

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского»

На правах рукописи



КОНДАКОВА ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА

**ВЫЯВЛЕНИЕ КОМПЛЕКСНЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ
МАРКЕРОВ ВОЗРАСТ-ЗАВИСИМЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ОРГАНИЗМА
ЧЕЛОВЕКА**

1.5.5 – физиология человека и животных

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:
доктор биологических наук, доцент
Мария Валерьевна Ведунова

Нижегород - 2022 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
1. Обзор литературы	11
1.1. Основные взгляды на процесс старения человека	11
1.2. Современные концепции старения	12
1.3. Биологический возраст и способы его измерения	17
1.3.1. Биохимические и иммунологические маркеры старения	18
1.3.2. Эпигенетические маркеры старения	20
1.4. Возраст-обусловленные изменения психофизиологических реакций человека	22
1.5. Гендерные различия возраст-зависимых изменений	24
1.6. Патологии, ассоциированные с ускоренным старением	26
1.6.1. Хроническая болезнь почек как модель ускоренного старения и её связь с сердечно-сосудистыми заболеваниями	28
1.7. Однонуклеотидные полиморфизмы как фактор развития возраст-ассоциированных патологий сердечно-сосудистой системы	30
2. Материалы и методы исследования	34
2.1. Объект исследования	34
2.2. Материалы исследования	35
2.3. Методы исследования	35
2.3.1. Определение биологического возраста по модели PhenoAge	35
2.3.2. Выявление некоторых биомаркеров ускоренного старения (GDF15, FGF21, FGF 23)	38
2.3.3. Выявление иммунологических показателей, ассоциированных с биологическим возрастом человека	38
2.3.4. Кариотипирование с оценкой уровня aberrаций хромосом	39
2.3.5. Выделение геномной ДНК	41
2.3.6. Определение полиморфизмов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (Real-time PCR)	41

2.3.7. Количественная оценка метилирования ДНК	43
2.3.8. Выявление возрастной акселерации эпигенетического возраста	43
2.3.9. Психофизиологические тесты когнитивных функций человека	44
2.3.10. Анализ функционального состояния стенки сосудов методом многоканальной объёмной сфигмографии	46
2.3.11. Статистические методы анализа	46
3. Результаты и их обсуждение	48
3.1. Определение биологического возраста с использованием модели PhenoAge	48
3.2. Возраст-зависимые изменения кариотипа человека	50
3.3. Оценка однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) генов как фактора риска развития сердечно–сосудистых заболеваний	56
3.4. Определение эпигенетического возраста и возрастной акселерации	68
3.5. Определение уровня некоторых биомаркеров, ассоциированных со старением	70
3.6. Выявление иммунологических показателей, ассоциированных с биологическим возрастом человека	71
3.7. Выявление возраст-опосредованных психофизиологических показателей	75
3.8. Исследование биологического возраста при терминальной стадии хронической почечной недостаточности	84
3.9. Исследование уровня биомаркеров в зависимости от исхода заболевания	90
3.10. Выявление иммунологических маркеров ускоренного старения при терминальной стадии хронической почечной недостаточности	93
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	97
ВЫВОДЫ	101
Список сокращений	103
ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА	105

Введение

Актуальность исследования

Одной из актуальнейших проблем современного мира, связанной с повсеместно возрастающей продолжительностью жизни, является старение населения. Старение - это сложный многофакторный процесс, ассоциированный с нарастающей функциональной дисрегуляцией и дегенерацией всех систем органов и тканей организма (Fuellen et al., 2019). Известно, что большая часть хронических и генетически детерминированных патологий связана с возрастом и развитием комплекса возраст - обусловленных нарушений метаболизма (Lowsky et al., 2014). Существующая разница между отдельными индивидуумами в процессе старения указывает на гетерогенность механизмов адаптации организма к возрастным изменениям. Следует отметить, что четких границ между здоровым и патологическим старением не существует, возраст-зависимые изменения во многом определяются скоростью старения, которую часто характеризуют как биологический возраст (Kudryashova et al., 2020). Одним из ключевых вопросов современной биологии и медицины является поиск адекватного метода оценки биологического возраста и маркеров возраст-зависимых изменений в организме.

Существует ряд подходов для построения биологических часов человека, основанных на различных параметрах. Наиболее достоверными и точными являются модели прогнозирования возраста на основе измерения метилирования ДНК. Они являются ценным инструментом для адекватной оценки скорости возрастных изменений (Horvath et al., 2016; Christiansen et al., 2016) и выявления ускорения биологического возраста (Horvath and Raj, 2018). Однако данный метод по-прежнему малодоступен и не может быть широко применен для определения риска ранней манифестации возраст-зависимых заболеваний и смертности. В связи с этим крайне актуальным остается поиск более простых биомаркеров, имеющих высокую прогностическую ценность при определении возрастных изменений и риска смертности.

В настоящее время существует ряд биомаркеров, которые коррелируют с возраст-зависимыми изменениями организма (Hartmann et al., 2021). В частности,

процесс старения характеризуется накоплением генетических повреждений на протяжении всей жизни, поэтому одним из биомаркеров старения является геномная нестабильность (da Silva et al., 2019). Кроме того, было показано, что хроническое системное воспаление слабой степени, которое сопровождает старение, известное как «inflammaging», связано с множеством болезненных состояний, обычно наблюдаемых у пожилого населения (Santoro et al., 2021). Проведенные ранее исследования демонстрируют информативность ряда биохимических показателей функционирования различных систем организма в качестве предикторов возраста (Jylhävä et al., 2017). Выявление ранних биомаркеров старения может позволить не только спрогнозировать индивидуальную траекторию старения организма, но и отложить, а в некоторых случаях и предотвратить развитие заболеваний.

К патологиям, провоцирующим возрастную акселерацию и ведущим не только к ухудшению качества жизни, но и ранней смертности, можно отнести ВИЧ (Horvath and Levine, 2015), синдром Дауна (Horvath et al., 2015), нейродегенеративные заболевания (Levine et al., 2015), а также хроническую болезнь почек (ХБП). Сегодня распространенность данного заболевания достигла масштабов эпидемии и составляет примерно 10% от населения Земли (Stenvinkel, 2013). Пациенты с терминальной стадией хронической почечной недостаточности (ТХПН) - наиболее тяжелой формой ХБП, демонстрируют фенотипы преждевременного старения во всех системах органов (Schroth et al., 2020; Ebert et al., 2020), таким образом данная патология может рассматриваться в качестве модели ускоренного старения.

Кроме того, на протяжении многих десятилетий нерешенным остается вопрос о причинах различий в продолжительности жизни у мужчин и женщин. Лонгитюдные популяционные исследования в различных странах и в разные эпохи показали, что женщины живут дольше мужчин (Luy and Gast, 2014). В настоящее время разница в продолжительности жизни между мужчинами и женщинами варьирует в зависимости от региона проживания, достигая максимума в России – 9 лет (Foreman et al., 2018). Гендерные различия остаются постоянными в отношении

сердечно-сосудистых, нейродегенеративных заболеваний и рака. При этом предложенные ранее гипотезы относительно половых различий в продолжительности жизни до сих пор не нашли убедительного подтверждения (Marais et al., 2018; Baum et al., 2021). Выявление ранних возрастных изменений и изучение гендерных различий этих процессов имеет решающее значение для ранней профилактики патологий и достижения цели здорового старения.

Цель и основные задачи исследования

Целью настоящего исследования стало выявление комплекса новых физиологических маркеров, ассоциированных с возраст-зависимыми изменениями в организме человека.

В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Охарактеризовать возрастные особенности с учетом гендерных факторов в выборке жителей центрального региона Российской Федерации;
2. Оценить ряд генетических, биохимических, иммунологических и психофизиологических показателей, ассоциированных с возраст-зависимыми изменениями организма человека;
3. Проанализировать биохимические, иммунологические и эпигенетические факторы ускоренного старения в модели ускоренного старения. Провести оценку прогностической значимости отдельных показателей на клинической модели ускоренного старения;
4. Выявить физиологические параметры для построения новых моделей определения биологического возраста человека.

Научная новизна

Впервые проведены масштабные исследования полногеномного метилирования ДНК жителей центрального региона Российской Федерации. Определен биологический возраст на основе полученных результатов с использованием основных эпигенетических моделей, а также впервые

верифицирована модель определения фенотипического возраста на жителях Российской Федерации.

Особенностью данного исследования является изучение маркеров возраст-зависимых изменений организма среди различных групп населения, в том числе долгожителей (старше 85 лет), а также их прямых потомков (от 1 до 3-х поколений), лиц с ускоренным старением (пациенты с ТХПН, находящиеся на гемодиализной терапии) и условно здоровых добровольцев с учетом гендерных различий. Данный подход позволяет сократить общепопуляционные колебания при оценке различных показателей и более точно выявлять значимые маркеры.

Изучены физиологические особенности возраст-зависимых изменений организма человека с учетом гендерных различий, показаны особенности гендер-специфичной возрастной акселерации.

Впервые изучен комплекс факторов (иммунологических, биохимических), обуславливающих ускоренное старение организма у пациентов с терминальной стадией хронической почечной недостаточности. Установлена возрастная акселерация по основным типам определения биологического возраста, включая эпигенетические модели на группе пациентов с ТХПН. Выявлено достоверно значимое изменение содержания биохимических и иммунологических маркеров в плазме крови пациентов с ТХПН по сравнению с контрольной группой. Показано, что концентрация всех исследуемых биомаркеров не коррелирует с продолжительностью и клиническими показателями заболевания, а вероятно определяется более сложными индивидуальными механизмами гомеостатической регуляции. Впервые показано прогностическое значение определения FGF21 у пациентов с ТХПН на гемодиализной терапии с неблагоприятным годичным прогнозом выживаемости.

В результате проведенного исследования были получены данные, позволившие разработать новые модели определения биологического возраста человека (Yusipov, Kondakova et al., 2022) на основе биохимических маркеров, иммунологического профиля и психофизиологических показателей организма человека.

Научно-практическая значимость

Разработанные биологические часы и выявленные механизмы развития возраст-зависимых изменений могут стать фундаментальной основой для разработки новых терапевтических стратегий.

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационного исследования, позволяют существенно изменить подход к молекулярной диагностике клинически значимых патологий, связанных с возрастом, и являются фундаментальной основой для разработки системы наиболее точного определения биологического возраста человека.

Выявление возрастной акселерации и маркеров риска смертности имеет особое значение для пациентов с хронической болезнью почек и может привести к появлению новых терапевтических подходов лечения терминальной стадии хронической почечной недостаточности.

Результаты диссертационного исследования используются в образовательном процессе кафедры общей и медицинской генетики Института биологии и биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработанные в Европе и Америке модели определения биологического возраста (фенотипического, эпигенетического) являются адекватными способами оценки биологического возраста для популяции жителей центрального региона Российской Федерации.

2. Показана отрицательная возрастная акселерация у женщин в моделях определения фенотипического и эпигенетического возраста.

3. Выявлен комплекс биохимических, иммунологических и психофизиологических показателей, ассоциированных с возраст-зависимыми изменениями в организме человека.

4. Терминальная стадия хронической почечной недостаточности ассоциирована с возрастной акселерацией, характеризующейся как фенотипическими и эпигенетическими, так и иммунологическими изменениями.

Личный вклад автора

Автор лично участвовал в проведении всех экспериментальных исследований, обработке полученных и изложенных в диссертации результатов, их анализе и обсуждении, а также совместно с соавторами участвовал в написании научных статей и апробации результатов исследования на конференциях и симпозиумах.

Достоверность научных результатов

Достоверность научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных и надежностью использования высокотехнологичных методов исследования, а также качественной и количественной согласованностью с результатами независимых исследований других авторов.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на 13 международных и российских мероприятиях, в том числе: VI съезде биофизиков России (16-21 сентября 2019, Сочи), XXI Зимней молодежной школе ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (24 - 29 февраля 2020, Курчатовский институт, Санкт-Петербург), 73-й всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (28 - 30 октября 2020, Нижний Новгород), 74-й Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», посвященной памяти проф. А.П. Веселова (Н. Новгород, 20–23 апреля 2021 г.), VII съезде физиологов СНГ с международным участием (Сочи-Дагомыс, 3-7 октября 2021 г.), 3rd International Conference Volga Neuroscience Meeting 2021 (Nizhny Novgorod, «Chayka» Resort Hotel August 24-27, 2021 г.), III конференции «Фундаментальные науки для медицины-2021» (FSM-2021) (Нижний Новгород, 27 декабря 2021 г.), XXVIII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2022»

(Санкт-Петербург, 24-26 марта 2022 г.), а также конкурсах инновационных проектов «МИР» и «УМНИК».

Публикации

По теме диссертации опубликовано 18 работ, из них 4 статьи в реферируемых журналах, входящих в перечень ВАК, 14 тезисов в сборниках всероссийских и международных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, выводы и список литературы. Работа изложена на 119 страницах, содержит 35 рисунков и 9 таблиц. Список литературы содержит 147 источников.

Благодарности

Автор выражает благодарность за разработку моделей определения биологического возраста ipAGE и Age-Estimation Clock, а также модели определения когнитивного возраста человека сотрудникам кафедры прикладной математики ИИТММ ННГУ Юсипову И.И., Кривоносову М.И. и Иванченко М.В. За помощь в наборе пациентов с хронической почечной недостаточностью научному сотруднику кафедры общей и медицинской генетики ИББМ ННГУ, главному врачу клиники амбулаторного гемодиализа «Фесфарм НН» Лобановой Н.А. За помощь в визуализации данных магистранту 2-го года направления «Биоинформатика» ИББМ ННГУ Корсаковой Д.О.

1. Обзор литературы

1.1. Основные взгляды на процесс старения человека

Старение - это неумолимый, зависящий от времени, многофакторный процесс, характеризующийся серией прогрессивных и необратимых физиологических изменений, связанных с потерей функциональных, психологических и социальных возможностей (Rose et al., 2012)

Старение - это непрерывное естественное и многофакторное явление, характеризующееся накоплением дегенеративных процессов, которые, в свою очередь, подкрепляются множественными изменениями и повреждениями в молекулярных путях, что приводит к системным патологиям организма (Franceschi et al., 2018).

Процесс старения имеет четко определенные характеристики у всех живых существ. Физиологическое старение сопровождается изменением многих биохимических параметров и прогрессирующим ухудшением, затрагивающим различные системы органов, существенно влияя на индивидуальное и социальное поведение (Mitnitski et al., 2015). Все эти изменения ухудшают состояние здоровья человека и снижают качество его жизни.

Существует два типа старения: естественное старение (биологическое или физиологическое) и преждевременное старение (патологическое). Естественное старение происходит, когда человек претерпевает неизбежные возрастные и временные изменения (Ashapkin et al., 2019). Процесс физиологического старения очень неоднороден даже среди особей одного вида. Различия в скорости старения привели к определению «биологического возраста», который связан с функциональным состоянием систем органов, независимо от хронологического возраста человека (De Toda et al., 2016). Факторы, влияющие на физиологический процесс старения, можно классифицировать как внутренние (например, наследственность, пол и раса) или внешние (например, окружающая среда, вредные привычки, диета и физическая активность) (Gutiérrez et al., 2018; Gadecka and Bielak-Zmijewska, 2019).

Напротив, патологическое старение характеризуется различными физическими и психическими расстройствами, обычно связанными с физиологическим старением в более раннем возрасте. Эти изменения связаны с хроническими заболеваниями, факторами окружающей среды, вредными привычками (такими как курение, употребление алкоголя и других наркотиков) и раком (Kubben and Misteli, 2017; Brietzke et al., 2019).

Физиологическое старение является следствием функционального упадка клеток, тканей и органов, вызывающего характерные изменения на протяжении всего жизненного цикла. Старение определяется генетическими и социально-физиологическими факторами или факторами окружающей среды, такими как диета, психический стресс, образование, социально-экономический статус, малоподвижный образ жизни или злоупотребление психоактивными веществами (Crimmins, 2021). Оба могут частично модулироваться, особенно компонент окружающей среды, который прямо или косвенно регулирует генетический фактор, играющий ключевую роль в процессе старения. Физиологический процесс старения и долголетие видов регулируются генетически, однако человеческое долголетие наследуется только примерно на 15-40%, с недавней оценкой в 16% (Morris et al., 2019). Таким образом, факторы окружающей среды (84%) превосходят генетическое бремя (16%) как решающие факторы старения.

1.2. Современные концепции старения

В настоящее время процесс старения характеризуется 10 общими чертами (Рис. 1). На клеточном уровне признаки старения включают геномную нестабильность, истощение теломер, эпигенетические изменения, потерю протеостаза, дерегуляцию чувствительности к питательным веществам (нарушение метаболизма), дисфункцию митохондрий, клеточное старение, истощение стволовых клеток, изменение межклеточной коммуникации и иммунное старение (López-Otín et al., 2013, Figuer et al., 2021).



Рис. 1. Общие признаки старения согласно современным концепциям (по López-Otín et al., 2013, Figuer et al., 2021)

Клеточное старение

Клеточное старение описывается как стабильное состояние остановки роста, при котором клетки не могут размножаться в ответ на несколько стрессов. Фенотип стареющих клеток характеризуется уплощенной морфологией, повышенной экспрессией белков, ингибирующих клеточный цикл, а также более высокой активностью β -галактозидазы. Стареющие клетки проявляют свои плеiotропные биологические функции посредством транскрипционной активации программы SASP, состоящей из цитокинов, хемокинов, факторов роста, протеаз внеклеточного матрикса и даже внеклеточных везикул, которые воздействуют на локальное микроокружение ткани (Sanderson and Scherbov, 2014). Действительно, клеточное старение влечет за собой хроническое воспаление через SASP и ухудшает регенеративный потенциал тканей при воздействии на стволовые клетки, что приводит к хроническим возрастным заболеваниям и старению организма (Gutiérrez et al., 2018).

Кроме того, в иммунных клетках также было обнаружено клеточное старение, вызывающее снижение функции иммунной системы, явление, называемое иммуностарением. Это явление приводит к нарушению клиренса стареющих клеток, способствуя тем самым их накоплению в тканях (Gadecka and Bielak-Zmijewska, 2019).

Иммунное старение

Согласно ряду исследований, с возрастом у людей, как правило, развивается хроническое провоспалительное состояние, известное как «inflammaging» и характеризующееся высоким уровнем циркулирующих воспалительных молекул (Ahadi et al., 2020). Данный термин описывает вялотекущее хроническое системное воспаление при старении и является очень значительным фактором риска заболеваемости и смертности у пожилых людей. Следовательно, «inflammaging» можно считать основной мишенью для антивозрастных стратегий. (Franceschi et al., 2018).

Многие эпидемиологические и биодемографические исследования показывают, что биомаркеры воспаления являются надежными предикторами заболеваемости (хронических заболеваний) и смертности у пожилых людей (Singh and Newman, 2011).

Накопление стареющих клеток и связанного с ними провоспалительного фенотипа является постоянным триггером воспаления (Kubben and Misteli, 2017). Отмечается повышенный уровень медиаторов, секретируемых моноцитами/макрофагами, таких как фактор некроза опухоли ($\text{TNF}\alpha$), интерлейкин-1 (IL-1) и интерлейкин-6 (IL-6), а также хемокинов, таких как хемоаттрактантный белок моноцитов-1 (MCP-1) и интерлейкина-8 (ИЛ-8). При этом противовоспалительные медиаторы, такие как IL-10, IL-4, IL-13 также могут быть повышены в качестве меры для контроля этого состояния (Brietzke et al., 2019).

Одним из общих знаменателей старения является накопление генетических повреждений на протяжении всей жизни (Moskalev et al., 2012). Более того, многочисленные болезни преждевременного старения, такие как синдром Вернера и синдром Блума, являются следствием повышенного накопления повреждений ДНК (Burtner and Kennedy, 2010). Целостность и стабильность ДНК постоянно подвергаются воздействию экзогенных физических, химических и биологических агентов, а также эндогенных угроз, включая ошибки репликации ДНК, спонтанные гидролитические реакции и активные формы кислорода (АФК) (Hoeijmakers, 2009).

Генетические повреждения, возникающие в результате внешних или внутренних воздействий, очень разнообразны и включают точечные мутации, транслокации, хромосомные дупликации и делеции, укорочение теломер и нарушение генов, вызванное интеграцией вирусов или транспозонов (Faggioli et al., 2012; Форсберг и др., 2012). Все эти формы изменений ДНК могут влиять на основные гены и транскрипционные пути, что приводит к дисфункциональным клеткам, которые, если их не устранить апоптозом или старением, могут поставить под угрозу ткани и гомеостаз организма.

Чтобы свести к минимуму эти повреждения, организмы развили сложную сеть механизмов репарации ДНК, которые в совокупности способны справляться с большинством повреждений, нанесенных ядерной ДНК (Lord and Ashworth, 2012). Системы геномной стабильности также включают в себя специфические механизмы для поддержания соответствующей длины и функциональности теломер и для обеспечения целостности митохондриальной ДНК (мтДНК) (Blackburn et al., 2006; Kazak et al., 2012). В дополнение к этим прямым повреждениям ДНК дефекты ядерной архитектуры, известные как ламинопатии, могут вызывать нестабильность генома и приводить к синдромам преждевременного старения (Worman, 2012).

Различные эпигенетические изменения влияют на все клетки и ткани на протяжении всей жизни (Talens et al., 2012). Эпигенетические изменения включают изменения в паттернах метилирования ДНК, посттрансляционную модификацию гистонов и ремоделирование хроматина.

Метилирование ДНК представляет собой включение метильной группы в молекулу ДНК, особенно когда за цитозином следует гуанин (Klose et al., 2006). Метилирование ДНК обычно связано со снижением транскрипционной активности и запускается семейством белков ДНК-метилтрансферазы (Jones, 2012).

Связь между метилированием ДНК и старением сложна. Ранние исследования описывали возрастное глобальное гипометилирование, но последующие анализы показали, что несколько локусов, в том числе те, которые соответствуют различным генам-супрессорам опухолей, фактически становятся гиперметилированными с возрастом (Maegawa et al., 2010). Клетки пациентов и мышей с прогероидными синдромами демонстрируют паттерны метилирования ДНК и модификации гистонов, которые в значительной степени повторяют те, которые обнаружены при нормальном старении (Osorio et al., 2010; Шумакер и др., 2006). Все эти эпигенетические дефекты или эпимутации, накопленные на протяжении всей жизни, могут специфически влиять на поведение и функциональность стволовых клеток (Pollina and Brunet, 2011).

В отличие от мутаций ДНК, эпигенетические изменения теоретически обратимы, что открывает возможности для разработки новых антивозрастных методов лечения (Freije and López-Otín, 2012; Рандо и Чанг, 2012). Известно, что восстановление физиологического ацетилирования H4 путем введения ингибиторов гистондеацетилазы позволяет избежать проявления возрастного нарушения памяти у мышей (Peleg et al., 2010), что указывает на то, что реверсия эпигенетических изменений может оказывать нейропротекторное действие.

1.3. Биологический возраст и способы его измерения

Хронологический возраст, определяемый как время, прошедшее с момента рождения, является главным фактором риска функциональных нарушений, хронических заболеваний и смертности. Однако из-за гетерогенности показателей здоровья пожилых людей, хронологический возраст не является точным показателем скорости процесса старения (Lowsky et al., 2014). Это явление привело к понятию «биологический возраст», которое оценивает, насколько хорошо индивид функционирует по сравнению с другими людьми того же хронологического возраста. Однако, несмотря на свое простое определение, количественная оценка биологического возраста является сложной задачей.

В течение последних десятилетий были предприняты обширные усилия по выявлению биомаркеров для количественной оценки старения человека на клеточном, тканевом и организменном уровнях, которые, согласно определению Американской федерации исследования старения должны соответствовать ряду критериев (Johnson, 2006, Butler et al., 2004). Однако на сегодняшний день такой маркер или комбинация маркеров не появилось. Скорость биологического старения также может различаться в разных тканях, и, следовательно, может оказаться невозможным принять измеримую общую скорость старения организма.

Биологический возраст понимается как синтетический показатель, состоящий из одного маркера или комбинации нескольких биологических маркеров, которые сами по себе или в сочетании с функциональными маркерами не только коррелируют с хронологическим возрастом, но и способны идентифицировать людей «младше» или «старше», чем их хронологический возраст в тех же демографических когортах. С помощью таких биомаркеров можно было бы получить траектории старения, где «ускоренные» предсказывали бы нездоровое старение и болезни, а «замедленные» — здоровое старение и долголетие.

Учитывая, что старение является самым большим фактором риска ряда хронических заболеваний, а также основной причиной функционального

снижения, крайне важно разработать способы измерения скорости старения конкретного человека. Эффективный показатель биологического возраста можно использовать для прогнозирования различных результатов для здоровья, таких как физические и когнитивные функции, заболеваемость и смертность. Если биологическое старение можно отслеживать, медицинские вмешательства могут применяться до появления первых клинических симптомов или появления хронических заболеваний. Последнее особенно важно, потому что большинство заболеваний, связанных со старением, имеют длительные латентные периоды, предшествующие манифестации, в отличие от узких временных окон после проявления для эффективного лечения (Franceschi et al., 2018).

На сегодняшний день нет клинически подтвержденных маркеров биологического возраста; однако в последние годы был предложен ряд многообещающих кандидатов (Franceschi et al., 2018). Их можно разделить на молекулярные (на основе ДНК, РНК и т. д.) или фенотипические биомаркеры старения - клинические показатели, такие как артериальное давление, сила сжатия, липиды или биохимические показатели функционирования различных систем организма (Jylhävä et al., 2017).

1.3.1. Биохимические и иммунологические маркеры старения

В настоящее время существует несколько информативных маркеров, связанных со старением и ускорением старения, которые показали высокую диагностическую ценность при сердечно-сосудистых, нейродегенеративных заболеваниях (болезнь Альцгеймера) и онкологии (Hartmann et al., 2021). В частности, фактор роста фибробластов 21 (FGF21) считается одним из ключевых маркеров возраст-зависимых заболеваний (Kondo et al., 2020). Совсем недавно FGF21 начали рассматривать как биомаркер, который увеличивается при ожирении, резистентности к инсулину, сердечно-сосудистых заболеваниях и ХБП (Xie and Leung 2017). Концентрация FGF21 в сыворотке увеличивалась при ухудшении функции почек, причем самые высокие значения наблюдались на 5

стадии ХБП (Hindricks et al., 2014). Повышение уровня FGF21 может быть компенсаторным ответом на лежащий в основе метаболический стресс или может быть связано с нарушением передачи сигналов, приводящее к устойчивости к этому фактору роста (Ong et al. 2015).

Фактор дифференцировки роста 15 (GDF15), также известный как цитокин, ингибирующий макрофаги (MIC-1), является членом семейства трансформирующих факторов роста- β (TGF- β). GDF15 модулирует энергетический метаболизм, регулируя функции митохондрий (Conte et al. 2020). В норме GDF15 экспрессируется в низких концентрациях во многих тканях. Гиперэкспрессия GDF15 наблюдается при развитии патологических состояний, таких как повреждение тканей и воспаление, при которых он играет защитную роль (Assadi et al. 2020). Совсем недавно GDF15 стал потенциальным биомаркером процесса старения и многих возрастных заболеваний, а также зарекомендовал себя как точный и ранний биомаркер смертности (Assadi et al. 2020).

Фактор роста фибробластов 23 (FGF23) является ключевым регуляторным фактором фосфатного гомеостаза и вырабатывается главным образом в костной ткани. Его основная гормональная функция заключается в регулировании уровня сывороточного фосфата и метаболизма витамина Д (Imel, Biggin, 2019). Повышение FGF23 может быть предиктором неблагоприятных исходов при ХБП, таких как риск развития сердечно-сосудистых заболеваний и смертности. Пациенты с повышенным уровнем FGF23 имеют более высокие показатели кальцификации аорты и коронарных артерий, чем пациенты с более низким уровнем FGF23. В популяции, не страдающей ХБП, более высокий уровень FGF23 независимо связан с повышенным риском основных сердечно-сосудистых событий. Таким образом, повышение уровня FGF23 является независимой детерминантой ССЗ как у пациентов с заболеваниями почек, так и у населения в целом (Lu, Hu, 2018).

CXCL9 представляет собой провоспалительный цитокин, который опосредует воспалительные реакции и связан с риском смертности от сердечно-

сосудистых заболеваний (Altara et al., 2015). Ранее было показано, что хемокин CXCL9, в норме активно участвующий в воспалительном иммунном ответе и рекрутировании макрофагов, в условиях старения является ключевым участником системного хронического воспаления, связан со старением сердечно-сосудистой системы и нарушением эластичности сосудов.

Одной из основных и недавних тенденций в области старения является разработка биомаркеров на основе -омик, которые имеют больший потенциал для оценки многофакторных процессов, а также использования вариаций на уровне метилирования ДНК. Сочетание эффективных биомаркеров нового поколения, способных оценивать биологический возраст, с классическими и инновационными биохимическими и функциональными специфическими для заболевания маркерами представляет собой наилучшую стратегию выявления траекторий старения, специфичных для заболевания (Franceschi et al., 2018).

1.3.2. Эпигенетические маркеры старения

Изменчивость метилирования ДНК уже несколько лет занимает центральное место в поиске маркеров биологического возраста. В основополагающей статье 2005 г. впервые показали, что у человека паттерны метилирования ДНК сильно меняются с возрастом (Fraga et al., 2005). Таким образом метилирование ДНК оказалось мощным источником надежных биомаркеров, способных коррелировать с различными клиническими состояниями (Bacalini et al., 2015; Durso et al., 2017)

Одним из наиболее поразительных результатов этих эпигенетических исследований на человеческих моделях является возникновение направленных и стохастических изменений метилирования ДНК, которые сильно коррелируют с хронологическим возрастом (Gentilini et al., 2015). Эти наблюдения проложили путь к генерации ряда «часов метилирования», которые являются результатом комбинации различных сайтов CpG, уровень метилирования которых коррелирует с хронологическим возрастом. Многие из таких часов были разработаны для

судебно-медицинских целей (Shi et al., 2017), что подчеркивает высокую точность оценки хронологического возраста, которая может быть получена из данных о метилировании ДНК.

В настоящее время наиболее используемыми являются пять «эпигенетических часов», которые показывают, насколько биологический возраст человека отличается от его хронологического возраста на момент измерения. Эти часы охватывают основанные на метилировании предикторы хронологического возраста: HorvathAge (Horvath, 2013), HannumAge (Hannum et al., 2013), предикторы смертности от всех причин (DNAm PhenoAge, DNAm GrimAge) и длины теломер (DNAm Telomere Length).

Эпигенетические часы DNAm PhenoAge построены по данным метилирования 513 сайтов CpG с использованием модели регрессии и способны предсказывать смертность почти от всех причин (Levine et al., 2018).

Часы метилирования ДНК Хорвата приобрели наибольшую популярность в качестве маркера биологического возраста в связи с его применимостью ко всем тканям, в то время как остальные маркеры применимы только в крови. Во многих различных исследованиях часы Хорвата показали признаки ускоренного старения во многих различных возрастных клинических состояниях, а также признак замедления старения у человеческих моделей долголетия, таких как итальянские долгожители и их потомки (Horvath et al., 2015; Armstrong et al., 2017).

На сегодняшний день эпигенетические часы, получившие название «DNAm GrimAge», превзошли своих предшественников в прогнозировании риска смертности, а также многих возрастных заболеваний. Более высокий показатель DNAm GrimAge был прочно связан со смертностью от всех причин в течение восьмого десятилетия. Предиктор продолжительности жизни, DNAm GrimAge является составным биомаркером на основе семи суррогатах DNAm и основанной на DNAm оценке количества лет курения. Корректировка DNAm GrimAge для хронологического возраста позволила создать новую меру ускорения эпигенетического возраста AgeAccelGrim (Lu et al., 2019).

Лаборатория Мариони сравнила эффективность эпигенетических предикторов возраста и смертности с точки зрения продолжительности жизни и прогнозирования заболеваний в одной из когорт (Hillary et al., 2020). GrimAge в целом показал лучшую производительность; он предсказал распространенность хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и частоту ряда заболеваний, включая диабет 2 типа и сердечно-сосудистые заболевания. Другое недавнее исследование также показало, что GrimAge превосходит часы Horvath, Hannum и PhenoAge в прогнозировании смертности от всех причин и возрастных клинических фенотипов (McCrary et al., 2021).

Несмотря на столь обнадеживающие результаты, необходимо приложить большие усилия для определения эпигенетических маркеров биологического возраста, которые основаны на анализе ограниченного числа сайтов CpG, чтобы получить недорогие часы, подходящие для крупномасштабных скринингов. Действительно, все существующие эпигенетические часы основаны на анализе многих сайтов CpG с повышенными затратами, которые не позволяют использовать их в больших масштабах для широкого применения.

1.4. Возраст-обусловленные изменения психофизиологических реакций человека

Одна из центральных ролей в здоровом старении принадлежит когнитивной сфере, включающей такие функции, как память, мышление, двигательные реакции и внимание. В настоящее время когнитивное старение человека остается одной из самых интересных и междисциплинарных проблем. Исследования возрастных изменений головного мозга на клеточном и системном уровнях привели к разработке концепции «когнитивного старения» (Blazer, 2017).

Когнитивный спад может привести ко многим трудностям даже в повседневной жизни, влияя на самочувствие человека. Было показано, что снижение когнитивных способностей, таких как память, мышление, внимание и скорость обработки информации, начинается на втором десятилетии жизни и

ускоряется по мере старения человека (Singh-Manoux, 2012). Однако люди одного хронологического возраста неоднородны по скорости снижения и общему уровню когнитивных нарушений. Хотя возрастная нейродегенерация считается частью физиологического процесса старения, ее ускорение является причиной перехода от нормального функционирования к легким когнитивным нарушениям, а затем к деменции (Levine, 2018). Таким образом, изменение скорости возрастной деградации нейронов и изменения когнитивных способностей могут быть причиной различий в проявлении деменций, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь малых сосудов и других возрастных патологий.

Возможность определения индивидуальной траектории возрастных изменений на раннем этапе позволит разработать комплекс мероприятий по предупреждению и снижению темпов патологических изменений в когнитивной сфере. Количественная оценка когнитивного старения также может помочь выявить факторы, влияющие на скорость возрастной нейродегенерации. Одним из ключевых вопросов является поиск методов, позволяющих оценивать когнитивные изменения на самых ранних этапах и служащих фундаментальной основой для разработки новых диагностических подходов.

В последнее время значительное внимание стали привлекать возрастные изменения цветовосприятия (Karwatsky et al., 2004; Wagner et al., 2005). Наиболее выраженные возрастные эффекты связаны с распознаванием оттенков: с возрастом чувствительность в коротковолновом диапазоне спектра снижается более значительно, чем в средне- и длинноволновом диапазонах. В результате становится труднее различать цвета и воспринимать цветовые контрасты (Nguyen-Tri, 2003).

Изменения сенсомоторных реакций, таких как скорость и точность принятия решений, также носят возрастной характер. В частности, изучение поведения пожилых людей при принятии решений показало, что они используют более простые эвристические стратегии (Queen, 2012). Кроме того, недавние исследования показывают, что замедление времени реакции, которое начинается уже в возрасте 20 лет, связано с повышенной осторожностью при принятии

решений и более медленными процессами принятия решений, а не с различиями в скорости мышления (von Krause, 2022). Снижение эффективности принятия решений объясняется когнитивными ограничениями в обработке информации у пожилых людей (Frey, 2015). Кроме того, было показано, что они менее последовательны в своем выборе (Finucane, 2005). Биологически эти эффекты можно объяснить гибелью нейронов неокортекса, при этом наиболее выраженные атрофические изменения наблюдаются в префронтальной коре. Также наблюдается уменьшение общего количества синапсов и снижение продукции многих нейротрансмиттеров, являющихся основными передатчиками информации между нейронами (Fjell, 2010).

Ранее было продемонстрировано, что возрастное снижение когнитивных функций, а также ряд возрастных состояний связаны с эпигенетическим ускорением старения, например, это показано для деменции, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и Хантингтона (Horvath, 2018). В то же время до сих пор отсутствуют надежные эпигенетические маркеры когнитивных изменений, в частности, часы Хорвата не обнаруживают связи со снижением когнитивных функций у монозиготных близнецов (Starnawska, 2017).

1.5. Гендерные различия возраст-зависимых изменений

Известно, что в любой популяции во всем мире женщины живут значительно дольше мужчин, однако основные физиологические процессы, которые определяют эти половые различия в возрастной смертности, в значительной степени остаются неизвестны (Hoffman, Valencak, 2021).

Гендерный разрыв в ожидаемой продолжительности жизни коренится в биологических различиях между мужчинами и женщинами, обусловленных социальными нормами, ограничениями, стимулами, ролями и эпидемиологическими условиями, которые допускают поведенческие и экологические различия, влияющие на здоровье (Zarulli et al., 2021).

Социально-поведенческие факторы частично объясняют разницу в смертности между женщинами и мужчинами, однако преимущество женщин в выживании выходит за рамки половых различий в склонности к риску и агрессии. Было предложено несколько физиологических объяснений широкой защиты женщин от различных хронических заболеваний и смертности.

Физиологические различия в сердечно-сосудистых заболеваниях, которые способствуют внутренней уязвимости у мужчин, включают более низкие уровни холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и повышенный уровень гипертонии. Хотя многие факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний у женщин снижены, некоторые из них, такие как распространенность ожирения, выше у женщин (Ng et al., 2014). Этот повышенный риск избыточного ожирения частично смягчается более благоприятным распределением жира (Arnold et al., 2017) в отложениях подкожной жировой ткани у женщин в пременопаузе.

Предполагается также, что половые различия в заболеваемости и прогрессировании рака вносят свой вклад в половые различия в смертности. Частота соматических мутаций выше у мужчин (Fischer, Riddle, 2017), что потенциально лежит в основе более ранней манифестации рака у мужчин, чем у женщин (Podolskiy et al., 2016).

Другим предлагаемым объяснением преимущества самок в выживании является более сильный врожденный и адаптивный иммунный ответ у взрослых особей (Klein, Flanagan, 2016), который может рассматриваться в качестве потенциального механизма снижения смертности от рака и более сильного ответа на иммунотерапию рака, наблюдаемого у женщин. Эта половая разница в реакции на лечение характерна не только для иммунотерапии рака; скорее, это отражение закономерности, которая становится все более очевидной во всех областях медицины (Voskuhl, 2016). Недавние отчеты о распространении ковидной инфекции в разных странах также указывают на вариативность по гендерному признаку в показателях смертности, среди которых 60-70% случаев приходится на мужчин (Spagnolo et al., 2020).

Предложенные ранее гипотезы относительно половых различий в продолжительности жизни, включая устойчивость женщин к влиянию окислительного стресса, более активное функционирование у них иммунной системы, защитный эффект гормонов, в частности эстрогена, а также компенсаторные эффекты второй X-хромосомы, до сих пор не нашли убедительного подтверждения (Austad, 2006). В связи с этим большое значение при решении данной проблемы придается возрастным изменениям уровня метилирования ДНК, так как изучение эпигенетической регуляции экспрессии в возрастном аспекте для обоих полов имеет большое значение (Kondakova et al., 2021).

Понимание основ гендерных различий в старении приведет к улучшению специфических для пола методов лечения, и, как следствие, увеличению здоровой продолжительности жизни, как женщин, так и мужчин (Cheng, Nelson, 2018).

1.6. Патологии, ассоциированные с ускоренным старением

Термин «ожидаемая продолжительность жизни» означает количество лет, которое человек может ожидать прожить. За последние сто лет продолжительность жизни в развитых странах увеличилась из-за более здорового образа жизни и лечения хронических патологий, вызывающих преждевременное старение. Снижение смертности в основном связано с улучшением здоровья, питания, образования, доходов, состояния здоровья и медицины. Более высокая продолжительность жизни населения приводит к более высокому проценту пожилых людей, поскольку возраст как хронологическая мера является важным фактором риска множественных заболеваний, известных как возрастные заболевания, включая сердечно-сосудистые заболевания, диабет и болезни почек (Luy et al., 2020; Chang et al., 2017).

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) заявила, что возрастные заболевания увеличились в прошлом веке из-за увеличения продолжительности

жизни, и ожидается, что к 2050 году численность населения мира в возрасте старше 60 лет увеличится вдвое (Crimmins, 2021).

Старение связано с более частым развитием патологий хронических заболеваний, таких как рак, инфекционные заболевания, сахарный диабет, ожирение, метаболический синдром, остеопороз, нейродегенеративные заболевания, хроническая болезнь почек (ХБП) и сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) (Juckett, 2009; Tan et al., 2019). Более того, некоторые возрастные факторы риска включают курение, гипергликемию, гиперлипидемию, ожирение, гипертензию, дислипидемию, а также потерю плотности костей и слабость, которые сгруппированы как факторы метаболического риска, которые могут привести к преждевременной смерти (Stewart, 2019). В сочетании с отсутствием физической активности вышеперечисленные факторы вызывают ускоренное старение и развитие сопутствующих патологий, таких как сердечно-сосудистые заболевания и / или ХБП.

Концепция ускоренного старения началась с наблюдения за редкими генетическими нарушениями, включая прогерия Хатчинсона-Гилфорда, нижнечелюстную дисплазию, синдром Вернера, и анеуплоидии, такие как синдром Дауна (СД) (Franceschi et al., 2018). В настоящее время возрастная акселерация связана с целым рядом возрастных заболеваний и состояний. Например, пациенты с синдромом Дауна (Horvath et al., 2015), ВИЧ (Horvath and Levine, 2015), ожирением (Horvath et al., 2014), болезнью Хантингтона (Horvath et al., 2016), Синдром Вернера (Maierhofer et al., 2017) и синдром Сотоса (Martin-Herranz et al., 2019), как правило, демонстрируют возрастное ускорение. Кроме того, эпигенетический анализ часов показал, что тяжелая форма COVID-19 была связана с увеличением возраста ДНК и повышенным риском смертности согласно GrimAge (Corley et al., 2021).

Среди многих патологий, связанных со старением, хроническая болезнь почек и сердечно-сосудистые заболевания являются одними из наиболее

распространенных и являются основной причиной глобальной заболеваемости и смертности (Carracedo et al., 2013).

1.6.1. Хроническая болезнь почек как модель ускоренного старения и её связь с сердечно-сосудистыми заболеваниями

Хроническая болезнь почек (ХБП) является прогрессирующим и необратимым заболеванием, определения и классификация которого менялись с течением времени. Международные рекомендации в настоящее время определяют ХБП как скорость клубочковой фильтрации (СКФ) <60 мл/мин/1,73 м² или явное структурное повреждение почек, наблюдаемое с помощью диагностических методов более 3 месяцев (Levin et al., 2013)

Характеристики ХБП аналогичны характеристикам процесса старения, поэтому было высказано предположение, что ХБП способствует преждевременному старению. Кроме того, хронические заболевания, обычно наблюдаемые при старении, такие как сердечно-сосудистые заболевания, воспаление, кальцификация сосудов, минеральные и костные нарушения часто отмечаются у пациентов с ХБП. Таким образом, у пациентов с ХБП наблюдается ускоренное старение по сравнению со здоровыми людьми.

Сердечно-сосудистые заболевания являются наиболее клинически значимым сопутствующим заболеванием, связанным с ХБП. Сосуществование обоих заболеваний можно объяснить следующим: у пациентов с ХБП выше распространенность нетрадиционных сердечно-сосудистых факторов риска; многие сердечно-сосудистые факторы риска усугубляют прогрессирование ХБП, и сама по себе ХБП может считаться фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний.

Хроническое воспаление является общей характеристикой пациентов с хронической болезнью почек (ХБП), которая способствует развитию и прогрессированию сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). У этих пациентов

связанное с уреимией хроническое воспаление играет важную роль в повреждении эндотелиальных клеток (Cannata-Andía et al., 2006), ишемической болезни сердца (Dregan et al., 2014) и преждевременном старении сосудистой стенки (Stenvinkel et al., 2013).

Кроме того, сердечно-сосудистые заболевания являются наиболее важной причиной смертности у пациентов с ХБП, находящихся на диализе. Накопление уремических токсинов при почечной патологии приводит к хроническому воспалению и увеличению окислительного стресса, способствуя развитию сердечно-сосудистых заболеваний, поскольку поврежденные эндотелиальные клетки в конечном итоге стареют (Carmona, 2020).

Пациентам с терминальной стадией хронической почечной недостаточности (ТХПН) обычно требуется заместительная почечная терапия, такая как гемодиализ, перитонеальный диализ или трансплантация почки. Поскольку количество пациентов с хронической болезнью почек (ХБП), получающих гемодиализ, продолжает расти во всем мире, а ежегодный уровень смертности пациентов, находящихся на диализе, достигает 10–20%, необходимо контролировать некоторые показатели для лучшего ведения пациентов (Wang et al., 2021)

Хотя ХБП и ССЗ имеют общие классические факторы риска, этот факт не в полной мере объясняет неравномерность роста сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности у больных с ХБП. Это побудило многие исследовательские группы искать новые механизмы, объясняющие высокий сердечно-сосудистый синдром у пациентов с ХБП. В результате возник новый термин: кардиоренальный синдром (КРС), предполагающий наличие общих механизмов и медиаторов, участвующих в прогрессировании ССЗ и ХБП (Kooman et al., 2014).

В индуцированных старением сердечно-сосудистых и почечных структурных и функциональных нарушениях могут участвовать несколько механизмов, включая старение клеток, воспаление, окислительный стресс, а также генетические и эпигенетические модификации (рис. 2.).

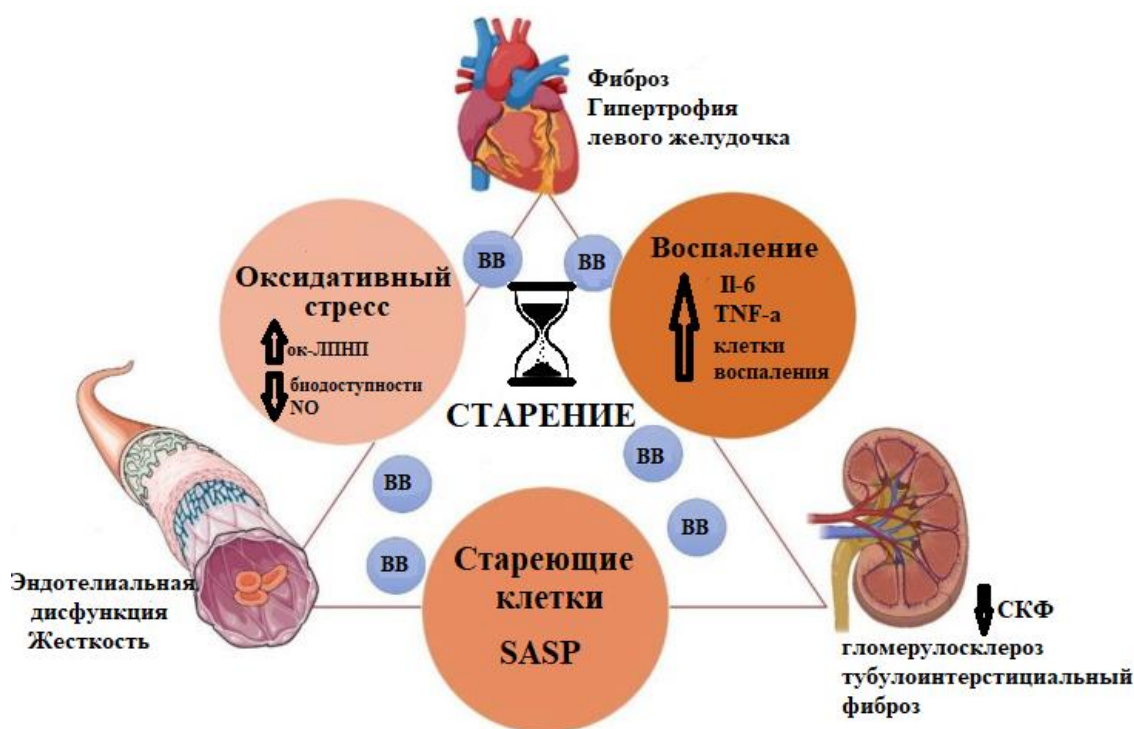


Рис. 2. Роль старения в кардиоренальном синдроме (Mas-Bargues et al., 2022); BB – внеклеточные везикулы, ок – ЛПНП – окисленные липопротеины низкой плотности, СКФ – скорость клубочковой фильтрации

Выделяемые почками провоспалительные цитокины и хемокины могут попадать в кровоток, что приводит к дисфункции отдаленных органов, включая сердечно-сосудистую систему. Данный факт может объяснить, по крайней мере частично, ускоренное сердечно-сосудистое старение, наблюдаемое у пациентов с ХБП (Stenvinkel et al., 2013).

Таким образом, основная проблема старения или связанных с возрастом заболеваний, заключается в слабости, усугубляемой постоянным и вялотекущим системным воспалением, в этом случае клетки теряют устойчивость к внешним повреждениям и могут приобретать старческий фенотип.

1.7. Однонуклеотидные полиморфизмы как фактор развития возраст-ассоциированных патологий сердечно-сосудистой системы

С развитием общественного здравоохранения и медицины в последние десятилетия увеличилось число стареющих людей. Среди этой группы сердечно-

сосудистые заболевания (ССЗ) являются ведущими причинами инвалидности и смертности (Ho et al., 2020). В настоящее время стало очевидно, что развитие сердечно-сосудистых патологий во многом определяется «генетическим грузом» человека. В частности, многие кардиомиопатии, каналопатии, аортопатии, а также сложные многофакторные заболевания, такие как ишемическая болезнь сердца, атеросклероз или мерцательная аритмия, имеют генетическую природу (Brodehl et al., 2021). Это положило начало развитию новой области науки - кардиогенетики (Соницева и Затейщиков, 2020).

Кроме этого, доказана серьезная роль генетических факторов в возникновении сахарного диабета, эссенциальной гипертонии, атеросклероза, бронхиальной астмы, некоторых форм рака, многих врожденных пороков развития и др. Большая часть вышеупомянутых заболеваний имеют мультифакториальный характер, это значит, что проявления клинических симптомов возникают только при совместном действии определённого числа генетических факторов и окружающей среды (Новиков, 2011).

Мультифакториальные заболевания могут быть гетерогенными: то есть разные гены могут обуславливать одно и тоже заболевание у разных людей, именно поэтому их очень сложно определить (Заугольная, 2010). Информация об уникальных особенностях отдельного человека может быть получена благодаря исследованию молекулярной структуры участков с полиморфизмом, в том числе и SNP (Иноземцева, Усольцева, 2015).

Однонуклеотидный полиморфизм (SNP) – это замена одного нуклеотида в молекуле ДНК в геноме особей одного вида или между гомологичными участками гомологичных хромосом (Люханов и др., 2014). SNP возникают в результате точечных мутаций и являются причиной появления белков с различной функциональной активностью. На 300 нуклеотидов в среднем встречается один SNP (Belotte et al., 2015).

Выявление однонуклеотидных полиморфизмов генов-кандидатов, которые взаимосвязаны с определённым наследственным заболеванием, является одним из

развивающихся направлений в изучении молекулярных механизмов предрасположенности к заболеваниям человека. Выделение главных этапов и составляющих патогенеза того или иного МФЗ и SNP поможет определить «неблагоприятные» SNP, наличие которых ухудшает прогноз при исследуемом заболевании (Иноземцева, Усольцева, 2015).

Наименее изучены в отношении влияния на функционирование сосудистой стенки, но представляют интерес для нас полиморфизмы A1298C метилентетрагидрофолатредуктазы, R3500Q аполипопротеина В, Gln279Arg матриксной металлопротеиназы–9, Asn357Ser матриксной металлопротеиназы–12 и C1997A коллагена типа I альфа 1.

Метилентетрагидрофолатредуктаза человека (MTHFR) представляет собой цитозольный флавопротеин, участвующий в одноуглеродном метаболизме, катализирующий превращение гомоцистеина в метионин, регулируя тем самым метаболизм фолата и гомоцистеина. Нарушение функциональности MTHFR способствует накоплению гомоцистеина, что приводит к состоянию гомоцистинурии – редкого метаболического состояния, которое приводит к различным сбоям в работе глаз, центральной нервной, скелетной и сосудистой систем (Nagarajan et al., 2020). Было обнаружено, что гипергомоцистеинемия является независимым нетрадиционным фактором риска для ССЗ, включая ишемическое заболевание (Palomino–Morales et al., 2010).

Мутация R3500Q (Arg3500Gln или rs5742904) в гене аполипопротеина В–100 обусловлена заменой аргинина на глутамин (Truong et al., 2018). R3500Q вызывает дефектное связывание с рецептором липопротеинов низкой плотности и гиперхолестеринемию. Это одна из наиболее распространенных наследственных мутаций, вызывающая нарушение липидного обмена и повышенный риск развития атеросклероза (Heidari MM. et al., 2016). Было обнаружено, что R3500Q является основным детерминантом уровней ЛПНП и кальцификации коронарных артерий. Предполагается, что замена аргинина глутамином предотвращает правильное сворачивание ApoB и, таким образом, снижает способность частиц ЛПНП

связываться с рецептором ЛПНП (Fawzy, M.S. et al., 2017). ApoB (R3500Q) считается одним из факторов риска развития инфаркта миокарда (ИМ) (Mohammed WJ. et al., 2018).

Матриксная металлопротеиназа–9 (ММР–9 или желатиназа В) играет важную роль в процессах репарации, воспаления, ремоделирования ткани, обмена цитокинов, регуляции связанных факторов роста. SNP в ММР9 rs17576 приводит к замене незаряженной аминокислоты (глутамина) на положительно заряженную аминокислоту (аргинин) (Maral et al., 2015). Этот полиморфизм, вероятно, изменяет конформацию белка, что приводит к изменению связывания субстрата и активности фермента (Tesfaigzi et al., 2006). Некоторые исследователи сообщают, что полиморфизм ММР9 rs17576 связан дисфункцией левого желудочка при ишемической болезни сердца (Li et al., 2019).

ММР12 (металлоэластаза макрофагов) представляет собой протеиназу, секретируемую макрофагами, которая была впервые идентифицирована по ее эластазной активности (Wolf et al., 2019). При отклонении от нормы экспрессии ММР12 обнаруживаются нарушения артериального ремоделирования, формирование ССЗ. В некоторых исследованиях показано, что аллель G и генотип AG являются факторами риска развития артериальной гипертензии, а генотип AA оказывает протективное действие на формирование заболевания (Москаленко М.И. и др., 2019).

Ген коллагена типа I альфа 1 (COL1A1) кодирует про–альфа 1 цепи коллагена типа I (Liu J. et al., 2018). Мутации в альфа-цепи данного гена ассоциированы с ССЗ, остеоартритом и остеопорозом, так как происходит нарушение химических и физических свойств фибрилл коллагена. При мутации данного гена происходит синтез дефектного белка, который значительно укорачивает продолжительность жизни гладких мышечных клеток сосудов, способствуя ускоренному сосудиному старению за счет стресс–индуцированной гиперактивации бета–галактозидазы (Кабалык и др., 2018). На данный момент в литературе нет информации о связи полиморфизма C1997A с развитием ССЗ.

2. Материалы и методы исследования

2.1. Объект исследования

Обследуемая группа состояла из 405 человек, проживающих на территории Нижегородской области. Группу условно здоровых добровольцев составили мужчины и женщины в возрасте 21-83 лет, не имеющие среди ближайших предков долгожителей (всего 167 человек, средний возраст $55,45 \pm 2,056$ лет). В группу долгожителей вошло 40 человек в возрасте 86 – 102 лет (средний возраст $91,9 \pm 1,1$ год). В группу потомков долгожителей вошли представители 1, 2 и 3 поколений в возрасте 22 – 77 лет (средний возраст $52,8 \pm 4,2$ года). При обследовании данных групп лиц в качестве входного контроля были выдвинуты следующие условия: отсутствие хронических и онкологических заболеваний в стадии обострения, а также отсутствие острых респираторных вирусных инфекций на момент сдачи биоматериала. Также в контрольную группу не включались беременные и кормящие женщины.

В группу пациентов с терминальной стадией ХБП вошло 112 человек в возрасте 25 - 83 года (средний возраст $54,66 \pm 1,46$ лет). Все пациенты проходили процедуру гемодиализа 3 раза в неделю (каждый сеанс по 4-5 часов), стаж гемодиализа варьировал от 1 до 231 месяца (средний период гемодиализа $68 \pm 4,56$ месяцев). Помимо основного заболевания (N18.5), для каждого участника фиксировались сопутствующие заболевания и принимаемые лекарства.

Каждый испытуемый заполнял добровольное информированное согласие на участие в исследовании, где были разъяснены характер и процедура исследования, возможные неудобства и риски, а также согласие на обработку персональных данных с учетом принципа конфиденциальности (доступность только исследовательской группе и представление данных в общем массиве). Кроме того, на каждого участника исследования заполнялась краткая анкета, включающая демографические данные, сведения об уровне образования, наличии вредных привычек (алкоголь, курение), особенностях питания, качестве сна и хронических заболеваниях. Все эксперименты проводились в соответствии с принципами Хельсинской декларации (Финляндия, 1964) и после рассмотрения этическим

комитетом Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского (протокол №1 от 2 декабря 2020 года).

2.2. Материалы исследования

Материалом для исследования послужила венозная кровь с добавлением антикоагулянтов Li - гепарина и K3-ЭДТА. Кровь из вены сдавалась утром натощак в интервале с 08.00 до 09.00, после 8-12 часового голодания. Накануне сдачи крови добровольцы предупреждались об исключении интенсивной физической нагрузки, отказа в приеме алкоголя и курении.

Для биохимического и иммуноферментного анализа использовалась негемолизированная плазма, полученная не позже 2 часов после забора крови путем осаждения центрифугированием в течение 10 минут при 3000 об/мин. Цельную кровь и плазму хранили в аликвотах при -80 С, не допуская повторных циклов оттаивания и заморозки.

2.3. Методы исследования

2.3.1. Определение биологического возраста по модели PhenoAge

Для определения биологического возраста использовалась модель PhenoAge (Levine et al., 2018), которая учитывает показатели общего клинического анализа (общее количество лейкоцитов (WBC), объем эритроцита (MCV), процент лимфоцитов (LYM (%)), ширина распределения эритроцитов по объему (RDW-CV (%)) и биохимических показателей анализов крови (альбумин, глюкоза, креатинин, щелочная фосфатаза, С-реактивный белок), а также значение хронологического возраста.

Общеклинические показатели крови определялись на автоматическом анализаторе Abacus Junior 30 (Diatron, Австрия), который учитывает 18 параметров крови: RBC –общее количество эритроцитов в литре, WBC – общее количество лейкоцитов в литре, HGB – гемоглобин, MCV – объем эритроцита, HCT – гематокрит, MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроцитах, MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, LYM – процент лимфоцитов,

MON – процент моноцитов, GRA – процент гранулоцитов, RDWc – ширина распределения эритроцитов по объему, PDW-CV – ширина распределения тромбоцитов по объему, PLT – тромбоциты, MPV – средний объем тромбоцита, PCT – тромбокрит (Карпищенко, 2014). Каждая проба для проверки достоверности результатов анализировалась трижды.

Биохимические маркеры определялись на плазме с добавлением Li - гепарина на полуавтоматическом анализаторе StatFax 3300 с использованием коммерческих наборов реагентов ДИАКОН-ДС (Россия). Такие биохимические показатели плазмы крови, как креатинин, щелочная фосфатаза, альбумин, глюкоза и С-реактивный белок (СРБ) были выбраны в качестве фенотипического возрастного предиктора и являются маркерами старения (Levine et al., 2018).

Анализ осуществлялся на плазме крови человека с антикоагулянтом Li – гепарином. Плазму единоразово размораживали при комнатной температуре, после чего сразу проводили анализ. Определение всех биохимических показателей основано на определении интенсивности окраски или оптической плотности соединения фотометрическим методом на полуавтоматическом фотометре Stat Fax 3300 (USA, Awareness Technology Inc.).

Для определения альбумина проводился фотометрический тест с бромкрезоловым зеленым по конечной точке. Реакция основана на образовании в кислой среде комплекса альбумина с бромкрезоловым зеленым, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации альбумина в измеряемой пробе (Шарышев и др., 2019).

Содержание глюкозы в исследуемых пробах определялось глюкозооксидазным методом по конечной точке. Глюкозооксидаза катализирует окисление β -D-глюкозы кислородом воздуха с образованием эквимольных количеств глюколактона и перекиси водорода. В присутствии фенола пероксидаза катализирует окисление хромогенных субстратов перекисью водорода с образованием окрашенного соединения, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации глюкозы в пробе (Шарышев и др., 2019).

Метод определения креатинина в сыворотке крови основан на реакции Яффе по конечной точке. При взаимодействии креатинина с пикриновой кислотой образуется окрашенный комплекс, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации креатинина в образце (Шарышев и др., 2019).

Содержание щелочной фосфатазы определялось кинетическим фотометрическим тестом. Принцип метода основан на катализе щелочной фосфатазой реакции гидролиза п-нитрофенилфосфата с образованием эквимольного количества п-нитрофенола и фосфата. Скорость образования п-нитрофенола прямо пропорциональна активности щелочной фосфатазы, измеряется фотометрически (Шарышев и др., 2019).

Содержание СРБ в исследуемой плазме крови проводилось иммунотурбидиметрическим методом, в основе которого лежит реакция антиген-антитело. СРБ образует комплекс с антителами, количество комплексов соответствует количеству СРБ в пробе и определяется фотометрически по увеличению мутности раствора (Камышников, 2009).

Для осуществления внутрилабораторного контроля качества, установления приемлемости результатов исследования использовались диагностические реагенты для биохимических исследований Trulab Р и N: аттестованные контрольные сыворотки «Патология» и «Норма» (DiaSys, Германия). Контрольные материалы применялись в тех же условиях, с теми же реагентами и оборудованием, что и анализируемые образцы плазмы крови добровольцев в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов. При нестабильности результатов контроля качества, в случае выхода значений контроля качества за пределы установленных диапазонов для используемого лота контрольного материала, при использовании новых наборов реагентов проводилась калибровка прибора. В случае совпадения показателей анализатора по итогам измерения контрольных материалов, проводили серию измерений по данным анализатам (Diasys, 2020).

Расчет биологического возраста по модели PhenoAge производился с использованием онлайн-калькулятора, разработанного в ННГУ им. Н.И. Лобачевского (<https://dpm-ageing.unn.ru/age-calculator/>).

2.3.2. Выявление некоторых биомаркеров ускоренного старения (GDF15, FGF21, FGF 23)

Для определения концентрации исследуемых биомаркеров GDF15, FGF21, FGF 23, Klotho проводился иммуноферментный анализ (ИФА) плазмы крови с использованием коммерческих наборов для определения Ростового фактора дифференцировки 15 (GDF15), Фактора роста фибробластов 21 (FGF21), Фактора роста фибробластов 23, белка Klotho (Cloud-Clone Corp., США). Наборы основаны на методике иммуноферментного анализа конкурентного ингибирования для количественного измерения *in vitro* аналитов в сыворотке, плазме и других биологических жидкостях. Анализ проводили на плазме с использованием антикоагулянта КЗ-EDTA, без гемолиза и липемии. Измерение оптической плотности проводили на фотометре Multiscan EX (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 450 нм (Ковальчук Л.В. и др., 2010). Концентрация определяемого соединения в образцах рассчитывалась в соответствии со стандартной (калибровочной) кривой.

2.3.3. Выявление иммунологических показателей, ассоциированных с биологическим возрастом человека

Для характеристики иммунологического профиля проводили мультиплексный анализ 47 цитокинов по технологии xMAP (LUMINEX, США) с использованием коммерческой тест-системы Milliplex MAP (Millipore, США) в соответствии с инструкцией производителя. Тест-система, включающая мультиплексную панель на основе магнитных микросфер, позволяет проводить одновременное определение 47 цитокинов, хемокинов и ростовых факторов в образцах плазмы крови человека. Пользовательская панель включала следующие

маркеры: sCD40L (CD40LG), EGF, эотаксин (CCL11), FGF-2, FLT-3L, фракталкин (CX3CL1), M-CSF (CSF1), GRO α (CXCL1), IFN α 2, IFN γ (IFNG), IL- 1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70) (IL12Bp70), IL-13, IL-15, IL-17A, IL-17E / IL-25 (IL25), IL-17F, IL-18, IL-22, IL- 27, IP-10 (CXCL10), MCP-1 (CCL2), MCP-3 (CCL7), M-CSF, MDC (CCL22), MIG (CXCL9), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), PDGF-AA, PDGF-AB / BB (PDGFB), TGF α , TNF α , TNF β (LTA), VEGF-A. Плазму с иммобилизованными антителами инкубировали при перемешивании в течение ночи (16–18 ч) при 2–8 °С. Регистрацию и анализ данных проводили с использованием стандартного набора программ на приборе Luminex MAGPIX (LUMINEX, США). Качество данных проверялось на основании следующих критериев: стандартная кривая для каждого анализита имеет значение 5P R2 > 0,95.

2.3.4. Кариотипирование с оценкой уровня aberrаций хромосом

Стандартный цитогенетический анализ проводили в двух группах испытуемых: группу долгожителей составили люди старше 85 лет, которые не имеют онкологических заболеваний, контрольная группа включала в себя лиц в возрасте от 50 до 70 лет, близкие родственники которых не являются долгожителями.

Цитогенетическое исследование проводилось по стандартной методике и с учетом рекомендаций российского общества медицинских генетиков (Kuznetsova et al., 2019). На начальном этапе исследования были приготовлены не прямые препараты из 48-часовой культуры ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови. Процесс приготовления не прямых препаратов метафазных хромосом можно подразделить на несколько этапов: накопление митотических клеток; гипотоническая обработка; фиксация клеток в смеси этанола и уксусной кислоты (в соотношении 3:1); распластывание хромосом на стекле; окрашивание препаратов.

Постановку культуры лимфоцитов периферической крови проводили в ламинарном боксе в стерильных условиях. Среда для культивирования клеток крови включала в себя питательную среду RPMI 1640 (ПанЭко, Россия), эмбриональную телячью сыворотку, сухой L-глутамин (ПанЭко, Россия), фитогемагглютинин (ПанЭко, Россия). Инкубировали культуру клеток в термостате в течение 48 часов при температуре 37°C. Для остановки деления клеток на стадии метафазы спустя 47 часов вводили в культуральную среду раствор колхицина, который нарушает формирование клеточного веретена, препятствуют клеточному делению (Карпищенко и др., 2012) и инкубировали культуру в течение 40 минут при 37°C. По истечении 40 минут осаждали клетки центрифугированием в течение 10 мин при 1200 об/мин, отбирали супернатант и проводили гипотоническую обработку в течение 20 минут путем добавления 5 мл раствора 0,56% KCl. После гипотонии осуществляли префиксацию путем добавления 0,5 мл охлажденного фиксатора, а затем 3 последовательные смены фиксатора (Баранов, Кузнецова, 2006).

Приготовление препаратов хромосом осуществляли путем раскапывания суспензии клеток над водяной баней с горячей водой. Для этого на охлаждённые предметные стёкла наносили несколько капель суспензии клеток с высоты 50 см, после высушивания препаратов над паром, проводили сушку на воздухе в течение суток или в термостате при 37°C (Рубцов, 2004).

Затем проводили дифференциальное GTG-окрашивание полученных препаратов с использованием трипсина и красителя Романовского-Гимза. Предобрабатывали препараты в растворе трипсина в течение 10 секунд, а затем проводили окрашивание разведенным красителем Гимза из расчета 3 капли на 3 мл фосфатно-солевого буфера в течение 3 минут, высушивали препараты на воздухе.

Цитогенетический анализ выполняли на световом микроскопе «Primo Star» (Carl Zeiss, Германия) в проходящем свете под масляной иммерсией при суммарном увеличении x1000.

Для каждого обследованного фиксировали количество метафазных пластинок, долю аберрантных клеток в процентном соотношении, общее число хроматидных разрывов на 100 клеток, а также численные аномалии хромосомного набора (анеуплоидии). Метафазные пластинки пригодные для анализа соответствовали следующим критериям: цельность пластинки, наличие минимум 44 хромосом, небольшое число наложений хромосом друг на друга. Результаты цитогенетического исследования, включая структурные нарушения хромосом обозначали согласно Международной системе цитогенетической номенклатуры хромосом человека (ISCN, 2013).

2.3.5. Выделение геномной ДНК

Для проведения полногеномного секвенирования с оценкой уровня метилирования, осуществляли выделение и очистку ДНК с помощью фенол-хлороформного метода по стандартной методике (Sambrook and Russell, 2006). Выделение ДНК осуществляли из 250 мкл замороженной цельной венозной крови с добавлением антикоагулянта КЗ-ЭДТА. Количество ДНК измеряли с использованием набора для количественного анализа ДНК Qubit dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific).

Для определения полиморфизмов выделяли геномную ДНК из клеток цельной крови с помощью набора реагентов «ДНК–Экстран–1» в соответствии с инструкцией производителя (Синтол, Россия). Приблизительный выход ДНК составляет 10–20 мг из 300 мкл цельной крови. Выделенную ДНК хранили при температуре –20 °С.

2.3.6. Определение полиморфизмов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (Real–time PCR)

В ходе работы использовали наборы для определения полиморфизмов C1997A гена COL1A1 (rs1107946), Gln279Arg гена MMP9 (rs17576), Asn357Thr гена MMP12 (rs652438), R3500Q гена ApoB (rs5742904) и A1298C гена MTHFR

(rs1801131) (Синтол, Россия) методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. В состав наборов входили 2,5х реакционная смесь (содержит все необходимые компоненты для проведения Real-time PCR), 2,5х разбавитель, Taq ДНК-полимераза, 5 Е/мкл, ДНК положительный контроль (ПКО) 1, ДНК ПКО 2, ДНК ПКО 3 и отрицательный контроль (ОКО).

Таблица 1

Соответствие названия гена с продуктом и исследуемым полиморфизмом

Ген	Продукт гена	Полиморфизм
MMP9	матриксная металлопротеиназа-9	rs17576 Gln279Arg
MMP12	матриксная металлопротеиназа-12	rs652438 Asn357Ser
COL1A1	про-альфа 1 цепи коллагена типа I	rs1107946 C1997A
MTHFR	метилентетрагидрофолатредуктаза	rs1801131 A1298C
ApoB	аполипопротеин В	rs5742904 R3500Q Arg3500Gln

Анализ проводили в соответствии с инструкцией производителя со следующими параметрами в программе амплификации:

95 °C – 3 мин	} 40 циклов
95 °C – 15 сек	
63 °C – 40 сек	

Анализ проводился на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad, США). Для анализа данных использовали два варианта обработки результатов исследования: анализ по пороговому циклу и анализ по дискриминации аллелей, учитывая результаты путем сопоставления положения неизвестного образца относительно контролей.

2.3.7. Количественная оценка метилирования ДНК

Выявление эпигенетических маркеров ускоренного старения проводили путем полногеномного анализа метилирования на чипах Infinium Methylation EPIC Bead Chip (850k). Бисульфитную обработку 250 нг выделенной и очищенной ДНК проводили с использованием набора EpiMark Bisulfite Conversion Kit (NEB). Образцы распределяли случайным образом по массиву чипа. Illumina Infinium Methylation EPIC Bead Chip использовали в соответствии с инструкциями производителя. Данная платформа позволяет измерять уровни метилирования ДНК из 866 836 геномных сайтов, с разрешением в один нуклеотид. Метилирование ДНК выражается в виде β значений в диапазоне от 0 для неметилированного до 1 - полное метилирование для каждого зонда. Полученные данные метилирования были предварительно обработаны и подвергнуты функциональной нормализации с использованием пакета minfi R. Из анализа исключались зонды с р-значением обнаружения выше 0,01 как минимум в 10% образцов и зонды с числом сфер менее трех, по крайней мере, в 5% образцов. Все пробы, не относящиеся к CpG или относящиеся к SNP, были также исключены из результатов, кроме того, были отфильтрованы пробы, обнаруженные в X и Y хромосомах.

2.3.8. Выявление возрастной акселерации эпигенетического возраста

Определение эпигенетического возраста проводили путём анализа метилома с использованием калькулятора Хорват. Рассматривали 4 основные модели эпигенетического возраста и связанной с ними акселерации: DNAmAgeHannum (Hannum et al., 2013), DNAmAge (Horvath, 2013), DNAmPhenoAge (Levine et al., 2018), DNAmGrimAge (Lu et al., 2019).

DNAmAgeHannum измеряет скорость старения метилома человека под влиянием пола и генетических вариантов, демонстрируя способность различать соответствующие факторы старения. Модель DNAmAge позволяет оценивать возраст метилирования ДНК в различных тканях и клетках. Биомаркер старения DNAmPhenoAge предсказывает почти все исходы заболеваемости и смертности,

хорошо предсказывая возникновение сердечно-сосудистых заболеваний и ишемической болезни сердца. Модель DNAmGrimAge включает хронологический возраст, пол, биомаркеры семи белков плазмы, историю курения.

Для расчета ускорения эпигенетического возраста испытуемых, рассматриваемых в исследовании, в первую очередь, для каждого типа эпигенетического возраста была построена линейная регрессионная модель, оценивающая хронологический возраст в группе условно здоровых добровольцев. Эпигенетическое ускорение возраста является остатком этой линейной модели. Все модели были построены с использованием пакета statsmodels на языке программирования Python сотрудниками кафедры прикладной математики ИИТММ ННГУ.

2.3.9. Психофизиологические тесты когнитивных функций человека

Для исследования когнитивных функций человека и выявления психофизиологических показателей, связанных с возрастом, использовались три когнитивных теста: 2 сенсомоторных теста (тест на арифметические вычисления и тест на идентификацию перевернутых букв) и тест компьютерной цветовой кампиметрии. Тестирование проводилось на веб-платформе ApWay, разработанной сотрудниками кафедры психофизиологии ННГУ им. Н.И. Лобачевского (<http://cogni-nn.ru/>).

Тесты сенсомоторной активности позволяют измерять сенсомоторную реакцию и определять степень сохранности отделов головного мозга, ресурсы пространственного и селективного внимания, а также способность к прогнозированию и обучению (Полевая, 2019).

В ходе исследования добровольцам предлагалось нажимать левую кнопку компьютерной мыши при предъявлении целевого стимула (правильное арифметическое выражение или правильно написанная буква), в то время как ошибочный стимул должен был игнорироваться. Всего предъявлялось 15 арифметических выражений и 50 букв русского алфавита. Ответы испытуемых на

стимулы характеризовались множественными показателями, включая ошибки в обнаружении и идентификации сигнала.

Компьютерная цветовая кампиметрия позволяет измерять функцию цветового различия и количественно оценить субъективные психофизиологические реакции. Функция цветового различия описывает распределение дифференциальных пороговых значений по шкале оттенков.

В ходе исследования использовалась цветовая модель HSL, в которой в качестве основных координат используются оттенок, насыщенность и яркость. Суть метода заключалась в следующем: сначала испытуемому предъявлялся стимул на фоне того же цвета, после чего он должен изменять оттенок стимула, нажимая левую кнопку мыши, пока не сможет различить и указать, какой предмет был «спрятан» на заданном фоне. После успешной идентификации решает обратная задача: необходимо запечатлеть момент, когда объект перестает быть заметным. Результатом тестирования являются пороговые значения оттенков для каждого из предъявленных стимулов, что позволяет характеризовать особенности восприятия цвета и формы объектов и дает информацию об уровне оперативной памяти и внимания, а также эмоциональном напряжении испытуемых.

Примеры референсных стимулов и результатов когнитивных тестов представлены на рисунке 3.

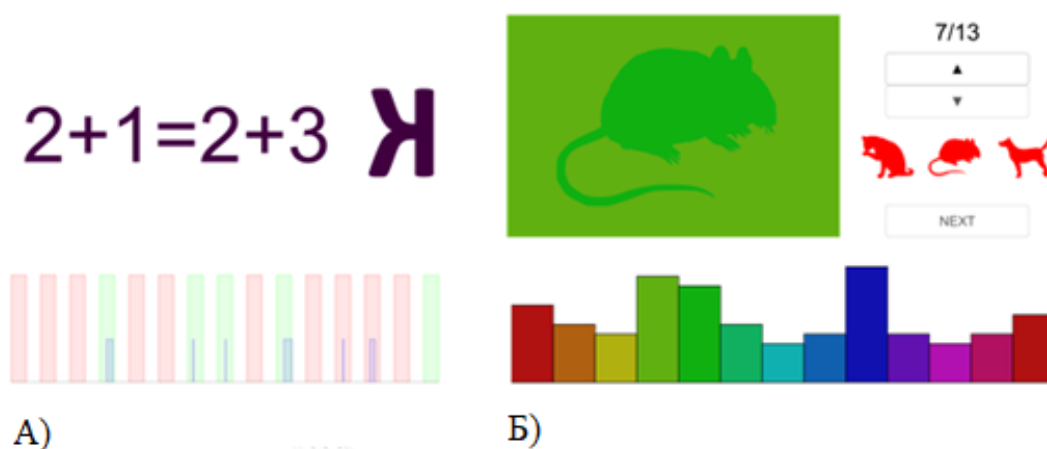


Рис. 3. Примеры визуальных стимулов, используемых в когнитивных тестах и полученные результаты при прохождении: а) тестов сенсомоторной активности; б) теста компьютерной цветовой кампиметрии

2.3.10. Анализ функционального состояния стенки сосудов методом многоканальной объёмной сфигмографии

Для анализа функционального состояния стенки сосудов проводили многоканальную объёмную сфигмографию в состоянии покоя с использованием прибора BOSO ABI-SYSTEM 100 (BOSCH + SOHN GmbH u. Co. KG, Германия).

При статистической обработке анализировались следующие показатели: лодыжечно-плечевой индекс (ЛПИ) для правых и левых конечностей, скорость каротидно-феморальной пульсовой волны (кфСПВ), диастолическое артериальное давление (дАД), систолическое артериальное давление (сАД), пульсовое артериальное давление (пАД), баланс артериального давления, частота пульса, индекс массы тела, также производилась детекция нарушений сердечного ритма. При этом повышение ПАД ≥ 60 мм рт. ст., СПВ >10 м/с и снижение ЛПИ $<0,9$ расценивались как признаки поражения сосудистой стенки.

Лодыжечно-плечевой индекс давления (ЛПИ) – это отношение сАД на голени к сАД на плечах. Показатель отражает степень стеноза или окклюзии артерий нижних конечностей в результате атеросклероза, и является скрининговым тестом для оценки состояния периферических артерий у лиц с высоким риском сердечно-сосудистых событий (Aboyans, 2012)

Скорость каротидно-феморальной пульсовой волны (кфСПВ) не только хорошо коррелирует с аортальной СПВ, но и дополнительно характеризует состояние артерий конечностей, поэтому зарекомендовал себя как независимый предиктор неблагоприятных сердечно-сосудистых событий и смертности (Tomiyama et al., 2016)

2.3.11. Статистические методы анализа

Статистический анализ был выполнен с помощью пакета программ MS Excel, GraphPad Prism v.6.0 (GraphPad Software Inc.) и с использованием библиотеки Python SciPy v1.6.3. Данные каждой выборки проверяли на нормальность

распределения с помощью теста Д'Агостино–Пирсона. Достоверность различий в распределении частот аллелей и генотипов между группами определяли по критерию χ^2 . Различия считали достоверными при уровне значимости p -значение (p) $< 0,05$. Для поиска наиболее ассоциированных с заболеванием маркеров был применен двусторонний тест Манна-Уитни. Полученные количественные данные представлены в виде медианы с указанием первого и третьего квартиля Me [Q1; Q3]. Для выявления корреляционных связей между двумя количественными параметрами использовали тест ранговой корреляции Спирмена, корреляция между биомаркерами считалась значимой при $p < 0,05$, а коэффициент корреляции (r) по модулю выше 0,5. Тот же подход был использован для поиска биомаркеров, связанных с хронологическим, фенотипическим, эпигенетическим возрастом и их ускорениями, которые были определены как остатки от хронологического возраста.

3. Результаты и их обсуждение

3.1. Определение биологического возраста с использованием модели PhenoAge

На первом этапе исследований определен биологический возраст среди условно здоровых добровольцев, которые составили контрольную группу и верифицирована модель PhenoAge (Levine et al., 2018) для популяции жителей Центрального региона РФ (Нижегородская область). Данная модель определения фенотипического возраста учитывает общеклинические и биохимические показатели крови: WBC, MCV, LYM (%), RDW-CV (%), альбумин, глюкоза, креатинин, щелочная фосфатаза, С-реактивный белок и значение хронологического возраста. Расчет биологического возраста производили по показателям, средние значения которых представлены в таблице 2.

Таблица 2

Средние значения биомаркеров в контрольной группе добровольцев

Показатель	Значения в исследуемой группе	Референсные значения
WBC, $10^9/\text{л}$	$5,55 \pm 0,15$	4,0–9,0
MCV, fl	$88,78 \pm 0,48$	76-96
RDWcv, %	$13,68 \pm 0,10$	11,5-14,5
LYM, %	$32,72 \pm 0,91$	25-40
Альбумин, г/л	$47,65 \pm 0,51$	35 – 50
Глюкоза, ммоль/л	$5,08 \pm 0,08$	3,9-5,5
Креатинин, мкмоль/л	$99,19 \pm 2,14$	53-115
Щелочная фосфатаза, Ед/л	$193,80 \pm 5,52$	<270
СРБ, мг/л	$4,06 \pm 2,38$	3-10

Поскольку на скорость старения влияют экологические факторы, образ жизни населения, диета и различные экзогенные факторы, важно провести

верификацию модели определения биологического возраста для конкретной популяции жителей выбранного региона.

По результатам корреляционной зависимости хронологического и фенотипического возраста была установлена достоверная связь ($r=0,91$, $p<0,05$) между фенотипическим и хронологическим возрастом исследуемой группы добровольцев (рис.4).

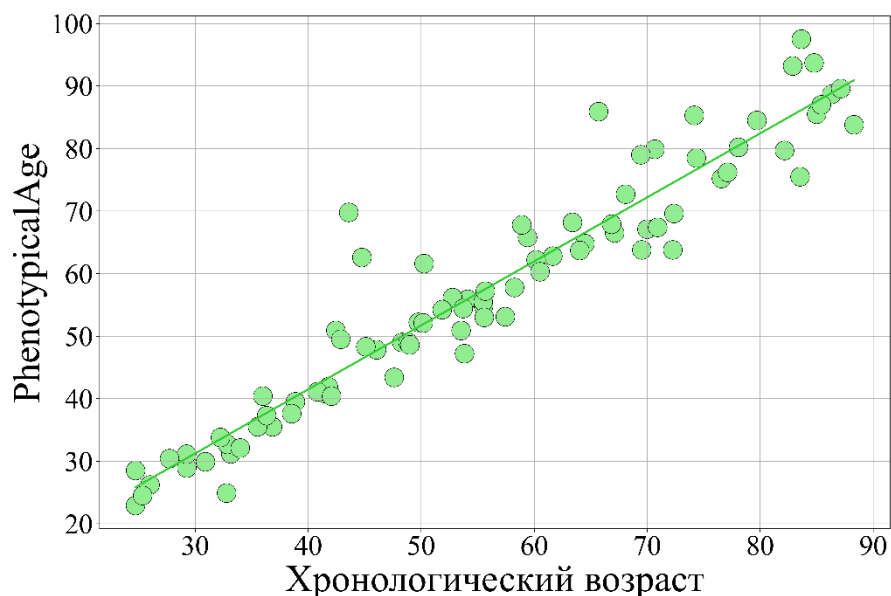


Рис. 4. Зависимость фенотипического возраста от хронологического в контрольной группе добровольцев

Среднее значение фенотипического возраста в контрольной группе составило $49,09 \pm 2,13$ лет, среднее отклонение от хронологического возраста составило 1,1 год. Данная модель показала высоко воспроизводимые результаты в рамках данного исследования, таким образом, она может применяться для определения биологического возраста на популяции жителей Нижегородской области.

При разделении данной группы по гендерному признаку, было выявлено достоверное увеличение возрастной акселерации у мужчин относительно женщин (рис. 5).

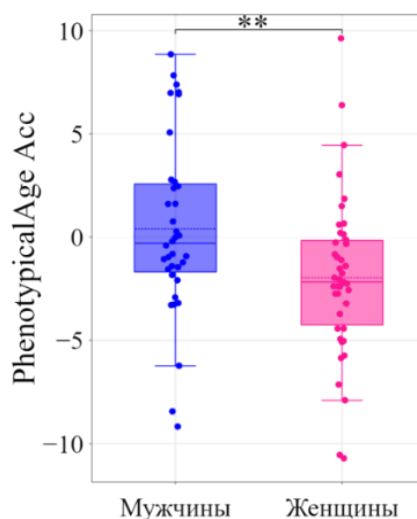


Рис. 5. Различия в возрастной акселерации в модели определения фенотипического возраста в группе мужчин и женщин; ** - статистически значимо при $p < 0,01$ (p-значение критерия Манна-Уитни-)

Отклонение в группе женщин составило - 1,9 лет, а в группе мужчин +0,4 года. Полученные результаты соотносятся с общепопуляционными данными относительно неравной продолжительности жизни мужчин и женщин для жителей Российской Федерации (Foreman et al., 2018). При этом в группе долгожителей 63% составляют женщины, их значение биологического возраста в среднем на $2,1 \pm 0,4$ года меньше, чем у мужчин.

3.2. Возраст-зависимые изменения кариотипа человека

Одним из факторов возраст-зависимых изменений является геномная нестабильность, маркером которой может служить спонтанная частота хромосомных aberrаций. Для выявления структурных перестроек и численных аномалий хромосомного набора был проведен стандартный цитогенетический анализ в группе долгожителей и контроля. Учитывали следующие типы хромосомных перестроек: транслокации, делеции, парные хромосомные и одиночные хроматидные фрагменты, а также разрывы в области центромеры. Структурные нарушения хромосом обозначали согласно Международной системе

цитогенетической номенклатуры хромосом человека (ISCN, 2013). Примеры учитываемых типов хромосомных aberrаций представлены на рисунке 6.

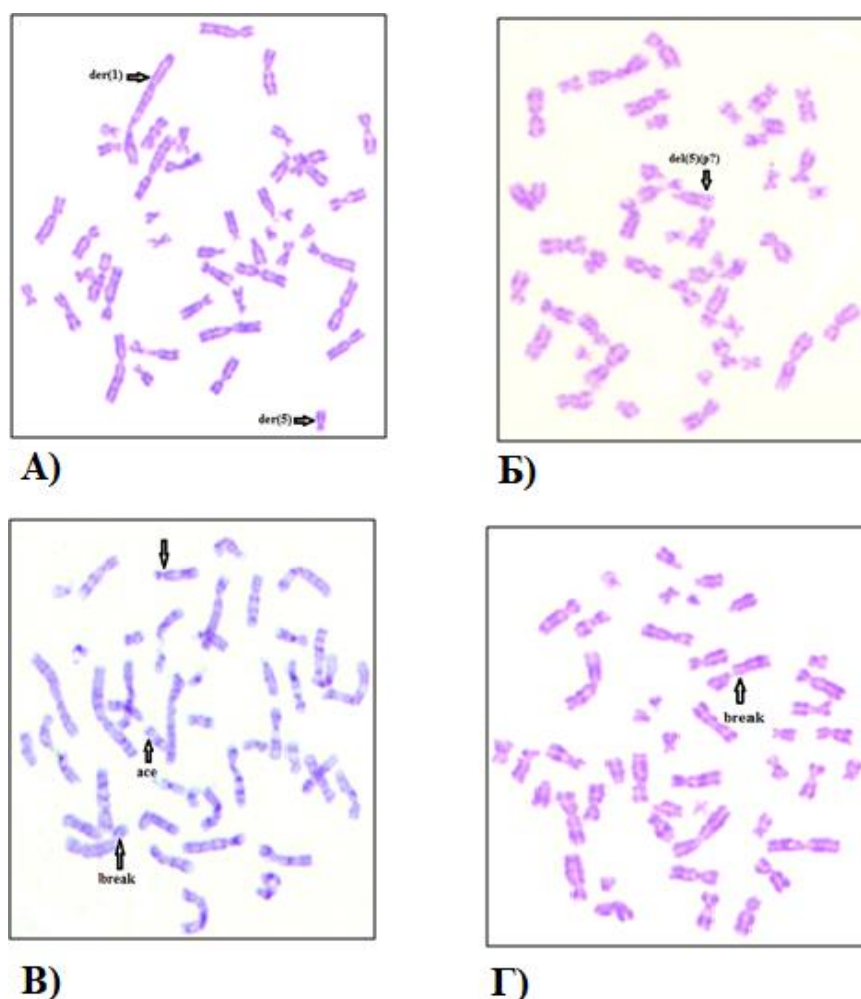


Рис. 6. Примеры учитываемых типов хромосомных aberrаций. А: [46, ХУ, t(1;5)] – дериваты хромосом (der), образованные в результате транслокации между 1 и 5 хромосомами. Б: [46, XX, del(5) (p?)] – структурная аномалия в виде делеции короткого плеча хромосомы 5. В: [46, XX] – парный хромосомный фрагмент хромосомы 3 и одиночный хроматидный разрыв в длинном плече хромосомы 5. Г: [46, XX] – одиночный хроматидный разрыв в длинном плече хромосомы 2

Для определения спонтанного уровня хромосомных aberrаций для каждого человека необходимо проанализировать не менее 100 метафазных пластинок. Однако у большинства долгожителей такого количества митозов не наблюдалось, что, в первую очередь, может быть связано с уменьшением митотической активности клеток при старении (таблица 3). Среднее количество метафазных пластинок в контрольной группе достоверно выше ($p < 0,05$, критерий Манна-

Уитни), чем у долгожителей в 1,8 раза. Выявлена достоверная связь между возрастом и количеством метафазных пластинок (коэффициент корреляции составил -0,622).

Таблица 3

Количество метафазных пластинок в исследуемых группах (среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего)

Группа Число метафазных пластинок	Контроль	Долгожители
Общее	95,2 $\pm$ 4,427	57,154 $\pm$ 9,536*
Пригодное для анализа	94,5 $\pm$ 4,453	39,923 $\pm$ 7,409*

* - статистически значимо при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

Для определения уровня aberrаций рассчитывали частоту разрывов хроматид для каждого типа aberrаций хромосом, а также общее число разрывов в пересчете на 100 клеток. Результаты сравнения исследуемых групп по частоте разных типов хромосомных перестроек представлены в таблице 4. Показано, что в группе долгожителей по сравнению с контрольной группой достоверно выше общее количество aberrаций, а также количество парных фрагментов.

Таблица 4

Спонтанная частота хромосомных aberrаций на 100 клеток (среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего)

Группа	Контроль	Долгожители
Общее количество aberrаций	5,126 $\pm$ 0,884	11,74 $\pm$ 2,793*
Транслокации	0,8 $\pm$ 0,562	1,083 $\pm$ 0,839
Делеции	0,878 $\pm$ 0,497	1,356 $\pm$ 0,56

Парные фрагменты	1,287±0,496	7,452±2,932*
Одиночные фрагменты	1,883±0,672	1,35±0,466
Разрывы по центромере	0,278±0,293	0,493±0,356

* - статистически значимо при $p < 0,05$ (t - критерия Стьюдента)

Для выявления связи между частотой хромосомных aberrаций и возрастом был использован корреляционный анализ Спирмена по индивидуальным данным возраст – частота aberrаций. При этом изучали влияние как хронологического, так и биологического возраста на частоту перестроек (табл. 5).

Таблица 5

Коэффициенты корреляции между спонтанной частотой хромосомных aberrаций и возрастом по индивидуальным данным

Возраст	Хронологический		Биологический (модель PhenoAge)	
	Контроль	Долгожители	Контроль	Долгожители
Общее количество aberrаций	r=0,635	r= -0,029	r=0,123	r=0,203
Транслокации	r=0,087	r=0,167	r=0,435	r= -0,087
Делеции	r=0,649	r= -0,604	r=0,127	r=0,551
Парные фрагменты	r=0,175	r= -0,106	r=0,078	r=0,113
Одиночные фрагменты	r=-0,106	r=0,009	r= -0,499	r= -0,275
Разрывы по центромере	r=0,522	r= -0,194	r=0,406	r= -0,314

В контрольной группе выявлена достоверная корреляционная связь между

уровнем aberrаций и хронологическим возрастом (коэффициент корреляции 0,635), в группе долгожителей такая связь отсутствовала. Было показано, что в группе долгожителей отмечается снижение частоты делеций с возрастом по сравнению с контрольной группой.

Не было установлено влияния возраста на частоту других типов aberrаций в исследуемых группах, что совпадает с некоторыми из литературных данных (Wojda et al., 2006). Анализ отклонения биологического возраста, определенного по модели PpenoAge, от хронологического, показал, что биологический (фенотипический) возраст не коррелирует с частотой aberrаций.

Также не было выявлено достоверных различий в частоте aberrаций и количестве анеуплоидий у лиц с ускоренным и замедленным старением (табл. 6, 7). Кроме этого, у лиц с разной скоростью старения было проведено исследование количества метафазных пластинок, при этом достоверных различий в выборках обнаружено не было.

Таблица 6

Спонтанная частота хромосомных aberrаций у лиц с ускоренным и замедленным старением (среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего)

Тип старения	Ускоренное	Замедленное
Общее количество aberrаций	7,45 $\pm$ 2,121	13,033 $\pm$ 3,391
Транслокации	0,711 $\pm$ 0,396	2 $\pm$ 2,236
Делеции	0,656 $\pm$ 0,315	2,65 $\pm$ 1,247
Парные фрагменты	4,695 $\pm$ 2,347	5,189 $\pm$ 1,948
Одиночные фрагменты	1,074 $\pm$ 0,36	3,225 $\pm$ 1,068
Разрывы по центромере	0,314 $\pm$ 0,222	0,769 $\pm$ 0,86

Количество клеток, содержащих анеуплоидии, у людей разных групп
(среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего)

Контроль	Долгожители	Ускоренное Старение	Замедленное Старение
14,717 $\pm$ 1,435	12,635 $\pm$ 2,609	14,005 $\pm$ 1,824	11,975 $\pm$ 4,358

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить особенности изменений кариотипа у долгожителей. Было показано, что в данной возрастной группе отсутствует возраст-зависимое увеличение частоты аберраций, при этом спонтанные частоты хромосомных аберраций в группе долгожителей достоверно выше, чем в контрольной группе.

Данные относительно уменьшения частоты делеций в группе долгожителей по сравнению с контрольной группой дают возможность предположить наличие особенностей функционирования репарационных систем у долгожителей, которые могут обеспечивать определенную геномную стабильность относительно других групп.

Известно, что основным механизмом возникновения структурной перестройки любого типа, в том числе и делеций, является наличие двухцепочечных разрывов в одной или нескольких хромосомах с последующим воссоединением образовавшихся фрагментов. Репарация таких повреждений может осуществляться по двум основным путям: гомологичная рекомбинация и воссоединение нехомологичных концов (Lans et al., 2012). Кроме этого, существуют альтернативные репарационные механизмы, ассоциированные с мутагенным эффектом – однокитевой отжиг и альтернативное соединение концов. Запуск данных мутагенных путей часто приводит к протяженным делециям, инсерциям и хромосомным транслокациям. Выбор механизма зависит от ряда факторов, включая тип клетки (например, митотически активные или нет,

стволовые клетки или нормальные соматические клетки), стадию клеточного цикла, статус хроматина и, возможно, возраст организма (Ceccaldi et al., 2016).

Следовательно, можно предположить, что у долгожителей репарация двухцепочечных разрывов происходит преимущественно по путям гомологичной рекомбинации и воссоединения нехомологичных концов, при этом их функционирование остаётся достаточно эффективным и менее подверженным ошибкам. Кроме того, согласно некоторым научным исследованиям, эпигенетические факторы и запуск апоптотической гибели клеток также играют важную роль в формировании хромосомных aberrаций (Finnon et al., 2008). Эпигенетический фон может определять эффективность восстановления повреждений ДНК через регуляцию транскрипции определенных генов. Конкретные механизмы на данный момент остаются неизвестными, однако в некоторых исследованиях рассматриваются такие параметры эпигенетического фона как индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 и уровень фокусов фосфорилированного гистона H2AX (Turinetti & Giachino, 2015). Предполагается, что гипометилирование генома приводит к повышению уровня хроматидных разрывов и снижению эффективности их репарации в клетках организма.

3.3. Оценка однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) генов как фактора риска развития сердечно-сосудистых заболеваний

Поскольку сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются ведущей причиной смертности населения в мире, а своевременное определение факторов риска развития патологий сердца и сосудов может значимо сказаться на продолжительности жизни, проведено определение влияния однонуклеотидных полиморфизмов на показатели, характеризующие эластичность стенки сосудов в разных исследуемых группах.

Для всех добровольцев были определены однонуклеотидные полиморфизмы 5 генов, ассоциированных с предрасположенностью к ССЗ, а именно генов матриксной металлопротеиназы — MMP9, MMP12, коллагена 1

типа–COL1A1, гена метилентетрагидрофолатредуктазы — MTHFR и гена, кодирующего белок аполипопротеин В — ApoB. Анализировалась частота распределения аллелей и генотипов в 3 группах: долгожителей, потомков долгожителей и условно здоровых добровольцев, не имеющих потомков долгожителей.

Частота распределений аллелей А и G полиморфизма rs17576 гена MMP9 в группе долгожителей составила 55,6% и 44,4% (46,9% и 53,1%–в группе потомков долгожителей, 60,7% и 39,3%–в группе условно здоровых лиц, соответственно). Во всех трёх группах генотип AG оказался преобладающим. (табл. 8). При анализе литературы было выявлено, что полиморфизм rs17576 связан с дисфункцией левого желудочка при ишемической болезни сердца и толщиной интима–медиа сонной артерии (Li et al., 2019).

Частота встречаемости аллеля А полиморфизма rs652438 гена MMP12 в группе потомков долгожителей составила 100%, а в группе условно здоровых лиц 89,5%. Генотип AA встречается чаще в исследуемых группах, тогда как генотип AG был обнаружен только в группе условно здоровых добровольцев и составил 11,6% (табл. 8). По данным литературы аллель G rs652438 является фактором риска развития ишемического инсульта, аневризмы аорты и ишемической болезни сердца в некоторых популяциях. Несинонимичная замена rs652438 в гене MMP12 повышает шанс развития артериальной гипертензии. Это связано с нарушением нормальной активности гена MMP12, который обладает эластолитической активностью (Москаленко М.И. и др., 2019).

Частота распределений аллелей С и А полиморфизма rs1107946 гена COL1A1 в группе долгожителей составила 83,3% и 16,7% соответственно, в группах потомков долгожителей и условно здоровых добровольцев 75% и 25%, 85,3% и 14,7% соответственно. Генотип CC преобладает в исследуемых группах и составляет 62,5%–72,3%. Генотип AA не встречается у долгожителей (табл. 8). При анализе литературных данных не было найдено информации о связи полиморфизма

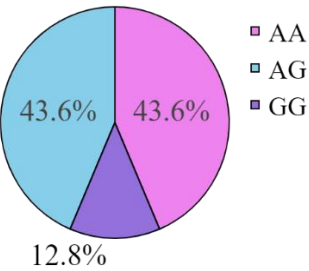
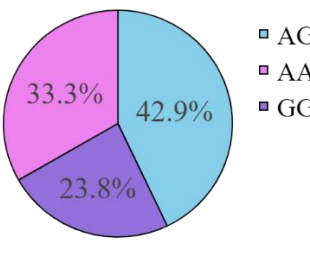
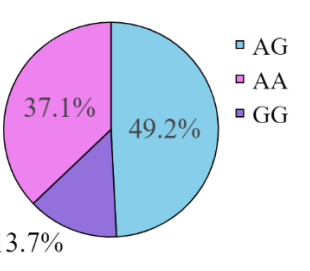
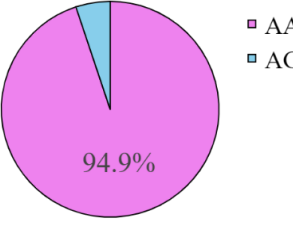
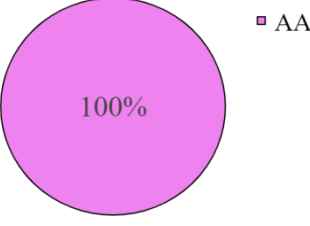
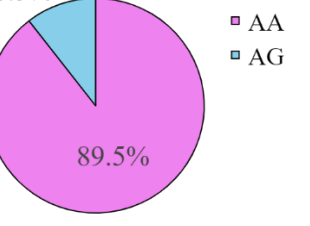
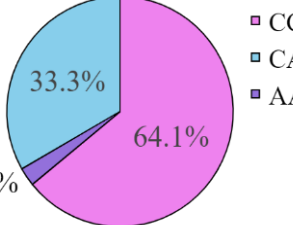
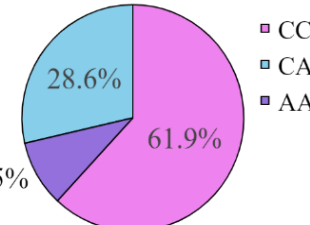
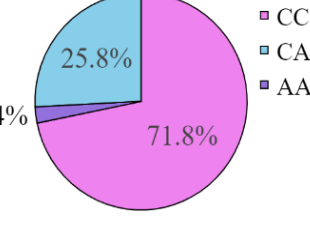
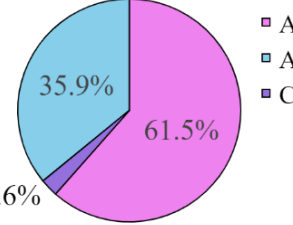
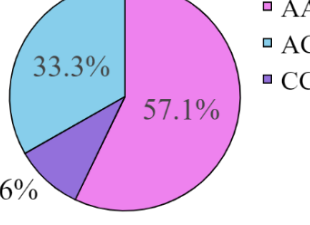
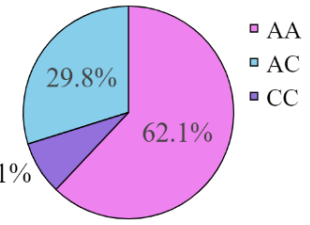
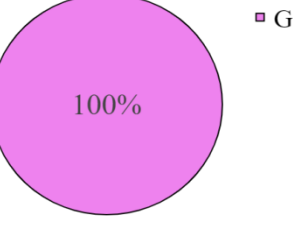
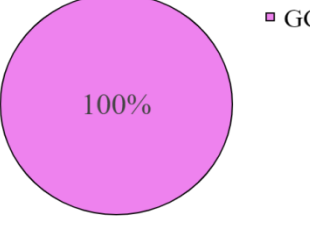
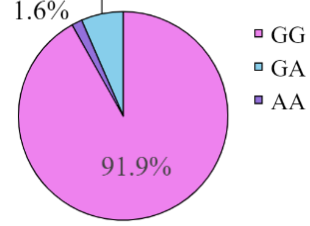
C1997A с развитием ССЗ, тем самым он представляет интерес для дальнейшего изучения.

Встречаемость аллеля А полиморфизма rs1801131 гена MTHFR выше, чем встречаемость аллеля С во всех трёх исследуемых группах. Генотип АА преобладает в исследуемых группах, при этом генотип СС полностью отсутствует в группе долгожителей (табл. 8). В литературе встречается информация, что данный полиморфизм повышает риск развития субклинического атеросклероза и ССЗ у пациентов с РА. Наиболее высокий риск развития обнаруживается в гомозиготном (СС) состоянии (Palomino–Morales R. et al., 2010).

Встречаемость аллеля G полиморфизма rs5742904 гена ApoB составила 100% в исследуемых группах долгожителей и потомков долгожителей, соответственно встречаемость генотипа GG составляет также 100% в данных группах. Генотипы GA и AA встречаются только в группе условно здоровых добровольцев (табл. 8). По литературным данным R3500Q вызывает дефектное связывание с рецептором липопротеинов низкой плотности и гиперхолестеринемию, что повышает риск развития атеросклероза (Heidari MM. et al., 2016). Показано, что полиморфизм R3500Q гена ApoB является одной из основных причин кальцификации коронарных артерий и гиперхолестеринемии, что приводит к повышению жёсткости сосудов (Fawzy, M.S. et al., 2017).

Несмотря на то, что полиморфизм rs5742904 гена ApoB отсутствует в исследуемых группах долгожителей и потомков долгожителей, не было выявлено достоверных различий в частоте встречаемости выбранных полиморфизмов в разных исследуемых группах. Результаты представлены в таблице 8.

Частота распределения полиморфизмов генов MMP9, MMP12, COL1A1, MTHFR, AроВ среди трех изучаемых групп

Полиморфизм	Частота распределения:		
	Исследуемые группы		
	Долгожители	Потомки долгожителей	Контрольная группа
rs17576 гена MMP9	 AA AG GG	 AG AA GG	 AG AA GG
rs652438 гена MMP12	 AA AG	 AA	 AA AG
rs1107946 гена COL1A1	 CC CA AA	 CC CA AA	 CC CA AA
rs1801131 гена MTHFR	 AA AC CC	 AA AC CC	 AA AC CC
rs5742904 гена AроВ	 GG	 GG	 GG GA AA

Для определения влияния наличия однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) на изменение показателей стенки сосудов и повышения риска ССЗ, использовали данные сфигмографии 158 условно здоровых добровольцев в возрасте 21-101 лет, которым был произведен скрининг SNP исследуемых генов.

При изучении влияния однонуклеотидных полиморфизмов в исследуемых генах на изменение функционального состояния стенки сосудов, первоначально предполагалось, что наличие замены пагубно влияют на состояние сердечно-сосудистой системы в отличие от аллелей дикого типа. Однако при анализе SNP COL1A1 (rs1107946) найдено достоверно значимое повышение показателей скорости каротидно-феморальной пульсовой волны (кфСПВ) в группе лиц с генотипом СС (дикий тип) по сравнению с генотипом СА (рис. 7).

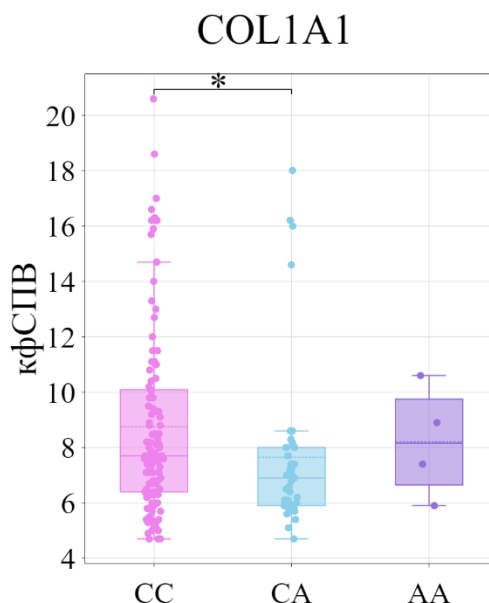


Рис. 7. Показатели скорости каротидно-феморальной пульсовой волны (кфСПВ) в исследуемой группе лиц в зависимости от генотипов полиморфизма rs1107946 гена COL1A1; * – статистически значимо при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

Несмотря на то, что пока нет информации о взаимосвязи SNP C1997A гена COL1A1 и риском развития ССЗ, полученные нами данные позволяют сделать предположение, что дикий тип способствует ускоренному сосудистому старению. Продукты выбранных генов могут иметь принципиальное значение для функционирования сосудистой стенки. Это связано с тем, что с возрастом сосуды

теряют эластичность из-за сшивок в коллагене, вызванных гликированием, а нарушение активности гена COL1A1 приводит к синтезу дефектных белков, влияющих на продолжительность жизни гладких мышечных тканей сосудов (Кабалык М.А. и др., 2018). Таким образом, генотип СА может рассматриваться как наиболее адаптивный в эволюционном плане.

При оценке лодыечно-плечевого индекса среди подгрупп с полиморфизмом гена MTHFR (rs1801131) было обнаружено достоверное значимое повышение встречаемости патологий у лиц с гетерозиготным вариантом аллеля (АС) (рис.8).

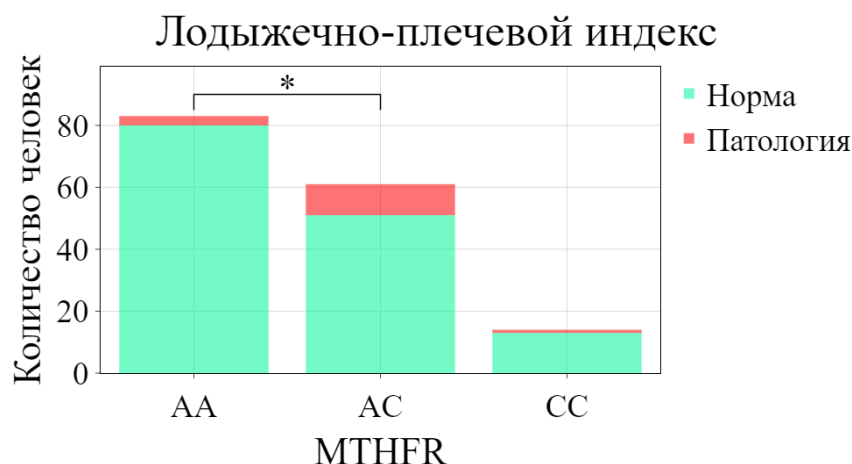


Рис. 8. Различия в оценке лодыечно-плечевого индекса в исследуемой группе лиц в зависимости от генотипов полиморфизма rs1801131 гена MTHFR; * – статистически значимо при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

Аналогичные результаты были получены и при оценке наличия гипертонической болезни среди исследуемых подгрупп с различными вариантами генотипа: достоверно чаще диагностировалась гипертония в группе лиц с генотипом АС по сравнению с гомозиготой по дикому типу АА (рис.9).

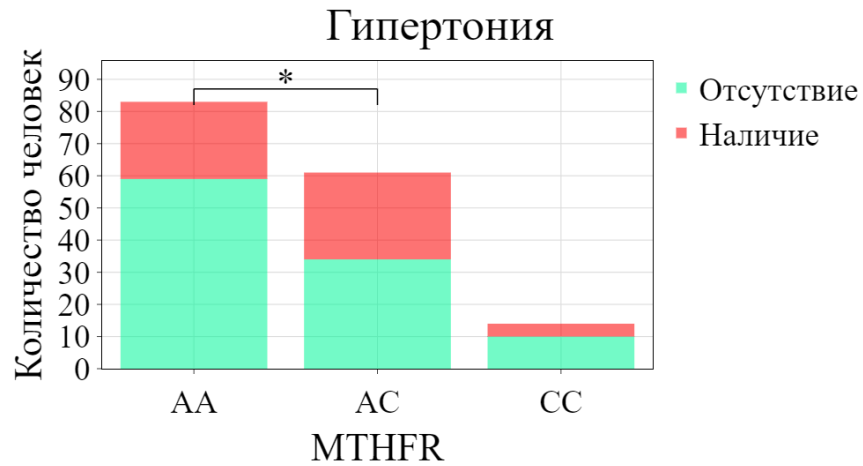


Рис. 9. Наличие гипертонии в исследуемой группе лиц в зависимости от генотипов полиморфизма rs1801131 гена МТНFR; * – статистически значимо при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

По литературным данным, полиморфизм гена МТНFR 1298 А>С повышает риск развития субклинического атеросклероза и сердечно–сосудистых заболеваний у пациентов с ревматоидным артритом. Было обнаружено, что гипергомоцистеинемия является независимым нетрадиционным фактором риска для ССЗ, включая ишемическое заболевание. Гомоцистеин прямо токсичен для эндотелиальных клеток, увеличивает окисление липопротеинов низкой плотности и имеет протромботические эффекты. Известно, что полиморфизм А1298С в гомозиготном (СС) состоянии может оказывать влияние на снижение активности ферментов, что менее выражено в гетерозиготных (АС) или нормальных (АА) состояниях (Palomino-Morales et al., 2010).

При анализе полиморфизма гена ММР9 найдено достоверно значимое повышение показателей систолического и диастолического артериального давлений в группе лиц с генотипом АА по сравнению с генотипом АГ (рис.10).

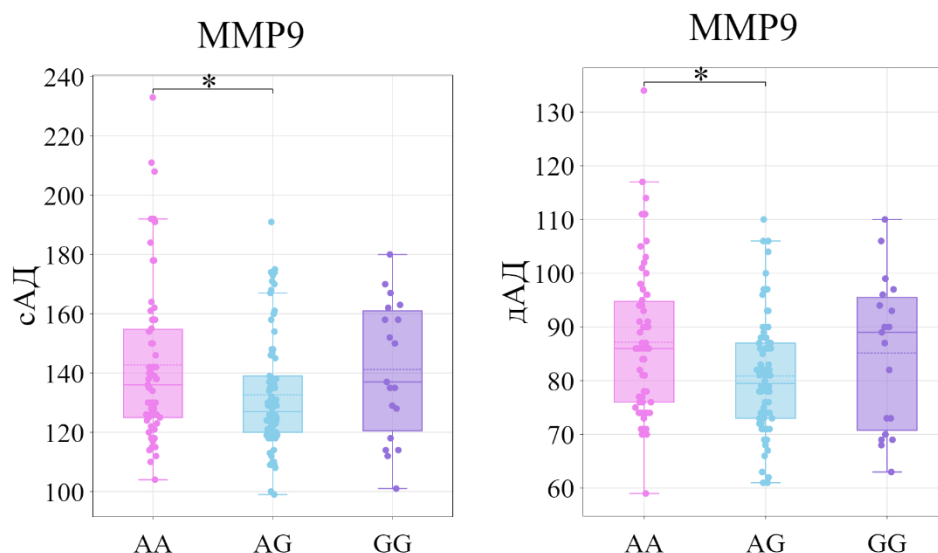


Рис. 10. Показатели систолического (сАД) и диастолического (дАД) артериального давления в исследуемой группе лиц в зависимости от генотипов полиморфизма rs17576 гена MMP9; * – статистически значимо при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

Кроме того, у лиц с генотипом AA и GG среднее значение индекса массы тела достоверно выше, чем у лиц с генотипом AG, что является отдельным фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний (рис.11).

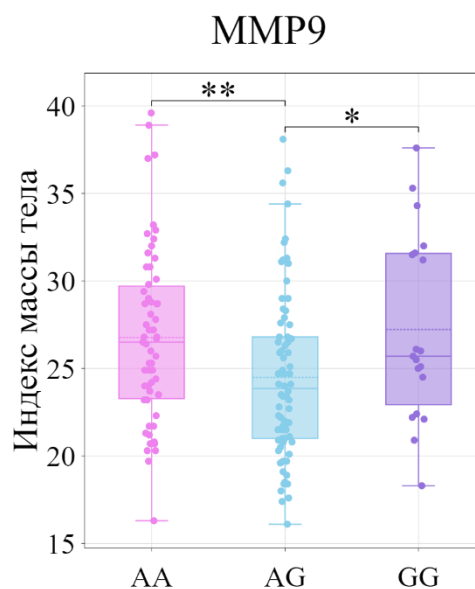


Рис. 11. Значения индекса массы тела в исследуемой группе лиц в зависимости от генотипов полиморфизма rs17576 гена MMP9; * – статистически значимо при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

При оценке наличия гипертонической болезни среди исследуемой группы лиц было показано, что среди добровольцев с генотипом AG достоверно реже встречается данный диагноз по сравнению с подгруппами гомозиготными как по дикому, так и по минорному аллелю (рис. 12).

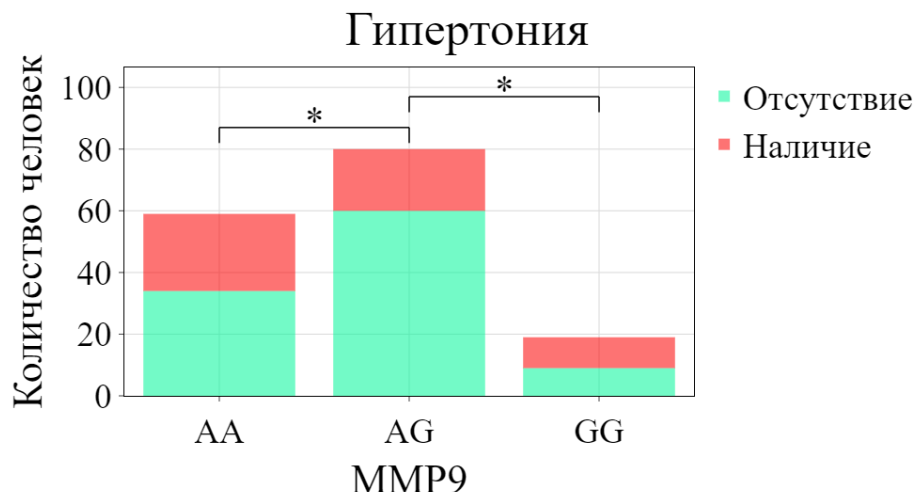


Рис. 12. Наличие гипертонии в исследуемой группе лиц в зависимости от генотипов полиморфизма rs17576 гена ММР9; * – статистически значимо при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

SNP rs17576 (Gln279Arg) представляет собой кодирующий вариант в экзоне 6 ММР9, приводящий к замене незаряженной аминокислоты (глутамин) на положительно заряженную аминокислоту (аргинин), которая может увеличивать ферментативную активность ММР9 (Li et al., 2019). Этот полиморфизм, вероятно, изменяет конформацию белка, что приводит к изменению связывания субстрата и активности фермента (Tesfaigzi et al., 2006).

Полученные результаты согласуются с некоторыми литературными данными относительно ассоциации аллеля дикого типа полиморфизма ММР9 с патологиями сердечно-сосудистой системы в других популяциях. В частности, в исследовании, проведенном на жителях Китая, было показано, что носительство генотипа ММР9 rs17576 AA ассоциировано с более высоким риском симптоматического внутричерепного атеросклероза (Feng et al., 2021). Полиморфизм ММР-9 rs17576 связан с повышенным риском ишемического инсульта в популяции Хан Хакка, а взаимодействие между ММР-9 rs17576 и ММР-

12 rs660599 также связано с повышенным риском ишемического инсульта (Fan et al., 2022). Показана большая частота встречаемости носительства аллели А гена MMP9 (rs17576) в группе пациентов с нестабильными атеросклеротическими бляшками по результатам микроскопического исследования атером после каротидной эндартерэктомии (Балацкий и др., 2018).

Особый интерес представляют результаты различий в возрастной акселерации биологического возраста, рассчитанного по модели PhenoAge среди лиц с вариациями генотипов полиморфизма rs17576 гена MMP9. Показано достоверно значимое увеличение показателя акселерации среди подгрупп с генотипами AA и GG и отрицательное значение акселерации биологического возраста среди гетерозиготных носителей аллеля данного полиморфизма (рис. 13).

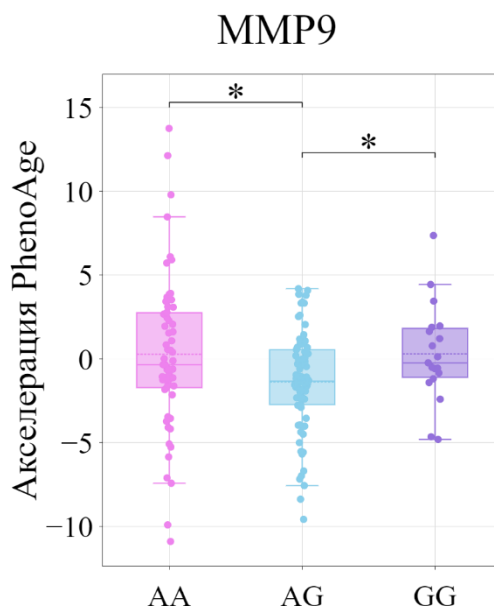


Рис. 13. Значение акселерации биологического возраста, рассчитанного по модели PhenoAge в исследуемой группе лиц в зависимости от генотипов полиморфизма rs17576 гена MMP9; * – статистически значимо при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

Полученные результаты подтверждают благоприятное влияние гетерозиготного носительства аллеля полиморфизма гена MMP9 по сравнению с гомозиготными вариантами. Можно предположить, что наличие данного варианта

генотипа может быть ассоциировано с более поздней манифестацией возраст-зависимых заболеваний, в частности, сердечно-сосудистых патологий.

Для выявления благоприятного набора изучаемых полиморфизмов провели кластеризацию по комбинированному распределению SNP в исследуемых генах. В результате получили 5 крупных гаплотипов (группы I-V) и сборную группу с разнообразными комбинациями изучаемых полиморфизмов. Результаты представлены на рисунке 14.

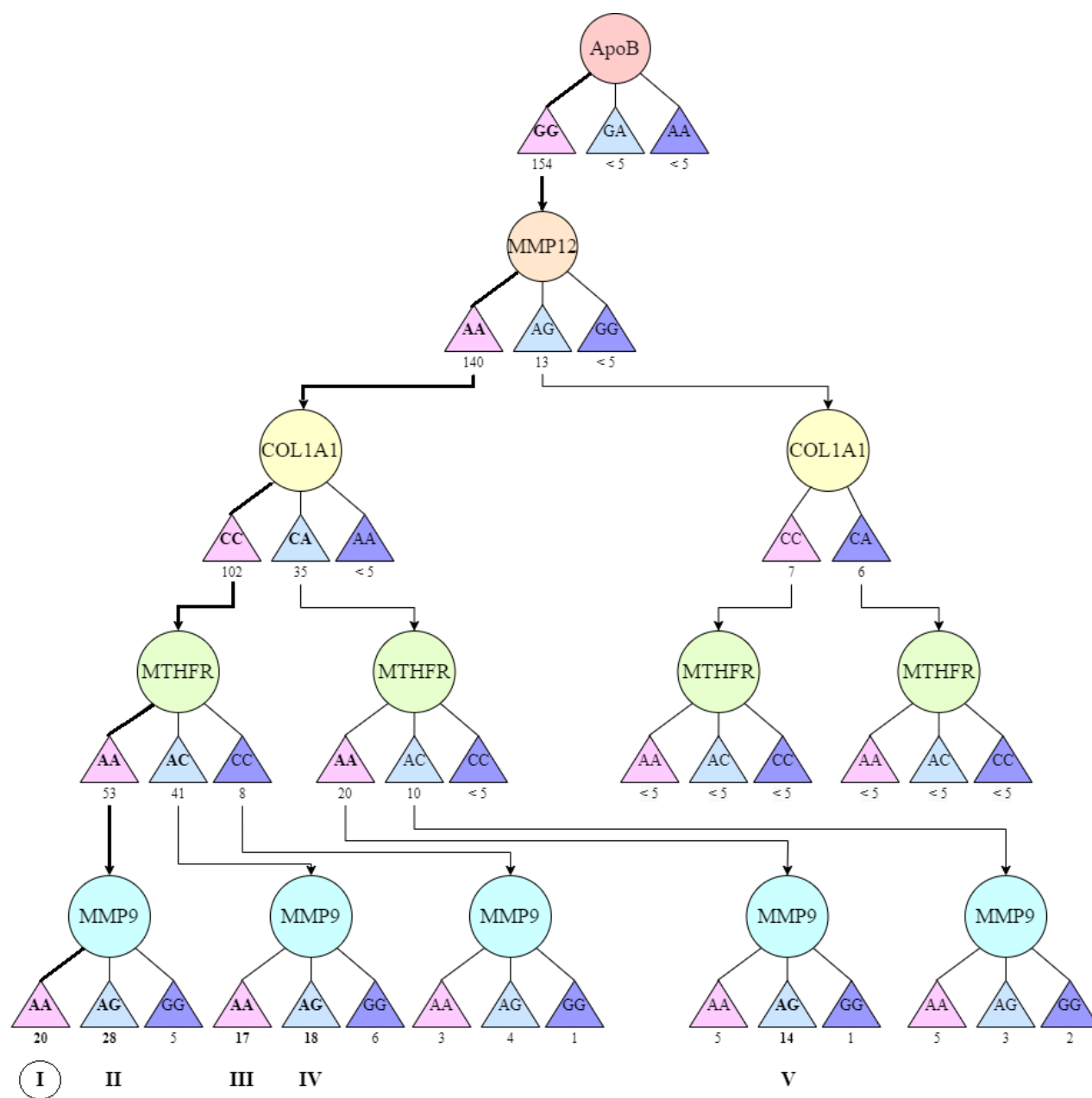


Рис. 14. Распределение гаплотипов по изучаемым полиморфизмам в популяции жителей Нижегородской области

По результатам распределения гаплотипов провели анализ среди полученных групп по ранее анализируемым параметрам. Были выявлены достоверные различия в оценке наличия гипертонии среди групп I и II, I и V, III и V. Также достоверные различия показаны для значений скорости каротидно-феморальной пульсовой волны (кфСПВ) между группами 1 и 4 (рис. 15)

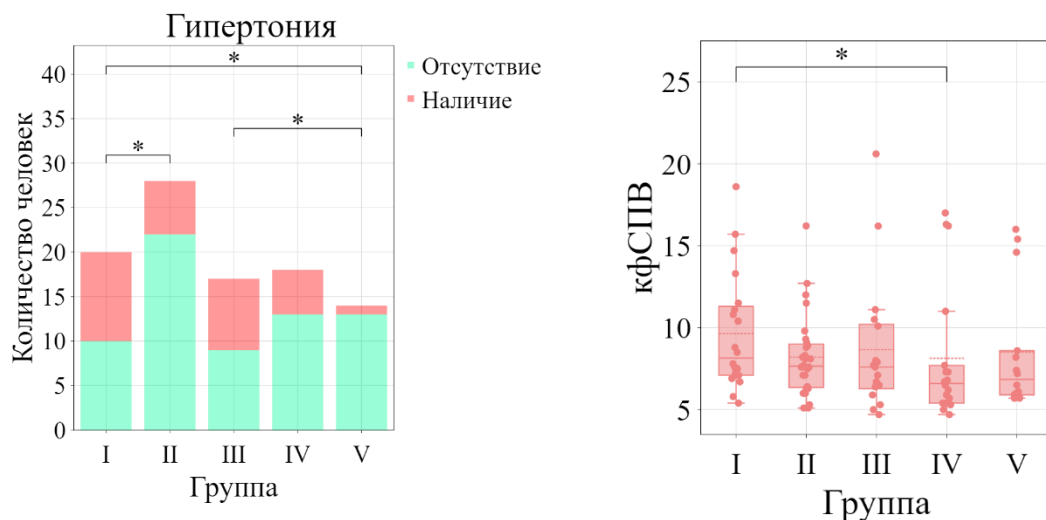


Рис. 15. Наличие гипертонии и различие показателей скорости каротидно-феморальной пульсовой волны (кфСПВ) среди исследуемых групп в зависимости от гаплотипов; * – статистически значимо при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

Систолическое артериальное давление (сАД) различается между группами I и 2, 1 и 4, а диастолическое артериальное давление (дАД) между группами I и II, а также I и V.

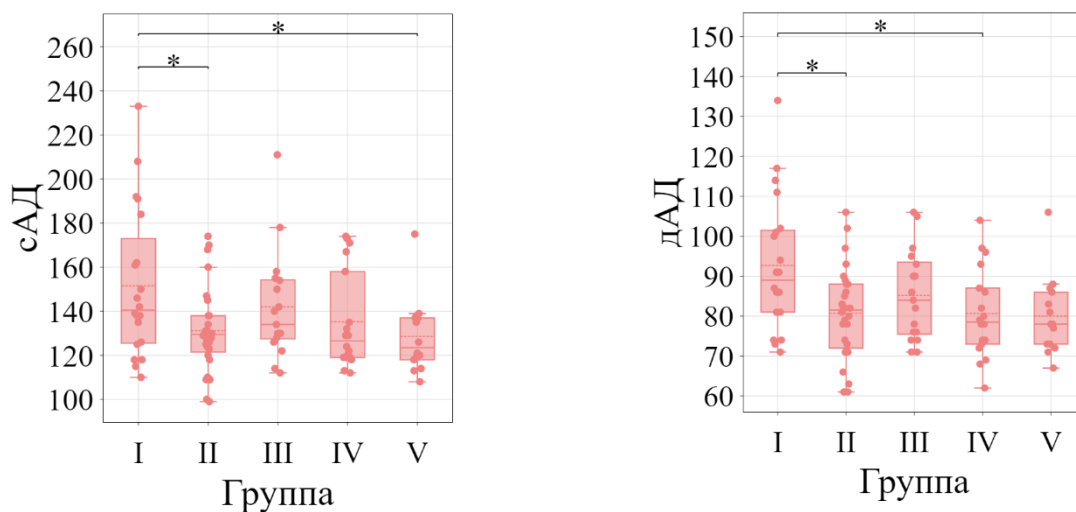


Рис. 16. Различия показателей систолического (сАД) и диастолического (дАД) артериального давления среди полученных гаплотипов; * – статистически значимо при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

По результатам комбинированного распределения генотипов можно охарактеризовать группу I как менее благоприятную при оценке показателей, связанных с состоянием сердечно-сосудистой системы. Следует отметить, что комбинация полиморфизмов в данной группе включает в себя аллели диких типов по всем изучаемым генам.

Таким образом, было обнаружено, что генотипы дикого типа генов COL1A1 и MMP9 ассоциированы с факторами риска развития осложнений в сердечно-сосудистой системе. Проведенные исследования позволяют выявлять новые ассоциации изучаемых полиморфизмов с функциональным состоянием сердечно-сосудистой системы, что имеет важное клиническое значение и требует дальнейшего изучения.

3.4. Определение эпигенетического возраста и возрастной акселерации

Для определения эпигенетического возраста был проведен полногеномный анализ метилирования генома. Для определения эпигенетического возраста рассматривали 4 основные модели эпигенетического возраста и связанной с ними акселерации: DNAmAgeHannum, DNAmAge, DNAmPhenoAge, DNAmGrimAge. Известно, что подход DNAmAgeHannum предсказывает возраст и скорость старения на основе состояния метилирования ДНК 71 маркера в образцах крови человека (Hannum et al., 2013). Модель DNAmAge позволяет оценивать эпигенетический возраст в различных тканях и клетках, что помогает идентифицировать ткани, демонстрирующие признаки ускоренного старения под влиянием различных заболеваний (Horvath, 2013). Модель DNAmGrimAge построена с использованием комбинации суррогатных биомаркеров смертности, основанных на метилировании ДНК, включая показатели семи белков плазмы, а также историю курения (Lu et al., 2019). На основе статуса метилирования ДНК и

фенотипического возраста модель DNAmPhenoAge позволяет предсказывать исходы возраст-зависимых заболеваний и риск смертности (Levine et al., 2018).

Для расчета значений по основным моделям определения эпигенетического возраста: DNAmAge, DNAmAgeHannum, DNAmPhenoAge, DNAmGrimAge использовался калькулятор Horvath (DNA Methylation Age Calculator). Для определения возрастной акселерации эпигенетического возраста субъектов, рассматриваемых в исследовании, было рассчитано значение остатков от модели линейной регрессии контрольной группы. Группы мужчин и женщин среди условно здоровых добровольцев были проанализированы отдельно. Результаты различий в возрастной акселерации между группами по основным типам эпигенетических возрастов представлены на рисунке 15.

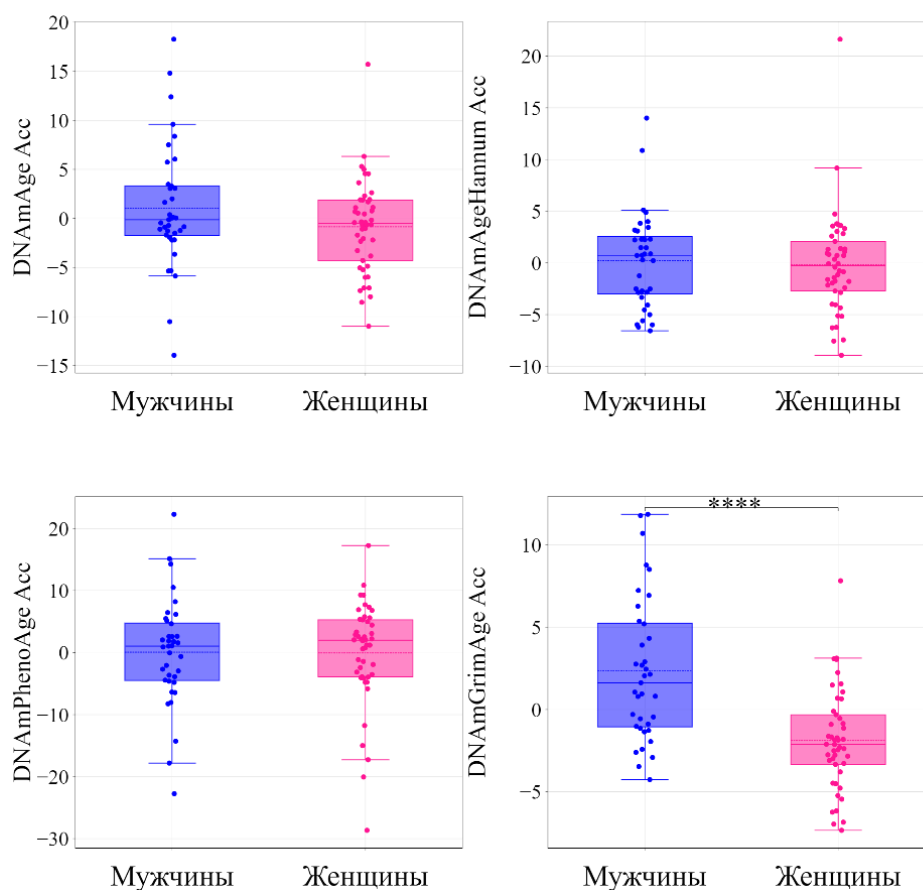


Рис. 15. Различия в возрастной акселерации по основным типам рассчитанного эпигенетического возраста: DNAmAge, DNAmAgeHannum, DNAmPhenoAge, DNAmGrimAge в группе мужчин и женщин контрольной группы; **** - статистически значимо при $p < 0,0001$ (скорректированное р-значение критерия Манна-Уитни)

Выявлено достоверно значимое увеличение возрастной акселерации эпигенетического возраста по модели DNAmGrimAge в группе мужчин ($2,2 \pm 0,7$ лет) относительно женщин ($-2,0 \pm 0,4$ года). Для данной модели определения биологического возраста показана связь с множеством возрастных заболеваний, а также способность в прогнозировании риска смертности. В ряде исследований показано преимущество данной модели определения акселерации эпигенетического возраста перед существовавшими ранее (Föhr et al., 2021).

3.5. Определение уровня некоторых биомаркеров, ассоциированных со старением

В настоящем исследовании были изучены три биомаркера (GDF15, FGF21 и FGF23), которые, согласно литературным данным, коррелируют с различными геронтологическими синдромами. При разделении групп по гендерному признаку было выявлено достоверно значимое различие в содержании белка FGF23 между мужчинами и женщинами. Различий в содержании двух других биомаркеров выявлено не было (рис. 16).

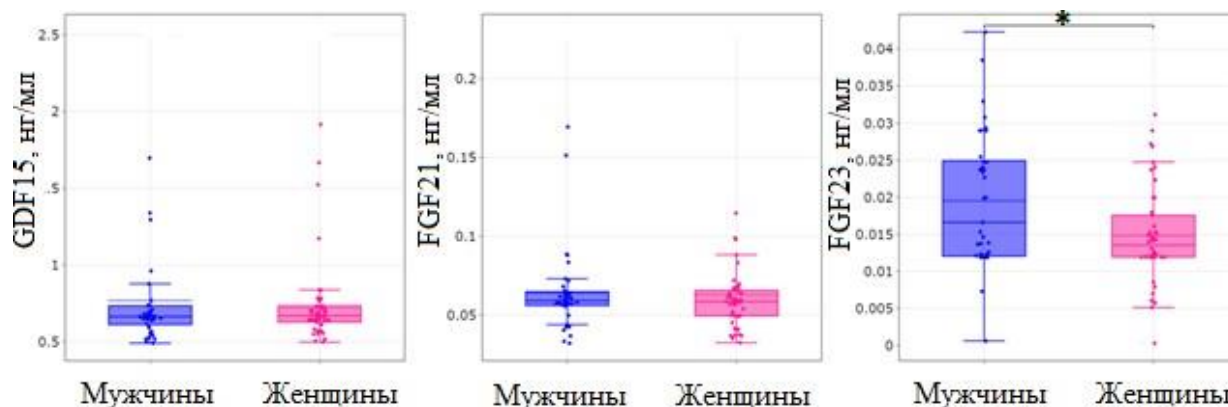


Рис. 16. Результаты определения количественного содержания GDF15, FGF21, FGF23 в плазме крови в группах условно здоровых мужчин и женщин; * – статистически значимо при $p < 0,05$ (критерий Манна- Уитни)

3.6. Выявление иммунологических показателей, ассоциированных с биологическим возрастом человека

Определены 46 показателей цитокинового профиля человека, включая провоспалительные и противовоспалительные маркеры. В результате было выявлено 6 показателей, для которых показана взаимосвязь, как с хронологическим возрастом, так и с моделями определения фенотипического и эпигенетического возраста в контрольной группе добровольцев (рис. 17).

Кроме классических маркеров воспаления, таких как интерлейкин-6 (IL- 6) и фактор некроза опухоли (TNF-а) выявлены нетипичные биомаркеры (MCP- 1, M-CSF, CXCL9, VEGF-A), которые, предположительно, вовлечены в процессы ускоренного старения. Гендерных различий в иммунологических показателях, связанных с различными типами определения биологического возраста выявлено не было.

Корреляция Спирмена

	-0.8 -0.4 0.0 0.4 0.8										
CD40L	0.28	0.2	0.24	0.22	0.3	0.32	-0.32	-0.26	-0.13	-0.13	0.11
EGF	0.23	0.15	0.2	0.16	0.19	0.25	-0.31	-0.21	-0.18	-0.21	0.085
Eotaxin	0.36	0.35	0.3	0.26	0.34	0.37	-0.22	-0.38	-0.28	-0.33	0.032
FGF-2	0.0034	-0.027	0.011	0.022	0.0038	0.065	-0.08	0.1	0.088	0.026	0.16
FLT-3L	0.23	0.18	0.19	0.2	0.21	0.23	-0.22	-0.26	-0.12	-0.18	0.034
Fraktalkine	0.16	0.13	0.2	0.13	0.2	0.21	-0.21	-0.082	-0.14	0.0037	0.23
G-CSF	0.37	0.36	0.34	0.34	0.31	0.39	-0.23	-0.34	-0.11	-0.4	0.12
GM-CSF	0	0.11	0.055	0.041	0.018	0	0.17	0.11	0.11	0.065	0.046
GROa	0.3	0.28	0.28	0.21	0.26	0.33	-0.19	-0.27	-0.22	-0.28	0.13
IFNa2	0.31	0.28	0.27	0.25	0.29	0.39	-0.28	-0.33	-0.14	-0.27	0.26
IFNy	0.26	0.2	0.25	0.24	0.25	0.32	-0.28	-0.18	-0.05	-0.2	0.063
IL-1a	0.074	0.12	0.084	0.074	0.1	0.15	0.043	-0.033	-0.0062	0.028	0.19
IL-1b	0.39	0.37	0.35	0.31	0.33	0.43	-0.27	-0.36	-0.19	-0.38	0.14
IL-1RA	0.1	0.03	0.14	0.17	0.12	0.15	-0.15	0.038	0.15	0.038	0.26
IL-2	0.16	0.11	0.1	0.053	0.12	0.19	-0.18	-0.19	-0.18	-0.21	0.1
IL-3	-0.19	-0.16	-0.17	-0.14	-0.13	-0.17	0.092	0.18	0.092	0.27	0.027
IL-4	0.26	0.22	0.28	0.23	0.29	0.29	-0.26	-0.15	-0.054	-0.091	0.21
IL-5	0.39	0.38	0.34	0.35	0.33	0.44	-0.24	-0.4	-0.16	-0.43	0.23
* IL-6	0.48	0.45	0.47	0.44	0.52	0.5	-0.35	-0.34	-0.19	-0.18	0.25
IL-7	-0.073	-0.11	-0.0056	-0.055	-0.068	-0.05	0.0045	0.17	0.041	0.1	-0.038
IL-8	0.39	0.35	0.37	0.34	0.36	0.45	-0.27	-0.31	-0.15	-0.31	0.23
IL-9	0.18	0.1	0.11	0.13	0.15	0.2	-0.25	-0.26	-0.11	-0.17	0.057
IL-10	0.22	0.22	0.24	0.25	0.24	0.26	-0.14	-0.084	-0.014	-0.12	0.14
IL-12 (p40)	0.32	0.28	0.35	0.26	0.29	0.32	-0.28	-0.21	-0.18	-0.31	0.0063
IL-12 (p70)	-0.16	-0.18	-0.074	-0.12	-0.12	-0.14	0.021	0.27	0.1	0.22	0.053
IL-13	0.31	0.28	0.28	0.25	0.26	0.36	-0.24	-0.28	-0.14	-0.3	0.22
IL-15	0.15	0.1	0.13	0.15	0.13	0.2	-0.2	-0.16	-0.0012	-0.14	0.15
IL-17A	0.043	0.013	0.036	0.038	0.062	0.096	-0.089	-0.00079	0.017	0.043	0.11
IL-17E/IL-25	-0.061	-0.072	-0.047	-0.06	-0.072	-0.026	-0.022	0.11	0.038	0.015	0.074
IL-17F	0.03	-0.035	0.036	0.056	0.043	0.027	-0.15	0.058	0.085	0.059	0.017
IL-18	0.34	0.31	0.34	0.31	0.34	0.36	-0.25	-0.25	-0.097	-0.19	0.24
IL-22	0.067	0.094	0.05	0.042	0.0089	0.1	0.033	-0.05	-0.059	-0.18	0.2
IL-27	0.38	0.41	0.41	0.36	0.33	0.39	-0.18	-0.3	-0.2	-0.39	0.059
IP-10	0.45	0.45	0.43	0.39	0.4	0.46	-0.25	-0.41	-0.26	-0.5	0.18
* MCP-1	0.51	0.45	0.48	0.43	0.53	0.51	-0.38	-0.43	-0.25	-0.27	0.091
MCP-3	0.021	-0.0051	0.025	0.024	0.0092	0.063	-0.098	0.0022	-0.0022	-0.023	0.18
* M-CSF	0.55	0.54	0.53	0.51	0.54	0.58	-0.32	-0.4	-0.19	-0.38	0.22
MDC	-0.15	-0.19	-0.11	-0.17	-0.12	-0.13	-0.0096	0.26	-0.017	0.15	0.074
* MIG	0.7	0.65	0.71	0.64	0.68	0.67	-0.51	-0.53	-0.27	-0.54	0.15
MIP-1a	0.045	-0.00017	0.04	0.039	0.055	0.091	-0.15	-0.049	-0.021	0.0034	0.11
MIP-1b	0.14	0.12	0.21	0.22	0.21	0.12	-0.14	0.058	0.067	0.054	0.059
PDGF-AA	0.29	0.23	0.29	0.25	0.31	0.35	-0.31	-0.24	-0.11	-0.13	0.17
DGF-AB/BB	0.37	0.3	0.36	0.35	0.38	0.42	-0.35	-0.31	-0.1	-0.2	0.14
TGFa	0.0047	-0.075	-0.043	0.028	0.011	0.046	-0.17	-0.044	0.059	0.016	0.028
* TNFa	0.49	0.49	0.48	0.45	0.46	0.52	-0.27	-0.4	-0.18	-0.42	0.21
TNFB	0.093	0.058	0.093	0.082	0.1	0.16	-0.13	-0.035	-0.046	-0.025	0.21
* VEGF-A	0.53	0.51	0.49	0.5	0.5	0.59	-0.33	-0.46	-0.13	-0.4	0.26
	Age	DNAmAge	DNAmAgeHannum	DNAmPhenoAge	DNAmGrimAge	PhenotypicalAge	DNAmAge acc	DNAmAgeHannum acc	DNAmPhenoAge acc	DNAmGrimAge acc	PhenotypicalAge acc

Рис. 17. Связь уровня биомаркеров и основных типов определения биологического возраста и связанной с ними акселерации (каждая тепловая ячейка отражает уровень корреляции по Спирмену, * - высокий уровень корреляции)

На основе проведенных исследований с применением регрессионной модели Elastic Net в группе здоровых добровольцев была разработана модель ipAGE (Yusipov et al., 2022), которая предсказывает возраст на основе оцененного ранее иммунологического профиля (рис.18).

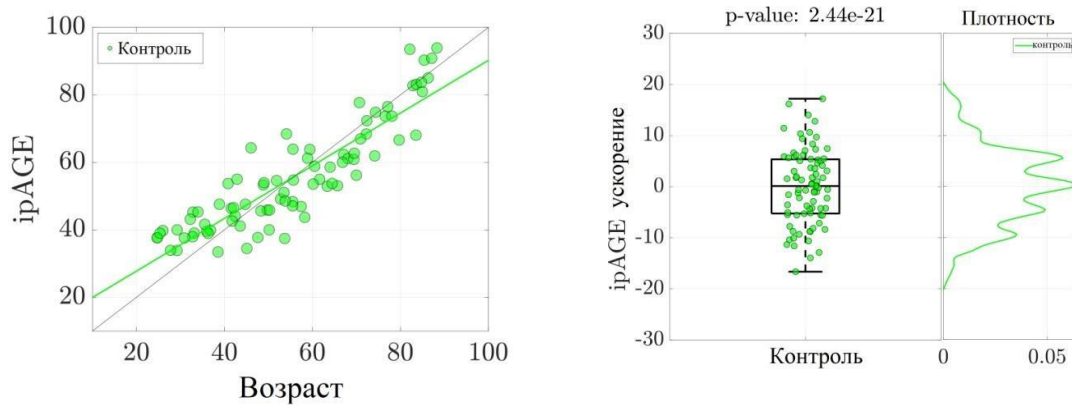


Рис. 18. Связь между ipAGE и хронологическим возрастом и ускорение ipAGE в контрольной группе добровольцев

Модель включает в себя 38 из 46 биомаркеров, коэффициент детерминации 0,79, средняя абсолютная ошибка 6,82 года, среднеквадратичная ошибка 8,17 года. Важно, что разработанные часы, основанные на иммунологических показателях крови, по своей точности могут конкурировать с эпигенетическими часами.

Компоненты часов ipAGE в значительной степени совпадают с недавно разработанными часами iAge (Sayed et al., 2021), которые применяли альтернативные экспериментальные и аналитические подходы.

Ранее было показано, что хемокин CXCL9 является ключевым участником системного хронического воспаления, связанного со старением сердечно - сосудистой системы и нарушением эластичности сосудов. При изучении результатов мультиплексного анализа цитокинов было выявлено, что данный биомаркер имеет наибольшую связь с различными типами определения биологического возраста. Таким образом, для выявления метаболических взаимоотношений между оцененными ранее показателями иммунного статуса: GDF15, FGF21 и CXCL9 была проанализирована взаимная корреляция концентраций данных биомаркеров в контрольной группе (рис. 19).

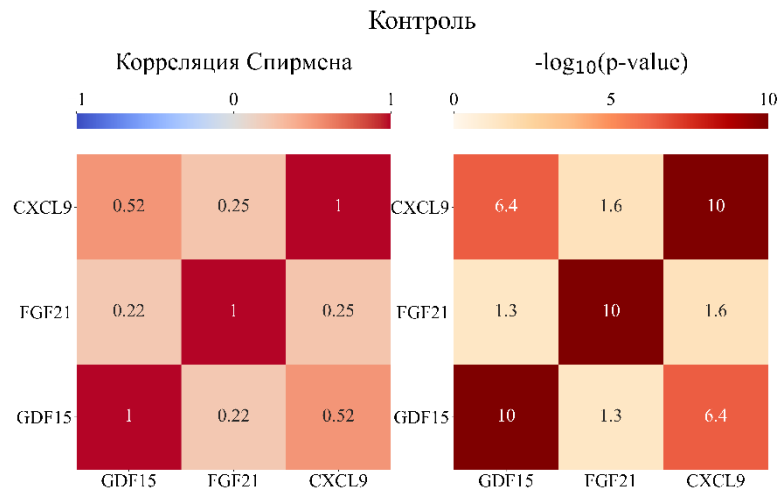


Рис. 19. Коэффициент корреляции Спирмена между исследуемыми биомаркерами GDF15, FGF21 и CXCL9 для группы условно здоровых добровольцев (контроль)

Тепловые карты коэффициента корреляции Спирмена демонстрируют взаимосвязь между концентрациями биомаркеров GDF15 и CXCL9.

Для изучения взаимосвязи между исследуемыми биомаркерами и основными рассчитанными эпигенетическими возрастами проводили корреляционный анализ Спирмена (рис. 20).

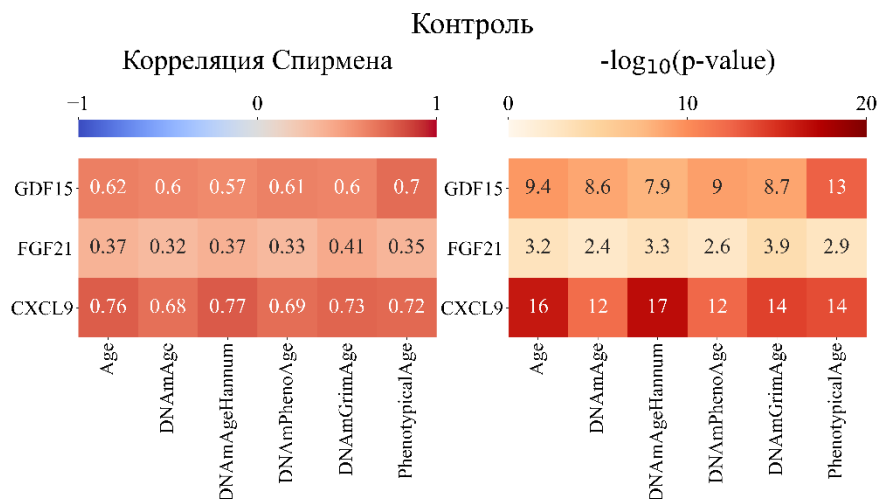


Рис. 20. Коэффициент корреляции Спирмена между исследуемыми биомаркерами и основными рассчитанными эпигенетическими возрастами для контрольной группы

Тепловые карты коэффициентов корреляции Спирмена демонстрируют

взаимосвязь между содержанием сразу двух биомаркеров: GDF15 и CXCL9 и всеми рассчитанными способами определения возраста. Однако взаимосвязи между концентрацией выбранных биомаркеров и возрастной акселерацией в контрольной группе выявлено не было.

Полученные данные по концентрации в крови трех биомаркеров позволили разработать регрессионную модель биологического возраста Age-Estimation Clock. Чтобы разработать модель, которая может предсказать хронологический возраст с использованием трех биомаркеров (GDF15, FGF21, CXCL9) была применена модель множественной линейной регрессии. Регрессия хронологического возраста по трем биомаркерам (CXCL9, FGF21, GDF15) показана в контрольной группе добровольцев (рис. 21).

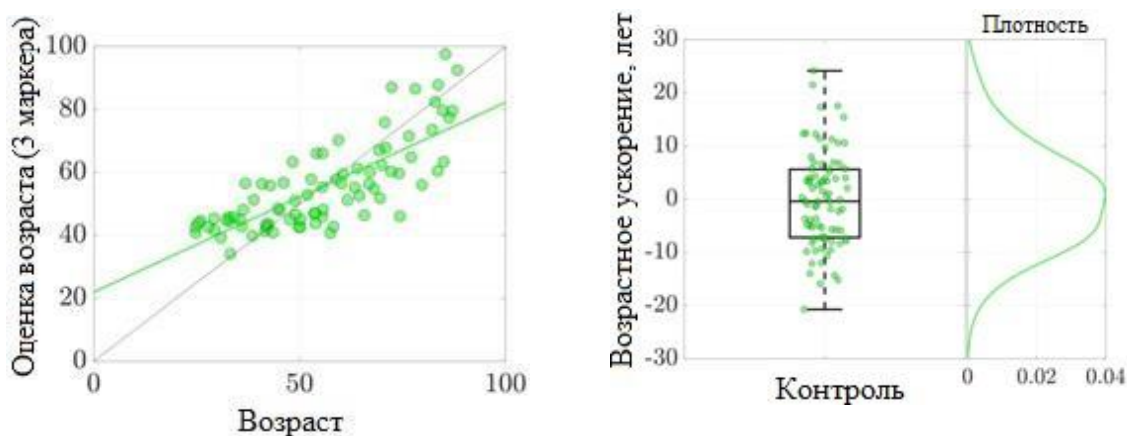


Рис. 21. Часы оценки возраста (Age-Estimation Clock), основанные на концентрации 3 биомаркеров, и возрастная акселерация в контрольной группе добровольцев

3.7. Выявление возраст-опосредованных психофизиологических показателей

Для выявления психофизиологических показателей, связанных с возрастом, проводили исследование когнитивного статуса с использованием 3 когнитивных тестов на платформе ApWay (Polevaya et al., 2019).

Траектория снижения когнитивных способностей с возрастом широко варьируется от одного человека к другому. Исследовали разнообразие психофизиологических реакций, оценив различия индивидуальных когнитивных способностей среди когорты одного возраста. Для этого анализировали

психофизиологические показатели, применимые при оценке прохождения человеком отдельного когнитивного теста: dH+, dH-, t+, t- для кампиметрии и MR, SMR для сенсомоторных тестов. По результатам прохождения когнитивных тестов с учетом полученных психофизиологических показателей все участники исследования были сгруппированы в 7 кластеров по их результативности относительно участников сопоставимого возраста. Полученные кластеры обозначены буквами от А до G (рис. 22).

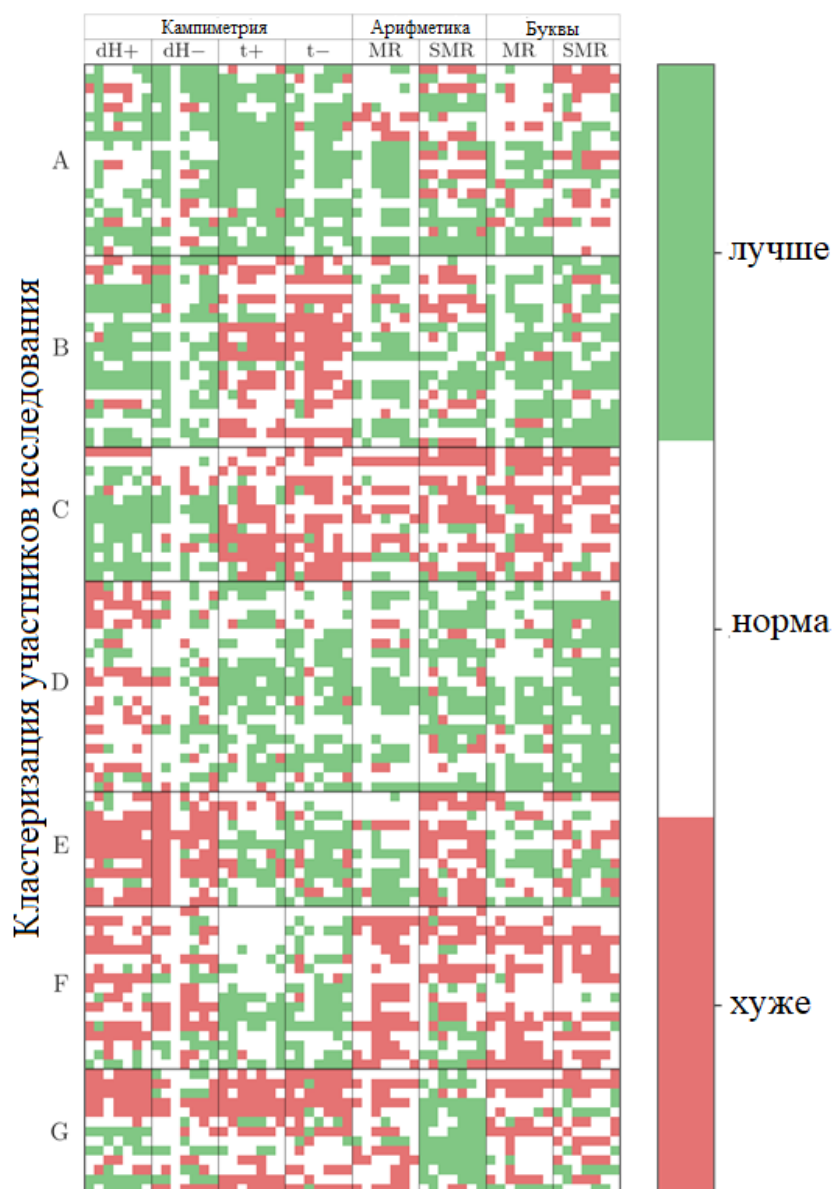


Рис. 22. Группировка участников исследования по сходству результатов когнитивных тестов. Строки таблицы соответствуют участникам, столбцы соответствуют психофизиологическим показателям когнитивных тестов, цвета характеризуют результаты участника по сравнению с другими людьми того же возраста: зеленый – результат лучше среднего на половину стандартного

отклонения, красный – результат хуже среднего на половину стандартного отклонения, белый – средний результат. А–G – метки идентифицированных групп участников

Следует отметить, что во всех представленных группах среди участников преобладают женщины. Кластеризация индивидуальных моделей поведения выявила определенные особенности поведения, характерные для каждой из выделенных групп.

Группа А – мужчины и женщины, средний возраст 39,2 года. Отмечается успешное выполнение всех представленных тестов по сравнению с испытуемыми того же возраста, за исключением сенсомоторной реакции (время распознавания стимула и принятия решения) в тесте на различение букв алфавита. Этот кластер участников тратит больше времени на принятие решений в контексте данного задания, однако, в то же время в этой группе выявлено наименьшее количество ошибок 1-го типа (ERR-1) – пропуск/отсутствие реакции на нужный стимул и тип 3 (ERR-3) – реакция на неправильный раздражитель. Таким образом, эта группа предположительно выбирает стратегию «больше времени – точнее результат». Полученные результаты свидетельствуют о высокой концентрации внимания и хорошей рабочей памяти.

Группа Б – мужчины и женщины, со средним возрастом 40,0 лет. Этот кластер характеризуется успешным выполнением всех заданий в сенсомоторных тестах. Участники тратят мало времени на получение точного результата (среднее количество всех видов ошибок меньше или равно по сравнению с другими группами). Особенностью является выполнение теста кампиметрии: этот кластер участников тратит больше времени на распознавание целевого стимула, используя при этом минимальное количество кликов. Таким образом, данная группа в контексте выполнения задачи по различению объектов выбирает стратегию «больше времени — меньше кликов». Результаты сенсомоторных тестов свидетельствуют о высоком ресурсе внимания и хорошей обучаемости.

Группа С – небольшая группа мужчин и женщин, средний возраст 44,5 года. Отмечается менее успешное выполнение всех представленных тестов по

сравнению с участниками аналогичного возраста. Этот кластер тратит много времени на решение всех представленных задач, как моторных, так и сенсомоторных, и показывает большое количество всевозможных ошибок в сенсомоторных тестах. В то же время в тесте кампиметрии участники этого кластера имеют более низкий порог цветового различения объектов, но тратят на это задание больше времени. Таким образом, для данной группы характерна низкая скорость передачи сигнала в нейронных сетях, что может быть связано с возрастными изменениями.

Группа D – мужчины и женщины, средний возраст 37,8 лет. Этот кластер успешно выполняет все виды сенсомоторных тестов, мало времени тратит на принятие решения, при этом демонстрируя высокую точность (низкий уровень ошибок типа ERR-1 и ERR-3 – пропуск правильных стимулов и реагирование на неправильные стимулы). Однако этот кластер менее успешен в задаче цветоразличения и демонстрирует высокий уровень ошибок ERR-LIM — превышение максимально возможного количества кликов для восприятия объектов при решении обратных задач в тесте кампиметрии. Таким образом, данная группа в контексте выполнения задачи по различению объектов выбирает стратегию «меньше времени — больше кликов». Возможно, имеет место эффект «застревания», при котором человек видит объект, когда он фактически исчезает с фона, что может быть особенностью цветовосприятия.

Группа E – это небольшая группа мужчин и женщин со средним возрастом 46,0 лет. Этот кластер участников проявляет особенности в выполнении заданий как сенсомоторных тестов, так и цветового различения в тесте кампиметрии. Участники этой группы тратят много времени на распознавание раздражителя и принятие решения по арифметическому тесту, при этом допуская большое количество ошибок, демонстрируя реакцию на неправильный раздражитель. В тесте кампиметрии они выбирают стратегию применения большего количества кликов с наименьшими затратами времени, что отражается на количестве ошибок.

Группа F – мужчины и женщины, средний возраст 37,9 года. Этот кластер характеризуется неудачным выполнением всех видов заданий по сравнению с

участниками аналогичного возраста. Люди этой группы тратят больше времени на выполнение всех задач, как двигательных, так и сенсомоторных. При выполнении кампиметрического теста они затрачивают меньше времени, но при этом обнаруживают высокий порог цветоразличения и большое количество ошибок, в том числе ошибок в распознавании фигур (ERR-1). Эти результаты свидетельствуют о снижении концентрации внимания и уменьшении рабочей памяти.

Группа G – это небольшая группа мужчин и женщин, средний возраст которых составляет 47,4 года. Этот кластер характеризуется неудачным выполнением всех видов заданий по сравнению с участниками того же возраста. Исключение составляет сенсомоторная реакция в тесте на арифметические вычисления, где участники этого кластера показывают хорошие результаты. Однако при выполнении всех когнитивных тестов они допускают большое количество ошибок разного рода (в том числе максимальное количество ошибок среди других кластеров в тесте кампиметрии). Эти результаты могут свидетельствовать о снижении концентрации внимания, оперативной памяти и искажении функции цветоразличения, что может быть связано с возрастными изменениями.

Проведено исследование ассоциаций между отдельными психофизиологическими показателями, полученными в ходе тестирования и хронологическим возрастом, а также фенотипическим возрастом. В результате показана значимая корреляция (p -значение $< 0,001$, корреляция Пирсона) для 21 из 64 психофизиологических показателей, которые являются производными 5 когнитивных индексов (рис.23).

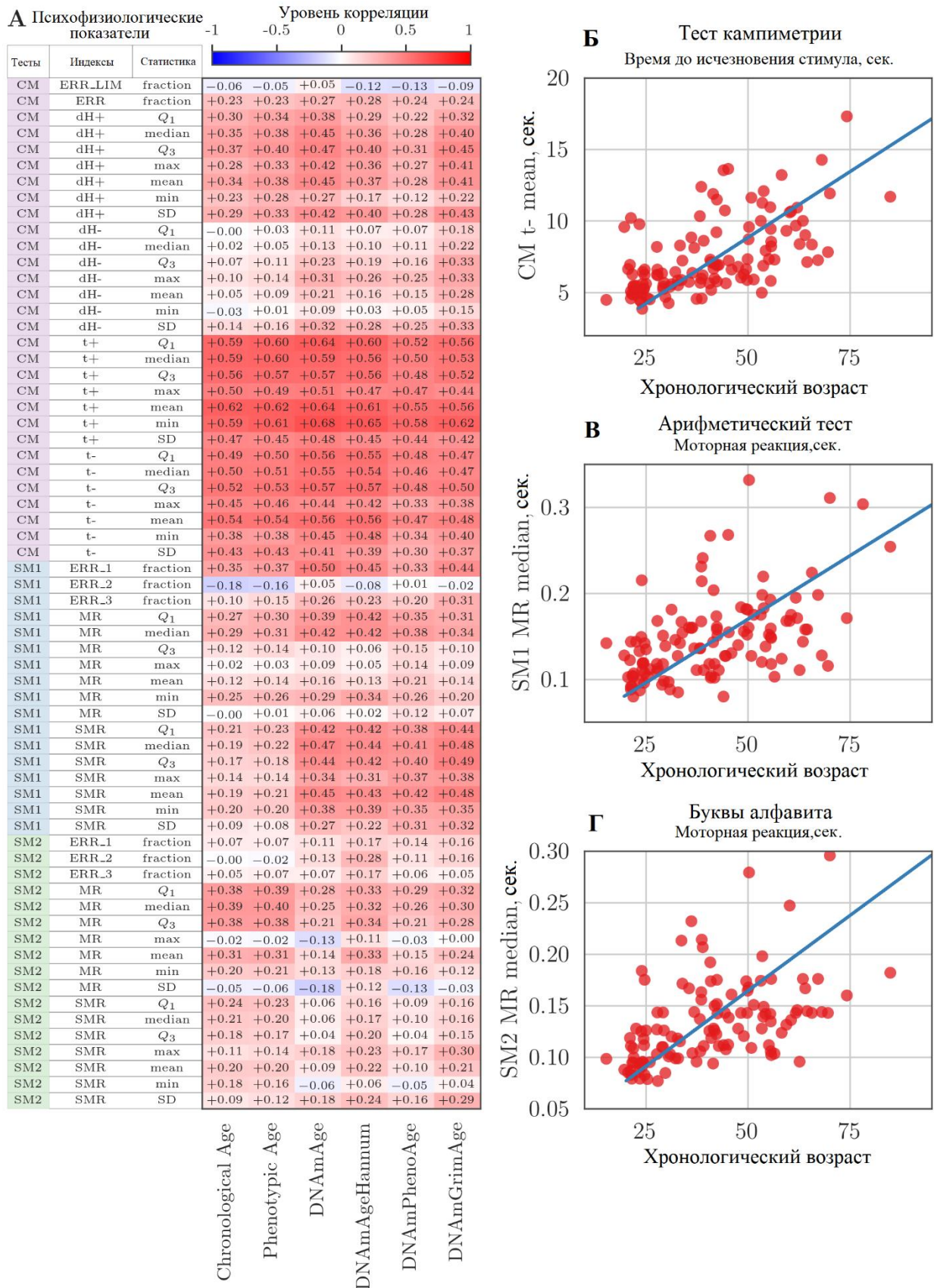


Рис. 23. Связь психофизиологических показателей и индексов с возрастом. А – Коэффициенты корреляции Пирсона, полученные в результате корреляции психофизиологических показателей и каждого типа возраста; Б, В, Г) Примеры количественных психофизиологических показателей, связанных с возрастом

Данные психофизиологические количественные показатели одинаковы как для фенотипического возраста (модель PhenoAge), так и для хронологического возраста.

При исследовании корреляции показателей с различными типами определения эпигенетического возраста (рис. 12), было выявлено, что 11 количественных показателей показывают значительную корреляцию (скорректированное p -значение $<0,001$, корреляция Пирсона) с DNAmAge, 9 количественных показателей с DNAmAgeHannum, 6 количественных показателей с DNAmGrimAge и 4 количественных показателя с DNAmPhenoAge. При этом общим маркером с оценкой хронологического возраста является время распознавания стимула в тесте кампиметрии (CM_t +).

По литературным данным известно, что более высокий уровень DNAmGrimAge ассоциируется с более низкими когнитивными способностями и поражением сосудов головного мозга в пожилом возрасте, независимо от когнитивных способностей в раннем возрасте (Hillary et al., 2020).

Возрастные изменения восприятия цвета могут быть связаны с увеличением доли нейронов с соматическими мутациями, вызванными эпигенетическим дрейфом в соответствующих нейронных сетях (Teschendorff et al., 2013; West et al., 2013). С возрастом неизбежны структурные и функциональные потери в организации рецепторного аппарата нейронов, канальных белков, ферментов, медиаторных пептидов и т.д. Очевидно, что с увеличением биологического возраста человека эти расстройства все более негативно влияют на основные когнитивные функции: сенсорные, перцепционные, мнестические. Прямая корреляция эпигенетического возраста со временем сенсомоторной реакции может свидетельствовать о естественном снижении скорости обработки информации в нервной системе с возрастом.

На основе проведенных исследований с учетом выявленных психофизиологических показателей, связанных с возрастом, сотрудниками кафедры прикладной математики ИИТММ были созданы хронологические предикторы когнитивного возраста (когнитивные часы) с использованием

различных моделей машинного обучения. Проведенный анализ выявил наличие нелинейности в возрастных изменениях когнитивных тестов индивидуумов. Выявлена более тесная связь психофизиологических показателей с биологическим возрастом, чем с хронологическим.

Наиболее точные прогнозы эпигенетического возраста с использованием когнитивного статуса человека были получены для DNAmAge (Horvath, 2013) и DNAmAgeHannum (Hannum, 2013).

При исследовании взаимосвязи между эпигенетическими, фенотипическими и когнитивными часами была показана высокая корреляция ($r > 0,75$) всех моделей определения биологического возраста с хронологическим возрастом. При этом значимых корреляций между возрастными ускорениями когнитивных, фенотипических и эпигенетических часов выявлено не было (рис.24).

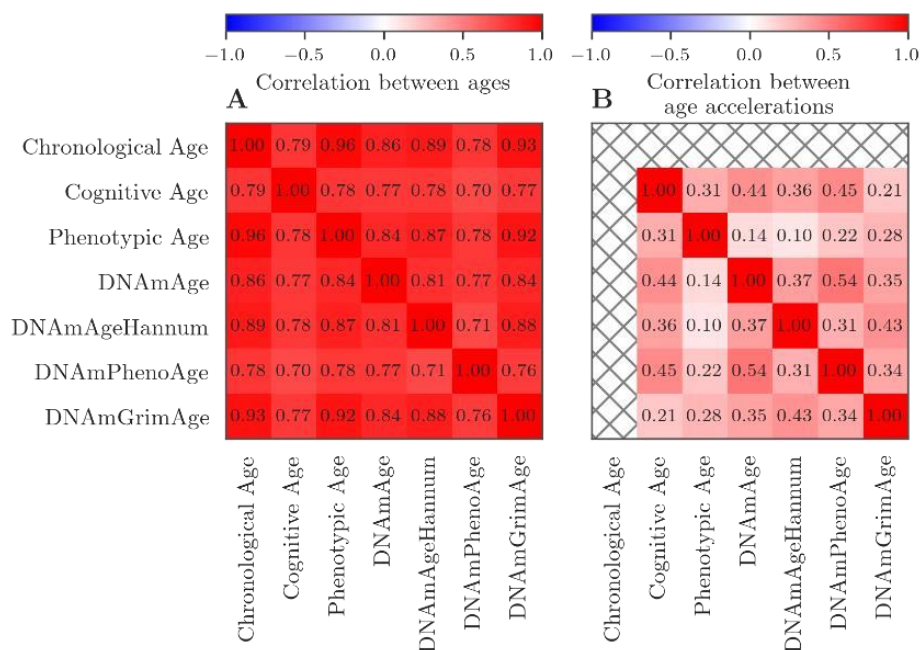


Рис. 24. Корреляционный анализ различных типов определения возраста (A) и возрастных ускорений (B) Каждая цветная ячейка тепловых карт иллюстрирует корреляцию Пирсона между разными типами возрастов и возрастными ускорениями

Используя разработанные часы когнитивного возраста, вычисляли акселерацию когнитивного возраста участников среди полученных ранее кластеров А-Г. Результаты представлены на рис. 25.

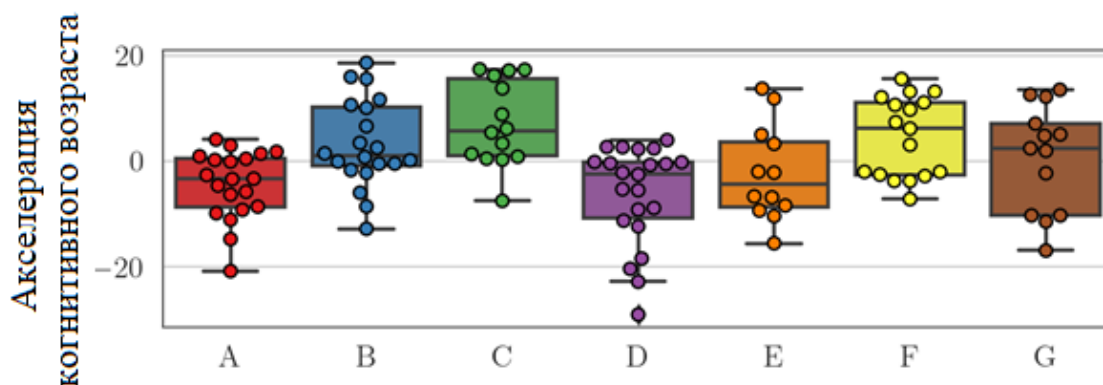


Рис. 25. Изменения акселерации когнитивного возраста среди участников из различных кластеров. Связь групп с ускорением когнитивного возраста проверялась одновыборочным Т-критерием путем сравнения с нулевым средним (без ускорения)

По результатам акселерации когнитивного возраста представленных групп стоит отметить статистически значимое ускоренное старение для групп С и F (+7,2 года и +4,58 года соответственно) и, наоборот, замедленное старение для групп А и D (- 4,43 года и -6,18 года соответственно). Данные результаты согласуются с результатами кластеризации после прохождения участниками когнитивных тестов. В частности, группа А, которая отлично справляется с когнитивными тестами, демонстрирует замедленное старение по сравнению с группами С и F, которые хуже справляются со всеми тестами и характеризуются ускоренным старением. Аналогичный результат соответствия полученных кластеров и акселерации когнитивного возраста показан для групп В, С, F, которые показывают менее успешные результаты в прохождении тестов по сравнению с группой D, которые характеризуются замедленным темпом когнитивного старения и демонстрируют хорошие результаты во всех тестах. Группы Е и G не показали существенных изменений в ускорении старения.

При этом между группами не было обнаружено статистически значимых связей с точки зрения хронологического возраста и различных типов биологического возраста. Также не было обнаружено статистической значимости ускорений биологического возраста.

Таким образом было показано, что для адекватной оценки возраст-

зависимых изменений организма человека можно применять определение биологического возраста с использованием биохимических параметров крови, доступных эпигенетических моделей, а также модели, основанной на иммунологических показателях крови.

3.8. Исследование биологического возраста при терминальной стадии хронической почечной недостаточности

В некоторых исследованиях было показано, что хроническая болезнь почек ассоциирована с фенотипом ускоренного старения. Применение общепринятых моделей определения биологического возраста человека позволило установить, что терминальная стадия хронической почечной недостаточности (ТХПН) ассоциирована с увеличением биологического возраста, что может рассматриваться как неблагоприятный прогностический признак развития сопутствующих заболеваний и ранней смертности.

С применением модели PhenoAge была установлена значительная возрастная акселерация ($+30,1 \pm 1,6$ лет) в группе пациентов с ТХПН по сравнению с группой условно здоровых добровольцев (рис. 26).

Однако использование такого рода модели при ТХПН может быть не вполне оправдано, т.к. в алгоритм определения возраста входит креатинин – показатель, который значительно повышен при данной патологии.

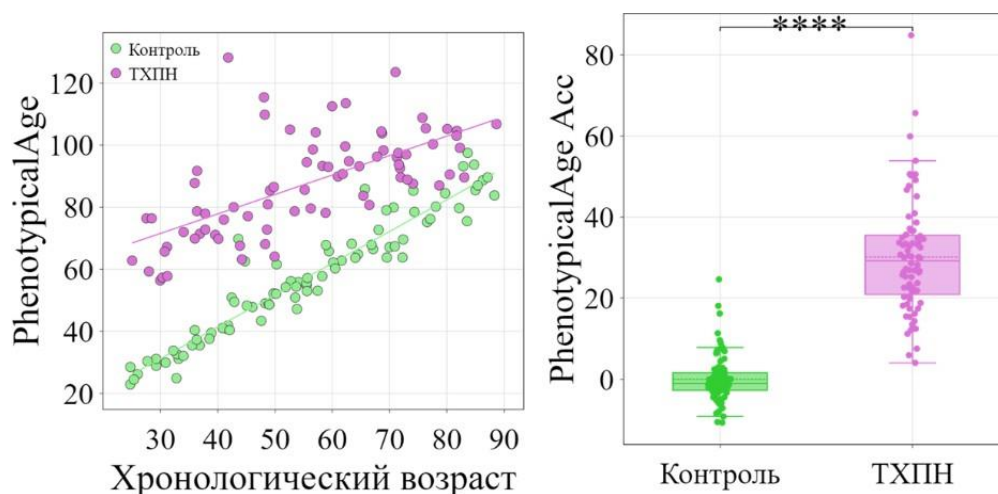


Рис. 26. а) Зависимость фенотипического возраста от хронологического возраста в группе пациентов с ТХПН по сравнению с контрольной группой; б) Различия в возрастной акселерации в модели определения фенотипического возраста в группе ТХПН по сравнению с контрольной группой; **** - статистически значимо при $p < 0,0001$ (критерий Манна-Уитни)

Установлено, что значимые отклонения показателей в группе пациентов с ТХПН в основном были обусловлены увеличением уровня креатинина и глюкозы в плазме крови. Определение концентрации креатинина в крови имеет важное диагностическое значение для оценки функции почек, поскольку снижение скорости фильтрации крови почками приводит к повышению концентрации креатинина в крови и снижению концентрации креатинина в моче, что указывает на почечную недостаточность.

Выявленное отклонение глюкозы в плазме крови может объясняться наличием у части пациентов сопутствующего сахарного диабета, как первого, так и второго типов, в том числе, основного диагноза – диабетической нефропатии. Многие исследователи считают, что ранние изменения почечных клубочков имеют решающее значение для последующего увеличения концентрации глюкозы в плазме крови. При повреждении клубочков нарушается фильтрация, что приводит к затруднению поступления глюкозы из крови в первичную мочу и уровень глюкозы в крови растёт.

Также следует отметить, что у части пациентов были выявлены отклонения в эритроцитарных показателях, а именно MCV (средний объём эритроцитов) и RDW-CV% (ширина распределения эритроцитов), что свидетельствует об анемии, которая часто встречается у больных, проходящих гемодиализную терапию. Анемия при ТХПН является многофакторным процессом, обусловленным относительным дефицитом эритропоэтина, уремическими ингибиторами эритропоэза, сокращением выживаемости эритроцитов и снижением уровня железа (Babitt, Lin, 2012).

С использованием эпигенетических часов, было показано, что трое из четырех эпигенетических возраста (DNAmAge, DNAmPhenoAge, DNAmGrimAge) показывают статистически значимую (р-значение Манна-Уитни ниже 0,05) возрастную акселерацию в группе субъектов с ТХПН (рис.27).

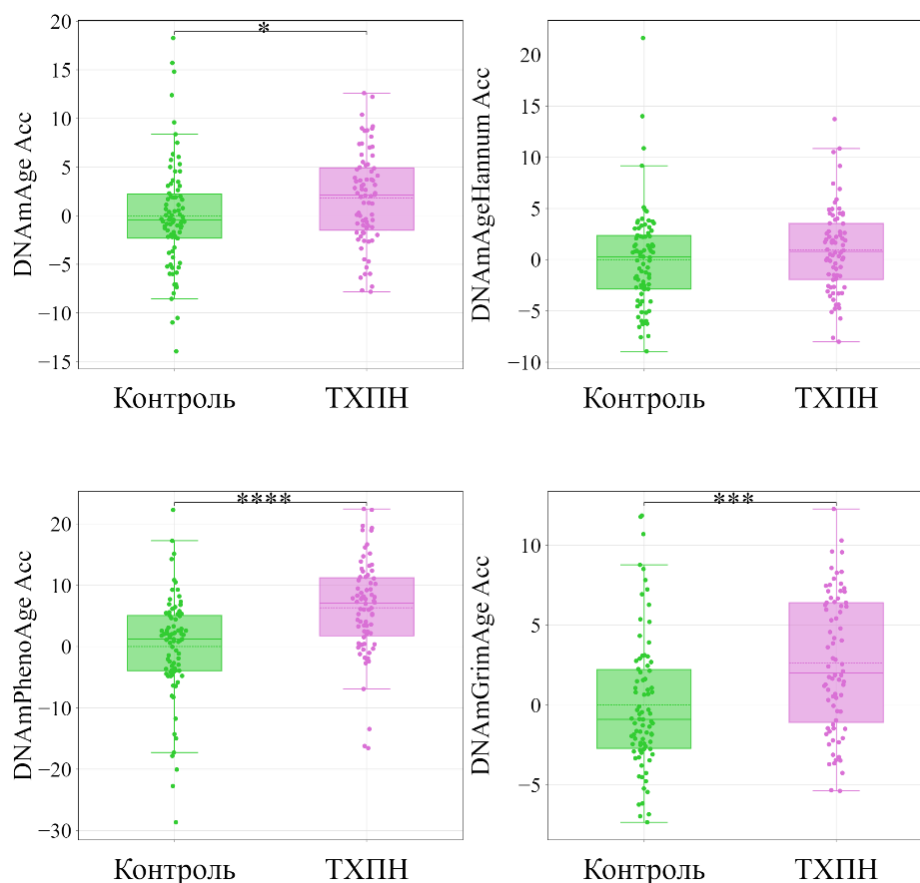


Рис.27. Различия в возрастной акселерации по основным типам рассчитанного биологического возраста: DNAmAge, DNAmAgeHannum, DNAmPhenoAge, DNAmGrimAge в группе пациентов с ТХПН по сравнению с контрольной группой; *- статистически значимо при $p < 0,05$, **** - статистически значимо при $p < 0,0001$ (критерий Манна-Уитни)

В среднем эпигенетическое возрастное ускорение в группе пациентов с ТХПН составило 3 года. Модель DNAmAgeHannum показала наименьшее ускорение на 0,6 года; самое высокое возрастное ускорение в 7,0 лет было зарегистрировано для модели DNAmPhenoAge.

По данным из истории болезни пациентов рассчитывали стаж гемодиализа и исследовали корреляцию между стажем гемодиализа (в месяцах) и

биологическим возрастом исследуемой группы (фенотипическим и эпигенетическим). В результате взаимосвязи данных показателей обнаружено не было (коэффициент корреляции по Спирмену 0,085), таким образом, отклонения биологического возраста не обусловлены стажем гемодиализа.

Для характеристики состояния организма в модели ускоренного старения, опираясь на ранее полученные результаты мультиплексного анализа цитокинов, проводили определение уровня 3 биомаркеров, ассоциированных со старением и выбранной патологией: FGF21, GDF15, CXCL9 (рис.28).

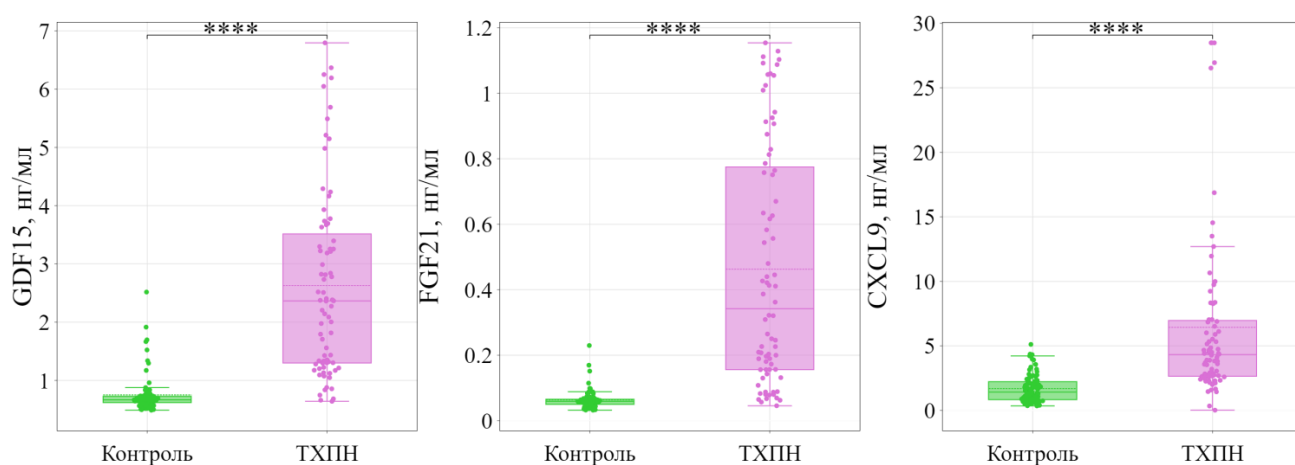


Рис. 28. Результаты определения количественного содержания исследуемых биомаркеров в плазме крови в группах условно здоровых добровольцев и пациентов с терминальной стадией ХБП; **** - статистически значимо при $p < 0,0001$ (критерий Манна-Уитни)

В результате было установлено статистически значимое ($p < 0,001$) увеличение содержания FGF21, GDF15 и CXCL9 в группе пациентов с ТХПН по сравнению с контролем. Уровень митокина GDF15 увеличился в 3,5 раза в группе ТХПН, уровень цитокина CXCL9 в 3,8 раза. Наибольшие различия между группами показаны для FGF21 (увеличение в 7 раз в группе ТХПН).

Исходя из литературных данных, FGF21, главным образом, секретируется печенью в ответ на травму, системное воспаление, такое как сепсис, рак и дисфункция почек. Повышение уровня FGF21 у больных с ХБП можно

рассматривать как часть защитного механизма для защиты тканей от повреждений (Прощай Г.А., Ворохобина, 2018). Так как GDF15 является митокином, то есть секретируется в ответ на митохондриальные и воспалительные стрессоры, повышение его уровня в плазме крови у пациентов с ХБП можно объяснить тем, что эти пациенты подвержены окислительному стрессу и системному вялотекущему воспалению.

Также обращает на себя большой разброс данных в показателях группы пациентов с ТХПН. При этом не было выявлено корреляции между концентрацией этих показателей и стажем гемодиализной терапии.

На основе ранее разработанной регрессионной модели биологического возраста по 3 биомаркерам крови (Age-Estimation Clock) было показано, что группа пациентов с ТХПН значительно увеличила возрастную акселерацию, в среднем до 75 лет (рис. 29).

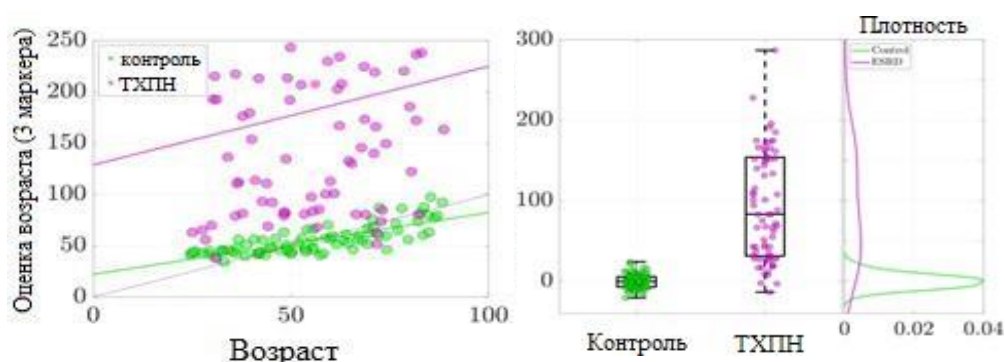


Рис. 29. Часы оценки возраста (Age-Estimation Clock) в контрольной группе и группе пациентов с ТХПН

Поскольку хроническая почечная недостаточность - этиологически неоднородное заболевание, вся когорта пациентов с ТХПН была разделена на две группы: с воспалительной причиной заболевания и с генетической этиологией. В группу с воспалительной причиной заболевания вошли пациенты с ТХПН на фоне хронического пиелонефрита, гломерулонефрита, диабетической нефропатии. В группу пациентов с генетической этиологией заболевания вошли пациенты ТХПН на фоне поликистоза почек, а также с гипоплазией и дисплазией почек.

Разделение группы пациентов в зависимости от причины заболевания не

выявило статистически значимых различий в концентрации биомаркеров (GDF15, FGF21 и CXCL9), а также в биологическом возрасте (рис. 30).

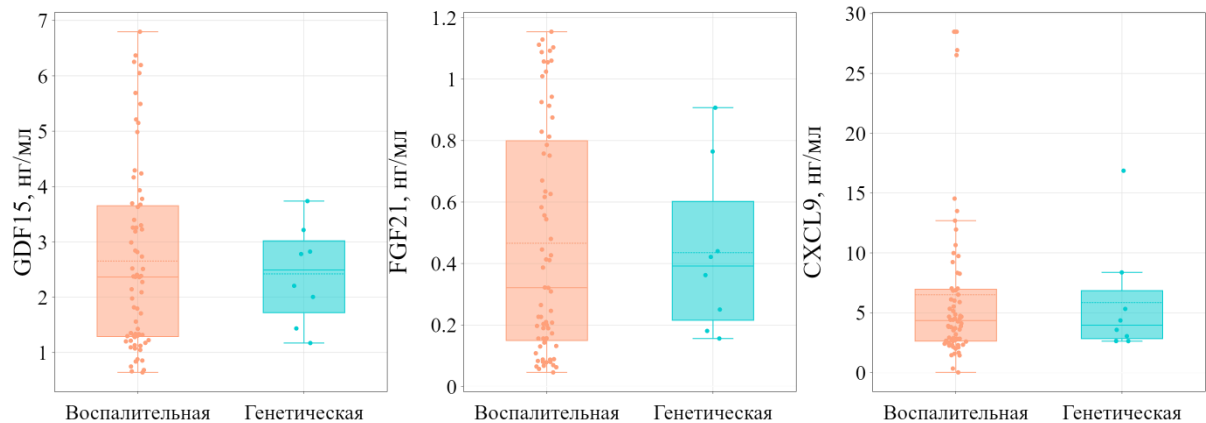


Рис. 30. Результаты определения количественного содержания GDF15, FGF21, CXCL9 в плазме крови в группах пациентов с ТХПН с различной этиологией заболевания

Поскольку концентрация всех изученных биомаркеров также не коррелировала с длительностью заболевания, вероятно в прогрессировании данной патологии задействованы более сложные индивидуальные механизмы гомеостатической регуляции.

При этом между группами пациентов с различной этиологией заболевания были продемонстрированы значительные различия при оценке возрастной акселерации по моделям DNAmAgeHannum и DNAmGrimAge (таб. 9).

Таблица 9

Различия в ускорении возраста по основным типам возрастов между двумя группами пациентов с ТХПН: с генетическими и воспалительными причинами заболевания

Возрастная акселерация	Генетическая (среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего)	Воспалительная (среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего)
------------------------	--	--

DNAmAgeAcc	$1,12 \pm 2,18$	$1,9 \pm 0,56$
DNAmAgeHannumAcc	$-2,17 \pm 1,6$	$1,32 \pm 0,48^*$
DNAmGrimAgeAcc	$-1,56 \pm 0,95$	$3,11 \pm 0,5^*$
DNAmPhenoAgeAcc	$0,69 \pm 4,1$	$6,98 \pm 0,84$
PhenotypicalAgeAcc	$26,6 \pm 6,3$	$30,59 \pm 1,65$

Разница между группами с «генетической» и «воспалительной» причиной заболевания составила 3,5 и 4,7 года соответственно.

3.9. Исследование уровня биомаркеров в зависимости от исхода заболевания

На следующем этапе исследования проанализировали пациентов с точки зрения выживаемости в течение года. Всего умерло 15,1 % от общего количество исследуемых субъектов с ТХПН. Основной причиной смертности явились нарушения реологии крови, в том числе как осложнения после перенесенной коронавирусной инфекции (COVID-19).

Разделение группы пациентов по исходу заболевания (живые/умершие) показало достоверно значимое ($p < 0,05$) увеличение содержания FGF21 в группе ТХПН с неблагоприятным годичным прогнозом выживаемости (рис. 31.)

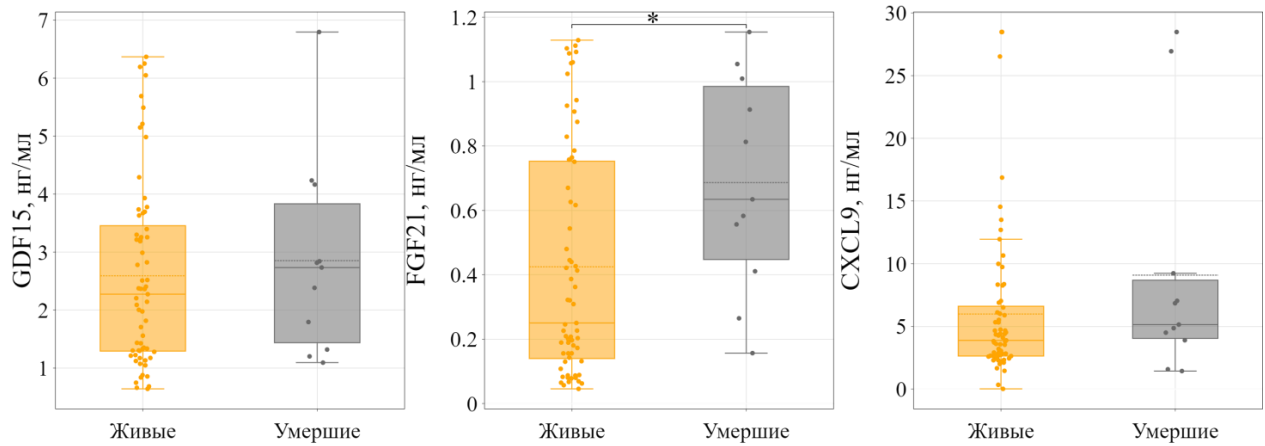


Рис. 31. Результаты определения количественного содержания исследуемых биомаркеров в плазме крови в группах пациентов с терминальной стадией ХБП с различным исходом заболевания; * - статистически значимо при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

Полученные данные об увеличении FGF21 у лиц с неблагоприятным прогнозом выживаемости в группе ESRD могут свидетельствовать о необходимости дополнительных исследований роли этого ростового фактора в развитии патологических реакций при хронической почечной недостаточности и выявлении прогностического значения этого биомаркера в других группах риска.

Несмотря на свою прогностическую ценность при ТХПН, концентрация FGF21 не коррелирует с эпигенетическим или фенотипическим возрастом, а также не связана с возрастной акселерацией. Значительных различий в темпах возрастного ускорения между группами с разными исходами заболевания выявлено не было (рис. 32).

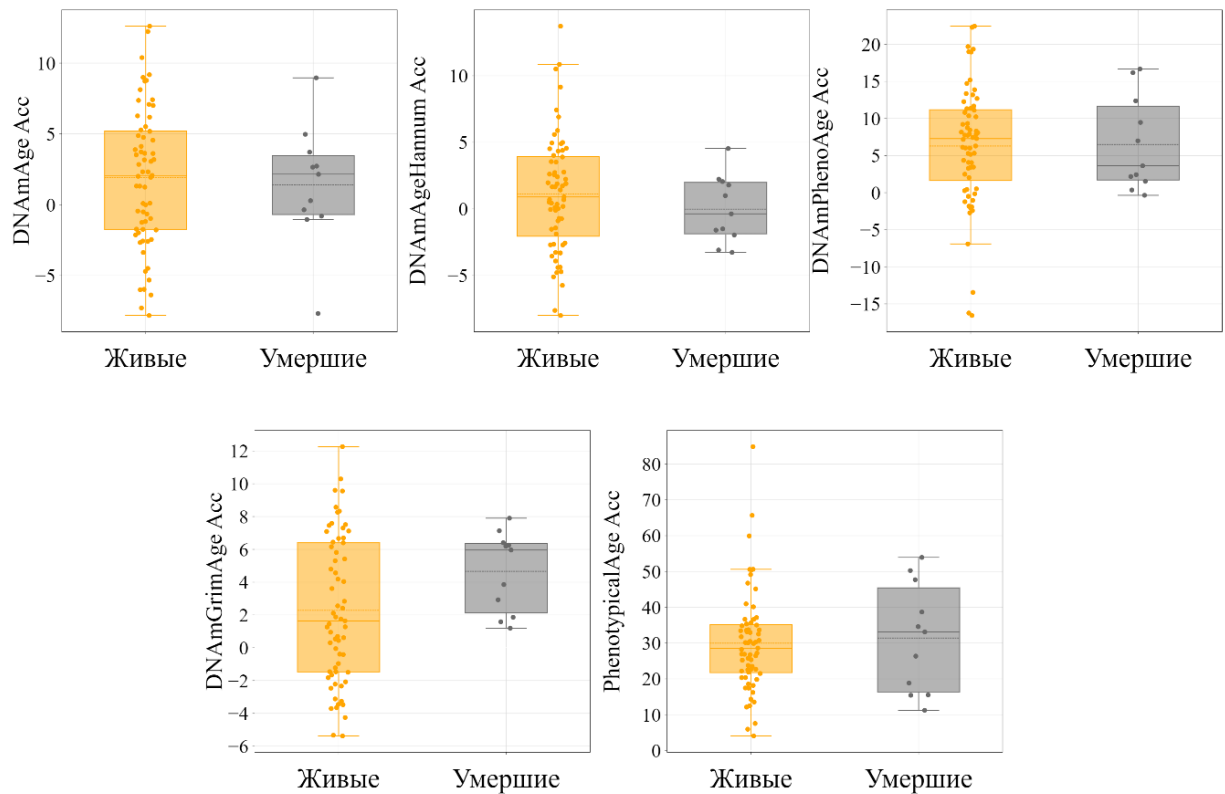


Рис. 32. Различия в возрастном ускорении по основным определяемым возрастам между двумя группами пациентов с ХБП в зависимости от исхода заболевания

При анализе годового прогноза выживаемости у умерших пациентов было обнаружено значительное увеличение возраста и возрастное ускорение по разработанным на основе 3 биомаркеров часам оценки возраста (рис.33).

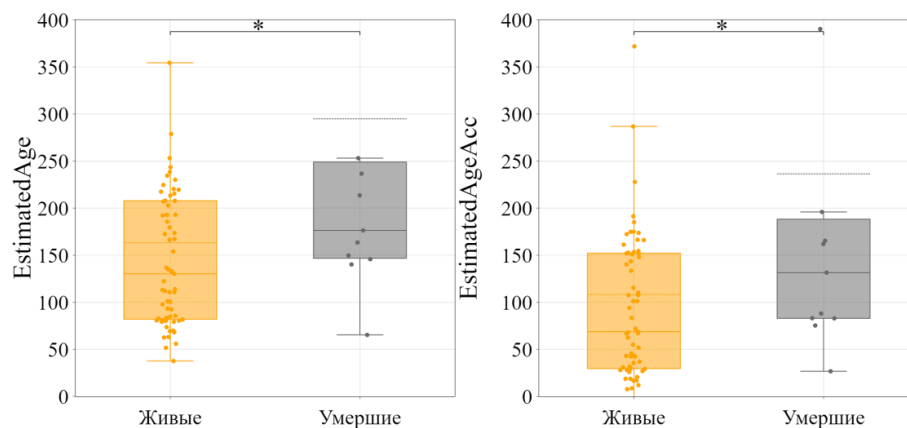


Рис. 33. Часы оценки возраста в группе живых и умерших пациентов; *- статистически значимо при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

Полученные результаты увеличения возраста по данной модели в группе умерших пациентов по сравнению с группой лиц, продолжающих лечение, открывают возможность дальнейшего улучшения прогностической ценности модели и идентификации групп риска.

3.10. Выявление иммунологических маркеров ускоренного старения при терминальной стадии хронической почечной недостаточности

Терминальная стадия хронической почечной недостаточности характеризуется стойким и неконтролируемым системным воспалением, которое не проходит даже после полного склероза почек. Следовательно, данный процесс требует рассмотрения маркеров, связанных с воспалением, и выявления тех из них, которые потенциально были бы более чувствительны к заболеванию с точки зрения выраженного ускорения возраста.

В результате проведенных исследований выявлено 18 показателей (рис. 34), достоверно различающихся между группой пациентов с ТХПН и контролем.

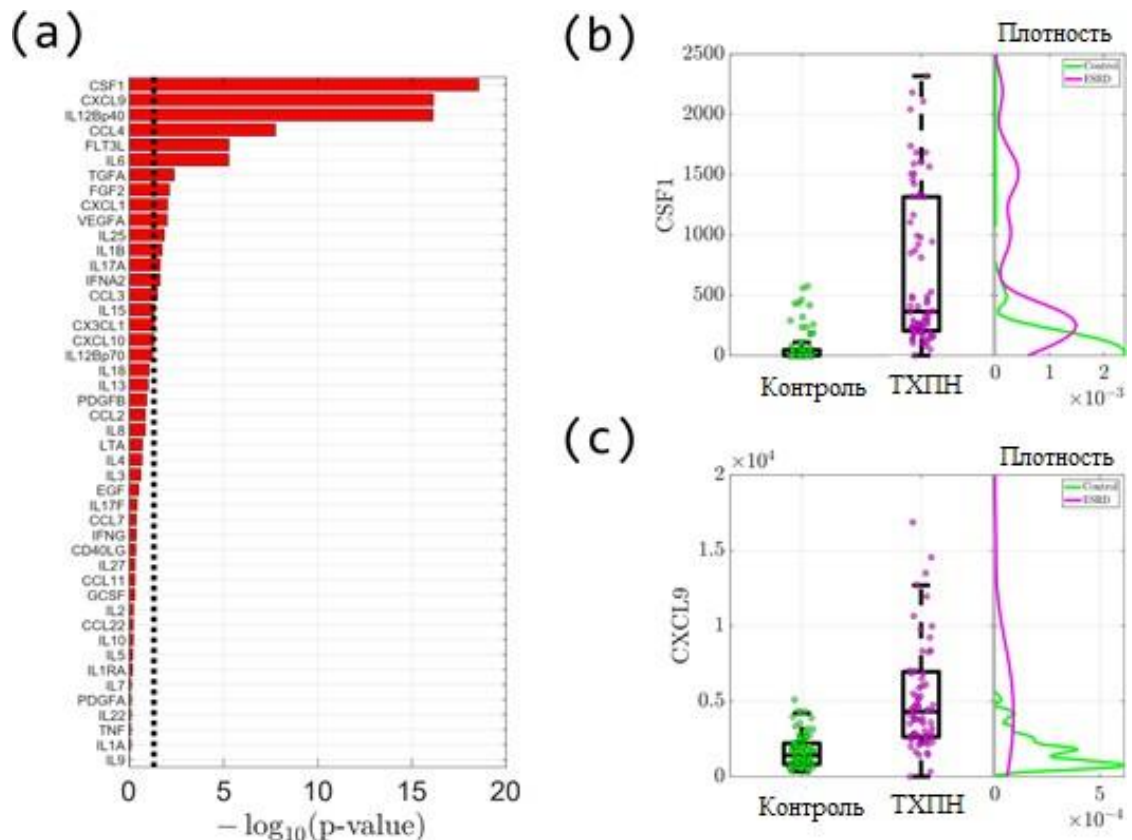


Рис. 34. Иммунологические маркеры, ассоциированные с ТХПН (а) значение p -value критерия Манна – Уитни, которое определяет достоверную разницу значений биомаркеров между группами. Пунктирная линия соответствует значению $p=0,05$. (b), (c) – распределение биомаркеров с наибольшей ассоциацией с ТХПН CSF1 и CXCL9

Наиболее сильная связь с заболеванием показана для таких маркеров как CSF1, CXCL9 и IL12Br40, на рисунке 18 продемонстрированы примеры неоднородности распределения первых двух биомаркеров в контрольной группе и группе пациентов с ТХПН.

Важным является факт идентификации показателей, которые долгое время не считались основными маркерами воспаления. В частности, хемокин CXCL9 (MIG), который, как известно, играет роль в индукции хемотаксиса, способствует дифференцировке и пролиферации лейкоцитов и, как член семейства IFN- γ -зависимых цитокинов, способствует развитию Th1-опосредованных провоспалительных реакций. Однако в последнее время появляются доказательства его ключевой роли в развитии возрастных заболеваний, таких как сердечно-сосудистые патологии, нейродегенерация, глаукома и снижение

противоопухолевого иммунитета. Несмотря на то, что молекулярные и клеточные механизмы действия этого хемокина широко известны, его роль в воспалении требует дальнейшего изучения.

Цитокин CSF1 (колониестимулирующий фактор макрофагов) представляет собой гемопоэтический фактор роста, который участвует в пролиферации, дифференцировке и выживании моноцитов, макрофагов и клеток-предшественников костного мозга. Известно, что концентрация CSF1 увеличивается во время старения и ряда связанных с возрастом заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, катаракта и сердечно-сосудистые заболевания.

Другие биомаркеры (IL12Bp40, FGF2, FLT3L), выявленные в результате исследования, были связаны только с воспалительными процессами, но не со старением. Отмечается, что только один из классических маркеров уремического воспаления, а именно IL6, коррелирует в исследовании с возрастным ускорением у людей с ТХПН. Терминальная стадия ХБП имеет ряд особенностей, поскольку процедура гемодиализа, направленная на детоксикацию и поддержание гомеостаза организма, является стрессовой: она вызывает динамические изменения низкомолекулярных продуктов метаболизма, большинство из которых токсичны для человеческого организма.

На основе ранее разработанной модели определения биологического возраста ipAGE, было обнаружено статистически значимое возрастное ускорение в группе пациентов с ТХПН по сравнению с контролем (рис. 35). Кроме того, важно отметить, что группа субъектов с ТХПН также показала большую дисперсию ipAGE по сравнению с контрольной группой.

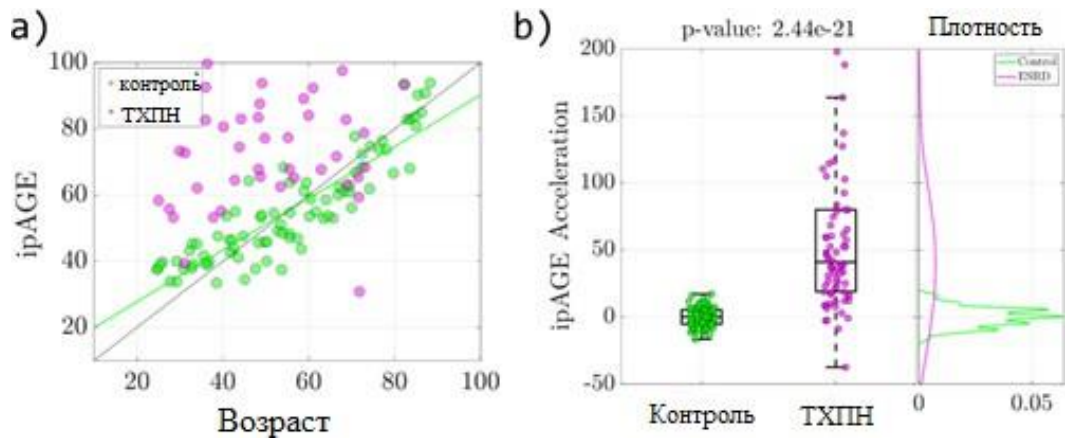


Рис. 35. (a) Связь между ipAGE и хронологическим возрастом; (b) ускорение ipAGE у контрольной группы и субъектов с ТХПН

Таким образом, для группы пациентов с терминальной стадией хронической почечной недостаточности показана возрастная акселерация на фоне хронического воспаления и смещения биохимических маркеров нарушения гомеостаза. Перечисленные выше факторы вовлечены в формирование фенотипа ускоренного старения, характерного для пациентов с терминальной стадией хронической почечной недостаточности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено комплексное исследование физиологических маркеров, ассоциированных с возраст-зависимыми изменениями в организме человека. Полученные результаты позволили создать новые модели определения биологического возраста человека.

Для определения биологического (фенотипического) возраста была верифицирована модель PhenoAge (Levine et al., 2018) и установлена достоверная связь между фенотипическим и хронологическим возрастом в исследуемой группе добровольцев. Поскольку модель показала высоко воспроизводимые результаты в рамках данного исследования, она может применяться для определения биологического возраста на популяции жителей Центрального региона РФ (Нижегородская область). Разделение группы по гендерному признаку показало достоверное увеличение возрастной акселерации у мужчин относительно женщин. Полученные результаты соотносятся с общепопуляционными данными относительно неравной продолжительности жизни мужчин и женщин для жителей Российской Федерации.

Для определения эпигенетического возраста был проведен полногеномный анализ метилирования генома. Рассчитывали значение эпигенетического возраста и возрастной акселерации по 4 моделям: DNAmAgeHannum, DNAmAge, DNAmPhenoAge, DNAmGrimAge. Выявлено достоверно значимое увеличение возрастной акселерации эпигенетического возраста по модели DNAmGrimAge в группе мужчин относительно женщин. В ряде исследований показано преимущество данной модели по сравнению с другими в точности расчета возрастной акселерации.

При выявлении частоты хромосомных aberrаций, которые являются одним из маркеров геномной нестабильности, было выявлено, что в группе долгожителей по сравнению с контрольной группой достоверно выше общее количество aberrаций, а также количество парных фрагментов. При этом в группе долгожителей отмечается снижение частоты делеций с возрастом по сравнению с контрольной группой, но фенотипический возраст не коррелирует с частотой

аббераций. Данные относительно уменьшения частоты делеций в группе долгожителей по сравнению с контрольной группой, дают возможность предположить наличие особенностей функционирования репарационных систем у долгожителей, которые могут обеспечивать определенную геномную стабильность относительно других групп.

Определено влияние однонуклеотидных полиморфизмов на показатели, ассоциированные с факторами риска развития патологий сердца. Анализируя частоту распределения аллелей и генотипов в 3 группах: долгожителей, потомков долгожителей и условно здоровых добровольцев было выявлено, что встречаемость аллеля дикого типа полиморфизма rs5742904 гена ApoB составила 100% в исследуемых группах долгожителей и потомков долгожителей. При изучении влияния однонуклеотидных полиморфизмов в исследуемых генах на изменение функционального состояния стенки сосудов, показано, что носительство гетерозиготного варианта полиморфизмов в генах COL1A1 (rs1107946) и MMP9 (rs17576) ассоциировано с благоприятным прогнозом в отношении основных маркеров сердечно-сосудистых заболеваний. Также показано отрицательное значение акселерации биологического возраста среди гетерозиготных носителей аллеля полиморфизма rs17576 гена MMP9, что также подтверждает благоприятное влияние гетерозиготного носительства аллеля по сравнению с гомозиготными вариантами. Можно предположить, что наличие данного варианта генотипа может быть ассоциировано с более поздней манифестацией возраст-зависимых заболеваний, в частности, сердечно-сосудистых патологий.

Для выявления биомаркеров, ассоциированных со старением, изучали цитокиновый профиль, включающий провоспалительные и противовоспалительные маркеры, а также ряд белков, для которых показана корреляция с различными геронтологическими синдромами. В результате изучения иммунологического профиля было выявлено 6 показателей, для которых показана взаимосвязь, как с хронологическим возрастом, так и с моделями определения фенотипического и эпигенетического возраста в контрольной группе

добровольцев. Гендерных различий в иммунологических показателях, связанных с различными типами определения биологического возраста выявлено не было. Однако показано достоверно значимое различие в содержании белка FGF23 между мужчинами и женщинами.

На основе проведенных исследований была разработана модель ipAGE (Yusipov, Kondakova et al., 2022), которая предсказывает возраст на основе оцененного ранее иммунологического профиля и Age-Estimation Clock, основанная на концентрации в крови трех биомаркеров. При этом разработанные часы по своей точности могут конкурировать с эпигенетическими часами.

Для выявления психофизиологических показателей, связанных с возрастом, проводили исследование когнитивного статуса с использованием 3 когнитивных тестов. Поскольку траектория снижения когнитивных способностей с возрастом широко варьирует от одного человека к другому, было исследовано разнообразие психофизиологических реакций, путем оценки различия индивидуальных когнитивных способностей среди когорты одного возраста. В результате была создана модель определения когнитивного возраста человека (когнитивные часы). При исследовании взаимосвязи между эпигенетическими, фенотипическими и когнитивными часами была показана высокая корреляция ($r > 0,75$) всех моделей определения биологического возраста с хронологическим возрастом.

С использованием нескольких моделей определения биологического возраста, включая эпигенетические часы, было показано, что терминальная стадия хронической почечной недостаточности ассоциирована с возрастной акселерацией, что может рассматриваться как не благоприятный прогностический признак развития сопутствующих заболеваний и ранней смертности. Также было обнаружено статистически значимое возрастное ускорение в группе пациентов с ТХПН по сравнению с контролем на основе ранее разработанной модели определения биологического возраста ipAGE.

При анализе пациентов с точки зрения выживаемости в течение года, было выявлено достоверно значимое увеличение содержания FGF21 в группе ТХПН с

неблагоприятным годичным прогнозом выживаемости. Также у умерших пациентов было обнаружено значительное увеличение возраста и возрастное ускорение по разработанным на основе 3 биомаркеров часам оценки возраста. Таким образом для группы пациентов с терминальной стадией хронической почечной недостаточности показана возрастная акселерация на фоне хронического воспаления и смещения биохимических маркеров нарушения гомеостаза.

Комплекс проведенных исследований доказал, что для адекватной оценки возраст - зависимых изменений организма человека можно применять определение биологического возраста с использованием биохимических параметров крови, доступных эпигенетических моделей, а также модели, основанной на иммунологических показателях крови и психофизиологических реакциях организма человека.

ВЫВОДЫ

1. Выявлено достоверно значимое увеличение возрастной акселерации фенотипического и эпигенетического возраста (модель DNAmGrimAge) в группе мужчин ($2,2 \pm 0,7$ лет) относительно женщин ($-2,0 \pm 0,4$ года).
2. Обнаружены генетические особенности в группе долгожителей: частота делеций хромосом увеличивается с возрастом, однако в группе долгожителей обнаружена отрицательная корреляционная связь между частотой делеций и хронологическим возрастом. Общая частота aberrаций и парных разрывов в группе долгожителей выше, чем в контрольной группе. Полиморфизм R3500Q гена ApoB (аполипопротеина В) отсутствует в группах долгожителей и потомков долгожителей.
3. Носители гетерозиготного варианта полиморфизмов COL1A1 и MMP9 ассоциированы с благоприятным прогнозом для функционирования сердечно-сосудистой системы. Выявлено отрицательное значение акселерации биологического возраста в модели PhenoAge среди гетерозиготных носителей аллеля полиморфизма MMP9.
4. Показано достоверно значимое ($p < 0,05$) увеличение содержания митокинов и цитокинов (FGF21, GDF15 и CXCL9), ассоциированных с возрастной акселерацией в плазме крови пациентов с терминальной стадией хронической почечной недостаточности. Установлена возрастная акселерация по основным типам определения биологического возраста у пациентов с терминальной стадией хронической почечной недостаточности по сравнению с условно здоровыми добровольцами. Неблагоприятный годичный прогноз выживаемости связан с достоверным ($p < 0,05$) увеличением содержания FGF21 в группе пациентов с терминальной стадией хронической почечной недостаточности.
5. Психофизиологическая модель комплексных маркеров старения организма человека включает 24 показателя сенсомоторной активности и цветоразличения.

6. Персонализация детектирования возраст-зависимых изменений обеспечивается благодаря интеграции выявленных физиологических параметров (биохимических, иммунологических, эпигенетических и психофизиологических).

Список сокращений

АФК – активная форма кислорода

ВВ – внеклеточные везикулы

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

МКБ – международная классификация болезней

ПТГ – паратиреоидный гормон

СКФ – скорость клубочковой фильтрации

ССЗ – сердечно сосудистые заболевания

ТХПН – терминальная стадия хронической почечной недостаточности

ХБП – хроническая болезнь почек

FGF21 – фактор роста фибробластов 21

FGF23 – фактор роста фибробластов 23

GDF15 – ростовой фактор дифференциации 15

LYM – относительное содержание лимфоцитов

MCV – средний объём эритроцита

RDW-CV – относительная ширина распределения эритроцитов по объёму

SASP – секреторный фенотип, связанный со старением

WBC – лейкоциты, белые кровяные тельца

PhenoAge, PhenotypicalAge – модель определения фенотипического возраста (Levine et al., 2018)

DNAmAge – модель определения эпигенетического возраста (Horvath, 2013)

DNAm PhenoAge – модель определения эпигенетического возраста (Levine et al., 2018)

DNAmAgeHannum – модель определения эпигенетического возраста (Hannum et al., 2013)

DNAmGrimAge – модель определения эпигенетического возраста (Lu et al., 2019)

DNAmAgeAcc – акселерация эпигенетического возраста, рассчитанная по модели DNAmAge

DNAmAgeHannumAcc – акселерация эпигенетического возраста, рассчитанная по модели DNAmAgeHannum

DNAmGrimAgeAcc – акселерация эпигенетического возраста, рассчитанная по модели DNAmGrimAge

DNAmPhenoAgeAcc – акселерация эпигенетического возраста, рассчитанная по модели DNAmPhenoAge

PhenotypicalAgeAcc – акселерация эпигенетического возраста, рассчитанная по модели PhenotypicalAge

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Аркова О.В. Изучение потенциально функционально значимых полиморфизмов ТАТА–боксов промоторов генов липидного метаболизма человека: Автореф. дисс. ... канд./докт.биол.наук. Новосибирск, 2017. 16 с.
2. Заугольная И.Н. Анализ наследственной патологии в популяциях взрослого и детского населения г. Комсомольска–на–Амуре // Экология и безопасность жизнедеятельности. 2010. № 1. С. 34–43.
3. Иноземцева А.А., Усольцева Е.Н. Роль однонуклеотидных полиморфизмов липидных нарушений в прогнозировании развития и оценке тяжести течения инфаркта миокарда // Комплексные проблемы сердечно–сосудистых заболеваний. 2015. №1. С. 51–60.
4. Москаленко М.И., Пономаренко И.В., Полоников А.В. и др. Полиморфный локус rs652438 гена MMP12 ассоциирован с развитием артериальной гипертензии у женщин // Артериальная гипертензия. 2019. Т. 25, №1. С. 60–65.
5. Новиков П.В. ДНК–тестирование: моногенные и мультифакториальные болезни // Русский медицинский журнал. 2011. №12. С. 794–800.
6. Прощай Г.А., Ворохобина Н.В., Загарских Е.Ю., Парцерняк С.А., Парцерняк А.С. Фактор роста фибробластов 21 и его влияние на метаболические процессы в организме человека // Вестник Санкт-Петербургского университета медицина Т. 13. Вып. 1. 2018.
7. Aboyans V. Measurement and Interpretation of the Ankle Brachial Index A Scientific Statement From the American Heart Association // Circulation. 2012. V. 126. P. 2890–2909
8. Ahadi S., Zhou W., Rose S.M.S.-F., Sailani M.R., Contrepois K., Avina M. et al. Personal aging markers and ageotypes revealed by deep longitudinal profiling // Nat. Med. 2020. V. 26. P.83–90.

9. Aicher A. The essential role of endothelial nitric oxide synthase for the mobilization of stem and progenitor cells // *Nat. Med.* 2003. №9. P. 1370–1376.
10. Altara R., Gu Y.M., Struijker-Boudier H.A., Thijs L., Staessen J.A., Blankesteijn W.M. Left Ventricular Dysfunction and CXCR3 Ligands in Hypertension: From Animal Experiments to a Population-Based Pilot Study // *PLoS One*. 2015. P. 10:e0141394.
11. Arnold A.P., Cassis L.A., Eghbali M., Reue K., Sandberg K. Sex hormones and sex chromosomes cause sex differences in the development of cardiovascular diseases // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017. V. 37, P. 746-756
12. Asahara T., Murohara T., Sullivan A., et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis // *Science* 1997. №275. P. 964-967.
13. Ashapkin V.V., Kutueva L.I., Kurchashova S.Y., Kireev I.I. Are There Common Mechanisms Between the Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome and Natural Aging? // *Front Genet.* 2019. V. 10. P. 455.
14. Assadi A, Zahabi A, Hart RA. GDF15, an update of the physiological and pathological roles it plays: a review // *Pflugers Arch.* 2020. V. 472. P. 1535-1546.
15. Austad S.N. Why women live longer than men: sex differences in longevity // *Gend Med.* 2006. V. 3, № 2. P. 79-92.
16. Babitt J.L., Lin H.Y. Mechanisms of anemia in CKD // *J Am Soc Nephrol.* 2012. V. 23, № .10. P.1631-1634.
17. Bacalini M.G., Gentilini D., Boattini A., Giampieri E., Pirazzini C., Giuliani C et al. Identification of a DNA methylation signature in blood cells from persons with Down Syndrome // *Aging (Albany NY).* 2015. V. 7, №2. P. 82–96.
18. Balci M., Kirkpantur A., Gulbay M., et al. Plasmafibroblast growth factor-23 levels are independently associated with carotid artery atherosclerosis in maintenance hemodialysis patients // *Hemodial. Int.* 2010. №14. P. 425-432.

19. Baragetti A., Palmen J., Garlaschelli K. Telomere shortening over 6 years is associated with increased subclinical carotid vascular damage and cardiovascular prognosis in the general population // J. Intern. Med. 2015. № 277. C.478-487.
20. Bergsma T., Rogaeva E. DNA Methylation Clocks and Their Predictive Capacity for Aging Phenotypes and Healthspan // Neurosci Insights. 2020. V. 15. P. 2633105520942221.
21. Bikbov B., Purcell C.A., Levey A.S., Smith M., Abdoli A. et al. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 // The Lancet. 2020. V. 395. P. 709-733.
22. Blazer D.G., 2017. Cognitive Aging: What We Fear and What We Know. Perspect Biol Med 60, 569-582.
23. Brietzke E., Cerqueira R.O., Soares C.N., Kapczinski F. Is bipolar disorder associated with premature aging? // Trends Psychiatry Psychother. 2019. V. 41. P. 315–317.
24. Butler M.G. Comparison of chromosome telomere integrity in multiple tissues from subjects at different ages // Cancer Genet. Cytogenet. 1998. № 105. C.138–144.
25. Carrero J.J, Stenvinkel P., Fellström B., et al. Telomere attrition is associated with inflammation, low fetuin-A levels and high mortality in prevalent haemodialysis patients // J Intern Med. 2008. № 263 C. 302-312.
26. Chen J.Z. Effect of homocysteine on the number and activity of peripheral blood endothelial progenitor cells // Cardiol. 2004. № 36. C. 233–239.
27. Cheng C.J., Nelson J.F. Physiological basis for sex-specific differences in longevity// Current Opinion in Physiology. 2018. V. 6. P. 57-64.
28. Christiansen L, Lenart A, Tan Q, Vaupel JW, Aviv A, McGue M, Christensen K. DNA methylation age is associated with mortality in a longitudinal Danish twin study // Aging Cell. 2016. V. 15. P.149-154.
29. Conte M, Martucci M, Mosconi G, Chiariello A, Cappuccilli M, Totti V,

Santoro A, Franceschi C, Salvioli S. GDF15 Plasma Level Is Inversely Associated With Level of Physical Activity and Correlates With Markers of Inflammation and Muscle Weakness // *Front Immunol*. 2020. P. 11:915.

30. Crimmins E.M. Recent trends and increasing differences in life expectancy present opportunities for multidisciplinary research on aging // *Nat. Aging*. 2021. V.1. P.12–13.

31. Csiszar A., Toth J., Peti-Peterdi J. et al. The aging kidney: role of endothelial oxidative stress and inflammation // *Acta Physiol. Hung*. 2007. № 94. C.107- 115.

32. De Toda I.M., Maté I., Vida C., Cruces J., De La Fuente M. Immune function parameters as markers of biological age and predictors of longevity // *Aging (Albany NY)*. 2016. V. 8, №11. P. 3110-3119.

33. Deng Y., Chang S. Role of telomeres and telomerase in genomic instability, senescence and cancer // *Lab. Invest*. 2007. № 87. C. 1071-1076.

34. Di Giuseppe R., Kühn T., Hirche F. et al. Potential predictors of plasma fibroblast growth factor 23 concentrations: crosssectional analysis in the EPIC-Germany study // *PLoS One*. 2015. № 10.7. P. 133-159.

35. DNA Methylation Age Calculator. <https://dnamage.genetics.ucla.edu/home>

36. Durso D.F., Bacalini M.G., Sala C., Pirazzini C., Marasco E., Bonafé M. et al. Acceleration of leukocytes' epigenetic age as an early tumor and sex-specific marker of breast and colorectal cancer // *Oncotarget*. 2017. V. 8, №. 14. P. 23237–23245.

37. Ebert T., Pawelzik S.C., Witasz A. et al. Inflammation and Premature Ageing in Chronic Kidney Disease // *Toxins (Basel)*. 2020. V.12, № 4: P.227.

38. Fawzy, M.S., Toraih, E.A., Aly, N.M. et al. Atherosclerotic and thrombotic genetic and environmental determinants in Egyptian coronary artery disease patients: a pilot study // *BMC Cardiovasc Disord*. 2017. V. 17, №26.

39. Fernández–Higuero JA., Etxebarria A., Benito–Vicente A. et al. Structural analysis of APOB variants, p.(Arg3527Gln), p.(Arg1164Thr) and p.(Gln4494del), causing Familial Hypercholesterolaemia provides novel insights into variant

pathogenicity// Scientific reports. 2015.

40. Figuer A, Bodega G, Tato P, et al. Premature Aging in Chronic Kidney Disease: The Outcome of Persistent Inflammation beyond the Bounds // *Int J Environ Res Public Health*. 2021. V.18, №15. P. 8044.

41. Fischer K.E., Riddle N.C. Sex differences in aging: genomic instability//*J Gerontol Ser A*. 2017. P.1-9

42. Fjell, A.M., Walhovd, K.B., 2010. Structural brain changes in aging: courses, causes and cognitive consequences // *Rev Neurosci* 21. P. 187-221.

43. Foreman K.J., Marquez N., Dolgert A., Fukutaki K., Fullman N. et al. Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories // *Lancet*. 2018. V. 10, № 392. P. 2052-2090.

44. Fraga M.F., Ballestar E., Paz M.F., Ropero S., Setien F., Ballestar M.L. et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005. V. 102, № 30. P.10604–10609.

45. Franceschi C., Garagnani P., Morsiani C., Conte M., Santoro A. et al. The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates // *Front Med (Lausanne)*. 2018. V.5. P. 61.

46. Frey, R., Mata, R., Hertwig, R., 2015. The role of cognitive abilities in decisions from experience: Age differences emerge as a function of choice set size // *Cognition*. V. 142. P 60-80.

47. Fuellen G, Jansen L, Cohen AA, Luyten W, Gogol M, Simm A, Saul N. et al. Health and Aging: Unifying Concepts, Scores, Biomarkers and Pathways // *Aging Dis*. 2019. V. 10. P. 883-900.

48. Gadecka A., Bielak-Zmijewska A. Slowing Down Ageing: The Role of Nutrients and Microbiota in Modulation of the Epigenome // *Nutrients*. 2019. P. 11. P. 1251.

49. Garagnani P., Bacalini M.G., Pirazzini C., Gori D., Giuliani C., Mari D. et al. Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age // *Aging Cell*. 2012. V. 11, № 6. P.1132–1134.

50. Gensous N, Bacalini MG, Franceschi C, Garagnani P. 2020. Down syndrome, accelerated aging and immunosenescence // *Semin Immunopathol.* V. 42. P. 635-645.
51. Gentilini D., Garagnani P., Pisoni S., Bacalini M.G., Calzari L. et al. Stochastic epigenetic mutations (DNA methylation) increase exponentially in human aging and correlate with X chromosome inactivation skewing in females // *Aging (Albany NY)*. 2015. V. 7, № 8. P.568–578.
52. Gutiérrez M., Tomas J.M., Calatayud P. Contributions of Psychosocial Factors and Physical Activity to Successful Aging // *Span. J. Psychol.* 2018. V. 21. P. 26.
53. Hannum G., Guinney J., Zhao L., Zhang L., Hughes G., Sada S. et al. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates // *Molecular Cell*. 2013. V. 49, № 2. P. 359–67.
54. Hartmann A., Hartmann C., Secci R., Hermann A., Fuellen G., Walter M. Ranking Biomarkers of Aging by Citation Profiling and Effort Scoring // *Front Genet.* 2021. V. 12. P. 686320.
55. Heidari M.M., Khatami M., Hadadzadeh M. et al. Polymorphisms in NOS3, MTHFR, APOB and TNF- α Genes and Risk of Coronary Atherosclerotic Lesions in Iranian Patients // *Research in Cardiovascular Medicine*. 2016. V. 5, №1.
56. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, Hobbs FD. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis // *PLoS One*. 2016. V. 11. P. 158765.
57. Hillary R. F., Stevenson A. J., McCartney D. L., Campbell A., Walker R. M. et al. Epigenetic measures of ageing predict the prevalence and incidence of leading causes of death and disease burden // *Clinical Epigenetics*. 2020. P.12, № 1. P 115.
58. Hindricks J, Ebert T, Bachmann A, Kralisch S, Lossner U, Kratzsch J. et al. Serum levels of fibroblast growth factor-21 are increased in chronic and acute renal dysfunction // *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014. V. 80. P. 918-924.
59. Ho Wei-Min, Yah-Yuan Wu, and Yi-Chun Chen. Genetic Variants behind Cardiovascular Diseases and Dementia // *Genes*. 2020. V.11, № 12. P. 1514.
60. Hoffman J. M., Valencak T. G. Sex differences and aging: Is there a role of

brown adipose tissue? // *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2021. V.531. P. 111310.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111310>.

61. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types // *Genome Biol*. 2015. V. 14. №. 10. P. 16-96.

62. Horvath S., Garagnani P., Bacalini M.G. et al. Accelerated epigenetic aging in Down syndrome // *Aging Cell*. 2015. V. 14, № 3. P. 491-495.

63. Horvath S., Ritz B.R. Increased epigenetic age and granulocyte counts in the blood of Parkinson's disease patients // *Aging (Albany NY)*. 2015. V.7, № 12. P.1130–1142.

64. ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013) International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Shaffer L.G., McGowan-Jordan J., Schmid M. Karger Medical and Scientific Publishers, 2013. Basel: S. Karger, 2009. 140 pp.

65. Jones P.A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond // *Nat Rev Genet*. 2012. V. 13, № 7. P.484–92.

66. Jung S.E., Shin K.J., Lee H.Y. DNA methylation-based age prediction from various tissues and body fluids // *BMB Rep*. 2017. V. 50, № 11. P. 546–553.

67. Jylhävä J., Pedersen N.L., Hägg S. Biological Age Predictors // *EBioMedicine*. 2017. V. 21. P.29-36.

68. Kai Li, Wusheng Li, Xi Dong Association of 677 C>T (rs1801133) and 1298 A>C (rs1801131) Polymorphisms in the MTHFR Gene and Breast Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis Based on 57 Individual Studies// *PLoS One*. 2014. V. 9

69. Karwatsky P., Overbury O., Faubert, J., 2004. Red-green chromatic mechanisms in normal aging and glaucomatous observers // *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 2861-2866.

70. Klein S.L., Flanagan K.L. Sex differences in immune responses // *Nat Rev Immunol*. 2016. V.16. P. 626-638.

71. Klose R.J., Bird A.P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators // *Trends Biochem Sci*. 2006.V. 31, № 2. P. 89–97.

72. Kondakova, E.V., Vershinina, O.S., Lopatenko, M.V., Franceschi, C,

Ivanchenko, M.V., Vedunova, M.V. Sex-Specific Age-Related Changes in Methylation of Certain Genes. *Sovrem Tekhnologii Med.* 2021. V.13, №3. P. 26-31.

73. Kondo Y, Komaba H, Fukagawa M. Endocrine fibroblast growth factors as potential biomarkers for chronic kidney disease // *Expert Review of Molecular Diagnostics.* 2020. V. 20. P. 715-724.

74. Kooman J.P., Kotanko P., Schols A.M., Shiels P.G., Stenvinkel P.. Chronic kidney disease and premature ageing // *Nat Rev Nephrol.* 2014. V. 10, №. 12. P. 732-42.

75. Kubben N., Misteli T. Shared molecular and cellular mechanisms of premature ageing and ageing-associated diseases // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. V. 18. P. 595–609.

76. Kudryashova KS, Burka K, Kulaga AY, Vorobyeva NS, Kennedy BK. 2020. Aging Biomarkers: From Functional Tests to Multi-Omics Approaches // *Proteomics.* V. 20. P. 1900408.

77. Levine M.E., Hosgood H.D., Chen B., Absher D., Assimes T., Horvath S. DNA methylation age of blood predicts future onset of lung cancer in the women's health initiative // *Aging (Albany NY).* 2015. V. 7, №. 9. P. 690–700.

78. Levin A., Tonelli M., Bonventre J., Coresh J., Donner J.A., Fogo A.B., Fox C.S., participants ISNGKHS. Global kidney health 2017 and beyond: a roadmap for closing gaps in care, research, and policy // *Lancet.* 2017. V. 390. P.1888-1917.

79. Levine M.E., Lu A.T., Bennett D.A., Horvath S. Epigenetic age of the pre-frontal cortex is associated with neuritic plaques, amyloid load, and Alzheimer's disease related cognitive functioning // *Aging (Albany NY).* 2015. V. 7, № 12. P. 1198–211.

80. Levine M.E., Lu A.T., Quach A., Chen B.H., Assimes T.L., Horvath S. et al. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan // *Aging (Albany NY).* 2018. P. 10:573-591.

81. Li T., Zhang X., Sang L. et al. The interaction effects between TLR4 and MMP9 gene polymorphisms contribute to aortic aneurysm risk in a Chinese Han population // *BMC cardiovascular disorders.* 2019. V. 19, №72.

82. Liu J., Shen JX., Wu HT. et al. Collagen 1A1 (COL1A1) promotes metastasis of breast cancer and is a potential therapeutic target // *Discovery Medicine.*

2018. Vol. 25, №139. P. 211–223.

83. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging // *Cell*. 2013. V. 153, №. 6. P. 1194-1217.

84. Lowsky D.J., Olshansky S.J., Bhattacharya J., Goldman D.P. Heterogeneity in healthy aging // *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014. V. 69. P. 640-649.

85. Lu A.T., Quach A., Wilson J.G., Reiner A.P., Aviv A., Raj K., Hou L. et al. DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan // *Aging (Albany NY)*. 2019. V. 11. P. 303-327.

86. Lv J.C, Zhang L.X. Prevalence and Disease Burden of Chronic Kidney Disease // *Adv Exp Med Biol*. 2019. V. 1165. P. 3-15.

87. Malmqvist K., Wallen H.N., Held C., et al. Soluble cell adhesion molecules in hypertensive concentric left ventricular hypertrophy // *J. Hypertens*. 2002. № 20. C. 1563–1569.

88. Mara A. McAdams-DeMarco, Hao Ying, et al. Frailty, Inflammatory Markers, and Waitlist Mortality Among Patients with End-Stage Renal Disease in a Prospective Cohort Study // *Transplantation*. 2018 № 102(10) C. 1740–1746.

89. Maral S., Acar M., Balcik O.S. et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 polymorphism in patients with myeloproliferative diseases // *Medicine*. 2015. Vol. 94, №16. P. e732.

90. Masi S., D'Aiuto F., Martin-Ruiz C., et al. Rate of telomere shortening and cardiovascular damage: a longitudinal study in the 1946 British Birth Cohort // *Eur Heart J*. 2014. № 35. C. 3296-3303.

91. McCrory C., Fiorito G., Hernandez B., Polidoro S., O'Halloran A. M. et al. GrimAge outperforms other epigenetic clocks in the prediction of age-related clinical phenotypes and all-cause mortality // *The Journals of Gerontology: Series A*. 2021. V.76, № 5. P.741–749.

92. Mintz G.S., Stone G.W., Weisz G. et al. Coronary Plaque Composition, Morphology, and Outcomes in Patients With and Without Chronic Kidney Disease

Presenting With Acute Coronary Syndromes // JACC Cardiovasc Imaging. 2012. № 5(3). C.53–61.

93. Mirza M.A., Larsson A., Lind L., et al. Circulating fibroblast growth factor-23 is associated with vascular dysfunction in the community // *Atherosclerosis*. 2009. № 205. C. 385-390.

94. Mitnitski A, Rockwood K. Aging as a process of deficit accumulation: its utility and origin // *Interdiscip Top Gerontol*. 2015. V. 40. P. 85-98.

95. Mohammed W.J., Al-Musawi B.M.S., Oberkanins C. et al. Molecular assessment of some cardiovascular genetic risk factors among Iraqi patients with ischemic heart diseases// *International Journal of Health Sciences (Qassim)*. 2018. Vol. 12, №3.

96. Moon J.S., Goeminne L.J.E, Kim J.T., Tian J.W., Kim S.H. et al. Growth differentiation factor 15 protects against the aging-mediated systemic inflammatory response in humans and mice // *Aging Cell*. 2020. V. 19. P.13195.

97. Morris B.J., Willcox B.J., Donlon T.A. Genetic and epigenetic regulation of human aging and longevity // *Biochim. et Biophys. Acta (BBA) Mol. Basis Dis*. 2019. V. 1865. P. 1718–1744.

98. Moskalev A.A., Shaposhnikov M.V., Plyusnina E.N., Zhavoronkov A., Budovsky A., Yanai H., Fraifeld V.E. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria // *Ageing Res. Rev*. 2012.

99. Nagarajan H., Narayanaswamy S., Vetrivel U. Mutational landscape screening of methylene tetrahydrofolate reductase to predict homocystinuria associated variants: An integrative computational approach // *Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2020. P. 819–820

100. Nakanishi N., Shiraishi T., Wada M. Brachial-ankle pulse wave velocity and metabolic syndrome in a Japanese population: the Minoh study // *Hypertens Res*. 2005. № 28. P. 125–131.

101. Ng M., et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and

obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 // *Lancet*. 2014. 384. P. 766-781

102. Nguyen-Tri, D., Overbury, O., Faubert, J., 2003. The role of lenticular senescence in age-related color vision changes // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. V. 44, P. 3698-3704.

103. Omisore OM, Duan W, Du W et al. Automatic tool segmentation and tracking during robotic intravascular catheterization for cardiac interventions // *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*. 2021. Vol. 11, №6. P. 2688-2710.

104. Ong K.L., Januszewski A.S., O'Connell R., Jenkins A.J., Xu A., Sullivan D.R. et al. The relationship of fibroblast growth factor 21 with cardiovascular outcome events in the Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes study // *Diabetologia*. 2015. V. 58. P. 464-473.

105. Pahl M.V., Gollapudi S., Sepassi L. Effect of end-stage renal disease on B-lymphocyte subpopulations, IL-7, BAFF and BAFF receptor expression // *Nephrol Dial Transplant*. 2010. № 25. C. 205-212.

106. Palomino–Morales R., Gonzalez–Juanatey C., Vazquez–Rodriguez TR. et al. A1298C polymorphism in the MTHFR gene predisposes to cardiovascular risk in rheumatoid arthritis// *Arthritis Research & Therapy*. 2010. №12. P. 71.

107. Paulo, Baumgratz de P., H  lady S., Orson W. Fibroblast growth factor 21 in chronic kidney disease // *J Nephrol*. 2019. 32(3). C. 365-377.

108. Polevaya S.A., Eremin E.V., Bulanov N.A., Bakhchina A.V., Kovalchuk A.V., Parin S.B. Event-related telemetry of heart rhythm for personalized remote monitoring of cognitive functions and stress under conditions of everyday activity. *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2019. V. 11, № 1. P. 109–115.

109. Queen T.L., Hess T.M., Ennis G.E., Dowd K., Gr  hn D. Information search and decision making: effects of age and complexity on strategy use // *Psychol Aging*. 2012. V. 27. P. 817-824.

110. Richard D.S., Anne R.C., Stefania B. et al. Plasma Klotho and cardiovascular disease in adults // J. Am. Geriatr. Soc. 2011. № 59. C. 1596–1601.

111. Rizvi S., Raza S.T., Mahdi F. Telomere Length Variations in Aging and Age-Related Diseases // Curr Aging Sci. 2014 № 7(3) C. 155-168.

112. Rodgers J.L., Jones J., Bolleddu S.I., Vanthenapalli S., Rodgers L.E. et al. Cardiovascular Risks Associated with Gender and Aging // J Cardiovasc Dev Dis. 2019. P. 6.

113. Roos M., Lutz J., Salmhofer H. et al. Relation between plasma fibroblast growth factor-23, serum fetuin-A levels and coronary artery calcification evaluated by multislice computed tomography in patients with normal kidney function // Clin. Endocrinol. 2008. № 68. C. 660–665.

114. Rose M.R., Flatt T., Graves J.L. et al. What is Aging? // Front Genet. 2012. V. 3. P.134.

115. Sanderson W.C., Scherbov S. Measuring the Speed of Aging across Population Subgroups // PLoS ONE. 2014. V. 9. P. 96289.

116. Santoro A., Bientinesi E., Monti D. Immunosenescence and inflammaging in the aging process: age-related diseases or longevity? // Ageing Res. Rev. 2021. V. 71. P.101422.

117. Sarnak M.J., Jaber B.L. Mortality due to sepsis in patients with end-stage renal failure compared to the general population // Kidney Int. 2000. № 58. C. 1758–1764.

118. Schroth J., Thiernemann C., Henson S.M. 2020. Senescence and the Aging Immune System as Major Drivers of Chronic Kidney Disease // Front Cell Dev Biol. V. 8. P. 564461.

119. Sela S., Shurtz-Swirski R., Cohen-Mazor M. Primed peripheral polymorphonuclear leukocyte: a culprit underlying chronic low-grade inflammation and systemic oxidative stress in chronic kidney disease // J Am Soc Nephrol 2005. № 16. C. 2431-2438.

120. Shah N.H., Dong C., Elkind M.S. et al. Fibroblast growth factor 23 is associated with carotid plaque presence and area: the Northern Manhattan study // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2015. № 35(9). P. 2048–2053.

121. Shi L., Jiang F., Ouyang F., Zhang J., Wang Z., Shen X. DNA methylation markers in combination with skeletal and dental ages to improve age estimation in children // *Forensic Sci Int Genet.* 2017. V. 33. P. 1–9.

122. Souweine J.S., Kuster N., Chenine L. et al., Physical inactivity and protein energy wasting play independent roles in muscle weakness in maintenance haemodialysis patients // *PLoS One.* 2018. № 13(8).

123. Spagnolo P.A., Manson J.E., Joffe H. Sex and gender differences in health: what the COVID-19 pandemic can teach us // *Ann Intern Me.* 2020. V. 173, № 5. P. 385–386

124. Starnawska A., Tan Q., McGue M., Mors O., Børglum A.D., Christensen, K. et al. Epigenome-Wide Association Study of Cognitive Functioning in Middle-Aged Monozygotic Twins // *Front Aging Neurosci.* 2017. V. 9. P. 413.

125. Stenvinkel P., Larsson T. Chronic Kidney Disease: A Clinical Model of Premature Aging // *Am J Kidney Dis.* 2013. P. 1-13.

126. Stewart J.H., Vajdic C.M., van Leeuwen M.T. et al. The pattern of excess cancer in dialysis and transplantation. // *Nephrol Dial Transplant.* 2009 № 24. P. 3225–3231.

127. Sun S., Wang Y., Wu Y. et al. Identification of COL1A1 as an invasion–related gene in malignant astrocytoma // *International journal of oncology.* 2018. Vol. 53, №6. P. 2542–2554.

128. Teschendorff A. E., West J., Beck S. Age-associated epigenetic drift: implications, and a case of epigenetic thrift? // *Hum Mol Genet.* 2013. V. 22. P.7-15.

129. Tesfaigzi Y., Myers O. B., Stidley C. A. et al. Genotypes in matrix metalloproteinase 9 are a risk factor for COPD // *International journal of chronic obstructive pulmonary disease.* 2006. V. 1, №3. P.267–278.

130. Tnakanishi N., Shiraishi T., Wada M. Brachial-ankle pulse wave velocity and syndrome in a Japanese population: the Minoh study // *Hypertens Res.* 2005. № 28. P. 125–131.

131. Tomiyama H., Matsumoto C., Shiina K., Yamashina A. Brachial-Ankle PWV: Current Status and Future Directions as a Useful Marker in the Management of Cardiovascular Disease and/or Cardiovascular Risk Factors // *Journal of atherosclerosis and thrombosis.* 2015. V. 23, № 2. P. 1–19.

132. Truong P.K., Van Bui C., Lao T.D. et al. Detection of Defective Apolipoprotein B–100 R3500Q Mutation Caused Familial Hypercholesterolemia in Vietnamese Patients // 6th International Conference on the Development of Biomedical Engineering in Vietnam (BME6): IFMBE Proceedings. V. 63. Springer, Singapore, 2018.

133. Vanholder R., Van Biesen W. Incidence of infectious morbidity and mortality in dialysis patients // *Blood Purif.* 2002. № 20. C.477-480.

134. Verkade M.A, van de Wetering J., Klepper M., et al. Peripheral blood dendritic cells and GM-CSF as adjuvant for hepatitis B vaccination in hemodialysis patients // *Kidney Int.* 2004. № 66. P. 614 – 621.

135. von Krause, M., Radev, S. and Voss, A., 2022. Mental speed is high until age 60 as revealed by analysis of over a million participants // *Nature Human Behaviour.*

136. Voskuhl R. Preclinical studies of sex differences: a clinical perspective // *Biol Sex Differ.* 2016, 7. P.7

137. Wagner, H.J., Kröger, R.H., 2005. Adaptive plasticity during the development of colour vision // *Prog Retin Eye Res* 24, 521-536.

138. Wang T., Fu W., Song S. et al. Matrix metalloproteinase–9 gene polymorphisms and their interaction with environment on subarachnoid hemorrhage risk // *Experimental biology and medicine.* 2018. Vol. 243, №9. P. 749–753.

139. Werner N., Kosiol S., Schiegl T., et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes // *N Engl J Med.* 2005. №353. C. 999-1007.

140. West J., Widschwendter M., Teschendorff A.E. Distinctive topology of age-

associated epigenetic drift in the human interactome // Proc Natl Acad Sci USA. 2013. V.110. P. 14138-14143.

141. Wyld M., Webster A.C. Chronic Kidney Disease is a Risk Factor for Stroke // J Stroke Cerebrovasc Dis. 2021. V.30. P.105730.

142. Wolf M., Clay S.M., Zheng S. et al. MMP12 inhibits corneal neovascularization and inflammation through regulation of CCL2 // Scientific reports. 2019. Vol. 9, №11579.

143. Xie T., Leung P.S. Fibroblast growth factor 21: a regulator of metabolic disease and health span // Am J Physiol Endocrinol Metab. 2017. V. 313. P.292-302.

144. Yusipov I., Kondakova E., Kalyakulina A., Krivonosov M., Lobanova N., Bacalini M.G., Franceschi C., Vedunova M., Ivanchenko M. Accelerated epigenetic aging and inflammatory/immunological profile (ipAGE) in patients with chronic kidney disease // Geroscience. 2022. P. 35237926. doi: 10.1007/s11357-022-00540-4.

145. Zarulli V., Kashnitsky I., Vaupel J.W. Death rates at specific life stages mold the sex gap in life expectancy // Proc Natl Acad Sci USA. 2021 V. 18, № 20. P. 2010588118.

146. Zhang L.Q., Liu H., Huang X.F. Relation of JAGGED 1 and collagen type 1 alpha 1 polymorphisms with bone mineral density in Chinese postmenopausal women // International journal of clinical and experimental pathology. 2014. V. 7, №10. P. 7142–7147.

147. Zhang Z., Wang Y., Zhang J. et al. COL1A1 promotes metastasis in colorectal cancer by regulating the WNT/PCP pathway // Molecular medicine reports. 2018. Vol. 17, №4. P. 5037–5042.