,598	0,556

В результате факторного анализа выделены следующие факторы, объединяющие различные показатели накопления сенесцентных клеток у пациентов исследуемой выборки (КМО=0,68, приемлемая адекватность): p16, показатели клеточной пролиферации, 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) (Таблица 13).

Таблица 13 – Структура взаимосвязей между выделенными биомаркерами сенесцентности на основании факторного анализа

Показатель	Компонент	
	1	2
СПВ, м/с		0,916
p16INK		0,914
МСК_прирост за 96ч		0,653
ФБ_прирост за 96ч		0,596
МСР-1		0,574
ОН		0,561
Длина теломер_МНК, п.о.	0,775	
Содержание CD34+клеток, %	-0,758	
IGF-1, нг/мл	0,751	
VCAM-1, нг/мл	-0,586	
МСК_лаг-фаза, ч	-0,543	
ФБ_лаг-фаза, ч	-0,549	
IL-6_МСК, нг/мл	0,702	
МСР-1_МСК, нг/мл	0,688	

СПВ – скорость пульсовой волны, МНК - моноклеарные клетки крови, IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1, VCAM-1 – молекула адгезии сосудистых клеток, МСК – мезенхимные стволовые/стромальные клетки, ФБ – фибробласты, IL-6 – интерлейкин-6, MCP-1 – белок хемоаттрактант моноцитов 1 типа.

3.5. Изучение связи параметра жесткости сосудов (скорость пульсовой волны) 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 корреляцию выявлена с параметрами МСК-прирост 96ч и ФБ-прирост 96ч, а также слабая корреляция с IL-6, как элементом SASP (Таблица 14).

Таблица 14 – Корреляция СПВ с показателями, отражающими накопление сенесцентных клеток на тканевом и клеточном уровнях

Параметр	Коэффициент корреляции r-Пирсона	p
Ткань		
P16INK	0,394	0,042
Клетки		
МСК_лаг-фаза	0,320	0,057
МСК_прирост за 96ч	-0,418	0,011
p21 МСК	0,160	0,359
H2AX МСК	0,181	0,446

Продолжение Таблицы 14

Бета-гал МСК	0,124	0,479
ФБ_лаг-фаза	0,284	0,168
ФБ_прирост за 96ч	-0,492	0,012
p21 ФБ	-0,010	0,966
Бета-гал ФБ	0,080	0,704
H2AX ФБ	0,336	0,188
SASP		
IL-6, _МСК	0,364	0,032
МСР-1, _МСК	0,280	0,103
РАI-1, _МСК	0,186	0,285
ON, нг/мл _МСК	-0,185	0,287
PEDF, нг/мл _МСК	-0,045	0,799
IL-6_ФБ	0,247	0,267
МСР-1_ФБ	0,125	0,569
РАI-1_ФБ	0,034	0,877
ON_ФБ	0,293	0,175
PEDF_ФБ	0,304	0,158

СПВ – скорость пульсовой волны, МСК – мезенхимные стволовые/стромальные клетки, ФБ – фибробласты, IL-6 – интерлейкин-6, МСР-1 – белок хемоаттрактант моноцитов 1 типа, РАI-1 – ингибитор активатора плазминогена 1 типа, ON – остеоонектин, PЕDF – фактор, полученный из пигментного эпителия.

При дальнейшем более детальном изучении результатов многофакторного регрессионного анализа продемонстрировано, что показатель жесткости артериальной стенки СПВ связан с уровнем экспрессии р16 в тканях независимо от возраста (Таблица 15).

Таблица 15 – Связь p16 с возрастом и параметром жесткости сосудистой стенки. Данные многофакторного регрессионного анализа

	B	S _b	t	ρ	VIF
Возраст	0,221	0,079	2,806	0,011	1,414
СПВ, м/с	0,043	0,169	0,257	0,048	1,414

Клеточные биомаркеры сенесцентности и SASP (Таблица 16) не продемонстрировали значимых линейных зависимостей с показателями жесткости сосудистой стенки.

Таблица 16 – Связь СПВ с возрастом и показателями SASP. Данные многофакторного регрессионного анализа

	B	S _b	t	p
Возраст	0,143	0,245	0,592	0,570
IL-6, нг/мл_МСК	-0,021	-0,170	-0,400	0,700
MCP-1, нг/мл_МСК	-0,019	-0,874	-1,201	0,264
PAI-1, нг/мл_МСК	0,318	0,375	0,753	0,473
ON, нг/мл_МСК	-1,551	-0,493	-0,850	0,420
PEDF, нг/мл_МСК	-0,116	-0,491	-1,634	0,141
IL-6, нг/мл_ФБ	-0,014	-0,223	-0,484	0,641
MCP-1, нг/мл_ФБ	0,006	0,432	0,591	0,571

Продолжение Таблицы 16

РАI-1, нг/мл_ФБ	0,607	0,554	1,390	0,202
ON, нг/мл_ФБ	1,425	0,520	2,037	0,076
РЕDF, нг/мл_ФБ	0,024	0,103	0,336	0,745

МСК – мезенхимные стволовые/стромальные клетки, ФБ – фибробласты, ИЛ-6 – интерлейкин-6, MCP-1 – белок хемоаттрактант моноцитов 1 типа, РАI-1 – ингибитор активатора плазминогена 1 типа, ON – остеоонектин, РЕDF – фактор, полученный из пигментного эпителия.

При этом при оценке ряда биомаркеров накопления сенесцентных клеток в подгруппах СПВ выше и ниже медианы выявлены статистически значимые различия. Паспортный возраст в подгруппах не различался (Таблица 17).

Таблица 17 – 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)	Статистический критерий	р
Возраст, лет	70,17±6,34	73,42±5,25	Т-критерий Стьюдента	0,154
SCORE2&SCORE- OP (балл) M±SD	26,4±3,31	27,1±2,84	Т-критерий Стьюдента	0,124

Продолжение Таблицы 17

Ткани (n=41)				
p16INK, кл/мм ²	5,046±1,909	3,815±1,865	T-критерий Стьюдента	0,049
Клетки (n=41)				
МСК-Лагфаза, ч	30,363±5,753	26,143±3,613	T-критерий Стьюдента	0,020
МСК-прирост 96ч	54,333±15,622	61,667±6,221	T-критерий Стьюдента	0,096
ФБ_Лаг-фаза, ч	27,714±6,126	21,534±4,130	T-критерий Стьюдента	0,045
ФБ-прирост 96ч	67,214±12,534	82,636±7,406	T-критерий Стьюдента	0,001
SASP (n=41)				
IL-6, нг/мл_МСК	45,693±36,192	28,289±18,316	T-критерий Стьюдента	0,070

Результаты многофакторного линейного регрессионного анализа также показали, что клеточный биомаркер ФБ-прирост 96ч связан с СПВ независимо от возраста (Таблица 18).

Таблица 18 – Связь СПВ с биомаркерами накопления сенесцентных клеток. Данные многофакторного регрессионного анализа

	B	S_b	t	p
Возраст	0,144	0,142	0,651	0,049
ФБ-прирост 96ч	-0,411	0,047	-1,853	0,048

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

Как уже продемонстрировано ранее, уровень экспрессии p16 в тканях связан с показателем жесткости сосудистой стенки независимо от возраста (Таблица 15). Аналогичные данные получены и для показателя клеточной пролиферации (Таблица 19).

Таблица 19 – Связь p16 с возрастом и показателем пролиферации клеток. Даннымногофакторного регрессионного анализа

	B	S _b	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 20).

Таблица 20 – Связь p16 с возрастом и показателями SASP. Данные многофакторного регрессионного анализа, скорректированный R² 0,724

	B	S _b	t	p
Возраст	0,197	0,072	2,756	0,015
IL-6, нг/мл_ФБ	0,028	0,009	3,145	0,007

МСР-1, нг/мл_ФБ	-0,004	0,002	-2,302	0,049
РАI-1, нг/мл_ФБ	0,074	0,108	0,685	0,504

ФБ – фибробласты, ИL-6 – интерлейкин-6, МСР-1 – белок хемоаттрактант моноцитов 1 типа, РАI-1 – ингибитор активатора плазминогена 1 типа.

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 (Таблица 21). В то же время нет достоверной связи уровня p16 с уровнем p21 в крови ($r=0,201$, $p=0,208$). Модель линейной регрессии для p21 построить не удалось.

Таблица 21 – Корреляция p16 с показателями, отражающими накопление сенесцентных клеток в плазме

Параметр	Коэффициент корреляции r-Пирсона	p
Системный кровоток		
Длина теломер_РВМС, bp	-0,148	0,382
cd34+%	-0,170	0,315
p16 мРНК	0,380	0,046
p21 мРНК	0,201	0,288
IGF-1	-0,154	0,362
FGF-21	0,247	0,141

Продолжение Таблицы 21

VCAM-1	0,312	0,006
Остеопрогерин	-0,052	0,768
Ферритин	0,061	0,719

IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1, FGF21 – фактор роста фибробластов21, VCAM-1 – молекула адгезии сосудистых 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 (Таблица 22). Для анализа накопления сенесцентных клеток в популяциях выделенных из тканей пациентов клеток дополнительно проводили оценку содержания в среде культивирования МСК и ФБ ряда секретлируемых клетками факторов, которые относят к SASP, методом иммуноферментного анализа.

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, выражено 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 ($r=0,433$, $p=0,008$).

Пролиферативный 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.

В нашей работе также зафиксирована повышенная активность ассоциированной со старением β -галактозидазы в культуре сенесцентных клетки 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.

Таблица 22 – Корреляция p16 с показателями, отражающими накопление сенесцентных клеток на клеточном уровне

Параметр	Коэффициент корреляции r-Пирсона	p
Клетки		
МСК_Лаг-фаза, ч	0,433	0,008
МСК-прирост 96ч	-0,569	0,000
Длина теломер МСК	-0,300	0,076
Теломераза МСК	-0,202	-
P21	0,134	0,444
H2AX	0,078	0,743
Бета-гал МСК	0,280	0,098
ФБ_Лаг-фаза, ч	0,290	0,168
ФБ-прирост 96ч	-0,546	0,006
Длина теломер ФБ	-0,210	0,314
Теломераза ФБ	-0,058	0,784
Бета-гал ФБ	0,380	0,051

Мы не обнаружили выраженных корреляций экспрессии H2AX в клетках с уровнем экспрессии p16 в тканях. Но при этом выявлена средней силы корреляция между уровнем экспрессии H2AX в ФБ и экспрессией p21 ($r=0,689$, $P=0,013$), а также с показателями пролиферации ФБ: для лаг-фазы ($r=0,563$, $P=0,019$), и для показателя прироста клеток за 96ч ($r=-0,639$,

$P=0,006$) (Рисунок 4). При изучении SASP МСК и ФБ 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 (Рисунок 5).

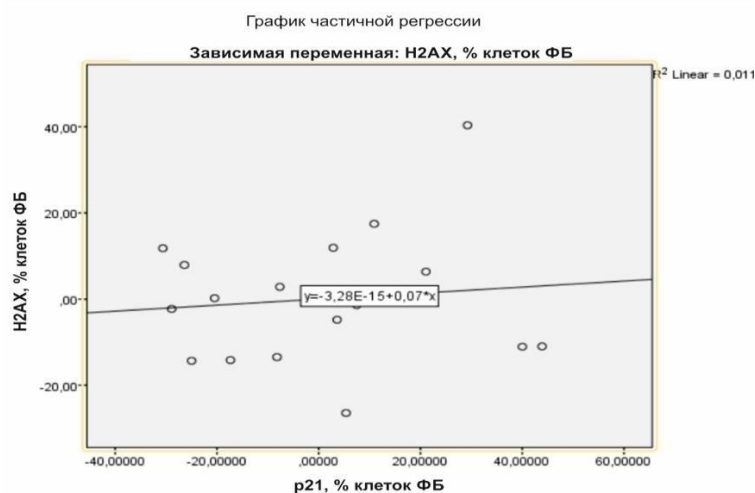


Рисунок 4 – График линейной регрессии, где зависимая переменная уровень экспрессии H2AX в ФБ, независимая переменная уровень экспрессии p21 в ФБ

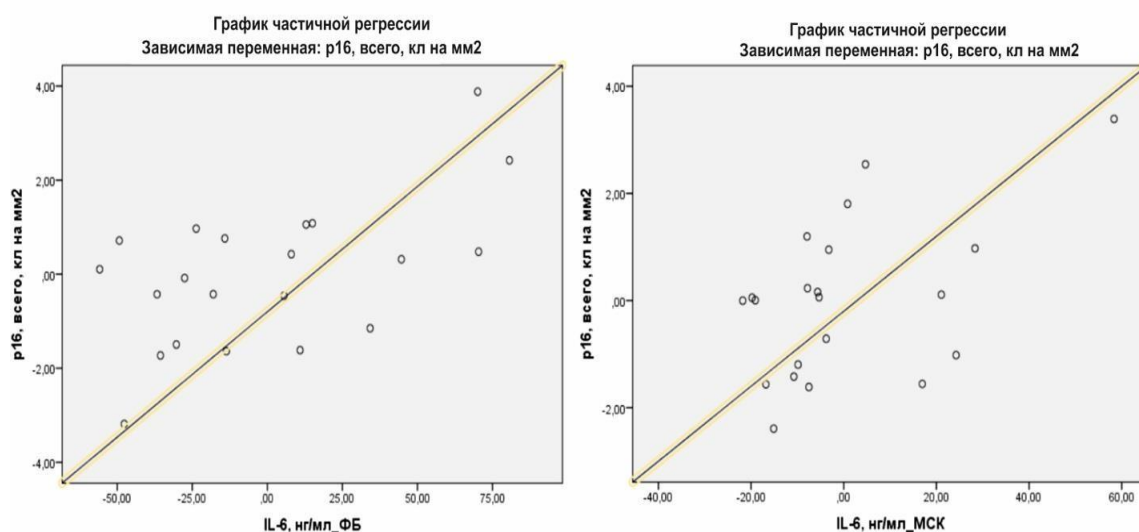


Рисунок 5 – График линейной регрессии, где зависимая переменная уровень экспрессии p16, независимые переменные: уровень секреции IL-6 ФБ и МСК

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 23).

Таблица 23 – Связь экспрессии p16 с показателями клеточной пролиферации и уровнем SASP (IL-6). Данные многофакторного регрессионного анализа

	B	S _b	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 (R^2 0,753, скорректированный R^2 0,727):

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

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 R^2 0,344):

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

Таким образом, данная формула позволяет предсказывать уровень экспрессии p16 в тканях, опираясь только на неинвазивно определяемые показатели (Рисунок 6).

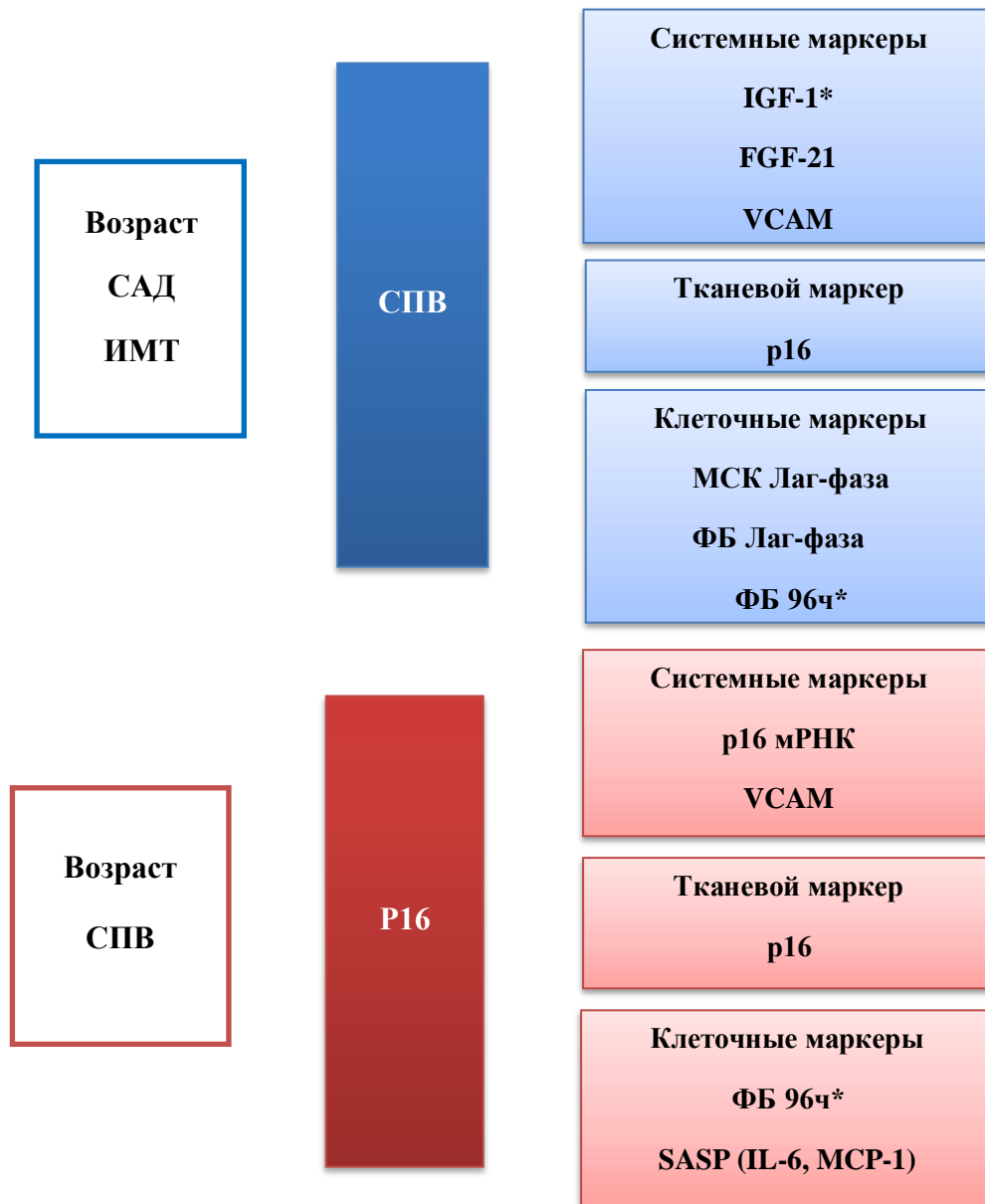


Рисунок 6 – Корреляции между клиническим биомаркером сосудистого старения СПВ и биомаркерами накопления сенесцентных клеток на плазменном, тканевом и клеточном уровнях (* – отрицательная связь)

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Создание уникальной биологической коллекции, включающей биологические образцы различного типа, полученные от пациентов старшей возрастной группы, оказалась трудной и интересной задачей, которая была с успехом реализована. На каждом этапе от планирования исследования и организации процесса до этапов хранения и поддержания процесса набора биоматериала был выявлен ряд сложностей: для части из них находились простые решения, для некоторых обсуждение оптимального выхода продолжается до сих пор.

Ниже обсуждены ключевые вопросы, которые необходимо учитывать при разработке методических подходов и рекомендаций в области биобанкирования при создании подобных коллекций.

Конфиденциальность и безопасность VS доступность данных

Одной из целей организации биобанков является широкая доступность накопленной и качественно собранной информации для исследователей в дальнейшем. В то же время при формировании и хранении больших данных исследователи сталкиваются с проблемой поиска методов защиты персональных данных. В нашем случае мы выбрали систему кодирования данных, где в индивидуальном коде пациента указывался доступ к результатам анамнеза, лабораторных и инструментальных данных без предоставления информации об индивидуальных персональных данных.

При создании системы индивидуального кодирования следует учитывать количество символов в одном коде и возможность перевода буквенного/цифрового кода в штрих-код. Помимо увеличения риска технических ошибок, мы столкнулись с проблемой, что на определенных этапах лабораторных исследований маркировка биообразцов была ограничена (длинный код сложно указать на ограниченном пространстве). Это потребовало введения новой упрощенной системы кодирования уже по

ходу проведения исследования, и осложнило работу в дальнейшем из-за необходимости соотносить данные от нескольких систем кодирования.

Информированность пациентов

В информированных согласиях мы предоставили пациентам возможность самостоятельно выбрать и указать ограничения, в которых биоматериалы и данные могут/не могут быть использованы. Такая формулировка позволяет пациентам занимать активную позицию, вовлекаться в процесс обсуждения исследования и разделять ответственность.

Также мы отметили, что с учетом низкого уровня информированности населения о правилах, целях и особенностях создания биобанков в России, пациентам требуется дополнительная информационная поддержка и после подписания ИС. Предпочтительным оставалось индивидуальное общение с лечащим врачом или научным сотрудником, в то время как бумажные и электронные ИС не предоставляли полной информации, поскольку запросы пациентов значительно превышали требования к ИС. Мы полагаем, что необходимо создание универсальных бумажных и электронных брошюр для пациентов по соответствующей тематике, а также отдельное создание пула ответов на наиболее частые вопросы, касающиеся безопасности пациентов при участии в донорстве биоматериала (например, бот-система).

Передача образцов, отслеживание и маркировка

Необходимым условием для организации набора биообразцов является наличие нескольких лечебных и диагностических профилей медицинского учреждения на одной территории. Для улучшения качества взаимодействия между подразделениями, передачи и контроля движения биологического материала мы создавали и активно использовали электронные средства коммуникации (системы быстрых уведомлений мессенджеров), что позволяло оперативно информировать о текущей ситуации всех участников исследования. Это особенно важно в случае

необходимости быстрой передачи биоматериалов в другие подразделения, например, для выделения клеточных линий, когда от скорости этого процесса зависит эффективность выделения и жизнеспособность клеток.

Кроме того, мы активно использовали несколько типов систем обратной связи для оперативного корректирования тактики по тому или иному пациенту.

Дублирование электронных лабораторных направлений бумажными имело как преимущества, так и недостатки (например, сложная маркировка тяжело наносилась на часть материалов, но она же позволяла не дублировать забор крови, если пациенту необходимо было плановое обследование в рамках госпитализации), поэтому в данном вопросе окончательный консенсус между подразделениями еще не достигнут.

Даже в условиях территориальной доступности всех отделений-участников исследования между собой, наличия инфраструктуры биобанка и продуманной системы маркировки, мы сталкивались с непредвиденными логистическими и организационными проблемами, которые нам не удавалось предвидеть заранее.

Так, путь биоматериала был организован по конвейерной схеме, когда каждый следующий этап предполагал успешное прохождение предыдущего (забор материала в операционной осуществлялся только после того, как пациент прошел двойную систему контроля соответствия критериям включения/исключения). Однако, возникали ситуации, когда результаты исследования приходили позднее проведенных последующих манипуляций: гемолиз крови в пробирке, не удалось взять материал во время оперативного вмешательства в связи с объективными сложностями, во время операции выявляли заболевание, препятствующее участию пациента в исследовании. Это приводило к тому, что в данных на некоторых пациентов появлялись пропуски, которые невозможно было заполнить, что влияло и на статистическую обработку, и на аналитическую справку при работе с базой. Использование сложных статистических методов при анализе результатов

позволяет корректировать эти проблемы, однако, при определенных дизайнах исследований такие особенности могут создать сложности, что необходимо учитывать при работе с биологическими коллекциями.

Контроль качества на различных этапах исследования

По мере проведения исследования и прохождения всех этапов создания подобной коллекции стало очевидно, что необходима дополнительная опция контроля качества проведения каждой фазы исследования. В первую очередь, это касалось клинических подразделений. В частности, необходимо было провести калибровку по минимально необходимому количеству крови/ткани для различных отделений. Так, например, забор кожи и жировой ткани технически значимо отличался при различных оперативных вмешательствах (изначально обязательным условием было только неиспользование коагулятора при заборе ткани и ее характер), в дальнейшем потребовалось введение дополнительных разъяснений по забору по каждому типу оперативного вмешательства. Благодаря своевременной информационной поддержке научного отдела и оперативным перестроениям работы клинических отделов большинство данных задач были решены.

В наше исследование мы включили пациентов пожилого и старческого возраста без декомпенсированных заболеваний и оценили связь жесткости магистральных артерий, измеренной с помощью СПВ, с традиционными факторами риска повышения артериальной жесткости. 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 ($r=-0,315$, $p=0,056$). Полученные данные согласуются с представленными в литературе результатами [269-271]. 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.

Основной гипотезой нашего исследования было предположение о наличии связи между жесткостью сосудистой стенки и известными биомаркерами накопления сенесцентных клеток, независимой от паспортного возраста. Первое подтверждение обоснованности такого предположения мы получили при проведении факторного анализа. Возраст не вошел в число выделенных факторов, объединяющих различные показатели накопления сенесцентных клеток у пациентов исследуемой выборки. Взаимная связь была показана для IGF-1, длины теломер PVMC, VCAM-1, cd34+, СПВ, p16INK4a (КМО=0,68, приемлемая адекватность).

Плазменные биомаркеры накопления сенесцентных клеток

В рамках нашего исследования мы оценили содержание в периферическом кровотоке ряда секретируемых стареющими клетками факторов. Так, IGF-1 участвует в эндокринной, аутокринной и паракринной регуляции процессов роста, развития и дифференцировки клеток и тканей организма. Точная роль IGF-

1 в старении человека и возраст-ассоциированных заболеваниях до конца не определена. Ряд исследований дают некоторое понимание возможного вклада этого фактора в старение организма, но имеющиеся на сегодня данные достаточно противоречивы [272; 273]. 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 [274].

Средний уровень IGF-1 в плазме крови нашей выборки соответствовал возрастной норме. Важным результатом нашей работы можно считать выявление значимой взаимосвязи IGF-1 с основным показателем жесткости артериальной стенки у пожилых людей. Эти результаты становятся понятны, если учесть, что IGF-1 оказывает существенное влияние на

сердечно-сосудистую систему, стимулируя рост кардиомиоцитов и гладкомышечных клеток в сосудистой стенке [275]. При этом более высокий уровень IGF-1 определялся у пациентов с СПВ менее 14м/с (т.е. с менее жесткими сосудами). 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.

Недавние исследования показали, что FGF21 играет ключевую роль в ремоделировании сердца и сосудистой стенки: экспрессия FGF21 защищает от патологической гипертрофии сердца, окислительного стресса и инфаркта миокарда [276-278]. В миокарде FGF21 действует как аутокринный гормон и контролирует аутофагию при кардиомиопатии, вызванной ожирением [279- 281].

Привлечение и адгезия моноцитов к эндотелию играют решающую роль в инициации атеросклероза. VCAM-1 косвенно отражает степень повреждения сосудистой стенки [282], и в исследованиях показана взаимосвязь уровня VCAM и ICAM с СПВ [283].

Но в то же время FGF21, наряду с IGF-1 и VCAM рассматриваются сегодня в панели биомаркеров, отражающих «старческую хрупкость» организма и изучаются в рамках теории сенесцентности [270; 284]. 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 [285]. Уровень VCAM и ICAM повышается у пациентов пожилого возраста вне зависимости от наличия или отсутствия факторов сердечно-сосудистого риска [286].

Мы в своем исследовании также продемонстрировали корреляцию между СПВ и FGF21 ($r=0,326$, $p=0,004$) и СПВ и VCAM-1 ($r=0,451$, $p<0,001$), что

отражает взаимосвязь уровня данных молекул в крови с жесткостью магистральных сосудов [287]. В группе СПВ выше 14 м/с концентрация FGF2 и VCAM-1 были выше, по сравнению с группой СПВ ниже 14 м/с, при условии отсутствия отличий между группами по возрасту. В отношении VCAM-1 данные о независимой от возраста связи с СПВ подтверждены множественным регрессионным анализом. В целом, эти данные согласуются с предположением о возможности рассмотрения жесткости магистральных сосудов в качестве показателя, отражающего системное старение организма.

Биомаркеры, отражающие накопление сенесцентных клеток в тканях

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 экспрессии p16 достоверно коррелирует с возрастом и рядом факторов риска ССЗ [288]. В нашей работе продемонстрирована независимая положительная связь уровня p16 в тканях у пациентов пожилого и старческого возраста без онкологических заболеваний 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 единый параметр, отражающий старение организма. Таким образом, можно сказать, что жесткость сосудистой стенки и биомаркер сенесцентных клеток p16 нарастают по мере старения организма, а кроме того оба показателя взаимосвязаны между собой, поскольку отражают разные стороны одного процесса старения.

Биомаркеры, отражающие накопление сенесцентных клеток в отдельных клеточных популяциях

В рамках исследования мы выделяли в культуру МСК и ФБ из тканей пациентов и исследовали выраженность биомаркеров сенесцентных клеток в этих популяциях. В качестве биомаркеров 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 [289; 290]. 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. Также 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 [291].

В наше исследование мы включили пациентов пожилого и старческого возраста, без декомпенсированных заболеваний, и подтвердили, что уровень ингибитора клеточного цикла p16, определяемый в ткани, статистически значимо связан с возрастом. Полученные данные согласуются с результатами, представленными в литературе [292].

Также мы продемонстрировали корреляцию между уровнем p16 в ткани и независимым показателем старения сосудистой стенки – СПВ, который мы рассматриваем как организменный биомаркер развития возраст-ассоциированных заболеваний. По результатам многофакторного регрессионного анализа также подтверждено статистически значимое влияние СПВ на уровень p16 независимо от возраста.

Наибольшее внимание было сконцентрировано на показателях, которые можно определить в периферической крови, поскольку это наиболее доступный, неинвазивный, воспроизводимый и экономичный метод диагностики. В качестве возможных биомаркеров сенесцентных клеток в системном кровотоке мы рассматривали определение уровня блокаторов клеточного цикла (p16, p21) в МНК, содержание специфических факторов роста (IGF-1, FGF-1, VCAM-1, остеопрogerин и ферритин) в кровотоке, а также такие показатели как содержание CD34+клеток и длину теломер в лейкоцитах. Оценить количество CD3+p16+ клеток методом проточной цитометрии не удалось. Поэтому мы оценивали уровни мРНК p16 и p21 методом ПЦР, учитывая, что согласно данным [293] Liu et al (2009), такой биомаркер, как уровень экспрессии p16 в CD3+ фракции Т-лимфоцитов периферической крови, может быть определен как в виде белка, так и мРНК, поскольку эти показатели хорошо коррелируют друг с другом [293].

Как уже говорилось выше, p16(INK4a) и p21(WAF1) представляют собой два независимых ингибитора циклинзависимой киназы, которые участвуют в блоке клеточного цикла. Как видно из Рисунка 7, напрямую эти два белка не взаимосвязаны между собой, но могут быть связаны опосредованно.

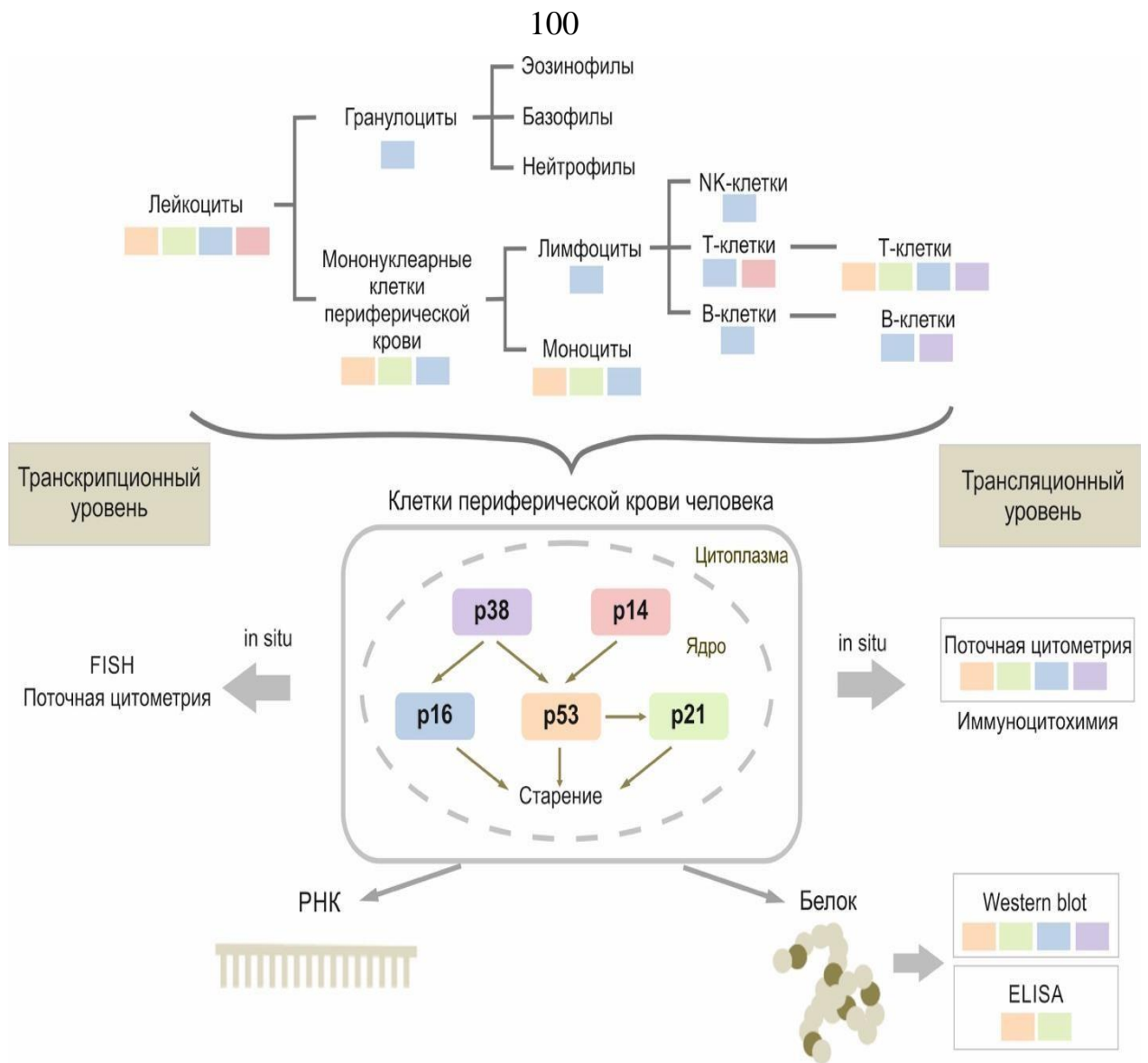


Рисунок 7 – Участие белков-ингибиторов циклинзависимых киназ в регуляции клеточного цикла (рисунок из статьи Guan et al., 2022)

Так, в исследованиях показано, что белок p16 положительно контролирует экспрессию p21 как в клетках человека, так и в мышечных клетках [294]. В то же время считается, что p21 играет роль в инактивации фактора репликации ДНК при раннем старении, а уже после запуска процессов старения уровень p21 снижается, и активации только p16 достаточно для поддержания остановки цикла сенесцентных клеток [295]. По этой причине ряд исследователей предлагает рассматривать биомаркером не уровень p21, а изменения соотношения p16/p21 у одного пациента в динамике для оценки уровня сенесцентных клеток [296].

Одним из косвенных биомаркеров накопления сенесцентных клеток в организме человека может служить показатель содержания в периферическом кровотоке ряда секретируемых стареющими клетками факторов (такими как уровень отдельных цитокинов и факторов роста в крови, включая компоненты SASP IL-6, MCP-1, активин А, IGF1, остеопонтин и др.). Поэтому была проведена оценка содержания в плазме крови пациентов, включенных в исследование, некоторых релевантных факторов (IGF-1, FGF-21, остеопрogerин, ферритин, растворимые VCAM-1 и ICAM-1). Среди растворимых показателей крови слабая, но статистически значимая положительная корреляция уровня p16 в тканях выявлена только с уровнем молекулы адгезии сосудистого эндотелия VCAM-1 ($r=0,312$, $p=0,006$). VCAM-1 косвенно отражает степень повреждения сосудистой стенки при старении [297] и считается неспецифическим биомаркером поражения сосудов.

Интересно отметить, что согласно нашим данным, изменение уровня VCAM-1 вносило существенный вклад в уровень другого биомаркера старения – длины теломер в лейкоцитах, так, независимо от возраста уровень IGF-1 и VCAM-1 влияли на этот параметр. Укорочение длины теломер в лейкоцитах рассматривается как один из нескольких путей инициации и поддержки процесса старения в организме. Показано, что длина теломер в лейкоцитах и активность теломеразы, наличие СНР-синдрома и атеросклероз – это основные факторы, влияющие на развитие ССЗ на клеточном уровне [298].

Теломеры – это повторяющиеся последовательности (TTAGGG) $_n$ на концах хромосом эукариотических клеток. Теломеры и теломераза обеспечивает полную репликацию хромосомной ДНК и предотвращает повреждения концов хромосом при делении клетки. При этом за каждый цикл деления теломера укорачивается на 50–100 пар оснований [299]. Когда теломеры укорачиваются до критической длины, возникает нестабильность генома, и активируется система репарации ДНК, что вызывает остановку

репликации, старение и гибель клеток [300-302] увеличение же длины теломер в лейкоцитах ассоциировано с риском развития различных видов рака [303; 304].

Многие крупные эпидемиологические исследования подтвердили взаимосвязь между длиной теломер периферических лейкоцитов и ССЗ [305-308]. ССЗ и укорочение теломер имеют много общих факторов риска, включая сахарный диабет, гипертонию, дислипидемию, ожирение и курение. Активный окислительный стресс и хроническое воспаление в свою очередь также являются важными факторами, способствующими укорочению теломер и развитию ССЗ [309; 310].

Barberie с соавт. показывали, что как циркулирующий в крови IGF-1, так и длина теломер лейкоцитов являются показателями здорового старения у людей [311]: так, и IGF-1, и длина теломер уменьшались с возрастом (IGF-1, $r=-0,601$, $P<0,001$; длина теломер, $r=-0,706$, $P<0,001$), а скорректированная по возрасту длина теломер была положительно связана с уровнем IGF-1 во всем возрастном диапазоне когорты.

Показано значительное укорочение теломер в эндотелиальных клетках в зонах атеросклеротического поражения, а также появление биомаркеров старения (бета-галактозидазы, ассоциированной со старением) в крови. Увеличение жесткости сосудистой стенки и изменение ее физических характеристик (сдвиг напряжения) индуцируют выработку белков адгезии (VCAM и ICAM) [312], поэтому логичны полученные результаты зависимости длины теломер и выработки белка VCAM в нашем исследовании.

Таким образом, если укорочение теломер клеток организма, вероятно, является одним из нескольких путей запуска и поддержки процесса старения, то изменение содержания факторов роста в периферическом кровотоке и других показателей крови – его очевидное системное проявление. Однако, рассматривая наши и литературные данные [296], можно предположить, что в поддержании процесса старения через

активацию уровня p16 напрямую они не участвуют и скорость формирование пула сенесцентных клеток не отражают.

Другим перспективным биомаркером 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 биомаркером раннего субклинического атеросклероза у здоровых людей и может дать дополнительную информацию о возраст-ассоциированных изменениях даже без учета влияния классических факторов риска и воспалительных биомаркеров [313].

Отсутствие прямых корреляций между уровнем p16 и длиной теломер и содержанием CD34+клеток можно объяснить наличием нескольких параллельных процессов инициации и поддержки старения в организме. Это предположение подтверждается распределением в факторном анализе. Параметры возраста, p16, VCAM-1 и IGF-1, показатели клеточной пролиферации, SASP (IL-6, PAI-1) определены в одну группу, что может свидетельствовать о сходных тенденциях изменений. А длина теломер в лейкоцитах, процент CD34+ клеток и содержание VCAM-1 и IGF-1 в кровотоке, показатели клеточной пролиферации и другие показатели SASP (MCP-1, ON) определены в другую группу. То есть факторы роста и показатели клеточной пролиферации изменяются в ответ на изменения в разных путях старения, но механизмы при этом задействованы разные, в том числе в контексте приобретения клетками сенесцентного секреторного фенотипа (SASP).

В качестве биомаркеров сенесценции на уровне клеточной популяции мы рассматривали показатели пролиферативного потенциала клеток, выделенных из тканей пожилых пациентов в культуру, уровень бета-галактозидазы, длину теломер в лейкоцитах и активность теломеразы, уровень экспрессии p21, а также показатели SASP и экспрессии H2AX как признанных биомаркеров раннего клеточного старения и повреждения ДНК.

При этом анализировали клеточные популяции как дифференцированных специализированных клеток (ФБ), так и популяции, содержащие мультипотентные стволовые клетки (МСК).

И для МСК, и для ФБ показатели пролиферативной активности выражено коррелировали с уровнем p16 в тканях. Пролиферативный клеточный потенциал ожидаемо снижается у пожилых пациентов, и мы показали корреляцию этих параметров с уровнем тканевого биомаркера накопления сенесцентных клеток. Данные линейной регрессии также подтвердили, что показатели клеточной пролиферации связаны с уровнем p16 независимо от возраста. Интересно, что аналогичная связь показана для МСК и с уровнем содержания CD34+клеток в кровотоке, что может отражать общее системное влияние старения на пул стволовых и прогениторных клеток в разных тканях организма.

Dimri с соавт. показал, что сенесцентные клетки экспрессируют ассоциированную со старением β -галактозидазу, ее появление обусловлено увеличением количества и размера лизосом в стареющих клетках, и она не обнаруживается в покоящихся или дифференцированных клетках [314; 315]. Сегодня β -галактозидаза – это один из наиболее широко используемых биомаркеров для идентификации стареющих клеток *in vitro* и *in vivo* [315-317]. Зафиксирована продукция ассоциированной со старением β -галактозидазы в культуре сенесцентных клеток и определены корреляции между p16 и β -галактозидазой в ФБ и МСК на уровне тенденции.

В клетках, подвергнутых действию агентов, вызывающих разрыв двухцепочечной ДНК, таких, например, как ионизирующее излучение, гистон H2AX фосфорилируется по S139. S139 фосфорилированный H2AX, называемый (гамма-H2AX), отмечает сайт двухцепочечных разрывов ДНК и служит для привлечения контрольной точки клеточного цикла и факторов репарации ДНК к месту повреждения. Поскольку при старении система репарации ДНК значительно нарушена, этот белок служит одним из биомаркеров сенесцентных клеток. Contrepois с соавт. показали, что уровень

фосфорилирования гистона H2AX повышается в фибробластах человека при старении из-за постоянного повреждения ДНК. Продемонстрирована аккумуляция H2AX при старении в тканях у мышей и в коже человека. Нокдаун H2AX ингибирует экспрессию воспалительных генов, которые формируют SASP, а сверхэкспрессия H2AX увеличивает экспрессию некоторых из этих генов в пролиферирующих клетках. Таким образом, повышенный уровень H2AX участвует во взаимодействии сенесцентных клеток друг с другом через SASP, а также вносит свой вклад в хроническое воспаление и развитие заболеваний, ассоциированных со старением[318].

Отсутствие выраженных корреляций экспрессии H2AX в клетках и p16 в тканях в нашей работе, с одной стороны, может говорить о разной динамике активации процессов клеточного старения, которые отражают эти белки. Но при этом выявлена средней силы корреляция между уровнем H2AX в ФБ и экспрессией p21, а также с показателями пролиферативной активности ФБ, что также указывает на вклад нескольких параллельных путей активации клеточного старения.

Как уже говорилось выше, несмотря на арест клеточного цикла, сенесцентные клетки метаболически активны и могут влиять на свое микроокружение [319; 320] за счет изменений в своем секретоме, включая экспрессию различных белков, таких как цитокины, интерлейкины, хемокины, протеазы, матриксные металлопротеазы [321]. Этот фенотип позволяет стареющим клеткам коммуницировать с соседними клетками, что называется секреторным фенотипом, ассоциированным со старением (SASP) [322-324].

Основная функция SASP заключается предположительно в уничтожении стареющих клеток. Считается, что SASP развился как способ общения стареющих клеток с иммунной системой (потенциально для облегчения их собственной очистки), а также как внеклеточный сигнал, способствующий регенерации тканей посредством стимуляции

близлежащих клеток-предшественников [325]. Факторы SASP играют положительную роль в постнатальном периоде, ускоряя заживление ран, участвуя в амплификации и распространении стареющих клеток, для подавления онкогенеза, способствуя элиминации стареющих клеток [326-328].

Ранее исследовали SASP в фибробластах человека, определив такие факторы SASP, как лиганды семейства MCP-1, фактор роста эндотелия сосудов и MCP20, интерлейкины и ряд других белков, для некоторых из них были идентифицированы определенные функции. Так, было продемонстрировано, что посредством интерлейкинов контролируется экспрессия SASP, за счет этого SASP может вызывать паракринное старение в клетках микроокружения [329]. Во многих исследованиях, в том числе в наших ранних работах, также было показано, что МСК, выделенные из жировой ткани пожилых пациентов, приобретают признаки клеточного старения, включая SASP [330].

Jurk с соавт. изучали корреляцию между хроническим воспалением в организме с повышенным содержанием интерлейкинов и хемокинов, и патологическим старением. Было показано, что хроническое воспаление усугубляет дисфункцию теломер и клеточное старение, приводит к снижению регенеративного потенциала многих тканей и ускоряет старение клеток у мышей [331].

Однако, изучение SASP наиболее информативно на выделенных клеточных культурах, поскольку отсутствует погрешность появления воспалительных факторов из системного кровотока или окружающих тканей. В нашем исследовании были выявлены средней силы корреляции между уровнем p16 и секрецией IL-6 МСК и ФБ, что подтвердилось и при построении линейной регрессии. Сходные данные были получены на хондроцитах при изучении SASP. Благодаря другому дизайну исследования, по результатам своей работы авторы делают вывод, что хотя и экспрессия p16 является биомаркером сенесцентных клеток, но эффекты старения

хондроцитов, скорее обусловлены продукцией компонентов SASP, чем потерей репликативной функции этих клеток [332]. Таким образом, они подтверждают косвенно паракринный вклад SASP в развитие старения.

Отдельно следует отметить вклад MCP-1 и PAI-1 как важных факторов SASP в развитии сердечно-сосудистого старения. Стареющие эндотелиальные клетки продуцируют огромное количество воспалительных факторов, наряду с интерлейкинами также выделяют MCP-1, TNF и другие медиаторы, которые способствуют атеросклерозу и тромбозу, а также молекулы клеточной адгезии, такие как VCAM-1 и PAI-1 [333]. Продукция этих молекул индуцирует привлечение моноцитов, циркулирующие моноциты проникают в субэндотелиальное пространство, поглощают ЛПНП и превращаются в пенистые клетки [334]. Как пенистые клетки, так и эндотелиоциты с SASP высвобождают избыток хемотаксических белков, включая интерлейкин-1, фактор некроза опухоли и MCP-1, что приводит к рекрутированию иммунных клеток и образованию атеросклеротических бляшек [335], а активация PAI-1 приводит к локальному тромбообразованию [335]. В Таблице 20 показаны результаты нашего исследования, которые указывают на выраженную корреляцию между уровнем MCP-1 и уровнем экспрессии p16 как биомаркера накопления сенесцентных клеток, что согласуется с высоким уровнем встречаемости ССЗ в выборке.

Важным итогом нашей работы стала демонстрация репрезентативности такого параметра, как уровень экспрессии p16 в тканях, в качестве показателя накопления сенесцентных клеток в организме. Используя множественный регрессионный анализ, мы предложили две математических модели для определения данного параметра в тканях по уровню других биомаркеров накопления сенесцентных клеток, определяемых неинвазивными методами и доступных в клинической практике.

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 ($r=0,334$, $p=0,048$), ИМТ ($r=0,421$, $p=0,005$), 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. Паспортный возраст имел слабую связь с длиной теломер мононуклеарных клеток ($r= - 0,244$, $p<0,001$), фибробластов ($r=-0.381$, $p=0,022$) и МСК ($r=-0,382$, $p=0,046$).
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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АГ – артериальная гипертензия
- АД – артериальное давление
- АПФ – ангиотензинпревращающий фермент
- БРА – блокаторы рецепторов ангиотензина
- ДАД – диастолическое артериальное давление
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИБС – ишемическая болезнь сердца
- ИМТ – индекс массы тела
- ИС – информированное согласие
- ЛПВП – липопротеины высокой плотности
- ЛПНП – липопротеины низкой плотности
- МСК – мезенхимные стволовые/стромальные клетки
- ОХС – общий холестерин
- ПД – пульсовое давление
- ПЦР - полимеразная цепная реакция
- САД – систолическое артериальное давление
- СПВ – скорости распространения пульсовой волны
- ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
- ФБ – фибробласты
- ФСБ – фосфатно-солевой буфер
- ХБП – хроническая болезнь почек
- ХСН – хроническая сердечная недостаточность
- ЧСС – частота сердечных сокращений
- EVA – early vascular aging

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)

FGF21 – фактор роста фибробластов 21 (fibroblast growth factor 21)

MCP-1 – белок хемоаттрактант моноцитов 1 типа (monocyte chemoattractantprotein-1)

ON – остеоонектин (osteonectin)

PAI-1 – ингибитор активатора плазминогена 1 типа (plasminogen activator inhibitor-1)

PBMC – мононуклеарные клетки периферической крови человека

PEDF – фактор, полученный из пигментного эпителия (pigment epithelium-derivedfactor)

SA- β gal – ассоциированная со старением β -галактозидаза

SAHF – ассоциированные со старением гетерохроматиновые фокусы

SASP – специфический секреторный фенотип, ассоциированный со старением (senescence-associated secretory phenotype)

VCAM-1 – молекула адгезии сосудистых клеток (vascular cell adhesion molecule)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bull World Health Organ. – 2019. – N 97(1). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30618467/>
2. Takashima, N. The relationship of brachial-ankle pulse wave velocity to future cardiovascular disease events in the general Japanese population: the Takashima Study. / N. Takashima, T. C. Turin, K. Matsui et al. // J Hum Hypertens. – 2014. – Vol. 28(5). P. 323-7.
3. Zanolli, L. Arterial Stiffness in the Heart Disease of CKD. / L. Zanolli, P. Lentini, M. Briet // J Am Soc Nephrol. – 2019. – Vol. 30(6). – P. 918-928.
4. Ohishi, M. The combination of chronic kidney disease and increased arterial stiffness is a predictor for stroke and cardiovascular disease in hypertensive patients. / M. Ohishi, Y. Tatara, N. Ito et al. // Hypertens Res. 2001. – Vol. 34. – P. 1209-1215.
5. Blacher, J. Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. / J. Blacher, A. P. Guerin, B. Pannier et al. // Circulation. 1999. – Vol. 99. – P. 2434–2439.
6. Shoji, T. Diabetes mellitus, aortic stiffness and cardiovascular mortality in end-stage renal disease. / T. Shoji, M. Emoto, K. Shinohara et al. // J Am Soc Nephrol. – 2001. – Vol. 12. – P. 2117–2124.
7. Yang, G. Cardiac troponin had limited diagnostic value for acute myocardial infarction in renal insufficiency: a meta-analysis. / G. Yang, Y. Yao, Y. Du et al. // Biomark Med. – 2020. – Vol. 14(6). – P. 481-49.
8. Terzi, M.Y. The cell fate: senescence or quiescence. / M.Y. Terzi, M. Izmirlı, B. Gogebakan // Molecular Biology Reports. – 2016. – Vol. 11(43). – P. 1213–1220.
9. Bramwell, J.C. Velocity of transmission of the pulse-wave. / J.C. Bramwell, A.V. Hill // The Lancet. – 1922. – Vol. 199. – P. 891–892.
10. Laurent, S. The structural factor of hypertension large and small artery alterations. / S. Laurent, P. Boutouyrie // Circ Res. – 2015. – Vol. 116. – P. 1007–

1021.

11. Olsen, M.H. A call to action and a lifecourse strategy to address the global burden of raised blood pressure on current and future generations: the Lancet Commission on hypertension. / M.H. Olsen, S.Y. Angell, S. Asma et al. // *Lancet*. – 2016. – Vol. 388. – P. 2665–2712.
12. Недогода С.В. Синдром раннего сосудистого старения у пациентов с метаболическим синдромом: особенности течения и диагностики. / С.В. Недогода, А.С. Саласюк, И.Н. Барыкина, В.О. Лутова, Е.А. Попова // *Южно-Российский журнал терапевтической практики*. – 2021. – N 2(1). – С. 50-62.
13. Mitchell, G.F. Hemodynamic correlates of blood pressure across the adult age spectrum: noninvasive evaluation in the Framingham Heart Study. / G.F. Mitchell, N. Wang, J.N. Palmisano et al. // *Circulation*. – 2010. – Vol. 122. – P. 1379–1386.
14. McEniery, C.M. ACCT Investigators. Normal vascular aging: differential effects on wave reflection and aortic pulse wave velocity: the Anglo-Cardiff Collaborative Trial (ACCT). / C.M. McEniery, Yasmin, I.R. Hall et al. // *J Am Coll Cardiol*. – 2005. – Vol. 46. – P. 1753–1760.
15. Segers, P. Asklepios investigators. Noninvasive (input) impedance, pulse wave velocity, and wave reflection in healthy middle-aged men and women. / P. Segers, E.R. Rietzschel, M.L. De Buyzere et al. // *Hypertension*. – 2007. – Vol. 49. – P. 1248–1255.
16. Mitchell, G.F. Impedance progress: aortic diameter rears its head again? / G.F. Mitchell // *Hypertension*. – 2007. – Vol. 49. – P. 1207–1209.
17. Анциперов В.Е. Скорость распространения пульсовой волны артериального давления как фактор ранней диагностики атеросклероза / В.Е. Анциперов, М.В. Данилычев, Г.К. Мансуров // *Сборник трудов XIV Всероссийской научно-технической конференции*. – 2020. – С. 164-172.
18. Mitchell, G.F. Hemodynamics of increased pulse pressure in older women in the community-based Age, Gene/Environment Susceptibility-Reykjavik Study. / G.F.

- Mitchell, V. Gudnason, L.J. Launer // *Hypertension*. – 2008. – Vol. 51. – P. 1123–1128.
19. Torjesen, A.A. Forward and backward wave morphology and central pressure augmentation in men and women in the Framingham Heart Study. / A.A. Torjesen, N. Wang, M.G. Larson et al. // *Hypertension*. – 2014. – Vol. 64. – P. 259–265.
20. Herbert, A. Reference Values for Arterial Measurements Collaboration. Establishing reference values for central blood pressure and its amplification in a general healthy population and according to cardiovascular risk factors. / A. Herbert, J.K. Cruickshank, S. Laurent et al. // *Eur Heart J*. – 2014. – Vol. 35. – P. 3122–3133.
21. Котовская Ю. В. Амбулаторное мониторирование пульсовых волн: статус проблемы и перспективы. Позиция российских экспертов / Ю. В. Котовская, А. Н. Рогоза, Я. А. Орлова, И. Н. Посохов // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. – 2018. – 17(4) . – С. 95-109.
22. Franklin, S.S. Predictors of new-onset diastolic and systolic hypertension: the Framingham Heart Study. / S.S. Franklin, J.R. Pio, N.D. Wong et al. // *Circulation*. – 2005. – Vol. 111. – P. 1121–1127.
23. Котовская Ю.В. Анализ пульсовой волны: новая жизнь старого метода / Ю.В. Котовская, Ж.Д. Кобалава // *Сердце: журнал для практикующих врачей*. – 2007. – N 3(35). – С. 133-137.
24. Поморова Ю.Г. Вариации связи скорости распространения пульсовой волны и артериального давления / Ю.Г. Поморова, А.А. Кондыков, В. Д. Киселев // *Известия Алтайского государственного университета*. – 1998. – N4. – С. 153-157.
25. Kaess, B.M. Aortic stiffness, blood pressure progression, and incident hypertension. / B.M. Kaess, J. Rong, M.G. Larson et al. // *JAMA*. – 2012. – Vol. 308. – P. 875–881.
26. Najjar, S.S. Pulse wave velocity is an independent predictor of the longitudinal increase in systolic blood pressure and of incident hypertension in the Baltimore

- Longitudinal Study of Aging. / S.S. Najjar, A. Scuteri, V. Shetty et al. // *J Am Coll Cardiol.* – 2008. – Vol. 51. – P. 1377–1383.
27. Guo, J. ERA JUMP Study Group. Increased aortic calcification is associated with arterial stiffness progression in multiethnic middle-aged men. / J. Guo, A. Fujiyoshi, B. Willcox et al. // *Hypertension.* – 2017. – Vol. 69. – P. 102–108.
28. Wu, S. Aging, arterial stiffness, and blood pressure association in Chinese adults. / S. Wu, C. Jin, S. Li et al. // *Hypertension.* – 2019. – Vol. 73. – P. 893–899.
29. Gurven, M. Does blood pressure inevitably rise with age?: longitudinal evidence among forager-horticulturalists. / M. Gurven, A.D. Blackwell, D.E. Rodríguez et al. // *Hypertension.* – 2012. – Vol. 60. – P. 25–33.
30. Lemogoum, D. Effects of hunter-gatherer subsistence mode on arterial distensibility in Cameroonian pygmies. / D. Lemogoum, W. Ngatchou, C. Janssen et al. // *Hypertension.* – 2012. – Vol. 60. – P. 123–128.
31. Avolio, A.P. Effects of aging on arterial distensibility in populations with high and low prevalence of hypertension: comparison between urban and rural communities in China. / A.P. Avolio, F.Q. Deng, W.Q. Li et al. // *Circulation.* – 1985. – Vol. 71. – P. 202–210.
32. Li, S. Influence of metabolic syndrome on arterial stiffness and its age-related change in young adults: the Bogalusa Heart Study. / S. Li, W. Chen, S.R. Srinivasan et al. // *Atherosclerosis.* – 2005. – Vol. 180. – P. 349–354.
33. Zachariah, J.P. Temporal trends in pulse pressure and mean arterial pressure during the rise of pediatric obesity in US children. / J.P. Zachariah, D.A. Graham, S.D. de Ferranti et al. // *J Am Heart Assoc.* – 2014. – Vol. 3. – e000725.
34. Dangardt, F. Association between fat mass through adolescence and arterial stiffness: a population-based study from The Avon Longitudinal Study of Parents and Children. / F. Dangardt, M. Charakida, G. Georgiopoulos et al. // *Lancet Child Adolesc Health.* – 2019. – Vol. 3. – P. 474–481.
35. Johansen, N.B. Determinants of aortic stiffness: 16-year follow-up of the Whitehall II study. / N.B. Johansen, D. Vistisen, E.J. Brunner et al. // *PLoS One.*

– 2012. – Vol. 7. – e37165.

36. Tsao, C.W. Cross-sectional relations of arterial stiffness, pressure pulsatility, wave reflection, and arterial calcification. / C.W. Tsao, K.M. Pencina, J.M. Massaro et al. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2014. – Vol. 34. – P. 2495–2500.
37. Tan, I. Effect of heart rate on arterial stiffness as assessed by pulse wave velocity. / I. Tan, M. Butlin, B. Spronck et al. // *Curr Hypertens Rev.* – 2018. – Vol. 14. – P. 107–122.
38. Ohyama, Y. Ten-year longitudinal change in aortic stiffness assessed by cardiac MRI in the second half of the human lifespan: the multi-ethnic study of atherosclerosis. / Y. Ohyama, G. Teixido-Tura, B. Ambale-Venkatesh et al. // *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* – 2016. – Vol. 17. – P. 1044–1053.
39. Brunner, E.J. Adiposity, obesity, and arterial aging: longitudinal study of aortic stiffness in the Whitehall II cohort. / E.J. Brunner, M.J. Shipley, S. Ahmadi-Abhari et al. // *Hypertension.* – 2015. – Vol. 66. – P. 294–300.
40. Lin, L.Y. Determinants of arterial stiffness progression in a Han-Chinese population in Taiwan: a 4-year longitudinal follow-up. / L.Y. Lin, Y.C. Liao, H.F. Lin et al. // *BMC Cardiovasc Disord.* – 2015. – Vol. 15. – P. 100.
41. Zachariah, J.P. Metabolic predictors of change in vascular function: prospective associations from a community-based cohort. / J.P. Zachariah, J. Rong, M.G. Larson et al. // *Hypertension.* – 2018. – Vol. 71. – P. 237–242.
42. McEniery, C.M. Nondiabetic glucometabolic status and progression of aortic stiffness: the Whitehall II Study. / C.M. McEniery, I.B. Wilkinson, N.B. Johansen et al. // *Diabetes Care.* – 2017. – Vol. 40. – P. 599–606.
43. Petersen, K.S. Effect of weight loss on pulse wave velocity: systematic review and meta-analysis. / K.S. Petersen, N. Blanch, J.B. Keogh et al. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2015. – Vol. 35. – P. 243–252.
44. Schmidt, K.M.T. Longitudinal effects of cigarette smoking and smoking cessation on aortic wave reflections, pulse wave velocity, and carotid artery distensibility. / K.M.T. Schmidt, K.M. Hansen, A.L. Johnson et al. // *J Am Heart*

- Assoc. – 2019. – Vol. 8. – e013939.
45. Ahmadi-Abhari, S. Physical activity, sedentary behavior, and long-term changes in aortic stiffness: the Whitehall II Study. / S. Ahmadi-Abhari, S. Sabia, M.J. Shipley et al. // *J Am Heart Assoc.* – 2017. – Vol. 6. – e005974.
 46. Menni, C. Gut microbial diversity is associated with lower arterial stiffness in women. / C. Menni, C. Lin, M. Cecelja et al. // *Eur Heart J.* – 2018. – Vol. 39. – P. 2390–2397.
 47. Ljungman, P.L.S. Long- and short-term air pollution exposure and measures of arterial stiffness in the Framingham Heart Study. / P.L.S. Ljungman, W. Li, M.B. Rice et al. // *Environ Int.* – 2018. – Vol. 121. – P. 139–147.
 48. Climie, R.E. Individual and neighborhood deprivation and carotid stiffness. / R.E. Climie, P. Boutouyrie, M.C. Perier et al. // *Hypertension.* – 2019. – Vol. 73. – P. 1185–1194.
 49. Mitchell, G.F. Heritability and a genome-wide linkage scan for arterial stiffness, wave reflection, and mean arterial pressure: the Framingham Heart Study. / G.F. Mitchell, A.L. DeStefano, M.G. Larson et al. // *Circulation.* – 2005. – Vol. 112. – P. 194–199.
 50. Cecelja, M. Arterial stiffening is a heritable trait associated with arterial dilation but not wall thickening: a longitudinal study in the twins UK cohort. / M. Cecelja, B. Jiang, L. Keehn et al. // *Eur Heart J.* – 2018. – Vol. 39. – P. 2282–2288.
 51. Benetos, A. Influence of the AGTR1 A1166C genotype on the progression of arterial stiffness: a 16-year longitudinal study. / A. Benetos, A. Giron, L. Joly et al. // *Am J Hypertens.* – 2013. – Vol. 26. – P. 1421–1427.
 52. Andersson, C. Association of parental hypertension with arterial stiffness in nonhypertensive offspring: the Framingham Heart Study. / C. Andersson, R. Quiroz, D. Enserro et al. // *Hypertension.* – 2016. – Vol. 68. – P. 584–589.
 53. Mitchell, G.F. Common genetic variation in the 3'-BCL11B gene desert is associated with carotid-femoral pulse wave velocity and excess cardiovascular disease risk: the AortaGen Consortium. / G.F. Mitchell, G.C. Verwoert, K.V. Tarasov et al. // *Circ Cardiovasc Genet.* – 2012. – Vol. 5. – P. 81–90.

54. Di Santo, J.P. Immunology. A guardian of T cell fate. / J.P. Di Santo // *Science*. – 2010. – Vol. 329. – P. 44–45.
55. Pereira, F.A. The orphan nuclear receptor COUP-TFII is required for angiogenesis and heart development. / F.A. Pereira, Y. Qiu, G. Zhou et al. // *Genes Dev*. – 1999. – Vol. 13. – P. 1037–1049.
56. Arlotta, P. Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. / P. Arlotta, B.J. Molyneaux, J. Chen et al. // *Neuron*. – 2005. – Vol. 45. – P. 207–221.
57. Niiranen, T.J. Prevalence, correlates, and prognosis of healthy vascular aging in a Western Community-Dwelling Cohort: the Framingham Heart Study. / T.J. Niiranen, A. Lyass, M.G. Larson et al. // *Hypertension*. – 2017. – Vol. 70. – P. 267–274.
58. Aatola, H. Prospective relationship of change in ideal cardiovascular health status and arterial stiffness: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. / H. Aatola, N. Hutri-Kähönen, M. Juonala et al. // *J Am Heart Assoc*. – 2014. – Vol. 3. – e000532.
59. D’Agostino, R.B. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. / R.B. D’Agostino, R.S. Vasan, M.J. Pencina et al. // *Circulation*. – 2008. – Vol. 117. – P. 743–753.
60. Nilsson, P.M. The early life origins of vascular ageing and cardiovascular risk: the EVA syndrome. / P.M. Nilsson, E. Lurbe, S. Laurent // *J Hypertens*. – 2008. – Vol. 26. – P. 1049–1057.
61. Laurent, S. Concept of extremes in vascular aging. / S. Laurent, P. Boutouyrie, P.G. Cunha et al. // *Hypertension*. – 2019. – Vol. 74. – P. 218–228.
62. Rattan, S.I.S. Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals. / S.I.S. Rattan // *Free Radic. Res*. – 2006. – Vol. 40. – P. 1230–1238.
63. Kirkland, L. Cellular Senescence: A Translational Perspective. / J.L. Kirkland, T. Tchkonja // *EBioMedicine*. – 2017. – Vol. 21. – P. 21–28.
64. Hayflick, L. The serial cultivation of human diploid cell strains. / L. Hayflick, P.S. Moorhead // *Experimental Cell Research*. – 1961. – Vol. 25. – P. 585–621.

65. van Deursen, J.M. The role of senescent cells in a geing. / J.M. van Deursen // Nature. – 2014. –Vol. 509(7501). – P. 439-446.
66. Gorgoulis, V. Cellular senescence: Defining a path forward. / V. Gorgoulis, P.D. Adams, A. Alimonti et al. // Cell. – 2019. – Vol. 179(4). – P. 813 -827.
67. Liu, J. Roles of telomere biology in cell senescence. / J. Liu, L. Wang, Z. Wang et al. // Replicative and Chronological Ageing. Cells. – 2019. – Vol. 8(1). – P. 54.
68. Wang, E. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death and failure to suppress bcl2 is involved. / E. Wang // Cancer Research. 1995. – Vol. 55(11). – P. 2284-2292.
69. Lopes-Paciencia, S. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. / S. Lopes-Paciencia, E. Saint-Germain, M.C. Rowell et al. // Cytokine. – 2019. – Vol. 117. – P. 15-22.
70. Ogradnik, M. Cellular aging beyond cellular senescence: Markers of senescence prior to cell cycle arrest in vitro and in vivo. / M. Ogradnik // Aging Cell. – 2021. – Vol. 20(4). – e13338.
71. Özcan, S. Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses. / S. Özcan, N. Alessio, M.B. Acar et al. // Aging. – 2016. – Vol.8(7). – P. 1316-1329.
72. Hernandez-Segura, A. Unmasking transcriptional heterogeneity in senescent cells. / A. Hernandez-Segura, T. V de Jong, S. Melov et al.// Curr. Biol. – 2017. – Vol. 27. – P. 2652–2660.
73. Бородкина, А.В. «Социальная жизнь» стареющих клеток: что такое SASP и зачем его изучать? / А. В. Бородкина, П. И. Дерябин, А. А. Грюкова, Н. Н. Никольский // Acta Naturae. – 2018. – N. 10. – С. 4–14.
74. Wang, M. Proinflammatory Arterial Stiffness Syndrome: A Signature of Large Arterial Aging. / M. Wang, R.E. Monticone, K.R. McGraw // J Vasc Res. – 2018. – Vol. 55(4). – P. 210-223.
75. Helman, A. p16-induced senescence of pancreatic beta cells enhances insulin

- secretion. / A. Helman, A. Klochendler, N. Azazmeh et al. // *Nat. Med.* – 2016. – Vol. 22. – P. 412–420.
76. Rossman, M.J. Endothelial cell senescence with aging in healthy humans: prevention by habitual exercise and relation to vascular endothelial function. / M.J. Rossman, R.E. Kaplon, S.D. Hill // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2017. – Vol. 313. – H890–H895.
77. Diekman, B.O. Expression of p16 is a biomarker of chondrocyte aging but does not cause osteoarthritis. / B.O. Diekman, G.A. Sessions, J.A. Collins // *Aging Cell.* – 2018. – Vol. 17(4). – e12771.
78. Chimenti, C. Senescence and death of primitive cells and myocytes lead to premature cardiac aging and heart failure. / C.Chimenti, J. Kajstura, D. Torella // *Circ. Res.* – 2003. – Vol. 93. – P. 604–613.
79. Kajstura, J. Myocyte turnover in the aging human heart. / J. Kajstura, N. Gurusamy, B. Ogórek // *Circ. Res.* – 2010. – Vol. 107. – P. 1374–1386.
80. Gregor, M.F. Inflammatory mechanisms in obesity. / M.F. Gregor, G.S. Hotamisligil // *Annu. Rev. Immunol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 415–445.
81. Ogrodnik, M. Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. / M. Ogrodnik, S. Miwa, T. Tchkonina // *Nat. Commun.* – 2017. – Vol. 8. – P. 15691.
82. Xu, S. Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases and Beyond: From Mechanism to Pharmacotherapies. / S. Xu, I. Ilyas, P.J. Little // *Aspect Pharmacological Reviews.* – 2021. – Vol. 73(3). – P. 924-967.
83. Kobashigawa, S. Stress-induced cellularsenescence contributes to chronic inflammation and Cancer progression. / S. Kobashigawa, Y.M. Sakaguchi, S. Masunaga et al. // *Therm. Med.* – 2019. – Vol. 35. – P. 41–58.
84. Liu, X. A tale of the good and bad: cell. / X. Liu, M. Wan // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* – 2019. – P. 97.
85. Rattanavirotkul, N. Understanding the Heterogeneity of Senescence and Ageing at the Single-cell Level. / N. Rattanavirotkul // University of Edinburg. – 2020.
86. Azar, A.Z. Clinical Implications for Mitochondrial Stress Induced Senescence and Potential Interventions: PhD dissertation / Ashley Zarify Azar. – Philadelphia,

2017. – 126 p.

87. Calcinotto, A. Cellular senescence: aging, cancer, and injury. / A. Calcinotto, J. Kohli, E. Zagato et al. // *Physiol. Rev.* – 2019. – Vol. 99. – P. 1047–1078.
88. Gorgoulis, V. Cellular senescence: defining a path forward. / V. Gorgoulis, P.D. Adams, A. Alimonti et al. // *Cell.* – 2019. – Vol. 179. – P. 813–827.
89. Serrano, M. Targeting senescence. / M. Serrano, N. Barzilai // *Nat. Med.* – 2018. – Vol. 24. – P. 1092–1094.
90. Hinze, C. Endocytosis in proliferating, quiescent and terminally differentiated cells. / C. Hinze, E. Boucrot // *J. Cell. Sci.* – 2018. – P. 131.
91. Baumann, K. Cellular senescence: senescence and reprogramming go hand-in-hand. / K. Baumann // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2016. – Vol. 18. – P. 4.
92. Kasthuber, E.R. Putting p53 in context. / E.R. Kasthuber, S.W. Lowe // *Cell.* – 2017. – Vol. 170. – P. 1062–1078.
93. Li, S. p53-induced growth arrest is regulated by the mitochondrial SirT3 deacetylase. / S. Li, M. Banck, S. Mujtaba et al. // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5. – P. 1-12.
94. Vousden, K.H. Blinded by the light: the growing complexity of p53. / K.H. Vousden, C. Prives // *Cell.* – 2009. – Vol. 137. – P. 413–431.
95. Kasteri, J. Translation control by p53. / J. Kasteri, D. Das, X. Zhon et al. // *Cancers.* – 2018. – Vol. 10. – P. 133.
96. Geleta, B. Cyclic dependent kinase (CDK): role in cancerpathogenesis and as drug target in cancer therapeutics. / B. Geleta, E. Makonnen, S.M. Abay // *J. Cancer Sci. Ther.* – 2016. – Vol. 8. – P. 160–167.
97. Mens, M.M. Cell cycle regulation of stem cells by MicroRNAs. / M.M. Mens, M. Ghanbari // *StemCell Reviews and Reports.* – 2018. – Vol. 14. – P. 309–322.
98. McCurdy, S.R. Targeting CDK to Prevent and Treat Retinoblastoma and Other Cancers: PhD dissertation / Sean R. McCurdy. – Canada, 2016. – 131 p.
99. He, S. Senescence in health and disease. / S. He, N.E. Sharpless // *Cell.* – 2017. – Vol. 169. – P. 1000–1011.
100. Song, S. Senescent cells: emerging targets for human aging and age-related

- diseases. / S. Song, T. Tchkonina, J.L. Kirkland et al. // *Trends Biochem. Sci.* – 2020. – Vol. 45(7). – P. 1-27.
101. Muñoz-Espín, D. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. / D. Muñoz-Espín, M. Cañamero, A. Maraver et al. // *Cell.* – 2013. – Vol. 155. – P. 1104–1118.
102. Herbig, U. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21 CIP1, but not p16 INK4a. / U. Herbig, W.A. Jobling, B.P. Chen et al. // *Mol. Cell.* – 2004. – Vol. 14. – P. 501–513.
103. Campisi, J. Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. / J. Campisi // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2011. – Vol. 21. – P. 107–112.
104. Carnero, A. Markers of cellular senescence. / A. Carnero // *Cell Senescence: Methods Protocols.* – 2013. – P. 63–81
105. Picallos-Rabina, P. The development of cell senescence. / P. Picallos-Rabina, L. Antelo-Iglesias, F. Triana-Martínez et al. // *Exp. Gerontol.* – 2019. – P. 110742.
106. Herranz, N. Mechanisms and functions of cellular senescence. / N. Herranz, J. Gil // *J. Clin. Invest.* – 2018. – Vol. 128. – P. 1238–1246.
107. Crane, A.M. The use of bromodeoxyuridine incorporation assays to assess corneal stem cell proliferation. *Corneal Regenerative Medicine.* / A.M. Crane, S.K. Bhattacharya // Springer. – 2013. – P. 65–70.
108. Mead, T.J. Proliferation assays (BrdU and EdU) on skeletal tissue sections. *Skeletal Development and Repair.* / T.J. Mead, V. Lefebvre // Springer. – 2014. – P. 233–243.
109. Adan, A. Cell proliferation and cytotoxicity assays. / A. Adan, Y. Kiraz, Y. Baran // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2016. – Vol. 17. – P. 1213–1221.
110. Cappella, P. Cell proliferation method: click chemistry based on BrdU coupling for multiplex antibody staining. / P. Cappella, F. Gasparri, M. Pulici et al. // *Curr. Protoc. Cytom.* – 2015. – Vol. 72 (7). – P. 1-7.
111. Moujaber, O. Cellular senescence is associated with reorganization of the microtubule cytoskeleton. / O. Moujaber, F. Fishbein, N. Omran et al. // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2019. – Vol. 76. – P. 1169–1183.

112. Ott, C. SIPS as a model to study age-related changes in proteolysis and aggregate formation. / C. Ott, T. Jung, T. Grune et al. // *Mech. Ageing Dev.* – 2018. – Vol. 170. – P. 72–81.
113. Bhatia-Dey, N. Cellular senescence as the causal nexus of aging. / N. Bhatia-Dey, R.R. Kanherkar, S.E. Stair et al. // *Front. Genet.* – 2016. – Vol. 7. –P. 13.
114. Herndon, L.A. Effects of ageing on the basic biology and anatomy of *C. elegans*. *Ageing: Lessons From C Elegans.* / L.A. Herndon, C.A. Wolkow, M. Driscoll et al. // Springer. – 2017. – P. 9–39.
115. Chen, H. Cell senescence culturing methods. *Biological Aging.* / H. Chen, Y. Li, T.O. Tollefsbol // Springer. – 2013. – P. 1–10.
116. Hernandez-Segura, A. Hallmarks of cellular senescence. / A. Hernandez-Segura, J. Nehme, M. Demaria et al. // *Trends Cell Biol.* – 2018. – Vol. 28. – P. 436–453.
117. Saitoh, Y. The influence of cellular senescence on intracellular vitamin C transport, accumulation, and function. / Y. Saitoh, A. Nakawa, T. Tanabe et al. // *Mol. Cell. Biochem.* – 2018. – Vol. 446. – P. 209–219.
118. Prata, L.G.L. Senescent cell clearance by the immune system: emerging therapeutic opportunities. / L.G.L. Prata, I.G. Ovsyannikova, T. Tchkonja et al. // *Seminars in Immunology.* Elsevier. – 2019. – Vol. 40. – P. 1–38.
119. Sasaki, M. Senescent cells are resistant to death despite low Bcl-2 level. / M. Sasaki, T. Kumazaki, H. Takano et al. // *Mech. Ageing Dev.* – 2001. – Vol. 122. – P. 1695–1706.
120. Chen, J. The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression. / J. Chen // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2016. – Vol. 6. – a026104.
121. Monti, D. Decreased susceptibility to oxidative stress-induced apoptosis of peripheral blood mononuclear cells from healthy elderly and centenarians. / D. Monti, S. Salvioli, M. Capri et al. // *Mech. Ageing Dev.* – 2001. – Vol. 121. – P. 239–250.
122. Volkart, P.A. Cyclin-dependent kinase 2 in cellular senescence and cancer. A

- structural and functional review. / P.A. Volkart, G. Bitencourt-Ferreira, A.A. Souto et al. // *Curr. Drug Targets*. – 2019. – Vol. 20. – P. 716–726.
123. Caglar, H.O. Alterations of cell cycle genes in cancer: unmasking the role of cancer stem cells. / H.O. Caglar, C.B. Avci // *Mol. Biol. Rep.* – 2020. – P. 1– 12.
124. Aitken, T.J. The expression differences of cyclin dependent kinase inhibitors in aged and young pancreatic Beta cells. / T.J. Aitken, S.G. Grover, P.L. Booren et al. // *Faseb J.* – 2018. – Vol. 32 (670). – P. 22.
125. Sacca, A.I. CDK4/6 Inhibition on glucose and pancreatic beta cell homeostasis in young and aged Rats. / A.I. Sacca, S. Thibault, M. Hong et al. // *Mol. Cancer Res.* – 2017. – Vol. 15. – P. 1531–1541.
126. Dumont, P. Overexpression of apolipoprotein J in human fibroblasts protects against cytotoxicity and premature senescence induced by ethanol and tert-butylhydroperoxide. / P. Dumont, F. Chainiaux, F. Eliaers et al. // *Cell Stress Chaperones*. – 2002. – Vol. 7. – P. 23.
127. Waaijer, M.E. The number of p16 positive cells in human skin reflects biological age. / M.E. Waaijer, W.E. Parish, B.H. Strongitharm et al. // *Aging Cell*. – 2012. – Vol. 11. – P. 722–725.
128. Chen, W. p53-related apoptosis resistance and tumor suppression activity in UVB-induced premature senescent human skin fibroblasts. / W. Chen, J. Kang, J. Xia et al. // *Int. J. Mol. Med.* – 2008. – Vol. 21. – P. 645–653.
129. Coppé, J.-P. Tumor suppressor and aging biomarker p16 induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. / J.-P. Coppé, F. Rodier, C.K. Patil et al. // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286. – P. 36396–36403.
130. Ressler, S. p16 is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. / S. Ressler, J. Bartkova, H. Niederegger et al. // *Aging Cell*. – 2006. – Vol. 5. – P. 379–389.
131. Dimri, G.P. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. / G.P. Dimri, X. Lee, G. Basile et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1995. – Vol. 92. – P. 9363–9367.

132. Piechota, M. Is senescence-associated β -galactosidase a marker of neuronal senescence? / M. Piechota, P. Sunderland, A. Wysocka et al. // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7. – P. 81099.
133. Lozano-Torres, B. The chemistry of senescence. / B. Lozano-Torres, A. Estepa-Fernández, M. Rovira et al. // *Nat. Rev. Chem*. – 2019. – Vol. 3. – P. 426–441.
134. Maier, A.B. B-galactosidase activity as a biomarker of replicative senescence during the course of human fibroblast cultures. / A.B. Maier, R.G. Westendorp, D. Van Heemst // *Ann. N. Y. Acad. Sci*. – 2007. – Vol. 1100. – P. 323–332.
135. Itahana, K. Colorimetric detection of senescence-associated β galactosidase. / K. Itahana, Y. Itahana, G.P. Dimri // *Cell Senescence: Methods Protocols*. – 2013b. – P. 143–156.
136. Lee, B.Y. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β - galactosidase. / B.Y. Lee, J.A. Han, J.S. Im et al. // *Aging Cell* 2006a. – Vol. 5. – P. 187–195.
137. Pati, S. X-gal staining of canine skin tissues: a technique with multiple possible applications. / S. Pati, S. Jain, M. Behera et al. // *J. Nat. Sci. Biol. Med*. – 2014. – Vol. 5. – P. 245.
138. Itahana, K. Colorimetric detection of senescence-associated β galactosidase. / K. Itahana, Y. Itahana, G.P. Dimri // *Cell Senescence: Methods Protocols*. – 2013. – P. 143–156.
139. Perše, M. Oxidative status and lipofuscin accumulation in urothelial cells of bladder in aging mice. / M. Perše, R. Injac, A. Erman // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – P. 1-11.
140. Vida, C. Role of macrophages in age-related oxidative stress and lipofuscin accumulation in mice. / C. Vida, I.M. de Toda, J. Cruces et al. // *Redox Biol*. – 2017. – Vol. 12. – P. 423–437.
141. Nociari, M.M. Lipofuscin accumulation into and clearance from retinal pigment epithelium lysosomes: physiopathology and emerging therapeutics. Lysosomes: Associated Diseases and Methods to Study Their Function. / M.M. Nociari, S. Kiss, E. Rodriguez-Boulan // *Intech Open*. – 2017. – P. 1–29.
142. Moreno-García, A. An overview of the role of lipofuscin in age-related

- neurodegeneration. / Moreno-García A., A. Kun, O. Calero et al. // *Front. Neurosci.* – 2018. – Vol. 12. – P. 464.
143. Basova, L. Lipofuscin accumulation in tissues of *Arctica islandica* indicates faster ageing in populations from brackish environments. / L. Basova, J. Strahl, E.E. Philipp et al. // *Mar. Biol.* – 2017. – Vol. 164. – P. 72.
144. Di Guardo, G. Lipofuscin, lipofuscin-like pigments and autofluorescence. / Di Guardo, G. // *European journal of histochemistry: EJH.* – 2015. – P. 59.
145. König, J. Mitochondrial contribution to lipofuscin formation. / J. König, C. Ott, M. Hugo et al. // *Redox Biol.* – 2017. – Vol. 11. – P. 673–681.
146. Höhn, A. Lipofuscin-bound iron is a major intracellular source of oxidants: role in senescent cells. / A. Höhn, T. Jung, S. Grimm et al. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2010. – Vol. 48. – P. 1100–1108.
147. Evangelou, K. Sudan black B, the specific histochemical stain for lipofuscin: a novel method to detect senescent cells. *Oncogene-Induced Senescence.* / K. Evangelou, V.G. Gorgoulis // Springer. – 2017. – P. 111–119.
148. Jung, T. Lipofuscin: detection and quantification by microscopic techniques. *Advanced Protocols in Oxidative Stress II.* / T. Jung, A. Höhn, T. Grune // Springer. – 2010. – P. 173–193.
149. Salmonowicz, H. Detecting senescence: a new method for an old pigment. / H. Salmonowicz, J.F. Passos // *Aging Cell.* – 2017. – Vol. 16. – P. 432–434.
150. Chandra, T. Senescence associated heterochromatic foci: SAHF. *The Functional Nucleus.* / T. Chandra // Springer. – 2016. – P. 205–218.
151. Boumendil, C. Nuclear pore density controls heterochromatin reorganization during senescence. / C. Boumendil, P. Hari, K.C. Olsen et al. // *Genes Dev.* – 2019. – Vol. 33. – P. 144–149.
152. Soto-Gamez, A. Therapeutic interventions for aging: the case of cellular senescence. / A. Soto-Gamez, M. Demaria // *Drug Discov. Today.* – 2017. – Vol. 22. – P. 786–795.
153. Narita, M. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. / M. Narita, S. Nuñez, E. Heard et al. // *Cell.* –

2003. – Vol. 113. – P. 703–716.
154. Hooten, N.N. Techniques to induce and quantify cellular senescence. / N.N. Hooten, M.K. Evans // *JoVE (J. Visualized Experiments)*. – 2017. – e55533.
155. Aird, K.M. Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF). / K.M. Aird, R. Zhang // *Cell Senescence*. Springer. – 2013. – P. 185–196.
156. Di Micco, R. Interplay between oncogene-induced DNA damage response and heterochromatin in senescence and cancer. / R. Di Micco, G. Sulli, M. Dobrev et al. // *Nat. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 13. – P. 292–302.
157. Baek, K.-H. Detection of oncogene-induced senescence in vivo. *Oncogene-Induced Senescence*. / K.-H. Baek, S. Ryeom // Springer. – 2017. – P. 185–198.
158. Lopes-Paciencia, S. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. / S. Lopes-Paciencia, E. Saint-Germain, M.-C. Rowell et al. // *Cytokine*. – 2019. – Vol. 117. – P. 15–22.
159. Ritschka, B. The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. / B. Ritschka, M. Storer, A. Mas et al. // *Genes Dev.* – 2017. – Vol. 31. – P. 172–183.
160. Acosta, J.C. Unbiased characterization of the senescence-associated secretome using SILAC-based quantitative proteomics. / J.C. Acosta, A.P. Snijders, J. Gil // *Cell Senescence: Methods Protocols*. – 2013a. – P. 175–184.
161. Lau, L. Uncoupling the senescence-associated secretory phenotype from cell cycle exit via interleukin-1 inactivation unveils its protumorigenic role. / L. Lau, A. Porciuncula, A. Yu et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 2019. – Vol. 39. – e00586– 18.
162. Saleh, T. Non-cell autonomous effects of the senescence-associated secretory phenotype in cancer therapy. / T. Saleh, L. Tyutynuk-Massey, E.K. Jr Cudjoe et al. // *Front. Oncol.* – 2018. – Vol. 8. – P. 164.
163. Canino, C. SASP mediates chemoresistance and tumor-initiating-activity of mesothelioma cells. / C. Canino, F. Mori, A. Cambria et al. // *Oncogene*. – 2012. – Vol. 31. – P. 3148–3163.
164. Salotti, J. Regulation of senescence and the SASP by the transcription factor C/EBP β . / J. Salotti, P.F. Johnson // *Experimental gerontology*. – 2019. – P.

- 110752.
165. Gonzalez-Meljem, J.M. Paracrine roles of cellular senescence in promoting tumorigenesis. / J.M. Gonzalez-Meljem, J.R. Apps, H.C. Fraser et al. // *Br. J. Cancer.* – 2018. – Vol. 118. – P. 1283
166. Rao, S.G. SASP: tumor suppressor or promoter? Yes!. / S.G. Rao, J.G. Jackson // *Trends Cancer.* – 2016. – Vol. 2. – P. 676–687.
167. Sun, Y. Urine-Derived Stem Cells Secreting Small Extracellular Vesicles Loaded in Acellular Amniotic Membrane for Wound Healing Promotion in Aged Mice. / Y. Sun, B. Chen, J. Zhang et al. // Available at SSRN. – 2019. – P. 3478068. .
168. Acosta, J.C. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. / J.C. Acosta, A. Banito, T. Wuestefeld et al. // *Nat. Cell Biol.* – 2013b. – Vol. 15. – P. 978–990.
169. Jurk, D. Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. / D. Jurk, C. Wilson, J. Passos et al. // *Nat. Commun.* – 2014. – Vol. 2. – P. 4172
170. Gasek, N.S. Strategies for targeting senescent cells in human disease. / N.S. Gasek, G.A. Kuchel, J.L. Kirkland et al // *Nat Aging.* – 2021. – Vol. 1. – P. 870–879.
171. St Sauver, J.L. Risk of developing multimorbidity across all ages in an historical cohort study: differences by sex and ethnicity. / J.L. St Sauver, C.M. Boyd, B.R. Grossardt et al. // *BMJ Open.* – 2015. – Vol. 5(2). – e006413
172. Kirkland, J.L. Translating the Science of Aging into Therapeutic Interventions. / J.L. Kirkland / *Cold Spring Harb Perspect Med.* – 2016. – Vol. 6(3). – a025908.
173. Spazzafumo L, Age-related modulation of plasmatic beta-Galactosidase activity in healthy subjects and in patients affected by T2DM. / L. Spazzafumo, E. Mensà, G. Matakchione et al. // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8(55) . – P. 93338-93348.
174. Moslehi, J. Telomeres and mitochondria in the aging heart. / J. Moslehi, R.A. DePinho, E. Sahin // *Circ Res.* – 2012. – Vol. 110(9). – P. 1226-37.

175. Salminen, A. Insulin/IGF-1 signaling promotes immunosuppression via the STAT3 pathway: impact on the aging process and age-related diseases. / A. Salminen, K. Kaarniranta, A. Kauppinen // *Inflamm Res.* – 2021. – Vol. 1. – P. 1-19.
176. Vitale, G. ROLE of IGF-1 System in the Modulation of Longevity: Controversies and New Insights From a Centenarians' Perspective. / G. Vitale, G. Pellegrino, M. Vallery // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2019. – Vol. 10. – P. 27.
177. Kirkland, J.L. Cellular Senescence: A Translational Perspective. / J.L. Kirkland, T. Tchkonja // *EBioMedicine.* – 2017. – Vol. 21. – P. 21-28.
178. Matjusaitis, M. Biomarkers to identify and isolate senescent cells. / M. Matjusaitis, G. Chin, E.A. Sarnoski et al // *Ageing Res Rev.* – 2016. – Vol. 29. – P. 1-12.
179. Birch, J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. / J. Birch, J.Gil // *Genes & Dev.* – 2020. – Vol. 34(23-24). – P. 1565-1576.
180. Voicehovska, J.G. Association of Arterial Stiffness With Chronic Kidney Disease Progression and Mortality. / J.G. Voicehovska, E. Bormane, A. Grigane et al. // *Heart, Lung and Circulation.* – 2021. – Vol. 30. – P. 1694–1701.
181. Makarewich, C.A. Gene Therapy With the DWORF Micropeptide Attenuates Cardiomyopathy in Mice. / C.A. Makarewich, S. Bezprozvannaya, A.M. Gibson // *Circ. Res.* – 2020. – Vol. 127(10). – P. 1340-1342.
182. SPRINT Research Group Final Report of a Trial of Intensive versus Standard Blood-Pressure Control. / SPRINT Research Group, C.E. Lewis, L.J Fine et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2021. – Vol. 384(20). – P. 1921-1930.
183. Demir, A. Decrease in Pulse Wave Velocity is Associated with Clinical Improvement in Patients with Ischemic Stroke. / A. Demir, Ş. Öztürk, A.H. Ekmekçi // *J. Stroke. Cerebrovasc. Dis.* – 2020. – Vol. 29(11). – e105206.
184. Papadopoulou, E. Dapagliflozin decreases ambulatory central bloodpressure and pulse wave velocity in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial / E. Papadopoulou, C. Loutradis, G. Tzatzagou // *J. Hypertens.* – 2021. – Vol.39(4). – P. 749-758.

185. Kelly, R. Noninvasive determination of age-related changes in the human arterial pulse. / R. Kelly, C. Hayward, A. Avolio et al. // *Circulation*. – 1989. – Vol. 80. – P. 1652–1659.
186. Cecelja, M. Genetic aetiology of blood pressure relates to aortic stiffness with bi-directional causality: evidence from heritability, blood pressure polymorphisms, and Mendelian randomization. / M. Cecelja, L. Keehn, L. Ye et al. // *Eur. Heart J.* – 2020. – Vol. 41. – 3314–3322.
187. Ashor, A.W. Effects of exercise modalities on arterial stiffness and wave reflection: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. / A.W. Ashor, J. Lara, M. Siervo et al. // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. – e110034.
188. Millasseau, S.C. Evaluation of carotid-femoral pulse wave velocity: influence of timing algorithm and heart rate. / S.C. Millasseau, A.D. Stewart, S.J. Patel et al. // *Hypertension*. – 2005. – Vol. 45. – P. 222–226.
189. Bussy, C. Intrinsic stiffness of the carotid arterial wall material in essential hypertensives. / C. Bussy, P. Boutouyrie, P. Lacolley et al. // *Hypertension*. – 2000. – Vol. 35. – P. 1049–1054.
190. Gaddum, N.R. Altered dependence of aortic pulsewave velocity on transmural pressure in hypertension revealing structural change in the aortic wall. / N.R. Gaddum, L. Keehn, A. Guilcher et al. // *Hypertension*. – 2015. – Vol. 65. – P. 362–369.
191. Spronck, B. Pressure-dependence of arterial stiffness: potential clinical implications. / B. Spronck, M.H. Heusinkveld, F.H. Vanmolkot et al. // *J. Hypertens.* – 2015. – Vol. 33. – P. 330–338.
192. Flamant, M. Role of matrix metalloproteinases in early hypertensive vascular remodeling. / M. Flamant, S. Placier, C. Dubroca et al. // *Hypertension*. – 2007. – Vol. 50. – P. 212–218.
193. Ait-Oufella, H. Long-term reduction in aortic stiffness: a 5.3-year follow-up in routine clinical practice. / H. Ait-Oufella, C. Collin, E. Bozec et al. // *J Hypertens.* – 2010. – Vol. 28. – P. 2336–2341.
194. Petersen, K.S. Effect of weight loss on pulse wave velocity: systematic review

- and meta-analysis. / K.S. Petersen, N. Blanch, J.B. Keogh et al. // *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* – 2015. – Vol. 35. – P. 243–252.
195. Way, K.L. The effect of high Intensity interval training versus moderate intensity continuous training on arterial stiffness and 24h blood pressure responses: a systematic review and meta-analysis. / K.L. Way, R.N. Sultana, A. Sabag et al. // *J. Sci. Med. Sport.* – 2019. – Vol. 22. – P. 385–391.
196. D’Elia, L. Effect of dietary sodium restriction on arterial stiffness: systematic review and meta-analysis of the randomized controlled trials. / L. D’Elia, F. Galletti, E. La Fata et al. // *J. Hypertens.* – 2018. – Vol. 36. – P. 734–743.
197. Zhang, J. Relation of arterial stiffness to left ventricular structure and function in healthy women. / J. Zhang, P.J. Chowienczyk, T.D. Spector et al. // *Cardiovasc. Ultrasound.* – 2018. – Vol. 16. – P. 21.
198. Faconti, L. Arterial stiffness can be modulated by pressure-independent mechanisms in hypertension. / L. Faconti, B. Farukh, R. McNally et al. // *J. Am. Heart Assoc.* – 2019. – Vol. 8. – e012601.
199. Phillips, A.A. Aortic distensibility is reduced during intense lower body negative pressure and is related to low frequency power of systolic blood pressure. / A.A. Phillips, S.S. Bredin, A.T. Cote et al. // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 2013. – Vol. 113. – P. 785–792.
200. Selamet Tierney, E.S. Pediatric Heart Network Investigators. Influence of aortic stiffness on aortic-root growth rate and outcome in patients with the Marfan syndrome. / E.S. Selamet Tierney, J.C. Levine, L.A. Sleeper et al. // *Am J Cardiol.* – 2018. – Vol. 121. – P. 1094–1101.
201. Cooper, J.N. Reductions in arterial stiffness with weight loss in overweight and obese young adults: potential mechanisms. / J.N. Cooper, J.M. Buchanich, A. Youk et al. // *Atherosclerosis.* – 2012. – Vol. 223. – P. 485–490.
202. Ong, K.T. Aortic stiffness is reduced beyond blood pressure lowering by short-term and long-term antihypertensive treatment: a meta-analysis of individual data in 294 patients. / K.T. Ong, S. Delerme, B. Pannier et al. // *J. Hypertens.* – 2011. – Vol. 29. – P. 1034–1042.

203. Laurent, S. Vascular Mechanism Collaboration. Dose-dependent arterial destiffening and inward remodeling after olmesartan in hypertensives with metabolic syndrome. / S. Laurent, P. Boutouyrie // *Hypertension*. – 2014. – Vol. 64. – P. 709–716.
204. Fok, H. Regulation of vascular tone and pulse wave velocity in human muscular conduit arteries: selective effects of nitric oxide donors to dilate muscular arteries relative to resistance vessels. / H. Fok, B. Jiang, B. Clapp et al. // *Hypertension*. – 2012. – Vol. 60. – P. 1220–1225.
205. Tropeano, A.I. Brachial pressure-independent reduction in carotid stiffness after long-term angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic hypertensives. / A.I. Tropeano, P. Boutouyrie, B. Pannier et al. // *Hypertension*. – 2006. – Vol. 48. – P. 80–86.
206. Edwards, N.C. Effect of spironolactone on left ventricular mass and aortic stiffness in early-stage chronic kidney disease: a randomized controlled trial. / N.C. Edwards, R.P. Steeds, P.M. Stewart et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2009. – Vol. 54. – P. 505–512.
207. Upala, S. Effects of statin therapy on arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trial. / S. Upala, K. Wirunsawanya, V. Jaruvongvanich et al. // *Int. J. Cardiol.* – 2017. – Vol. 227. – P. 338–341.
208. D’elia, L. Effect of statin therapy on pulse wave velocity: a meta-analysis of randomized controlled trials. / L. D’elia, E. La Fata, A. Iannuzzi et al. // *Clin. Exp. Hypertens.* – 2018. – Vol. 40. – P. 601–608.
209. Mandraffino, G. Arterial stiffness improvement after adding on PCSK9 inhibitors or ezetimibe to high-intensity statins in patients with familial hypercholesterolemia: a Two-Lipid Center Real-World Experience. / G. Mandraffino, R. Scicali, J. Rodríguez-Carrío et al. // *J. Clin. Lipidol.* – 2020. – Vol. 14. – P. 231–240.
210. Batzias, K. Effects of newer antidiabetic drugs on endothelial function and arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. / K. Batzias, A.S. Antonopoulos, E. Oikonomou et al. // *J. Diabetes Res.* – 2018. – Vol. 2018. – P.

- 1–10.
211. Chilton, R. Effects of empagliflozin on blood pressure and markers of arterial stiffness and vascular resistance in patients with type 2 diabetes. / R. Chilton, I. Tikkanen, C.P. Cannon et al. // *Diabetes Obes. Metab.* – 2015. – Vol. 17. – P. 1180–1193.
212. Niederhoffer, N. Calcification of medial elastic fibers and aortic elasticity. / N. Niederhoffer, I. Lartaud-Idjouadiene, P. Giummelly et al. // *Hypertension.* – 1997. – Vol. 29. – P. 999–1006.
213. Blacher, J. Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. / J. Blacher, A.P. Guerin, B. Pannier et al. // *Circulation.* – 1999. – Vol. 99. – P. 2434–2439.
214. Rodriguez, R.A. Pharmacologic Therapies for aortic stiffness in end-stage renal disease: a systematic review and meta-analysis. / R.A. Rodriguez, M. Spence, R. Hae et al. // *Can. J. Kidney. Health Dis.* – 2020. – Vol. 7. – P. 2054358120906974.
215. Chertow, G.M. Treat to Goal Working Group. Sevelamer attenuates the progression of coronary and aortic calcification in hemodialysis patients. / G.M. Chertow, S.K. Burke, P. Raggi // *Kidney Int.* – 2002. – Vol. 62. – P. 245–252.
216. Block, G.A. Effects of sevelamer and calcium on coronary artery calcification in patients new to hemodialysis. / G.A. Block, D.M. Spiegel, J. Ehrlich et al. // *Kidney Int.* – 2005. – Vol. 68. – P. 1815–1824.
217. Othmane Tel, H. et al. Effect of sevelamer on aortic pulse wave velocity in patients on hemodialysis: a prospective observational study. / H. Othmane Tel, G. Bakonyi, J. Egresits et al. // *Hemodial Int.* – 2007. – Vol. 11(suppl 3). – S13–S21.
218. Lomashvili, K.A. Effect of bisphosphonates on vascular calcification and bonemetabolism in experimental renal failure. / K.A. Lomashvili, M.C. Monier-Faugere, X. Wang, et al. // *Kidney Int.* – 2009. – Vol. 75. – P. 617–625.
219. Teronen, O. MMP inhibition and downregulation by bisphosphonates. / O. Teronen, P. Heikkilä, Y.T. Kontinen et al. // *Ann. N Y Acad. Sci.* – 1999. – Vol. 878. – P. 453–465.

220. Tintut, Y. Tumor necrosis factor- α promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. / Y. Tintut, J. Patel, F. Parhami et al. // *Circulation*. – 2000. – Vol. 102. – P. 2636–2642.
221. Rogers, M.J. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. / M.J. Rogers, S. Gordon, H.L. Benford et al. // *Cancer*. 2000. – Vol. 88. – P. 2961–2978.
222. Lehenkari, P.P. Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. / P.P. Lehenkari, M. Kellinsalmi, J.P. Näpänkangas et al. // *Mol. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 61. – P. 1255–1262.
223. Caffarelli, C. Bisphosphonates, atherosclerosis and vascular calcification: update and systematic review of clinical studies. / C. Caffarelli, A. Montagnani, R. Nuti et al. // *Clin. Interv. Aging*. – 2017. – Vol. 12. – P. 1819–1828.
224. Caillon, A. $\gamma\delta$ T cells mediate angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. / A. Caillon, M.O.R. Mian, J.C. Fraulob-Aquino et al. // *Circulation*. – 2017. – Vol. 135. – P. 2155–2162.
225. Mäki-Petäjä, K.M. Rheumatoid arthritis is associated with increased aortic pulse-wave velocity, which is reduced by anti-tumor necrosis factor- α therapy. / K.M. Mäki-Petäjä, F.C. Hall, A.D. Booth et al. // *Circulation*. – 2006. – Vol. 114. – P. 1185–1192.
226. Knowles, L. Do anti-tumour necrosis factor- α biologics affect subclinical measures of atherosclerosis and arteriosclerosis? A systematic review. / L. Knowles, N. Nadeem, P.J. Chowienczyk // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 2020. – Vol. 86. – P. 837–851.
227. Kim, E.-C. Senotherapeutics: emerging strategy for healthy aging and age-related disease. / E.-C. Kim, J.-R. Kim // *BMB reports*. – 2019. – Vol. 52(1). – P. 47-55.
228. Wang, C. von DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. / C. Wang, D. Jurk, M. Maddick et al. // *Aging Cell*. – 2009. – Vol.8(3). – P. 311-323.

229. Sikora, E. Targeting normal and cancer senescent cells as a strategy of senotherapy./ E. Sikora, A. Bielak-Zmijewska, G. Mosieniak // *Ageing Research Reviews*. – 2019. – Vol.55. – P. 100941.
230. Newman, J.C. Strategies and Challenges in Clinical Trials Targeting Human Aging. / J.C. Newman, S. Milman, S.K. Hashmi // *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*. – 2016. – Vol. 71(11). – P.1424-1434.
231. Burd, C.E. Barriers to the Preclinical Development of Therapeutics that Target Aging Mechanisms. / C.E. Burd, M.S. Gill, L.J. Niedernhofer et al. // *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. – 2016. – Vol. 71(11). – P. 1388-1394.
232. Kirkland, J.L. Senolytic drugs: from discovery to translation. / J.L. Kirkland, T. Tchkonja // *J. Intern. Med.* – 2020. – Vol.288. – P. 518–536.
233. Zhu, Y. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. / Y. Zhu, T. Tchkonja, T. Pirtskhalava et al. // *Aging Cell*. – 2015. – Vol. 14(4). – P. 644-658.
234. Niedernhofer, L.J. Senotherapeutics for healthy ageing. / L.J. Niedernhofer, P.D. Robbins // *Nature Reviews. Drug Discovery*. – 2018. – Vol. 17(5). – 377.
235. Xu, M. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. / M. Xu, T. Pirtskhalava, J.N. Farr et al. // *Nature Medicine*. – 2018. – Vol. 24(8). – P. 1246-1256.
236. Roos, C.M. Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. / C.M. Roos, B. Zhang, A.K. Palmer // *Aging Cell*. – 2016. – Vol. 15(5). – P. 973-977.
237. Farr, J.N. Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice. / J.N. Farr, M. Xu, M.M. Weivoda et al. // *Nature Medicine*. – 2017. – Vol. 23(9). – 1072-1079.
238. Schafer, M.J. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. / M.J. Schafer, T.A. White, K. Iijima et al. // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8. – P. 14532.

239. Ogrodnik, M. Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. / M. Ogrodnik, S. Miwa, T. Tchkonja et al. // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8. – P. 15691.
240. Bussian, T.J. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. / T.J. Bussian, A. Aziz, C.F. Meyer et al. // *Nature*. – 2018. – Vol. 562(7728). – P. 578-582.
241. Yosef, R. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. / R. Yosef, N. Pilpel, R. Tokarsky-Amiel et al. // *Nature Communications*. – 2016. – Vol. 7. – P. 11190.
242. Zhu, Y. New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463. / Y. Zhu, E.J. Doornebal, T. Pirtskhalava et al. // *Aging*. – 2017. – Vol. 9(3). – P. 955-963.
243. Jeon, O.H. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. / O.H. Jeon, C. Kim, R.-M. Laberge et al. // *Nature Medicine*. – 2017. – Vol. 23(6). – P. 775-781.
244. Samaraweera, L. A Novel Indication for Panobinostat as a Senolytic Drug in NSCLC and HNSCC. / L. Samaraweera, A. Adomako, A. Rodriguez-Gabin // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7(1). – P. 1900.
245. Hickson, L.J. Corrigendum to ‘Senolytics decrease senescent cells in humans: preliminary report from a clinical trial of dasatinib plus quercetin in individuals with diabetic kidney disease’. / L.T.J. Hickson, L.G.P. Langhi Prata, S.A. Bobart et al. // *EBioMedicine*. – 2020. – Vol. 47. – P. 446–456.
246. Johmura, Y. Senolysis by glutaminolysis inhibition ameliorates various age-associated disorders. / Y. Johmura, T. Yamanaka, S. Omori et al. // *Science*. – 2021. – Vol. 371. – P. 265–270.
247. Xu, M. JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. / M. Xu, T. Tchkonja, H. Ding et al. // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 2015. – Vol. 112. – E6301–E6310.
248. Lériada-Viso, A. Pharmacological senolysis reduces doxorubicin-induced

- cardiotoxicity and improves cardiac function in mice. / A. Léri-da-Viso, A. Estepa-Fernández, Á. Morellá-Aucejo et al. // *Pharmacol Res.* – 2022. – Vol. 183. – e. 106356.
249. Liu, P. Anti-Aging Implications of Astragalus Membranaceus (Huangqi): A Well-Known Chinese Tonic. / P. Liu, H. Zhao, Y. Luo // *Aging and Disease.* – 2017. – Vol. 8(6). – P. 868-886.
250. Hubbard, B.P. Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases. / B.P. Hubbard, D.A. Sinclair // *Trends in Pharmacological Sciences.* – 2014. – Vol. 35(3). – P. 146-154.
251. Lamming, D.W. Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-aging therapeutics. / D.W. Lamming, L. Ye, D.M. Sabatini // *The Journal of Clinical Investigation.* – 2013. – Vol. 123(3). – P. 980-989.
252. Si, H. Dietary antiaging phytochemicals and mechanisms associated with prolonged survival. / H. Si, D. Liu // *The Journal of Nutritional Biochemistry.* – 2014. – Vol. 25(6). – P. 581-591.
253. Nakamura, S. Autophagy and Longevity. / S. Nakamura, T. Yoshimori // *Molecules and Cells.* – 2018. – Vol. 41(1). – P. 65-72.
254. Chondrogianni, N. Proteasome activation: An innovative promising approach for delaying aging and retarding age-related diseases. / N. Chondrogianni, K. Voutetakis, M. Kapetanou, // *Ageing Research Reviews.* – 2015. – Vol. 23. – P. 37-55.
255. Burton, D.G.A., Cellular senescence: Immunosurveillance and future immunotherapy. / D.G.A. Burton, A. Stolzing // *Ageing Research Reviews.* – 2018. – Vol. 43. – 17-25.
256. Demaria, M. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. / M. Demaria, N. Ohtani, S.A. Youssef et al. // *Developmental Cell.* – 2014. – Vol. 31(6). – P. 722-733.
257. Krizhanovsky, V. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. / V. Krizhanovsky, M. Yon, R.A. Dickins et al. // *Cell.* – 2008. – Vol. 134(4). – 657-667.

258. Muñoz-Espín, D. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. / D. Muñoz-Espín, M. Cañamero, A. Maraver // *Cell*. – 2013. – Vol. 155(5). – P. 1104-1118.
259. Kirkland, J.L. Cellular senescence: a translational perspective. / J.L. Kirkland, T. Tchkonja // *EBioMedicine*. – 2017. – Vol. 21. – P. 21–28.
260. Zhu, Y. Orally active, clinically translatable senolytics restore α -Klotho in mice and humans. / Y. Zhu, L.G.P. Langhi Prata, E.O. Wissler Gerdes et al. // *EBioMedicine*. – 2022. – Vol. 77. – e103912.
261. Basisty, N. A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. / N. Basisty, A. Kale, O.H. Jeon et al. // *PLoS Biol.* – 2020. – Vol. 18. – e3000599.
262. Tripathi, U. Impact of senescent cell subtypes on tissue dysfunction and repair: importance and research questions. / U. Tripathi, A. Misra, T. Tchkonja et al. // *Mech. Ageing Dev.* – 2021. – Vol. 198. – e111548.
263. Tchkonja, T. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. / T. Tchkonja, Y. Zhu, J. van Deursen et al. // *J. Clin. Invest.* – 2013. – Vol. 123. – P. 966–972.
264. Hernandez-Segura, A. Unmasking transcriptional heterogeneity in senescent cells. / A. Hernandez-Segura, T.V. de Jong, S. Melov et al. // *Curr. Biol.* – 2017. – Vol. 27. – P. 2652–2660.
265. Faget, D.V. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. / D.V. Faget, Q. Ren, S.A. Stewart // *Nat. Rev. Cancer*. – 2019. – Vol. 19. – P. 439–453.
266. Chaib, S. Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic. / S. Chaib, T. Tchkonja, J.L. Kirkland // *Nature Medicine*. – 2022. – Vol. 28. – P. 1556–1568.
267. Ткаченко, Ю.В. Адаптация методики измерения скоростипульсовой волны для скрининговых обследований в амбулаторной практике. / Ю.В. Ткаченко, И.Д. Стражеско, Е.Н. Борисов [и др.] // *Клиническая практика*. – 2019. – N 10(1). – С. 48–56.

268. 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. / А.Г. Сорокина, Я.А. Орлова, О.А. Григорьева [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2021. – N 20(8). – С. 3051.
269. Mikael, L.R. Vascular Aging and Arterial Stiffness. / L.R. Mikael, A.M.G. Paiva, M.M. Gomes et al. // *Arq Bras Cardiol.* – 2017. – Vol. 109(3). – P. 253–258.
270. Avolio, A.P. Arterial Flow, Pulse Pressure and Pulse Wave Velocity in Men and Women at Various Ages. / A.P. Avolio, T. Kuznetsova, G.R. Heyndrickx et al. // *Adv Exp Med Biol.* – 2018. – Vol. 1065. – P. 153–168.
271. Battistoni, A. Vascular Aging and Central Aortic Blood Pressure: From Pathophysiology to Treatment. / A. Battistoni, A. Michielon, G. Marino et al. // *High Blood Press Cardiovasc Prev.* – 2020. – Vol. 27(4) . – P. 299–308.
272. Salminen, A. Insulin/IGF-1 signaling promotes immunosuppression via the STAT3 pathway: impact on the aging process and age-related diseases. / A. Salminen, K. Kaarniranta, A. Kauppinen // *Inflamm Res.* – 2021. – Vol. 1. – P. 1–19.
273. Vitale, G. Role of IGF-1 System in the Modulation of Longevity: Controversies and New Insights From a Centenarians' Perspective. / G. Vitale, G. Pellegrino, M. Vollery et al. // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2019. – Vol. 10. – P. 27.
274. Johnson, S.C. Nutrient Sensing, Signaling and Ageing: The Role of IGF-1 and mTOR in Ageing and Age-Related Disease. / S.C. Johnson // *Subcell Biochem.* – 2018. – Vol. 90. – P. 49–97.
275. Chisalita, S.I. Human aortic smooth muscle cells are insulin resistant at the receptor level but sensitive to IGF1 and IGF2. / S.I. Chisalita, G.S. Johansson, E. Liefvendahl et al. // *J Mol Endocrinol.* – 2009. – Vol. 43(6) . – P. 231–9.
276. Planavila, A. FGF21 and Cardiac Physiopathology. / A. Planavila // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2015. – Vol. 6. – P. 133.

277. Planavila A, Redondo-Angulo I, Ribas F, Garrabou G, Casademont J, Giralt M et al. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress. / A. Planavila, I. Redondo-Angulo, F. Villarroya et al. // *Cardiovasc Res.* – 2015. – Vol. 106(1). – P. 19-31.
278. Joki, Y. FGF21 attenuates pathological myocardial remodeling following myocardial infarction through the adiponectin-dependent mechanism. / Y. Joki, K. Ohashi, D. Yuasa et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2015. – Vol. 459(1). – P. 124-30.
279. Rupérez, C. Autophagic control of cardiac steatosis through FGF21 in obesity-associated cardiomyopathy. / C. Rupérez, C. Lerin, G. Ferrer-Curriu // *Int J Cardiol.* – 2018. – Vol. 260. – P. 163-170.
280. Cardoso, A.L. Towards frailty biomarkers: Candidates from genes and pathways regulated in aging and age-related diseases. / A.L. Cardoso, A. Fernandes, J.A. Aguilar-Pimentel et al. // *Ageing Res Rev.* – 2018. – Vol. 47. – P. 214–277.
281. Tezze, C. FGF21 as Modulator of Metabolism in Health and Disease. / C. Tezze, V. Romanello, M. Sandri // *Front Physiol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 419.
282. Chen, W. Matrix stiffness regulates the interactions between endothelial cells and monocytes. / W. Chen, B. Tian, J. Liang et al. // *Biomaterials.* – 2019. – Vol. 221. – P. 119362.
283. Srivastava, P. Imbalance between Angiotensin II - Angiotensin (1-7) system is associated with vascular endothelial dysfunction and inflammation in type 2 diabetes with newly diagnosed hypertension. / P. Srivastava, S. Badhwar, D.S. Chandran et al. // *Diabetes Metab Syndr.* – 2019. – Vol. 13(3) . – P. 2061–2068.
284. Stanifer, J.W. Relations of established aging biomarkers (IL-6, D-dimer, s-VCAM) to glomerular filtration rate and mortality in community-dwelling elderly adults. / J.W. Stanifer, L. Landerman, C.F. Pieper et al. // *Clin Kidney J.* – 2018. – Vol. 11(3). – P. 377–382.
285. Villarroya, J. Aging is associated with increased FGF21 levels but unaltered FGF21 responsiveness in adipose tissue. / J. Villarroya, J.M. Gallego- Escuredo,

- A. Delgado-Anglés // Aging cell. – 2018. – Vol. 17(5). – e12822.
286. Richter, V. Circulating vascular cell adhesion molecules VCAM-1, ICAM- 1, and E-selectin in dependence on aging. / V. Richter, F. Rassoul, K. Purschwitz et al. // Gerontology. – 2003. – Vol. 49(5). – P. 293-300.
287. Jia, G. Sowers JR. Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction. / G. Jia, A.R. Aroor, C. Jia // Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. – 2019. – Vol. 1865(7). – P. 1802–1809.
288. Shimizu, I. Cellular senescence in cardiac diseases. / I. Shimizu, T. Minamino // J Cardiol. – 2019. – Vol. 74(4). – P. 313–319.
289. Bruder, S.P. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. / S.P. Bruder, N. Jaiswal, S.E. Haynesworth // J Cell Biochem. – 1997. – Vol. 64(2). – P. 278–94.
290. Dodig, S. Hallmarks of senescence and aging. / S. Dodig, I. Čepelak, I. Pavić // Biochem Med (Zagreb). – 2019. – Vol. 29(3). – P. 030501.
291. Kirkland, J.L. Cellular Senescence: A Translational Perspective. / J.L. Kirkland, T. Tchkonja // EBioMedicine. – 2017. – Vol. 21. – P. 21-28.
292. Lawrence, I. Correlations between age, functional status, and the senescence-associated proteins HMGB2 and p16. / I. Lawrence, M. Bene, T. Nacarelli et al. // GeroScience. – 2018. – Vol. 40. – P. 193–199.
293. Liu, Y. Expression of p16 in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. / Y. Liu, H.K. Sanoff, H. Cho et al. // Aging Cell. – 2009. – Vol. 8(4). – P. 439-48.
294. Al-Khalaf, H.H. p16(INK4A) positively regulates p21(WAF1) expression by suppressing AUF1-dependent mRNA decay. / H.H. Al-Khalaf, A. Aboussekhra // PLoS One. – 2013. – Vol. 8(7). – e70133.
295. Stein, G.H. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. / G.H. Stein, L.F. Drullinger, A. Soulard // Mol Cell Biol. –1999. – Vol. 19(3). – P. 2109-17.

296. Guan, L. Assessment of cell cycle regulators in human peripheral blood cells as markers of cellular senescence. / L. Guan, K.C. Crasta, A.B. Maier // *Ageing Research Reviews*. – 2022. – Vol. 78. – e101634.
297. Chen, W. Matrix stiffness regulates the interactions between endothelial cells and monocytes. / W. Chen, B. Tian, J. et al. // *Biomaterials*. – 2019. – Vol. 221. – e119362
298. Huang, Y-Ch. Telomere Attrition and Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential in Cardiovascular Disease. / Y-Ch. Huang, Ch-Yu. Wang // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22(18). –e9867.
299. O’Sullivan, R.J. Telomeres: Protecting chromosomes against genome instability. / R.J. O’Sullivan, J. Karlseder // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 11(3). – P. 171–181.
300. Aubert, G. Telomeres and aging. / G. Aubert, P.M. Lansdorp // *Physiol Rev.* – 2008. – Vol. 88(2). – P. 557-79.
301. Hackett, J.A. Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability. / J.A. Hackett, D.M. Feldser, C.W. Greider // *Cell*. – 2001. – Vol. 106(3). – P. 275-86.
302. Blackburn, E.H. Telomere states and cell fates. / E.H. Blackburn // *Nature*. – 2000. – Vol. 408(6808). – P. 53-6.
303. Shay, J.W. Role of telomeres and telomerase in cancer. / J.W. Shay, W.E. Wright // *Semin Cancer Biol.* – 2011. – Vol. 21(6). – P. 349-53.
304. Aviv, A. Mutations, Cancer and the Telomere Length Paradox. / A. Aviv, J.J. Anderson, J.W. Shay // *Trends Cancer*. – 2017. – Vol. 3(4). – P. 253-258.
305. Brouillette, S.W. Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: A nested case-control study. / S.W. Brouillette, J.S. Moore, A.D. McMahon et al. // *Lancet*. – 2007. – Vol. 369(9556). – P. 107-14.
306. Haycock, P.C. Leucocyte telomere length and risk of cardiovascular disease:

- Systematic review and meta-analysis. / P.C. Haycock, E.E. Heydon, S. et al. // *BMJ*. – 2014. – Vol. 349. – g4227.
307. Epel, E.S. The rate of leukocyte telomere shortening predicts mortality from cardiovascular disease in elderly men. / E.S. Epel, S.S. Merkin, R. Cawthon et al. // *Aging (Albany NY)*. – 2008. – Vol. 1(1). – P. 81-8.
308. Jaiswal, S. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. / S. Jaiswal, P. Fontanillas, J. Flannick et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2014. – Vol. 371(26). – P. 2488-98.
309. Bekaert, S. Telomere length and cardiovascular risk factors in a middle-aged population free of overt cardiovascular disease. / S. Bekaert, T. De Meyer, E.R. Rietzschel et al. // *Aging Cell*. – 2007. – Vol. 6(5). – P. 639-47.
310. Fitzpatrick, A.L. Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study. / A.L. Fitzpatrick, R.A. Kronmal, J.P. Gardner et al. // *Am. J. Epidemiol.* – 2007. – Vol. 165(1). – P. 14-21.
311. Barbieri, M. Higher circulating levels of IGF-1 are associated with longer leukocyte telomere length in healthy subjects. / M. Barbieri, G. Paolisso, M. Kimura et al. // *Mech Ageing Dev.* – 2009. – Vol. 130(11-12). – P. 771-6.
312. Chatzizisis, Y.S. Role of Endothelial Shear Stress in the Natural History of Coronary Atherosclerosis and Vascular Remodeling. / Y.S. Chatzizisis, A.U. Coskun, M. Jonas et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2007. – Vol. 49. – P. 2379–2393.
313. Hallberg, L. Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron. / L. Hallberg, L. Hulthén // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2000. – Vol. 71(5). – P. 1147-60.
314. Efimenko, A.Y. Autologous Stem Cell Therapy: how aging and chronic diseases affect stem and progenitor cells. / T. Kohegura, Z. Akopyan, Y. Parfyonova. // *Biores Open Access*. – 2018. Vol. 4(1). – P. 26-38.
315. Itahana, K. Colorimetric detection of senescence-associated β galactosidase. / K. Itahana, Y. Itahana, G.P. Dimri // *Methods Mol. Biol.* – 2013.

– Vol. 965. – P. 143-56.

316. Maier, A.B. β -galactosidase activity as a biomarker of replicative senescence during the course of human fibroblast cultures. / A.B. Maier, R.G. Westendorp, D. Van Heemst // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2007. – Vol. 1100. – P. 323-32.
317. Lee, B.Y. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. / B.Y. Lee, J.A. Han, J.S. Im et al. // *Aging Cell.* – 2006. – Vol. 5(2). – P. 187–195.
318. Contrepois, K. Histone variant H2A. Accumulates in senescent cells and promotes inflammatory gene expression. / K. Contrepois, C. Coudereau, B.A. Benayoun et al. // *Nat. Commun.* – 2017. – Vol. 8. – P. 14995.
319. Liu, X-l. Oncogene-induced senescence: a double edged sword in cancer. / X-l. Liu, J. Ding, L-H. Meng // *Acta Pharmacol Sin.* – 2018. – Vol. 39(10). – P. 1553-1558.
320. Lopes-Paciencia, S. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. / S. Lopes-Paciencia, E. Saint-Germain, M-C. Rowell et al. // *Cytokine.* – 2019. – Vol. 117. – P. 15-22.
321. Ritschka, B. The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. / B. Ritschka, M. Storer, A. Mas et al. // *Genes Dev.* – 2017. – Vol. 31(2). – P. 172-183.
322. Acosta, J.C. Unbiased characterization of the senescence-associated secretome using SILAC-based quantitative proteomics. / J.C. Acosta, A.P. Snijders, J. Gil // *Methods Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 965. – P. 175-84.
323. Lau, L. Uncoupling the senescence-associated secretory phenotype from cell cycle exit via interleukin-1 inactivation unveils its protumorigenic role. / L. Lau, A. Porciuncula, A. Yu et al. // *Mol. Cell Biol.* – 2019. – Vol. 39(12). – e00586-18.
324. Saleh, T. Non-cell autonomous effects of the senescence-associated secretory phenotype in cancer therapy. / T. Saleh, L. Tyutynuk-Massey, E.K. Jr Cudjoe et al. // *Front Oncol.* – 2018. – Vol. 8. – P. 164.
325. Canino, C. SASP mediates chemoresistance and tumor-initiating-activity of mesothelioma cells. / C. Canino, F. Mori, A. Cambria et al. // *Oncogene.* – 2012. – Vol. 31(26). – P. 3148-63.

326. Gonzalez-Meljem, J.M. Paracrine roles of cellular senescence in promoting tumorigenesis. / J.M. Gonzalez-Meljem, J.R. Apps, H.C. Fraser et al. // *Br. J. Cancer.* – 2018. – Vol. 118(10). – P. 1283-1288.
327. Rao, S.G. SASP: tumor suppressor or promoter? Yes! / S.G. Rao, J.G. Jackson // *Trends Cancer.* – 2016. – Vol. 2(11). – P. 676-687.
328. Sun, Y. Urine-Derived Stem Cells Secreting Small Extracellular Vesicles Loaded in Acellular Amniotic Membrane for Wound Healing Promotion in Aged Mice. / Y. Sun, B. Chen, J. Zhang et al. // Available at SSRN. – 2019. – e3478068.
329. Acosta, J.C. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. / J.C. Acosta, A. Banito, T. Wuestefeld et al. // *Nat. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 15(8). – P. 978-90.
330. Efimenko, A.Yu. Adipose-derived stromal cells (ADSC) from aged patients with coronary artery disease keep MSC properties but exhibit age markers and have an impaired angiogenic potential. / N.A. Dzhoyashvili., N.I. Kalinina, T.N. Kochegura et al. // *Stem Cells Trans Med.* – 2014. – Vol. 3(1). – P. 32-41.
331. Jurk, D. Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. / D. Jurk, C. Wilson, J. Passos et al. // *Nat. Commun.* – 2014. – Vol. 2. – P. 4172.
332. Diekman, B.O. Expression of p16 is a biomarker of chondrocyte aging but does not cause osteoarthritis. / B.O. Diekman, G.A. Sessions, J.A. Collins et al. // *Aging Cell.* – 2018. – Vol. 17. – e12771.
333. Pantsulaia, I. Senescent endothelial cells: potential modulators of immunosenescence and ageing. / I. Pantsulaia, W.M. Ciszewski, J. Niewiarowska // *Ageing Res. Rev.* – 2016. – Vol. 29. – P. 13–25.
334. Weber, C. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. / C. Weber, H. Noels // *Nat. Med.* – 2011. – Vol. 17(11). – P. 1410–22.
335. Banerjee, P. Senescence-associated secretory phenotype as a hinge between cardiovascular diseases and cancer. / P. Banerjee, S. Kotla, L. Velatooru et al. // *Front. Cardiovasc. Med.* – 2021. – Vol. 8. – e763930.