

УДК 616.7-009.17-072.85-055.2-053.9
DOI: 10.35693/2500-1388-2021-6-4-19-39

Перспективы оценки биологического и иммунологического возраста человека по факторам крови

Н.Д. Курган¹, Е.И. Панова¹, Л.В. Силакова¹, А.М. Каганский^{1, 2}, С.А. Рыбцов³

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО» (Санкт-Петербург, Россия)

²ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет» (Владивосток, Россия)

³Центр регенеративной медицины Института регенерации и репарации Университета Эдинбурга
(Эдинбург, Великобритания)

Аннотация

По данным ВОЗ, к 2050 году в развитых странах население старше 60 лет удвоится. Это приведет к необходимости дальнейшего повышения пенсионного возраста и увеличению нагрузки на систему здравоохранения. Поэтому остро стоит вопрос сохранения здоровья и продления активного долголетия, а также внедрения раннего мониторинга и профилактики преждевременного старения и возрастных нарушений во избежание ранней нетрудоспособности. В обзоре выделены критические факторы в циркуляции крови, влияющие на процесс старения, и индикаторы, отражающие его. Показана связь биологического возраста, механизмов старения регенеративной и иммунной систем с изменениями в циркулирующих факторах крови. Обсуждаются подходы к гигиене здоровья и долголетия и концепция иммунологического возраста. Рассматриваются возможности традиционных и перспективных методов экспресс-анализа и мультиплексной комплексной оценки старения систем организма для предварительного экспресс-анализа биологического и иммунологического возрастов в домашних условиях или при первичном осмотре с последующей обработкой в высокотехнологичных центрах для определения групп риска и мониторинга здорового старения. Определены подходы по защите здоровья и поддержания здорового старения для продления активного трудоспособного периода жизни.

Ключевые слова: биологический возраст, старение, иммунологический возраст, цитокины, маркеры заболеваний, тест на иммунологический возраст.

Конфликт интересов: не заявлен.

Для цитирования:

Курган Н.Д., Панова Е.И., Силакова Л.В., Каганский А.М., Рыбцов С.А. Перспективы оценки биологического и иммунологического возраста человека по факторам крови. Наука и инновации в медицине. 2021;6(4):19-39.
doi: 10.35693/2500-1388-2021-6-4-19-39

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда №19-18-00058.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Анне Едовиной и Валерии Кашенко за помощь в подготовке иллюстраций к обзору. Авторы выражают свою искреннюю благодарность одному из основных авторов этого обзора Александру Каганскому за его неоценимый вклад в идею и написание статьи и скорбят о его безвременной и трагической кончине.

Сведения об авторах

Курган Н.Д. – инженер по научно-исследовательской работе факультета технологического менеджмента и инноваций.

E-mail: mika97@list.ru

Панова Е.И. – инженер по научно-исследовательской работе факультета технологического менеджмента и инноваций.

E-mail: evgeniyapanova1996@gmail.com

Силакова Л.В. – канд. экон. наук, доцент факультета технологического менеджмента и инноваций.

ORCID: 0000-0003-2836-1281

E-mail: silakovalv@itmo.ru

Каганский А.М. – канд. биол. наук, доцент факультета технологического менеджмента и инноваций; директор центра геномной и регенеративной медицины Школы биомедицины.

ORCID: 0000-0002-6219-6892

E-mail: kagasha@yahoo.com

Рыбцов С.А. – старший научный сотрудник Центра регенеративной медицины, Институт регенерации и репарации.

ORCID: 0000-0001-7786-1878

E-mail: srybtsov@ed.ac.uk

Автор для переписки

Рыбцов Станислав Александрович

Адрес: Центр регенеративной медицины, Институт регенерации и репарации, университет Эдинбурга, Биоквартер, Литл Франц Драйв 5, Эдинбург, Великобритания.

E-mail: srybtsov@ed.ac.uk

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; РНК – рибонуклеиновая кислота; КСБМ – концентрация и состав белков и/или метаболитов; ВД – возрастная динамика; СОД – супероксиддисмутаза; ИФА – иммуноферментный анализ; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ИХА – иммунохроматографический анализ; СКФ – скорость клубочковой фильтрации.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Рукопись получена: 29.07.2021

Рецензия получена: 14.09.2021

Решение о публикации принято: 15.09.2021

Prospects for assessing the biological and immunological age of a person by blood factors

Nikita D. Kurgan¹, Evgeniya I. Panova¹, Lyubov V. Silakova¹, Aleksandr M. Kaganskii^{1,2}, Stanislav A. Rybtsov³

¹ITMO University (St. Petersburg, Russia)

²Far Eastern Federal University (Vladivostok, Russia)

³Center for Regenerative Medicine, Institute of Regeneration and Reparation, University of Edinburgh (Edinburgh, UK)

Abstract

According to the WHO, by 2050 in developed countries, the population over 60 years old will double. This will lead to a further increase in the retirement age and an elevation of burden on the health care system. Therefore, there is an acute issue of maintaining health and prolonging active longevity, as well as the introduction of monitoring for prevention of premature aging and age-related disorders to avoid early disability. The review aims to discuss the aging process and identify critical blood factors affecting or indicating progress in biological aging. The connection of biological age, the regenerative and immune systems aging with the shift in circulating blood factors have been evaluated. The concepts of "health and longevity hygiene" and the concept of "immunological age" are debated. Perspective methods of rapid and multiplex analyzes of blood factors are discussed, as well as the prospects for preliminary analysis of biological and immunological age at home with subsequent processing in high-tech centers to identify risk groups and monitor healthy aging. Approaches to protecting health, slowing aging and rejuvenating the elderly, maintaining healthy aging, and prolonging active life have been defined.

Keywords: biological age, aging, immunological age, cytokines, disease markers, immunological age test.

Conflict of interest: nothing to disclose.

Citation

Kurgan ND, Panova EI, Silakova LV, [Kaganskii AM], Rybtsov SA. **Prospects for assessing the biological and immunological age of a person by blood factors.** *Science and Innovations in Medicine*. 2021;6(4):19-39. doi: 10.35693/2500-1388-20201-6-4-19-39

Study funding. The study was supported by the RSF Foundation, project No. 19-18-00058

Compliance with ethical standards. This article does not describe any studies involving humans or animals as objects.

Acknowledgments. The authors express their gratitude to Anna Edovina and Valeria Kashchenko for their help in preparing illustrations for the review. The authors express their sincere gratitude to one of the main authors of this review Aleksandr Kaganskii for his invaluable contribution to the idea and writing of the article and mourn his untimely and tragic death.

Nikita D. Kurgan – research engineer Faculty of Technological Management and Innovations.

E-mail: mika97@list.ru

Evgeniya I. Panova – research engineer Faculty of Technological Management and Innovations. E-mail: evgeniyapanova1996@gmail.com

Lyubov V. Silakova – PhD in Economics, Associate professor Faculty of Technological Management and Innovations. ORCID: 0000-0003-2836-1281

E-mail: silakovalv@itmo.ru

Aleksandr M. Kaganskii – PhD in Biology, Associate professor, Faculty of Technological Management and Innovations; Director of the Center for genomic and regenerative medicine, School of Biomedicine. ORCID: 0000-0002-6219-6892

E-mail: kagasha@yahoo.com

Stanislav A. Rybtsov – PhD in Genetics, senior research fellow of the Centre for Regenerative Medicine, Institute of Regeneration and Reparation.

ORCID: 0000-0001-7786-1878

E-mail: srybtsov@ed.ac.uk

Corresponding Author

Stanislav A. Rybtsov

Address: Center for Regenerative Medicine, Institute of Regeneration and Reparation, University of Edinburgh, Bioquarter, 5 Little France Drive, Edinburgh, UK.

E-mail: srybtsov@ed.ac.uk

CCL2 – C-C Motif Chemokine Ligand 2 (monocyte chemotactic protein 1 – MCP-1); CCL3 – C-C Motif Chemokine Ligand 3 (macrophage inflammatory protein 1 – MIP-1α); CCL11 – C-C Motif Chemokine Ligand 11; CCL27 – C-C Motif Chemokine Ligand 27; IL27 – Interleukin 27; IL1b – Interleukin 1 Beta; IL6 – Interleukin 6; THBS4 – thrombospondin-4; SPARCL1 – SPARC-like protein 1; NGF – Neural growth factor; TNF – Tumor Necrosis Factor; CRP – C-Reactive Protein; IL17 – Interleukin 17; B2M – Beta-2-Microglobulin; GDF-15 – growth differentiation factor 15; TIMP2 – TIMP Metalloproteinase Inhibitor 2; PAI-1 – Plasminogen activator inhibitor-1 (SERPINE1); Kallistatin – (Serpin A4, Kallikrein inhibitor, Serpin Peptidase Inhibitor); IGF1 – insulin-like growth factor 1; GDF11 – growth differentiation factor 11; RANKL – Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; BMP – bone morphogenetic protein; VWF – Von Willebrand Factor; mTOR – Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase; NAD+ – Nicotinamide adenine dinucleotide; eNAMPT – secreted extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase; SASP – senescent associated secretory phenotype; HRP – horseradish peroxidase; AP – alkaline phosphatase; ROS – Reactive oxygen species; NGS – Next Generation Sequence; OS-BLIA – Open-sandwich bioluminescent immune-analysis; ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay; IFA – immunofluorescence analysis.

Received: 29.07.2021

Revision Received: 14.09.2021

Accepted: 15.09.2021

ВВЕДЕНИЕ

Изучение факторов крови – простой и доступный способ оценки здоровья человека и дополнения традиционных показателей его биологического возраста новыми объективными критериями [1–4]. С возрастом замедляются процессы роста и развития, регенерации и восстановления тканей; они постепенно заменяются усиленным катаболизмом, активностью воспалительных клеток и резистентностью к инсулину [3]. Увеличивается количество стареющих клеток, поддерживающих воспалительную петлю; клеточный клиренс из-за замедления митохондриальной и аутофагии снижается, что приводит к повреждению и дисфункции митохондрий и клеток [5, 6].

Мониторинг факторов циркулирующей крови, а также естественных жидкостей человека дает важную информацию о процессах старения и позволяет определять стратегию медицинского вмешательства для предотвращения или замедления развития возрастных заболеваний [7]. Тема вмешательства и предотвращения

возрастных изменений является чрезвычайно значимой для человечества, что отражается во множестве публикаций, в популярных изданиях и многочисленных попытках коммерциализации новых «средств Макропулоса» [8]. Человечество еще находится на пути раскрытия тайны долголетия, и поэтому многочисленные исследования и разработки методов мониторинга старения, разработка средств замедления старения и предупреждения заболеваний, связанных с возрастом, привлекает колоссальное финансирование соответствующих отраслей науки [4].

С развитием мультиплексных методов экспресс-анализа метаболитов и белков в крови открывается возможность комплексной оценки состояния организма человека не только в лабораторных условиях, но и посредством индивидуальных устройств. Такие устройства первоначально предлагались пациентам с потенциально опасными для жизни заболеваниями, где необходим ежедневный мониторинг. Мобильные устройства индивидуального пользования были разработаны для таких

заболеваний, как сахарный диабет, сердечно-сосудистые заболевания, серьезные гормональные расстройства и тяжелые вирусные инфекции [9]. Однако с развитием мобильных устройств и современных методов анализа представляется возможным создание относительно дешевых приборов индивидуального пользования для мониторинга здоровья в домашних условиях [10]. Эти устройства будут способны оценивать состояние иммунной системы, скорость старения организма и даже биологический возраст. Это поможет человеку получать объективные показатели собственных усилий по поддержанию здорового образа жизни, следить за рационом питания, понимая, как это отражается на его здоровье и биологическом возрасте и как его усилия влияют на перспективу активного долголетия. Постоянное наблюдение за концентрацией и составом белков и метаболитов (КСБМ) в выделениях и физиологических жидкостях человека, таких как слюна, моча, потовые выделения, а также в плазме крови позволят создать комплексную картину состояния здоровья, основанную на объективных биохимических показателях. Информация должна будет обрабатываться в едином центре с помощью мультипараметрических статистических методов, включая нейросети. Это позволит создавать ежедневный профиль здоровья человека, а в сочетании с информацией о его физической активности и рационе питания выдавать предупреждения о негативных тенденциях в состоянии здоровья. Такая информация будет полезна не только для пациентов с установленным диагнозом, но и для диагностики и предупреждения преждевременного старения, а также негативных сценариев, приводящих к развитию старческих заболеваний. Кроме того, такие приборы незаменимы для людей, находящихся в экстремальных ситуациях, а также для женщин в период беременности и лактации. Они также смогут упростить для врачей задачу просвещения пациентов и их мотивации следовать здоровому образу жизни. Это будет способствовать увеличению количества трудоспособного населения в предпенсионном возрасте, обладающего значительным опытом и способного к интенсивному труду.

Дополнением к мобильным устройствам индивидуального пользования могла бы стать стратегия «домашний отбор образца — анализ в высокотехнологичной лаборатории». Отбирая образцы дома, пациент может отправить их по почте в единый высокотехнологичный центр и получить консультацию через мобильное приложение [10]. В едином центре будет производиться мультиплексная оценка состава образца и комплексная интерпретация результатов с выдачей рекомендаций, а также постановкой диагноза для дальнейшего назначения реабилитационных мероприятий или лечения. Устройства для индивидуального отбора образцов и их первичной обработки сократят финансовые и временные затраты на анализ образцов в стационарных высокотехнологичных лабораториях. Благодаря высокотехнологичным лабораториям, в медицинскую диагностику могли бы быть привнесены современные методы анализа плазмы крови, слюны и мочи, включая такие методы, как проточная цитометрия флуоресцентных частиц (cytometric bead arrays) [11]; MALDI-TOF масс-спектрометрия. CyTOF

(cytometry by time of flight — цитометрия по времени полета) [12, 13]; масс-спектрометрический анализ; методы транскрипционного и геномного анализа единичных человеческих клеток, маркеров мутировавшей ДНК, а также общий анализ ДНК, РНК инфекционных агентов в физиологических жидкостях с использованием NGS (Next Generation Sequencing, методы секвенирования нового поколения).

Для интегральной оценки здоровья уже разработаны методики оценки биологического возраста, основанные на физиологических показателях, которые объективно отражают состояние здоровья человека, скорость его старения. Но такие методики не затрагивают причины возникновения патологических состояний, что не дает возможности определить стратегию предупреждения и лечения возможных заболеваний. К сожалению, несмотря на интенсивные исследования генетических и эпигенетических маркеров, а также метаболитов и белковых факторов в организме, до сих пор не существует четких представлений о причинно-следственных связях процесса старения. В последнее время корреляционная связь некоторых эпигенетических маркеров с биологическим возрастом обсуждается во многих обзорных работах [14–17].

Корреляция между генетической и эпигенетической регуляцией процессов старения очень сложна, а компенсаторные механизмы в организме многочисленны. С учетом этого в новейших экспериментальных работах для уточнения патологических изменений в процессе старения появилась тенденция наряду с эпигенетическими маркерами включать в модели биологического возраста факторы крови и/или экспрессионные профили генов, отражающие непосредственные изменения в функционировании организма [4, 16, 18]. Именно поэтому нам представляется особенно важным проведение анализа КСБМ, связанных с возрастом. Важно, что КСБМ могут не только прямо отражать отклонения от здорового старения, но и одновременно подсказывать стратегии корректирующих медицинских вмешательств. Разработка подходов к мониторингу данных показателей позволит разработать методики замедления старения и отсрочить развитие старческих заболеваний. Часто опасные заболевания у пожилых людей развиваются бессимптомно, и анализ специфичных факторов крови как существенное дополнение к анализу биологического возраста является наиболее рентабельным и точечным методом ранней диагностики.

Эпидемия COVID-19 сосредоточила усилия мирового сообщества на решении проблемы уязвимости пожилых людей к инфекционным заболеваниям [19]. Как оказалось, параметры биологического возраста, основанные на физиологических показателях, могут предсказывать тяжесть протекания и последствия COVID-19 [20–22]. В то же время методы анализа биологического возраста с помощью эпигенетических модификаций ДНК клеток крови не всегда способны предсказать уязвимость стареющего организма к инфекционным осложнениям [23]. И напротив, непосредственный анализ динамических параметров иммунной реакции, таких как способность лимфоцитов образовывать

новые клеточные популяции, специфичные к новым антигенам, способность вырабатывать большое количество специфичных к инфекции антител, способность к быстрому выбросу провоспалительных факторов в ответ на распознавание инфекционных поверхностей, профиль воспалительных цитокинов и метаболитов, фагоцитарная активность миелоидных клеток, а также результативное успокоение иммунной реакции после удаления инфекции, значительно снижающихся с возрастом, позволяет вычислить нарастающие уязвимости иммунной системы [24].

Значительное увеличение с возрастом хронической воспалительной реакции, а также общее снижение эффективности иммунной системы связаны с накоплением в организме стареющих (сенесцентных) клеток. Так, повышенную воспалительную реакцию («цитокиновый шторм») связывают с присутствием в тканях пожилого человека сенесцентных клеток, проявляющих чрезмерную воспалительную реакцию [25]. Таким образом, тестирование параметров иммунологических возрастных изменений исключительно важно для сохранения здоровья в пожилом возрасте. Накопление сенесцентных клеток иммунной системы провоцирует иммунодефицитные состояния [26]. Так, у пожилых людей предпенсионного и пенсионного возраста, особенно с сопутствующими заболеваниями, такими как диабет, с большей вероятностью возникает дисфункция иммунного ответа, что приводит к неспособности успешно искоренить инфекционные агенты [22, 27].

■ ЦЕЛЬ

Выделить критические факторы, влияющие либо отражающие старение организма, а также определить перспективные методики мультиплексного анализа КСБМ, которые могут быть использованы в портативных мобильных устройствах или в высокотехнологичных центрах анализа образцов для предупреждения заболеваний, связанных с возрастом.

■ БИОЛОГИЧЕСКИЙ ВОЗРАСТ

Индивидуальный биологический возраст человека может кардинально отличаться от календарного [1]. Разработаны многочисленные подходы к анализу биологического возраста. Обычно биологический возраст оценивается по состоянию органов и тканей организма, а также его физиологических реакций. При оценке используются морфологические, физиологические и функциональные характеристики организма и сравниваются со средним биологическим возрастом других людей того же календарного возраста [1, 28–30]. Часто используются общие физиологические параметры – состояние сосудистой системы, вестибулярного аппарата (баланс тела), скорость реакции, уровень сахара в крови, показатели метаболизма [1, 3, 31, 32], количество шагов, которое человек проходит в день [33]. Также современные исследователи используют «индекс хрупкости» [22, 34] и «индекс нарастающей нестабильности генетической регуляции» [35].

Значительным продвижением в анализе биологического возраста стало открытие эпигенетических часов

[36], методов анализа модификаций районов ДНК. Так, были разработаны предикторы, основанные на анализе метилирования 353 CpG в тканях [36] или на основе 71 CpG в лейкоцитах [37]. Это дает возможность спрогнозировать продолжительность жизни с поправкой на хронологический возраст и другие факторы риска [38, 39]. В ходе дальнейших исследований количество маркеров метилирования, предсказывающих все случаи смертности, было сокращено до 10. Был разработан предиктор продолжительности жизни [40]. Для повышения точности прогноза в модель ввели одновременно маркеры метилирования и изменения экспрессии генов, связанных с воспалением, повреждением ДНК и активностью [16].

Недавно была разработана интегральная модель, где наряду с анализом метилирования ДНК был включен ряд циркулирующих факторов, отвечающих за клеточный стресс, воспаление и сигнализирующих о количестве сенесцентных клеток. Эта модель позволила со статистически достоверной точностью прогнозировать продолжительность жизни, количество старческих заболеваний, предрасположенность к диабету 2 типа. Также модель показывала тесную связь продолжительности жизни и заболеваний человека с образом его жизни, включая здоровое питание и уровень образования [18].

Скорость старения, определяющая биологический возраст, также зависит от различных внешних факторов, включая режим питания, вредные привычки, загрязнение окружающей среды [1, 41]. Индивидуальное старение может ускоряться из-за психолого-социальных факторов, таких как стресс, депрессия, нарушение сна, режима работы и отдыха или перенесенных инфекционных заболеваний [30, 42–45].

Старение является основным потенциальным фактором риска для широкого спектра состояний, таких как иммунодефицит, сердечно-сосудистые заболевания, диабет, рак и различные неврологические расстройства [46–48]. Для многих из этих заболеваний не существует эффективных методов лечения, а старение ощутимо снижает эффективность разработанных методик, несмотря на прилагаемые усилия специалистов и значительные инвестиции в клинические и лабораторные исследования [49].

Оценка индивидуального биологического возраста и идентификация маркеров старения необходимы для прогнозирования продолжительности жизни, оценки риска развития возрастных заболеваний. Кроме того, измерение биологического возраста необходимо для оценки лечебных мероприятий по замедлению возрастных изменений. Так, было показано, что ограничение калорийности пищи, контроль артериального давления, умеренная физическая активность, противовоспалительные препараты, лекарства, контролирующие чувствительность к инсулину, гигиена, прививки против инфекционных заболеваний способны снизить риск преждевременной нетрудоспособности и даже замедлить темп старения [2, 50, 51]. При этом некоторые лекарства и лечебные процедуры могут оказывать и негативное влияние, усугубляя процесс старения, увеличивая индивидуальный биологический возраст или вызывая проблемы со здоровьем у пожилых людей [52].

Мероприятия по замедлению старения нуждаются в методиках объективной оценки их эффективности. Как обсуждается в литературе, одними из лучших предикторов продолжительности жизни и биологического возраста являются анализ метилирования ДНК и «индекс хрупкости», в то время как анализ по длине теломеров менее предсказателен [53]. По нашему мнению, более широкое дополнение традиционных критериев биологического возраста биохимическими показателями крови и анализом естественных жидкостей человека может облегчить постановку диагноза и помочь практикующим врачам получать простые показатели, отражающие динамику параметров биологического возраста для понимания состояния здоровья пациента на молекулярном уровне, для раннего распознавания и лечения заболеваний у пожилых пациентов.

■ СТАРЕНИЕ СОСУДОВ И НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Один из показателей биологического возраста — это состояние нервной и сердечно-сосудистой систем, способность сосудов реагировать на стресс и изменения физической активности [1]. Под давлением наследственных факторов и факторов окружающей среды плотность капиллярной сети на единицу объема с возрастом снижается. Это связано с увеличением массы тела и естественным снижением экспрессии факторов роста, регулирующих рост сосудов. Уменьшение количества нейронов и синаптических связей, регулирующих вазомоторный ответ сосудов, приводит к уменьшению максимального размера просвета капилляров и ослабляет реакцию на стресс [54]. Недавно показано, что тромбоспондин-4 (THBS4) и SPARCL1 содержатся в высоких концентрациях в сыворотке крови молодых мышей, и их концентрация с возрастом снижается. Уровень этих факторов напрямую определяет образование синапсов в культивируемых нейронах, что предполагает их важную роль в поддержании функционирования нервной системы [55]. Факторы, связанные с регенерацией нервных тканей, представлены в **таблице 1**.

Фактор роста нервов (NGF) — нейротрофический фактор, который регулирует развитие и поддержание центральных холинергических нейронов, симпатических и сенсорных периферических нейронов [56].

ФАКТОРЫ	РОЛЬ В РЕГЕНЕРАЦИИ	ВД*
THBS4, SPARCL1	Поддерживают образование синаптических связей.	-
NGF	Регулирует развитие и поддержание центральных холинергических нейронов, симпатических и сенсорных периферических нейронов. Поддерживает уровень тестостерона через стимуляцию секреции гонадотропин-рилизинг-гормона. Низкий уровень в крови — индикатор риска болезни Альцгеймера.	-
ЛИПОФУСЦИН	Маркер поврежденных митохондрий в стареющих клетках. Присутствие в плазме крови отражает риск нейродегенеративных заболеваний.	+

Примечание. ВД* — возрастная динамика. Увеличение количества в плазме крови с возрастом (+), уменьшение с возрастом (-).

Таблица 1. Факторы, влияющие на регенерацию нервной ткани
Table 1. Factors affecting the regeneration of nervous tissue

Системное снижение уровня NGF связано с ухудшением когнитивных функций и риском развития болезни Альцгеймера [57]. Также показано, что назальное введение NGF может резко увеличить концентрацию тестостерона в сыворотке у стареющих животных. Лечение NGF было предложено в качестве потенциальной терапии возрастного гипогонадизма. NGF увеличивает активность нейронов гипоталамуса и стимулирует секрецию гонадотропин-рилизинг-гормона, что значительно повышает сексуальную мотивацию, улучшает качество спермы и восстанавливает фертильность стареющих животных [58]. Накопление с возрастом липофусцина (lipofuscin) является одним из важных признаков старения, что было предложено как тест на старение сосудистой и нервной системы [59]. Липофусцин — продукт неполной лизосомной деградации поврежденных митохондрий, аутофлуоресцентный липо пигмент, образованный липидами, металлами и неправильно свернутыми белками. С возрастом липофусцин откладывается вокруг нервных клеток, в клетках сердечной мышцы и кожи. Липофусцин был предложен как универсальный маркер, ассоциированный с возрастом и отражающий дисфункцию митохондрий в связи с повреждением свободными радикалами. Маркер возможно детектировать в плазме крови или слюне, и он отражает риск нейродегенеративных заболеваний [59, 60].

Наряду с гормональными изменениями, рассогласование ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, нарушение роста и регуляции сосудистой сети также вызывают снижение мышечной активности, повышение свертываемости крови и артериального давления. Кроме того, снижение концентрации гемоглобина в эритроцитах приводит к гипоксическим нарушениям в периферических тканях, что увеличивает вероятность патологических нарушений в организме. Общее ослабление иммунного ответа, старение иммунных клеток и снижение кровоснабжения тканей вызывают хронические очаги инфекции. Это приводит к повреждению сосудов, что изменяет биохимические показатели плазмы крови, в частности усиливает секрецию воспалительных факторов (см. ниже). Повышение концентрации маркеров воспаления в плазме крови также связано с повреждением нервной и сердечно-сосудистой систем и может значительно сократить продолжительность жизни. Связанное с возрастом накопление метаболитов в крови может усилить воспалительный ответ, что также часто приводит к повреждению сердечно-сосудистой системы и нарушению функции почек.

■ СТАРЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ

Во время старения происходят метаболические изменения, которые в совокупности с повышенным воспалительным фоном приводят к снижению способности тканей к регенерации и восстановлению, вызывая развитие старческих заболеваний (**таблица 2**). Снижение концентрации GDF11, PDGF-AB, VEGF, FGF2, поддерживающих регенерационную способность центральной нервной системы, сосудов, сердца и скелетных мышц, приводит к постепенной деградации этих тканей [61–63].

В то же время увеличение катаболических факторов, таких как GDF8, активин А, приводят к замедлению регенерации тканей сердца и скелетных мышц, снижая способность к регенерации в ответ на травматическое воздействие [64, 65]. В молодом возрасте в циркуляции крови присутствуют факторы, которые способствуют росту костной ткани. Недавно обнаружено, что GDF11 участвует в росте и регенерации костной ткани через активацию сигнального пути BMP [66]. Также недавно показано участие белка апелин в регенерации скелетной мускулатуры. Возможный механизм связан с увеличением синтеза белка и деления митохондрий. Более того, апелин стимулирует аутофагию и включает противовоспалительные сигнальные пути. Его содержание в крови снижается с возрастом, что является одной из причин возрастной мускулярной дистрофии [67]. Также апелин способствует гематопоезу, в частности показана его вовлеченность в дифференцировки гранулоцитов — клеток, осуществляющих фагоцитоз и воспалительную функцию [68, 69].

Также обнаружено, что в плазме молодых животных содержится значительное количество Cadherin-13. Предполагается, что Cadherin-13 служит в качестве рецептора-ловушки для RANKL, запускающего развитие остеокластов. В пожилом возрасте уровень Cadherin-13 в плазме снижается, что усиливает RANKL-зависимое развитие остеокластов и деградацию костной ткани активированными остеокластами [70].

К сожалению, прямо измерить способность к регенерации трудно, так как большинство событий по регенерации тканей имеет локальный характер и происходит как ответ на повреждение. Изменения концентрации некоторых важных факторов с возрастом не наблюдается, и лишь после получения повреждения сила регенерационного ответа в молодом и пожилом организме может быть оценена в полной мере. Зависимое от возраста снижение уровня гормона роста и окситоцина приводит к замедлению роста и развития всех систем организма, включая процессы регенерации. С возрастом снижение чувствительности к инсулину приводит к нарушению питания регенерирующих и иммунных тканей, в то время как хроническое воспаление повышает расход энергии и вызывает повреждение митохондрий. В результате клетки теряют способность отвечать на метаболические ростовые стимулы [71]. В норме в здоровой клетке митохондрии вырабатывают супероксиддисмутазу (СОД), которая активно нейтрализует образующиеся в ходе жизнедеятельности свободные радикалы ROS (reactive oxygen species). Регенерация тканей — это исключительно энергозатратный процесс, требующий деления и дифференцировки клеток и синтеза белка. В ходе регенерации под воздействием ростовых факторов (гормона роста, окситоцина, IGF1 и инсулина) происходит активация метаболических сигнальных путей внутри клетки (mTOR, TORC), что одновременно повышает не только синтез белка, но и расход быстрых углеводов и запасание жиров. Высокая активность комплекса mTOR снижает аутофагию, митофагию и продукцию СОД, что уменьшает количество функциональных митохондрий, снижает

ФАКТОРЫ	РОЛЬ В РЕГЕНЕРАЦИИ	ВД*
APELIN	Увеличивает продолжительность жизни мышечной, способствует синтезу белка, делению митохондрий и регенерации скелетной мускулатуры. Участвует в дифференцировке гранулоцитов.	-
GDF11, PDGF-AB	Позитивно влияет на регенерацию ЦНС, сосудов, сердечной и скелетной мускулатуры, участвует в регенерации и развитии костной ткани.	-
GDF15	Индикатор старения митохондрий и уровня клеточного энергоснабжения. Также повышается при клеточном стрессе.	+
ACTIVIN A, GDF8	Замедляет регенерацию мускулатуры, в результате чего возникает мускульная дистрофия.	+
CADHERIN13	Подавляет дифференциацию остеокластов и уменьшает потерю костной массы, связанную с остеопорозом и возрастом.	-
ОКСИТОЦИН	Поддерживает регенерацию мускулатуры, печени, заживление тканей.	~
ГОРМОН РОСТА	Запускает метаболические процессы, участвует в росте и развитии тканей организма.	-
ENAMPT	Увеличивает синтез NAD ⁺ , улучшает когнитивные функции, регенерацию и увеличивает продолжительность жизни у животных.	-

Примечание. ВД* — возрастная динамика. Увеличение количества в плазме крови с возрастом (+), уменьшение с возрастом (-); ~ индуцируется при регенерации тканей и снижается с возрастом.

Таблица 2. Факторы, влияющие на регенерацию тканей
Table 2. Factors affecting tissue regeneration

защиту клеток от повреждений свободными радикалами [72]. В молодом возрасте при высокой чувствительности к инсулину процесс активации метаболизма происходит быстро. Иммунная система эффективно удаляет поврежденные клетки. Высокий синтез СОД и других антиоксидантов быстро снижает концентрацию ROS, что защищает митохондрии и другие внутриклеточные органеллы от повреждений. В пожилом возрасте стареющие (сенесцентные) клетки находятся в воспалительном состоянии и синтез СОД хронически снижен. Это приводит к повышению уровня ROS и повреждению митохондрий и клеток, в то время как процесс регенерации замедлен в связи с низким уровнем гормона роста и окситоцина, а также в связи с нарастающей резистентностью к инсулину [73, 74]. В совокупности повышенная метаболическая активность отдельных воспаленных клеток при нарушении функции митохондрий, недостаточная концентрация защитных окислительно-восстановительных молекул (например, H₂S) [75, 76] приводят к старению значительного пула клеток. Недавно было показано, что уровень в циркуляции крови growth differentiation factor 15 (GDF15) может служить индикатором дисфункции митохондрий и производства клеточной энергии [77], а также сигнализировать об ускоренном старении [18].

Кроме того, процессы регенерации приводят к значительному расходу NAD⁺. С возрастом концентрация NAD⁺ в плазме крови снижается в два раза каждые 20 лет [78]. Возможно, это связано с накоплением хронически воспаленных сенесцентных клеток, которые активно расходуют NAD⁺ [79]. С возрастом также снижается продукция eNAMPT (secreted extracellular

nicotinamide phosphoribosyltransferase). В результате падения концентрации eNAMPT снижается продукция NAD⁺ в плазме. eNAMPT секретируются во внеклеточных везикулах. Было показано, что искусственное повышение уровня eNAMPT приводит к улучшению регенерации, повышению когнитивной функции и увеличению продолжительности жизни у мышей [80]. Снижение доступности NAD⁺ приводит к недостаточной метаболической активности здоровых клеток и замедлению эффективной регенерации тканей [81]. Все эти события, включая клеточное старение, дополнительно запускают патологические процессы, накопление стареющих клеток, снижение регенерации и развитие возрастных нарушений [82, 83]. Факторы, влияющие на регенерацию тканей, отражены в **таблице 2**.

■ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ВОЗРАСТ

Свой вклад в скорость старения также вносят старение иммунной системы, определяющей иммунологический возраст человека, снижение функциональной способности клеток иммунной системы и гуморального иммунного ответа. В то же время с возрастом количественно и качественно снижается производство специфических антител в ответ на иммунизацию. Снижается производство наивных Т-клеток. Обедняются эпитопы Т-клеточного рецепторов, созревших Т-клеток; увеличивается количество истощенных и стареющих клеток иммунной системы; снижается фагоцитирующая способность клеток. Возрастные изменения в состоянии здоровья можно обнаружить по анализам иммунных клеток и КСБМ в плазме крови.

■ ПРОЦЕССЫ, ПРИВОДЯЩИЕ К СТАРЕНИЮ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

В 2020 году мир столкнулся с пандемией новой коронавирусной инфекции, и проблема контроля и снижения заболеваемости вышла на первый план. Ключевыми факторами стали нагрузка на систему здравоохранения, отсутствие вакцины и высокие показатели смертности среди пожилых людей. COVID-19, вызываемый вирусом CovSARS-2 с высокой степенью контагиозности, поражает наиболее уязвимые слои населения, а именно: людей с повышенным индексом массы тела, хроническими и старческими заболеваниями, такими как диабет, сердечно-сосудистые, аллергические, аутоиммунные, онкологические заболевания, иммунодефициты, заболевания крови. Также факторами риска являются возраст, курение [84] и превышение биологического возраста над календарным [20]. Кроме того, было обнаружено, что лекарственные препараты, замедляющие старение и убивающие стареющие клетки организма (сенолитики), могут снижать тяжесть течения COVID-19 и даже способны бороться с гипертрофическим воспалительным ответом — «цитокиновым штормом» [85]. Некоторые составляющие биологического возраста приводят к увеличенной уязвимости пожилых людей. Например, недавно было показано, что с возрастом увеличивается экспрессия гена ACE2, через который вирус проникает в клетки эпителия легких [86]. Кроме общего снижения физиологических реакций, процессов заживления,

восстановления и регенерации, существенный вклад в эту уязвимость вносит старение непосредственно иммунной системы. Иммунное старение можно определить как снижение активности иммунной системы и развитие неспособности осуществлять свою функцию. Иммуностарение можно описать в нескольких основных процессах (**рисунок 1**). Прежде всего, это снижение продукции молодых предшественников иммунных клеток, пролиферативного потенциала иммунных клеток, клеточного разнообразия, репертуаров распознавания антигенов, накопление клеток со сниженной функцией и реакцией на стимулы, стареющих клеток памяти, снижение фагоцитоза и накопление сенесцентных клеток с хроническим воспалительным фенотипом.

А. Костный мозг в молодости продуцирует большое количество предшественников Т-клеток (предшественники тимоцитов) с громадным количеством паттернов распознавания чужеродных антигенов. Большое количество предшественников поддерживает архитектуру тимуса. Тимус производит громадное количество наивных Т-клеток. В пожилом возрасте производство предшественников Т-клеток снижается, что наряду с генетическими причинами приводит к деградации (инволюции) тимуса [87, 88]. Снижение рекомбинации в Т-клеточном рецепторе в костном мозге и снижение эффективности негативной селекции в тимусе приводят к уменьшению количества наивных Т-клеток и к ограниченному количеству паттернов Т-клеточных рецепторов, что снижает возможность распознавания внутриклеточных инфекций.

Б. У молодых остается высокая способность распознавать новые антигены (левая панель), лимфоциты легко активируются и обладают большим потенциалом пролиферации, что приводит к образованию клеток памяти с высоким потенциалом к пролиферации. Лимфоциты пожилых людей способны реагировать и уничтожать известные организму инфекции, но с трудом способны образовывать новые Т-клетки для новых антигенов. С возрастом в организме накапливается большее количество истощенных (слабопролиферирующих) и сенесцентных клеток памяти.

В. В молодом возрасте костный мозг производит большое количество предшественников наивных В-клеток, реагирующих на стимуляцию инфекционными антигенами секрецией большого количества слабоспецифичных антител (IgM). Эти антитела обеспечивают, с одной стороны, пассивную неспецифическую защиту от инфекций, а с другой стороны — маркируют стареющие клетки для стимуляции фагоцитоза макрофагов. Кроме того, высокий уровень рекомбинации в созревающих клетках во время инфекции обеспечивает эффективное переключение классов антител IgM → IgG (показано красной стрелкой) и высокий уровень секреции антител (IgG) с громадным разнообразием специфичности к поверхностным маркерам инфекционных агентов (вирусов, бактерий и т.д.). В пожилом возрасте костный мозг снижает производство предшественников, что является одним из факторов дезорганизации структуры селезенки и лимфатических узлов (лимфоидные органы), где В-клетки созревают [89]. В

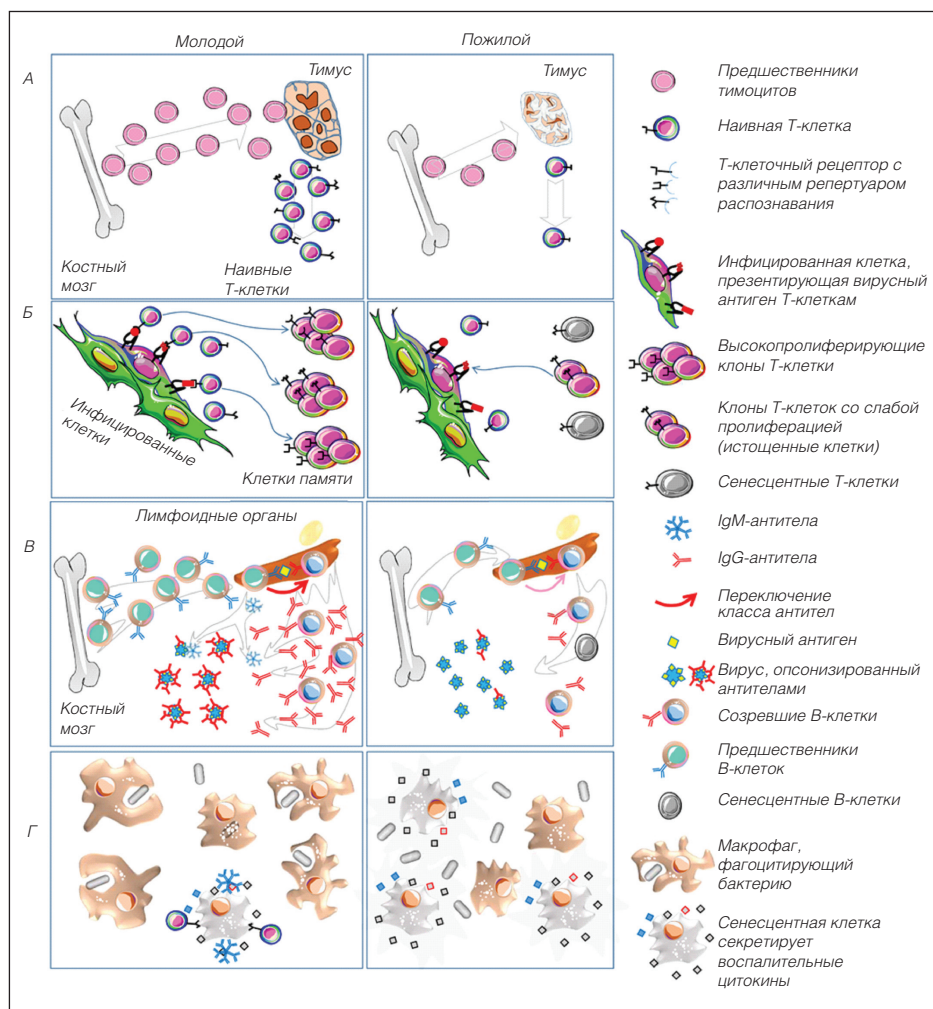


Рисунок 1. Процессы старения иммунной системы. Слева – молодая иммунная система, справа – иммунная система пожилых людей.

Figure 1. The processes of the immune system aging. On the left – the young immune system, on the right – the immune system of the elderly.

результате снижается производство как специфических (IgG), так и неспецифических антител (IgM).

Г. В молодом возрасте присутствует большое количество фагоцитирующих клеток, удалявших клеточный мусор, бактериальные инфекции, а также стрессированные, поврежденные, мутировавшие и стареющие клетки. Поддерживается высокая вероятность апоптоза клеток после повреждения. В пожилом возрасте эффективность фагоцитоза снижается, происходит накопление стареющих клеток и клеточного мусора. Сенесцентные клетки приобретают SASP (находятся в воспаленном состоянии и секретируют воспалительные факторы). Воспалительная реакция сенесцентных клеток становится хронической, при инфекции переходит в «цитокиновый шторм». Стареющие клетки оказывают негативное воздействие на окружающие ткани. В молодом организме иммунные клетки (Т-хелперы, натуральные киллеры, В-клетки, моноциты и дендритные клетки) способны быстро и со значительной амплитудой секретировать воспалительные факторы в ответ на инфекцию. Молодые иммунные клетки также способны быстро гасить производство воспалительных

факторов сразу после удаления инфекции. У пожилых присутствует много пролиферативно-истощенных клеток, неспособных к адекватной секреции цитокинов в ответ на стимуляцию антигеном. В молодом возрасте присутствует богатый репертуар минорных высокоспециализированных иммунных клеток, но с возрастом их количество и разнообразие сокращаются [90].

■ НАКОПЛЕНИЕ СЕНЕСЦЕНТНЫХ КЛЕТОК С ВОЗРАСТОМ КАК ПРИЧИНА ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ

С возрастом происходит накопление сенесцентных клеток как в иммунной системе, так и по всему организму (**рисунок 1, Г**). Сенесцентность клетки – это выработанная в ходе эволюции реакция организма, предотвращающая размножение зараженных вирусом или поврежденных клеток [91]. Так, после существенного повреждения ДНК, нарушения мета-

болизма, блокировки иммунитета клетки или если в результате мутации или вирусного воздействия происходит гиперстимуляция клеточного деления (что приводит к истощению клетки), клетка способна уйти в апоптоз (программированную смерть) [92]. Однако, если клетка не способна уйти в апоптоз, включается программа ускоренного старения клетки (программа сенесцентности). Множество вирусов выработали способы блокировки клеточного апоптоза, чтобы использовать клетку для своего размножения [93]. Предполагается, что сенесцентность – это защитный механизм, который высшие организмы выработали в ходе эволюции в ответ на способность вирусов блокировать апоптоз [91]. При включении программы сенесцентности клетки перестают делиться и приобретают так называемый senescent associated secretory phenotype (SASP) – сенесцент-ассоциированный секреторный фенотип. Они начинают производить воспалительные цитокины, а также поверхностные маркеры, которые сообщают иммунной системе, что эту клетку надо удалить из организма. В молодом организме сенесцентных клеток мало, потому что они активно удаляются фагоцитирующими (поглощающими) клетками – так называемыми «клетками-мусорщиками», а также активно маркируются и убиваются лимфоцитами [90]. Неизвестно, почему с возрастом иммунная система постепенно перестает распознавать и удалять сенесцентные клетки. Возможно, возрастное накопление

сенесцентных клеток связано с недостаточной активностью лимфоцитов по распознаванию и уничтожению больных клеток, секретирующих воспалительные цитокины. Возможно также, что снижается продукция антител, распознающих и маркирующих сенесцентные клетки, соответственно снижается способность фагоцитирующих «клеток-мусорщиков» распознавать и удалять сенесцентные клетки. Способность «клеток-мусорщиков» к фагоцитозу с возрастом также снижается [94]. Из-за этого в циркуляции крови и тканях накапливаются остатки мертвых клеток, бактерий и убитых вирусов. Все перечисленные процессы приводят, с одной стороны, к накоплению не удаленного мусора, вызывающего воспаление, а с другой — к аккумуляции сенесцентных клеток, бурно реагирующих повышенной секрецией воспалительных цитокинов во время иммунной реакции на инфекции. Так, недавно показано, что повышенный уровень $\text{TNF}\alpha$ в крови при ревматоидном артрите или в связи с общим подъемом воспаления в случае инфекции может вызвать септический шок с множественной дисфункцией органов. Это также вызывает повреждение миокарда и повреждение сосудов, приводящее к недостаточности кровообращения [95]. Именно поэтому пожилые пациенты, имеющие хронические воспаления и заболевшие новой коронавирусной инфекцией COVID-19, при тяжелом ее течении чаще погибают от «цитокинового шторма». По сравнению с молодыми пожилые люди уязвимы и для других инфекционных заболеваний и более склонны к серьезным побочным эффектам [96].

Иммунодефициты проявляются из-за старения стволовых клеток крови и клеток иммунной системы, из-за снижения их пролиферативного и дифференцированного потенциала, а также из-за неспособности к возбуждению в ответ на инфекцию.

Таким образом, составляющими увеличения иммунологического возраста являются развитие хронического воспаления из-за накопления сенесцентных клеток, постепенное снижение пролиферативного и дифференцированного потенциала стволовых клеток крови, приводящее к снижению производства лимфоидных клеток и к иммунодефицитным состояниям. В совокупности это приводит к неспособности эффективно убить инфекцию и очистить организм от остатков убитых микроорганизмов [97].

Применяя меры по своевременному мониторингу и целевому восстановлению иммунной функции, отслеживая воспалительные факторы и применяя лекарственные препараты, которые контролируют воспалительную реакцию, а также используя сенолитики, можно защитить стареющее население от тяжелых побочных эффектов, сократить количество случаев преждевременной смертности даже в условиях пандемии таких заболеваний, как COVID-19.

■ ИНДИКАТОРЫ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СТАРЕНИЯ

Одним из важнейшим проявлений старения иммунной системы является воспалительное старение [98]. Общий уровень воспалительной реакции может

также быть связан не только с острыми и хроническими инфекциями, но и с нарушениями микрофлоры кишечника. Так, «западная диета» с обилием углеводов и жиров в продуктах питания приводит к накоплению микрофлоры, вызывающей повреждение клеток кишечника и воспалительную реакцию [99]. Это приводит к хроническому подъему в плазме крови таких провоспалительных факторов, как $\text{TNF-}\alpha$, IL6 , вызывая повреждение сосудов и тканей. Преобладание воспалительной микрофлоры является фактором развития диабета и артрита [99, 47]. Воспаление, вызванное инфекциями или преобладанием воспалительной кишечной микрофлоры, вызывает хроническую индукцию и истощение иммунной системы. Гиперстимуляция инсулина и факторов роста значительно активирует липидный обмен для обеспечения иммунных реакций [27]. Однако при хроническом воспалении постоянная активация метаболических сигнальных путей может приводить к нарушению самоочищения в клетках, снижению секреции ферментов, отвечающих за удаление свободных радикалов, и вызывать инсулиновую резистентность [100, 83]. Все это в совокупности вместе с повреждающим действием инфекций может приводить к клеточной дисфункции и переходу клетки в сенесцентное состояние [47, 83].

Как было сказано выше, с возрастом в крови человека увеличивается количество сенесцентных клеток, проявляющих воспалительный фенотип SASP. Этот фенотип выражается в секреции провоспалительных факторов и детектируется по секреции индикаторов накопления сенесцентных клеток, а также по высокой системной концентрации в плазме крови этих воспалительных факторов (**таблица 3**). Этот процесс называют воспалительным старением. Он является одним из основных проявлений старения иммунной системы, которая оказывается неспособной к эффективному удалению стареющих клеток и к быстрому гашению воспалительной реакции после удаления инфекции.

Воспалительное старение также связано с постепенным накоплением нефункциональных, сенесцентных клеток иммунной системы, приводящих к развитию иммунодефицитов в пожилом возрасте, что приводит к неполному освобождению от острых инфекций и их тенденции к переходу в хроническую фазу. Как показали многочисленные исследования, воспаление способствует развитию диабета, хрупкости костей скелета, воспалительного заболевания кишечника, артрита, воспалению нервной ткани, хронического воспаления легких и других неизлечимых заболеваний, таких как рак, болезнь Альцгеймера и рассеянный склероз [49, 98]. Также смертность от всех причин среди пожилых людей коррелирует со здоровьем полости рта. Так, воспаление десен, слизистой оболочки полости рта, пародонта связано с риском инсульта, инфаркта миокарда, ревматоидного артрита, сердечно-сосудистых заболеваний [101]. Именно поэтому анализ слюны на воспалительные факторы представляется исключительно важным.

При оптимальном состоянии иммунной системы в молодом возрасте воспалительная реакция быстро стихает, после того как возбудитель удаляется из организма.

ФАКТОРЫ	РОЛЬ В СТАРЕНИИ	ВД*
CCL2, CCL11, CCL27	Воспаление нервной системы и привлечение эффективных клеток к месту воспаления. Значительно активируются при болезни Альцгеймера. Связаны с тяжестью течения заболеваний печени и значительно повышены у пожилых людей со стенозом аортального клапана, а также с аутоиммунными расстройствами.	+
CCL2, IL17, IL27, VWF	Воспаление сосудистого эндотелия, повреждение тканей, вызванное воспалением. Ишемическая болезнь сердца.	+
TNF, IL27	Старение гемопоэтических стволовых клеток.	
IL1B, IL6, TNF, CRP	Общее острое воспаление – «цитокиновый шторм» и/или показатели возрастных воспалительных изменений.	+
IL17	Фактор периферического воспаления, связанного с адаптивной иммунной системой. Воспаление кишечника, преддиабетическое состояние, аутоиммунные заболевания, артрит, псориаз.	+
B2 - МИКРОГЛОБУЛИН	Фактор нарастающей дисфункции почек и воспаления.	+
ICAM-1, VCAM-1, VWF	Адгезионные молекулы – индикаторы воспаления сосудов и нервных тканей.	+
НЕОПТЕРИН	Метаболит, секретируемый макрофагами типа M1. Отражает общее хроническое воспаление, воспалительный возраст природного иммунитета.	+
АПЕЛИН	Включает противовоспалительные сигнальные пути.	-
TIMP2	Антивоспалительный фактор, ингибитор металлопротеиназ, поддержание функции гиппокампа.	-
PAI-1, UPAR, LTA4, LTB4, PGD2, 5-HETE	Концентрация в плазме отражает накопление стареющих (сенесцентных) клеток с воспалительным фенотипом.	+
KALLISTATIN	Антиоксидантные свойства, предотвращение воспалительной индукции сенесцентных клеток.	-

Примечание. ВД* – возрастная динамика. Увеличение количества в плазме крови с возрастом (+), уменьшение с возрастом (-).

Таблица 3. Воспалительные и противовоспалительные факторы, связанные со старением

Table 3. Inflammatory and anti-inflammatory factors associated with aging

Поврежденные клетки быстро удаляются, а здоровые ткани быстро восстанавливаются. С возрастом иммунный ответ на патоген с большей вероятностью принимает хронический характер в связи с медленным удалением остатков инфекции и поврежденных и стареющих клеток. Сенесцентные клетки склонны в большей амплитуде реагировать на воспаление, проявляя SASP. Так, вместе паттерны остатков неудаленных антигенов и хроническое воспаление при определенных обстоятельствах могут вызывать «цитокиновый шторм» и даже сепсис, превращаясь в неконтролируемый процесс. В подтверждение этого недавно было обнаружено, что «цитокиновый шторм» возникает уже после пика заражения COVID-19 в связи с присутствием в циркуляции крови большого количества неудаленных остатков вирусов и поврежденных клеток [102].

Анализ литературы выявил ряд факторов, связанных с воспалительным возрастом. Концентрация этих факторов увеличивается с возрастом, и они в существенной степени влияют на биологический и иммунологический возраст человека. Это простагландины, хемокины, цитокины, вызывающие воспалительную реакцию и привлекающие иммунные клетки к местам воспаления, и интерлейкины, управляющие размножением иммунных клеток. Кроме того, при воспалении накапливаются метаболиты – индикаторы воспаления. Часть из них непосредственно связана с накоплением стареющих сенесцентных клеток и отражает нарастающую

дисфункцию иммунной системы. При патологии или старении эти факторы не только отражают старение, но и сами вовлечены в повреждение тканей.

Воспалительные факторы. Их количество увеличивается с возрастом и в слюне, и в плазме крови. Так, увеличивается концентрация цитокинов, инициирующих воспалительный ответ (TNF α), интерлейкинов, вызывающих пролиферации иммунных клеток (IL1 β , IL6, IL27), и хемокинов (CCL11, CCL27), привлекающих иммунные клетки к месту воспаления, секретирующих ферментов (матриксные металлопротеиназы), которые гидролизуют межклеточный матрикс в тканях, облегчая доступ эффективных иммунных клеток к месту воспаления, и метаболитов, участвующих в привлечении лимфоцитов к месту воспаления и их активации (**таблица 3**) [24]. Также обнаружено увеличение CCL11 с возрастом. Инъекции CCL11 в кровь экспериментальным животным снижали когнитивную функцию и задерживали регенерацию нервных тканей [103].

С возрастом происходит постепенное увеличение уровня секреции простагландина Prostaglandin D2 (PGD2) – основного инициатора воспаления. Высокий уровень PGD2 в легких блокирует созревание дендритных клеток, отвечающих за обучение Т-клеток, борющихся с легочными инфекциями [104]. Развитие воспалительной реакции зависит от экспрессии цитокинов, таких как TNF, и интерлейкинов IL1 β , IL6, которые в свою очередь запускают работу хемокинов по привлечению воспалительных клеток к месту воспаления [105]. Хронический подъем экспрессии стареющих тканей хемокинов CCL2, CCL11, CCL27 приводит к хроническому присутствию макрофагов типа-M1 в тканях и их повреждению. Было показано вовлечение CCL2 в остеопороз [106], в патогенез болезни Альцгеймера и снижение когнитивной функции [107]. Также уровень CCL2 является индикатором биологического возраста и предлагается как показатель уровня хрупкости организма в пожилом возрасте [108]. Уровень CCL27 значительно повышен при пародонтозе в слюне пожилых людей [109] и при аутоиммунных заболеваниях кожи [110, 111]. Экспрессия CCL27 нарушена в тканях при диабете. Отсутствие CCL27 снижает привлечение Т-клеток к поврежденным тканям, что является одной из причин плохого заживления тканей при диабете [112].

У пожилых людей вырабатывался более высокий IL17, особенно во время иммунного ответа на системную инфекцию. Так, секретируемый нейтрофилами IL17 приводит к повреждению печени и гибели инфицированных вирусом старых модельных мышей [113]. Повышенный уровень в плазме крови IL17 является фактором риска ишемического церебрального инсульта (атеросклеротического инфаркта головного мозга) и вызывает сенесцентность эндотелиальных клеток [114].

Повышенный уровень IL17 является одной из причин псориаза, TNF-независимого ревматоидного артрита [115], воспалительного заболевания кишечника [116] и диабета [117].

Возрастные изменения иммунной системы приводят к снижению ее способности производить сбалансированное количество лимфоидных и миелоидных клеток. В многочисленных публикациях показано смещение баланса в сторону развития миелоидных клеток [118]. Такое смещение является результатом воспалительного повреждения гемопоэтических стволовых клеток через TNF-зависимое повышение уровня IL27-рецептора и повышение уровня его лиганда IL27 в плазме крови [119, 120]. Высокий уровень IL27 в крови связан с риском развития ишемической болезни сердца и воспалением сосудистого эндотелия [121].

Секретируемые адгезионные молекулы, обладающие антиадгезионными свойствами. При нормальной иммунной реакции секреция этих молекул призвана снижать иммунную активность в воспаленных тканях, блокируя адгезию иммунных клеток в месте воспаления. Однако в случае хронического воспаления уровень растворимых (секретируемых) адгезионных молекул в плазме крови повышается. Повышение уровня растворенных адгезионных молекул, таких как ICAM-1, VCAM-1, свидетельствует о воспалении сосудистого эндотелия. VCAM-1 является индикатором предрасположенности к нейродегенеративным заболеваниям, связан со снижением функции гиппокампа и общим ухудшением здоровья [122]. Высокая концентрация ICAM-1 в норме свидетельствует о снижении иммунной реакции, но при хроническом увеличении в плазме крови с возрастом говорит об общем ухудшении здоровья и связана с «индексом хрупкости» [123].

Растворимый vWF является склеивающим белком при тромбообразовании крови. Повышение его концентрации в крови сигнализирует о повреждении сосудов, хроническом эндотелиальном воспалении и повышении риска кровоизлияния [124]. vWF, хронически активируя поверхность сосудистого эндотелия, увеличивает риск образования атеросклеротических бляшек [125]. Кроме того, vWF считается прогностическим маркером заболеваний, связанных с возрастом, таких как предынфарктное, предынсультные состояния, инсульт, диабет и острая воспалительная реакция [124].

Наиболее распространенный индикатор хронического воспаления — это C-reactive protein (CRP). CRP — белок, участвующий в образовании комплекса комплемента, который связывается с антителами, опсонизирующими вирусы, бактерии, гельминты, а также клетки, находящиеся в предапoptотическом или сенесцентном состоянии, и инициирует комплемент-зависимый лизис таких объектов [126]. Его концентрация в крови является индикатором повышенной лизирующей активности в организме человека. Острое повышение его концентрации обычно связано с воспалительной реакцией в ответ на инфекции. Кроме того, его хроническое повышение, связанное с возрастом, может быть индикатором множества расстройств, таких как старческая мускулярная дистрофия [127],

онкологические заболевания [128], преддиабетическое состояние [129], нейродегенеративные заболевания и снижение когнитивной функции [130].

Некоторые метаболиты способны быть индикаторами как острого, так и хронического воспаления, связанного с возрастом. Например, компонент иммунного комплекса на Т-клетках белок $\beta 2$ — микроглобулин (B2M) увеличивается в концентрации во время воспаления, и его подъем связывают как с риском смерти от сердечно-сосудистых заболеваний и хронического воспаления [131], так и с развитием общей немощности и хрупкости организма [132]. Плазма крови старых животных, содержащая большое количество B2M, способна привести к повреждению мышечных тканей и гиппокампа у экспериментальных животных [133].

Неоптерин — метаболит, секретируемый макрофагами во время воспаления. Его уровень также повышается с возрастом в связи нарастанием хронического и связанного с возрастом воспаления в тканях [134].

■ ФАКТОРЫ, ОБЛАДАЮЩИЕ АНТИВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Понимая значение противовоспалительных препаратов для преодоления воспалительного старения, поиску таких субстанций ученые уделяют особое внимание. В исследованиях даже дискутируется использование выделений паразитических гельминтов в качестве противовоспалительных агентов [135]. Поиск новых факторов, контролирующих воспалительную реакцию, снижающих количество и воспаление сенесцентных клеток или сообщающих о наличии воспаления, является приоритетной задачей в ближайшей перспективе.

Сравнение плазмы крови молодых и старых животных, а также исследования плазмы пуповинной крови человека показали обильное содержание противовоспалительных факторов у молодых. Например, ингибиторы матриксных металлопротеиназ, обладая противовоспалительными свойствами, снижают воспалительную реакцию в очищенных от инфекции тканях, таким образом завершая иммунный ответ. Ингибитор матриксных металлопротеиназ TIMP2 присутствует в больших количествах в плазме крови новорожденных. Например, при инъекции TIMP2 в кровь старых мышей наблюдается снижение воспаления и восстановление функции гиппокампа [136]. Белок апеллин, содержащийся в высокой концентрации в молодой крови, контролирует противовоспалительные каскады. Он способен подавлять воспаление нервных тканей [137] и защищать от токсического повреждения инфекционными агентами [138].

Каллистатин (Kallistatin) является членом суперсемейства ингибиторов сериновых протеиназ (серпинов). Он защищает от повреждения сосудов, обладая противовоспалительными свойствами и подавляя окислительный стресс. Каллистатин значительно уменьшает TNF- α -индуцированное старение клеток сосудистого эндотелия человека, понижает активность β -галактозидазы (внутриклеточного маркера старения клеток) и экспрессии ингибитора-1 активатора

плазминогена (PAI-1), а также стимулирует работу антиоксидантных ферментов. Эти исследования *in vitro* и *in vivo* дают важную информацию о роли и механизме каллистатина в предотвращении сосудистого старения и сенесцентности клеток [139].

■ ИНДИКАТОРЫ СЕНЕСЦЕНТНЫХ КЛЕТОК

Присутствие сенесцентных клеток в тканях тестируют с помощью нескольких маркеров. Основной параметр сенесцентности — остановку клеточного деления — определяют по окрашиванию на экспрессию ингибиторов деления p16^{INK4a}, p21^{CIP1}. Также сенесцентные клетки обычно детектируют по возрастанию активности фермента β-галактозидазы. Однако эти маркеры присутствуют на определенных стадиях и в нормальных клетках, поэтому они не являются строго специфичными маркерами сенесцентности клеток. Только использование нескольких маркеров одновременно — сенесцент-ассоциированной β-галактозидазы, отслеживание перемещения ядерного белка HMGB1 в межклеточное пространство и мониторинг увеличения фосфорелирования гистона γH2AX в ядре (индикатора повреждения ДНК), а также измерение увеличения размера клеток — дает надежные результаты определения сенесцентных клеток [140]. Но такие сложные исследования могут проводиться в рамках высокотехнологичных лабораторий. Тем не менее анализ некоторых циркулирующих факторов может дать интегральную оценку количества сенесцентных (стареющих) клеток в организме.

После включения программы сенесцентности клетка начинает выделение ряда воспалительных факторов и металлопротеиназы для облегчения клеткам иммунной системы распознавания и проникновения к воспаленным клеткам для их удаления. Сенесцентные клетки, включая сенесцентно-ассоциированный секреторный фенотип (SASP), выделяют провоспалительные цитокины (IL1b, IL6, TNFa) и хемокины (CCL2, CCL3), вызывая локальный иммунный ответ для подробного анализа причин воспаления и сенесцентности. Также сенесцентность наступает в том числе и при повреждении клеток инфекционными агентами [83]. При снижении функционирования иммунной системы и в связи с возрастом происходит аккумуляция сенесцентных клеток в тканях организма. Накопление сенесцентных клеток с возрастом поднимает общий базовый уровень воспаления организма. Такой негативный воспалительный фон при сниженной амплитуде иммунной реакции приводит к повреждению окружающих тканей, а также является фактором риска развития диабета, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [48].

Провоспалительные факторы, выделяемые сенесцентными клетками, производятся и здоровыми иммунными клетками и тканями во время ординарной иммунной реакции. Именно сенесцентные клетки придают организму системный хронический характер. Исследования специфических факторов, сигнализирующих о накоплении именно сенесцентных клеток, — это исключительно важная задача, направленная на предсказание возрастных изменений и рисков развития заболеваний, связанных с возрастом. Как было недавно

показано, концентрация PAI-1 и uPAR факторов в крови тесно связана с накоплением сенесцентных клеток в организме и может быть надежным индикатором нарастания возрастного воспаления в периферических тканях. Они также являются важными индикаторами воспалительного процесса в нервных тканях, приводящего к снижению когнитивной функции [141, 18].

Кроме того, оказалось, что простагландины — факторы, включающие воспалительную реакцию, — также оказались способны включать программу сенесцентности у дендритных клеток и в клетках других тканей организма. Это значительно снижает эффективность локального иммунного ответа из-за дисфункции дендритных клеток [104].

Тестирование факторов старения — исключительно важный анализ для медицины 21 века. Человечество снизило вероятность смерти от инфекций, используя прививки и антибиотики, противовоспалительные препараты и гигиену. Препараты, нормализующие кровяное давление, современная малоинвазивная хирургия и внедрение коронарного стентирования в совокупности продлили трудоспособный возраст на 5–10 лет. Такой значительный скачок в увеличении продолжительности жизни привел к увеличению пенсионного возраста и поднял планку для дальнейшего продления активного трудоспособного долголетия в развитых странах в условиях сокращения рождаемости. Повышение продолжительности жизни также вызвало переход стареющего населения в новую возрастную зону старческих заболеваний (диабет, заболевания опорно-двигательного аппарата, онкологические и нейродегенеративные заболевания, а также заболевания, для которых наука еще не создала эффективных способов лечения). Меры по мониторингу показателей крови и соблюдение здорового образа жизни позволяют сократить расходы на медицинское обслуживание, предупреждая болезни, и замедлить на ранних стадиях развитие опасных заболеваний. Введение понятия «гигиена здоровья и долголетия» повлечет за собой разработку методов мультиплексного мониторинга объективных показателей состояния организма.

■ КОНВЕНЦИОНАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА КСБМ

За последний год в связи с угрозами, вызванными вирусом COVID-19, только за первые 3 месяца эпидемии было опубликовано более 500 научных работ, предлагающих методы тестирования вирусных белков и факторов воспаления, и их количество продолжает расти. Некоторые конвенциональные (традиционные) методы анализа КСБМ могут быть приспособлены для индивидуального применения, совмещены с мобильными устройствами для анализа результатов и дистанционной обработки с выдачей рекомендаций пациенту и лечащему врачу (рисунок 2).

А. Иммуноферментный анализ. Захватывающие антитела к исследуемому белку прикрепляются к поверхности 96-луночной плашки, после экспозиции разбавленной плазмы крови исследуемый белок (или метаболит) прикрепляется к аффинной части захватывающих антител. После отмывки излишков плазмы добавляют

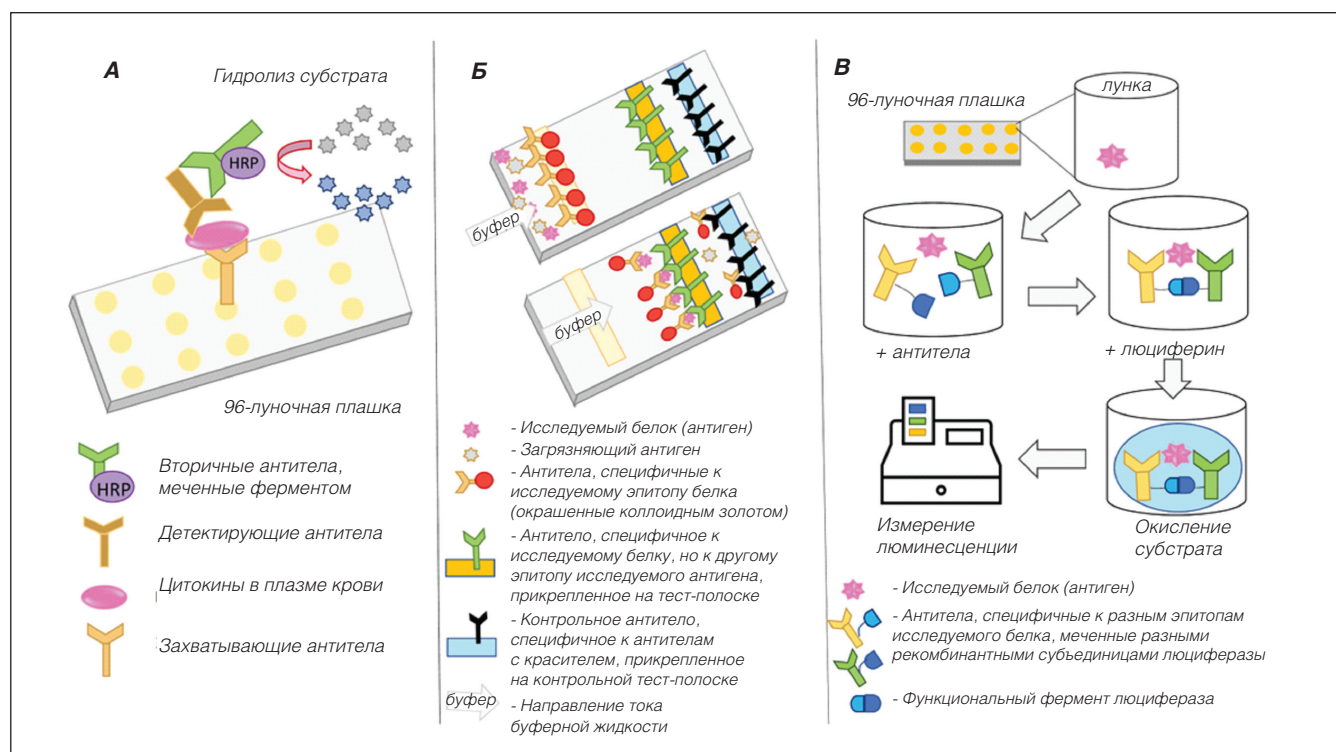


Рисунок 2. Конвенциональные методы анализа КСБМ.

А. Иммуноферментный анализ. **Б.** Иммунохроматографический анализ. **В.** Метод биолуминесцентного анализа комплементации фрагментов белка.

Figure 2. Conventional analytic methods of concentration and structure of proteins and/or metabolites. **A.** Enzyme immunoassay. **B.** Immunochromatographic analysis. **C.** The method of bioluminescent protein-fragment complementation assay.

детектирующие антитела, меченные ферментом, способным гидролизовать субстрат, так что он приобретает цветную окраску (HRP – horseradish peroxidase, фермент-пероксидаза, выделенный из хрена). Окраску детектируют оптическими методами. Захватывающие антитела и детектирующие антитела имеют разный эпитоп распознавания на исследуемом белке, что позволяет им не конкурировать за связывание.

Б. Иммунохроматографический анализ. С током буферной жидкости образец плазмы крови растворяет меченые антитела, которые захватывают из плазмы исследуемый белок (антиген). На тестовой полоске прикреплены схватывающие антитела, аффинные к альтернативному эпитопу исследуемого белка. Комплекс меченых антител, захвативших антиген, задерживается на тестовой полоске. Накопление окраски на тестовой полосе наблюдается визуально. С током буферной жидкости избыток несвязавшихся меченых антител захватывается на контрольной полоске антителами, аффинными к меченым антителам. Незахваченные загрязняющие антигены смываются в накопительную подушку.

В. Метод биолуминесцентного анализа комплементации фрагментов белка. Два антитела, меченные разными рекомбинантными фрагментами люциферазы, связываются с разными эпитопами исследуемого белка. В результате такого связывания двух разных антител с антигеном происходит объединение двух рекомбинантных доменов фермента люциферазы. Происходит

восстановление ее функциональности, и фермент окисляет субстрат, превращая его в флуоресцентный. Концентрация исследуемого антигена определяется в темноте визуально по интенсивности флуоресценции. Низкие концентрации детектируют с помощью считывающих устройств.

Рассмотрим перечисленные методы анализа подробнее.

■ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

Наиболее наглядным и не требующим сложного оборудования является иммуноферментный анализ. Он позволяет оценить КСБМ в плазме крови с помощью цветной ферментной реакции. Единственным ограничением этого анализа является наличие высокоаффинных антител к исследуемому белку или метаболиту.

Иммуноферментный анализ (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) широко применяется при анализе КСБМ, когда концентрация целевого протеина или метаболита варьирует в значительной степени (**рисунок 2А**). Это лабораторный иммунологический метод качественного или количественного анализа, который используется для широкого круга низкомолекулярных соединений, макромолекул, цитокинов, гормонов, а также поверхностей вирусных белков и пр. В основе метода лежит специфическая реакция «антиген – антитело». Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента, который разлагает субстрат. Этот субстрат после разложения приобретает цвет и оседает вокруг антитела с исследуемой молекулой, что используется для количественной регистрации сигнала. Также предпринимаются попытки расширить количество одновременно детектируемых белков плазмы, используя мечение антител к разным белкам несколькими флуоресцентными маркерами [142].

Иммуноферментный анализ может быть использован для нескольких белков и метаболитов. Пространственное разнесение связывающих антител в виде нанесенных точек или полосок, а также применение антител, меченных разными гидролизующими ферментами с последующей последовательной окраской разными субстратами, позволяют детектировать 2–3 КСБМ одновременно. Использование стационарных фоторегистрирующих устройств и даже в некоторых случаях фотокамеры мобильного телефона позволяет детектировать даже мелкие и плотно расположенные цветные объекты. Современное программное обеспечение и мобильные приложения могут оценивать интенсивность окраски, проводя грубую оценку количества исследуемого белка и даже скорость накопления окраски при серийном фотографировании. Серийное фотографирование и анализ контрольных полосок дают возможность проводить не только качественный, но и высокоточный количественный анализ. Чувствительность ELISA в большинстве коммерческих продуктов достигает 3–5 пг/мл. При применении методов амплификации, таких как биотин-стрептовидин с использованием дополнительных промежуточных антител или амплификации тирамидами, можно увеличить чувствительность определения КСБМ до 100 раз [143]. Однако это существенно удорожает анализ, увеличивает трудозатраты и повышает требования к специфичности антител для предотвращения неспецифичных сигналов.

■ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Одним из распространенных и популярных методов анализа КСБМ, применяемых в индивидуальных тестовых системах, является иммунохроматографический анализ — ИХА (Immunochromatographic assay, ICA, or lateral flow analysis, LFA). Этот относительно дешевый метод может быть использован для быстрого анализа даже в домашних условиях, именно поэтому его широко используют для производства тестовых систем (рисунок 2Б).

В качестве метки для антител наиболее часто используется коллоидное золото. Антитела конъюгируют с частицами коллоидного золота, далее меченые частицы коллоидного золота центрифугированием отделяют от абсорбированных его антител [144]. После помещения сыворотки крови или слюны на тестовую полоску, на которую предварительно нанесены антитела с коллоидным золотом, происходит образование иммунокомплексов (связывание антител с антигеном, например с белком-цитокином). Двигаясь с капиллярным фронтом жидкости, иммунокомплексы встречают на пути прикрепленные к подложке антитела антигены, но прикрепленные к его альтернативному эпитопу (к другой части белка-цитокина). Таким образом происходит накопление антител с коллоидным золотом в виде цветной полоски, которую можно распознать визуально (рисунок 2Б).

В качестве модификаций используют различные способы мечения захватывающих антител, включая ферменты HRP или AP, или флуоресцентные метки.

ИСА — простой метод с минимальными требованиями к подготовке жидкого образца, где результат может быть получен за 5–20 минут после нанесения пробы. ИСА имеет большой потенциал для массового первичного скрининга, и именно поэтому он имеет серьезное конкурентное преимущество по сравнению с другими аналитическими методами.

Недостатком метода является невысокая (100–400 pg/ml) чувствительность по сравнению с диагностикой ПЦР (полимеразная цепная реакция), поэтому наибольшее распространение он получил при тестировании крупных белков, таких как повторяющиеся белки вирусных капсидов или поверхностных молекул бактерий. Только в анализе таких объектов множественное прилипание антител, помеченных коллоидным золотом, дает достаточную для визуальной диагностики окраску. Однако этот метод имеет большой потенциал. Например, чувствительность может быть повышена в несколько раз при применении амплификации размеров частиц коллоидного золота [144]. Также для мечения антител предлагается использовать углеродные нанотрубки. Некоторые авторы утверждают, что после преодоления гидрофобности нанотрубок и использования нековалентного способа конъюгации можно поднять визуальное распознавание сигнала в ~10 раз и таким образом детектировать вещества, растворенные в плазме крови с разрешением 63 нг/мл при использовании ИХА [145].

Применение других чувствительных методов окраски (иммуноферментной, люминесцентной, флуоресцентной) также весьма перспективно для ИСА, но требует создания простых устройств для считывания динамики накопления сигнала.

■ МЕТОД БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА КОМПЛЕМЕНТАЦИИ ФРАГМЕНТОВ БЕЛКА (PCA)

Детекция концентрации малых молекул, включая цитокины, осуществляется методом биолуминесцентного анализа комплементации фрагментов белка (protein-fragment complementation assay, PCA) (рисунок 2В). Изначально метод применялся для исследования ассоциации белков между собой. В ходе дальнейших исследований, после ковалентного присоединения к антителам двух частей люциферазы, удалось применить метод для детекции КСБМ прямо в растворе или в стабилизированной плазме крови. N-концевая производная (LnBiT) и два C-концевых пептида с 11 остатками (LcBiT и SmBiT) соответствуют последовательным бета-цепям, с которыми VH и VL цепи были слиты и экспрессированы в клетках *Escherichia coli*. Путем оптимизации условий реакции и пептидной последовательности удалось повысить эффективность комплементации люциферазы, и в результате антиген-остеокальциновый пептид может быть обнаружен с низким фоновым сигналом. При добавлении субстрата комплекса «антиген — антитело» люцифераза дает яркое световое излучение. Яркость достигает 88% от излучения при использовании люциферазы дикого типа. В недавних публикациях сообщается о возможности видеть

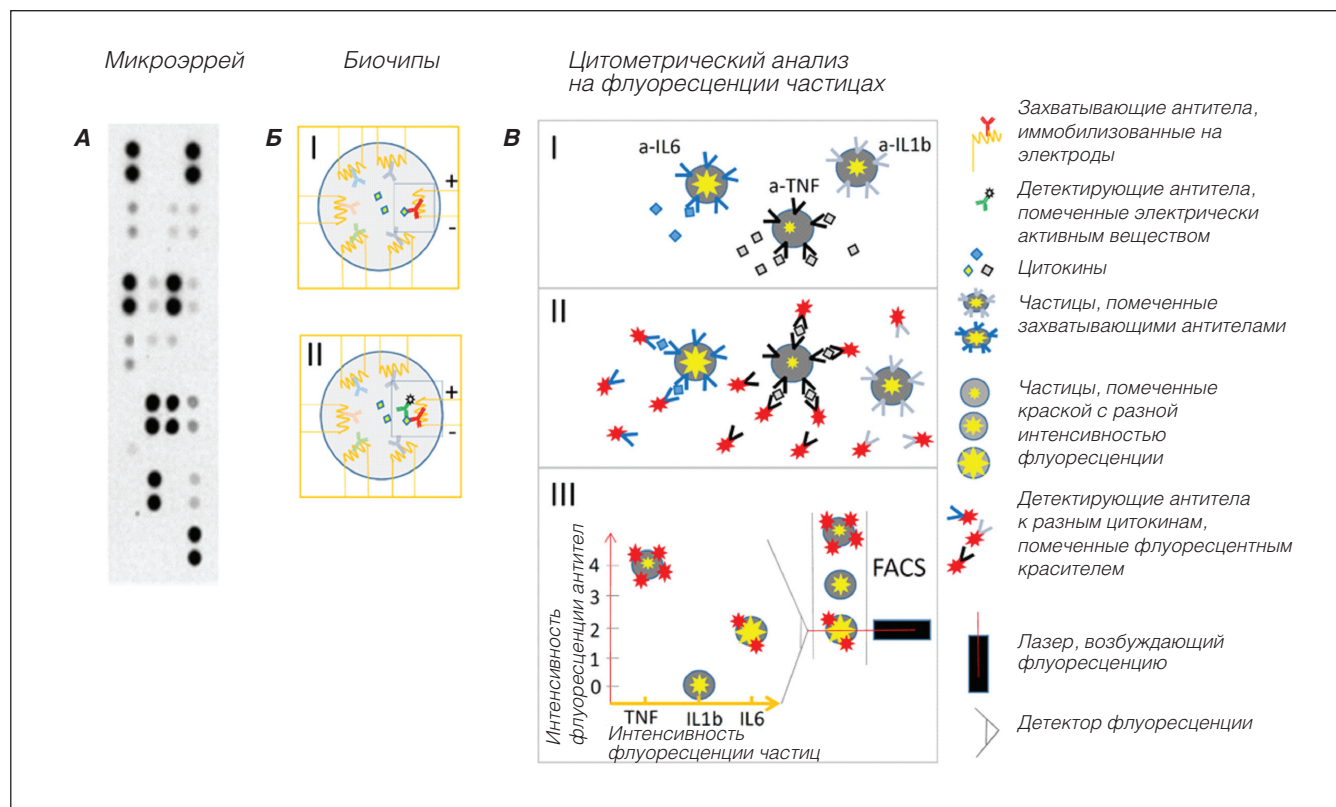


Рисунок 3. Мультиплексные виды анализа КСБМ.
Figure 3. Multiplex analysis of concentration and structure of proteins and/or metabolites.

яркое свечение люминофора прямо в капле жидкости даже невооруженным глазом при анализе методом OS-BLIA [146]. Именно поэтому этот тип детекции, называемый авторами «метод открытого сэндвича — биолюминесцентного иммуноанализа» (OS-BLIA), может стать основой многих систем обнаружения непосредственно в местах оказания медицинской помощи. PCA способен детектировать присутствие КСБМ (например цитокинов) с высоким разрешением. Однако, к сожалению, этот анализ трудно применить в мультиплексном варианте, так как в одном объеме может быть измерена концентрация только одного антигена ввиду уникальности люциферазной реакции. Кроме того, обычно для количественного анализа флуоресценции необходимы специальные фоторегистрирующие устройства.

■ СОВРЕМЕННЫЕ МУЛЬТИПЛЕКСНЫЕ ВИДЫ АНАЛИЗА

Мультиплексные (многоканальные) методы анализа стали возможны после разработки методов мечения антител различными маркерами, которые возможно детектировать с достаточной точностью, одновременно различая наличие метки разных близко расположенных антител и их концентрацию в заданном объеме. Эти методы могут применяться только в высокотехнологичной лаборатории, оборудованной современными приборами, такими как многоканальные проточные цитометры, масс-спектрометры, фотодетекторы спектра флуоресценции и современные высокопроизводительные секвенаторы (устройство, с помощью которого выполняется

автоматизированное определение последовательности нуклеотидов в цепи ДНК — секвенирование).

Развитие мультиплексных методов связано с двумя тенденциями: пространственным разнесением детектирующих антител в микрообъеме и применением меток, которые могут быть детектированы в одном микрообъеме.

■ РАЗНЕСЕНИЕ ДЕТЕКТОРОВ В МИКРООБЪЕМЕ

Примерами мультиплексных методов, основанных на разнесении детектирующих антител, являются эррей/микроэррей с антителами, цитометрический анализ КСБМ на флуоресцентных частицах и анализы с использованием биосенсоров.

Эррей/микроэррей с антителами. Антитела наносятся на подложку в виде пятен со строгим пространственным расположением, где каждому пятну соответствует специфическое антитело, связывающее отдельный белок или метаболит, и интенсивность окраски соответствует концентрации соответственного белка в исходном материале (рисунок 3А).

Биосенсоры. На поверхности расположены участки с микроэлектродами, которые детектируют связывание антигенов по изменению электрического поля из-за «антиген — антитело». Для усиления используют вторичные детектирующие антитела, помеченные металлами (рисунок 3Б). Electrodes могут детектировать, например, IL6 при связывании его с антителом в концентрации от 25нг/мл. Также показана чувствительность биосенсоров для IL1В и IL10 в диапазоне 1 до 15нг/мл [147]. В связи с пандемией COVID-19 биосенсоры к таким белкам, как CRP, TNF, IL6, стали наиболее актуальны в связи с тем, что результат анализа на

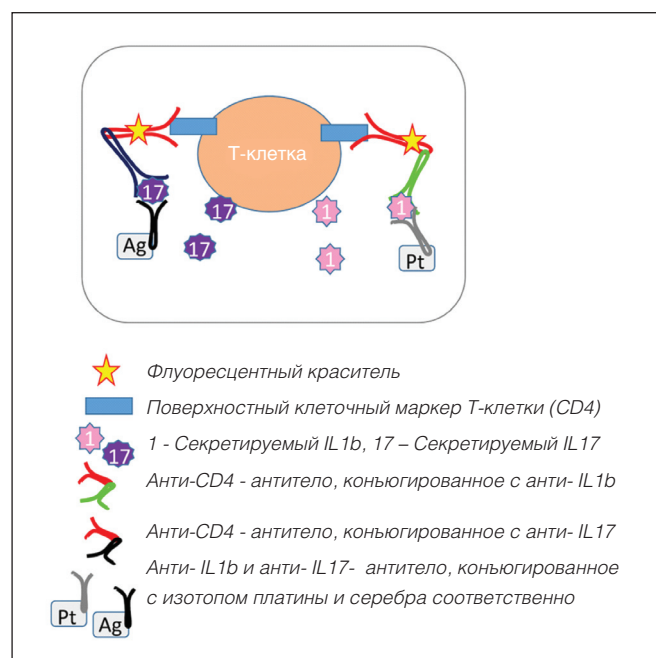


Рисунок 4. Пример использования изотопов и флуоресцентных маркеров в мультиплексном анализе секретируемых интерлейкинов Т-хелперными клетками. **Figure 4.** An example of the use of isotopes and fluorescent markers in the multiplex analysis of secreted interleukins by T helper cells.

биосенсорах может быть получен за время от нескольких секунд до нескольких минут.

Проточный цитометрический анализ КСБМ на флуоресцентных частицах. Основан на том, что каждая микрочастица помечена разными захватывающими антителами к разным антигенам. Микрочастицы имеют собственную флуоресценцию и различаются по интенсивности этой флуоресценции (чтобы различить, какой антиген будут захватывать антитела, прикрепленные к ней). После помещения этих микрочастиц в плазму крови происходит связывание антигенов (цитокинов) с соответствующим антителом на каждой частице отдельно. Детектирующие антитела помечены другим флуоресцентным маркером (чтобы различить, сколько антител связали антиген на каждой частице, то есть определить количество прилипших к антителам цитокинов). При анализе этих частиц на проточном цитометре и при прохождении микрочастицы через детектор одновременно считывается флуоресцентный маркер самой частицы (код микрочастицы) и количество цитокинов, связанных со специфическими антителами на микрочастице по флуоресценции детектирующих антител [11] (**рисунок 3В**). Некоторые технологии позволяют увеличить панель флуоресцентного кодирования микрочастиц. Так, технология, зарегистрированная под торговым названием FirePlex, позволяет различать до 70 различных флуоресцентных штрих-кодов на слое-ных частицах из гидрогелей, определяя до 70 различных антител, прикрепленных к таким частицам [148]. Используя стратегию сочетания различных уровней интенсивности флуоресценции и различающихся по спектру флуоресцентных маркеров в технологии X MAP Technology (Luminex), удалось добиться различения до

100 частиц, покрытых разными антителами, способных определять до 100 растворенных в плазме белков в одном объеме при использовании многоканальной проточной цитометрии [149].

В то же время развитие новых методов мечения позволит увеличить одновременно детектирование КСБМ в одном объеме на одной микрочастице или участке микроэрреэ. Для этого в качестве меток могут применяться флуоресцентные маркеры с различным спектром флуоресценции, ионы изотопов металлов или олигонуклеотиды ДНК.

■ ПРИМЕНЕНИЕ НОВЫХ МЕТОК ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ КСБМ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАСШИРЕНИЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОСТИ

Флуоресцентные метки. В качестве мультиплексных меток чаще всего используют флуоресцентные красители, которые позволяют одновременно различать около 20 антител к 20 различным маркерам на поверхности одной клетки. Более широкий набор меток был разработан относительно недавно. Например, используют синтетические пластики «квантум-дот» с узким спектром излучения. В последние годы приобрел широкую популярность и породил линейку коммерческих продуктов метод, использующий мечение антител изотопами металлов, что позволяет получить более 100 различных меток (**рисунок 4**).

Два конъюгированные антитела присоединяются к Т-клеточному маркеру на поверхности клетки и одновременно к секретируемому Т-клеткой интерлейкину (IL1b или IL17). Таким образом можно измерять для каждой клетки крови специфичный цитокиновый профиль.

Изотопы металлов. Использование изотопов металлов позволило расширить спектр одновременно детектируемых КСБМ. Разработаны устройства, использующие масс-спектрометрический анализ для распознавания (в экспериментальных условиях) концентрации до 100 изотопов металлов, конъюгированных с антителами. Детектирование меченных изотопами антител проводится с использованием метода CyTOF (cytometry by time-of-flight) – «штрих-кодирование живых иммунных клеток цитометрией по времени пролета» [13]. Уже сейчас предлагаются коммерческие продукты, позволяющие одновременно детектировать до 60 КСБМ, находящихся в одном объеме или на одном носителе. В случае использования флуоресцентных магнитных частиц появляется возможность прикрепить на них до 60 первичных антител при анализе на проточном цитометре, совмещенном с масс-спектрометрией. Количество одновременно измеряемых различных белков и метаболитов может достигать 1500.

ДНК-метки. Третий интересный метод «штрих-кодирования» антител связан с их мечением уникальными олигонуклеотидными последовательностями ДНК. Этот метод не имеет ограничений по количеству кодирующих последовательностей. Ограничение применения такой метки связано с тем, что возможна деградация ДНК-метки из-за присутствия в физиологических жидкостях гидролизующих ее нуклеаз.

Поэтому необходимо применять блокаторы нуклеаз и ограничивать время от начала окрашивания до конечного секвенирования образцов. Метод совместим с NGS-анализом (Next generation sequencing) для определения последовательности ДНК («штрих-кода») и ее количества [150]. Если использовать мечение магнитных частиц с прикрепленными антителами, где детектирующие антитела помечены олигонуклеотидами («штрих-кодами»), то количество одновременно тестируемых белков ограничивается только наличием аффинных антител для пробного сэндвича.

Аптамеры как альтернатива антителам. Ограниченное количество высокоаффинных антител, способных детектировать разнообразие белков и метаболитов, привело к разработке новых подходов. Антитела до сих пор остаются дорогостоящим реагентом в связи с большими затратами на разработку и их получение в больших количествах. Создание аптамеров — олигонуклеотидов ДНК или РНК, способных с высокой аффинностью детектировать КСБМ, привело к удешевлению и расширению возможностей экспресс-анализов [151]. Аптамеры так же, как и антитела, могут быть помечены флуоресцентными метками, изотопами металлов или «штрих-кодированием» (спайкой между уникальными олигонуклеотидными последовательностями ДНК с аптамерами). Селекция новых аптамеров и их использование для вышеперечисленных методов анализа переходит из поисковой научной сферы к промышленным разработкам. В ближайшие десятилетия мы увидим появление новых методов детекции КСБМ с использованием более дешевых реагентов с возможностью мультиплексного тестирования в биологических жидкостях человека.

■ ФОКУС ОБЗОРА, ОГРАНИЧЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Изданная в последние десятилетия литература о роли циркулирующих факторов крови в процессе старения требует систематического осмысления. В результате анализа около 200 источников литературы из баз данных PubMed, Scopus, Web of Science и РИНЦ мы выделили ключевые экспериментальные работы и обзорные статьи, посвященные факторам крови и естественных выделений человека, концентрация которых изменяется в процессе старения, а также ключевым факторам предрасположенности к опасным заболеваниям, связанным с возрастом и/или патологическими состояниями, приводящими к опасным заболеваниям. Среди них есть факторы, вызывающие или отражающие хроническое воспаление, системное накопление сенесцентных клеток, которое участвует в нейродегенеративных расстройствах, указывает на патологии сердечно-сосудистой и выделительной систем, отражающие нарушение метаболизма, снижение общего регенерационного потенциала, а также свидетельствующие о дисфункции иммунной системы. Основным критерием выбора литературы был анализ факторов, связанных с контролем возрастных изменений и старения, а также маркеров — индикаторов подобных процессов.

Фокус нашего обзора был связан с гипотезой, что концентрация и состав белков и метаболитов (КСБМ)

может непосредственно отражать патологические процессы, происходящие в организме. Циркулирующие белки и метаболиты доставляют во все части организма управляющие сигналы, непосредственно участвуя в процессах роста, развития и старения. Мы предположили, что именно нарушение этих процессов ведет к патологическим состояниям. И таким образом коррекция на ранней стадии способна замедлить процессы старения до наступления патологических изменений в организме. Тестирование отмеченных нами в обзоре КСБМ позволит выявить системную патологию во всех частях организма, а не только в циркулирующих клетках крови, в отличие от методов, которые сконцентрированы на анализе образцов, взятых непосредственно из проблемных тканей.

Нам представляется возможным создание мультиплексной тестовой системы для клинического анализа, основанной на ограниченном наборе специфических циркулирующих факторов, которые свидетельствуют об отдельном патологическом процессе или серии патологических процессов в организме. Тестовая система может быть использована для постановки диагноза для широкого спектра заболеваний, а также ассоциировать причины заболеваний в единый патологический процесс. При регулярных мониторингах этих факторов возможно отслеживать как предрасположенность к конкретному патологическому процессу на ранних стадиях, так и развитие патологических процессов во времени. Выявление патологических факторов или обнаружение резкого изменения в концентрации определенного белка или метаболита, связанного с патогенезом, может быть поводом для лечебного вмешательства (введение блокирующих антител или инъекции самого действующего белка или ингибитора). Данный подход позволит немедленно скорректировать патологический процесс, а возможно, и предотвратит опасные заболевания на ранних стадиях. Тестирование КСБМ — это относительно простая процедура, которая при наличии устройств или тестеров для экспресс-диагностики позволяет получить результат в течение от нескольких минут до часа после получения образца, а в мультиплексном варианте — проводить одновременное тестирование десятков ключевых факторов для сотен пациентов за ограниченный промежуток времени.

Мы сознательно ограничили обсуждение обширных исследований и методов тестирования старения и биологического возраста по анализу ДНК-модификаций, так как нашей целью было выявить методы, которые могут быть проведены сравнительно простым и дешевым способом, и дать непосредственные рекомендации о возможной коррекции патологических состояний. Обсуждаемые нами методы позволяют произвести анализ при отборе относительно небольшого образца периферической крови, где исследуемый фактор находится в относительно низкой концентрации. Такие анализы могут быть произведены как в рамках ординарных клинических лабораторий, так и индивидуально на дому. В высокотехнологических центрах медицинского анализа такие методы позволяют производить анализ массово и с небольшими финансовыми затратами.

Анализ модификаций генома/гистонов требует дорогостоящих и затратных по времени методов, а также достаточно большого количества клеточного материала для исследований. Именно поэтому эти методы анализа модификаций генома остаются передовой и прорывной частью науки, но для массового применения в качестве рутинных тестов в клинике, а тем более для индивидуального использования требуются дополнительные исследования и шаги для их адаптации. В то же время маркеры, которые мы предлагаем для обсуждения, отражают системный уровень патологий, но требуют дальнейших клинических испытаний и статистической оценки на более широкой группе пациентов с различными заболеваниями, связанными с возрастом, и оценки их связи со случаями ускоренного старения. Мы также допускаем, что конкретные рыночные условия, убежденность населения и требования институтов, принимающих финансовые решения, могут существенно влиять на внедрение подобных методов тестирования, а также на коммерческий успех и широкое применение.

■ ВЫВОДЫ

Старение организма сопровождается увеличением его биологического возраста, который в норме должен коррелировать по времени с календарным возрастом. Однако некоторые внутренние эпигенетические модификации, патологические условия и влияние окружающей среды могут замедлить или ускорить процесс естественного старения.

Блокирование факторов, отрицательно влияющих на продолжительность жизни и/или их лечение, которое позитивно сказывается на здоровье и долголетию, является разумной стратегией предотвращения ускоренного старения, предупреждения развития старческих заболеваний, ранней инвалидности и продления активной жизни пожилых людей [73, 133]. Среди стратегий, уже апробированных в клинической практике или которые будут переведены в клиническую практику, можно выделить следующие: преодоление

инсулинорезистентности второго типа путем изменения диеты [100]; фармакологическое лечение инсулинорезистентности; стимуляцию восстановления тканей с помощью окситоцина, гормона роста в сочетании с препаратами, повышающими чувствительность к инсулину; предотвращение развития хронического воспаления путем своевременного лечения, вакцинации и использования противовоспалительных лекарств; внедрение сенолитических препаратов и других герантопротекторов [96]. Все эти меры невозможны без внедрения дешевых массовых методов мониторинга объективных показателей старения по показателям крови, слюны и других физиологических жидкостей.

Будущее медицины за созданием «гигиены старения» — мультиплексного анализа КСБМ, позволяющего проводить периодический регулярный мониторинг изменений состава ключевых факторов в домашних условиях с комплексной автоматической оценкой программными средствами и выдачей оценки и программы реабилитации в случае отклонения от нормы.

Рассмотренные выше факторы и индикаторы, отражающие естественные и патологические процессы старения, могут быть использованы для создания панели мониторинга старения. Циркулирующие факторы могут не только отражать старение организма, быть предикторами развития опасных заболеваний, но и служить потенциальными лекарственными препаратами для коррекции старения и патологических состояний.

В обзоре мы предложили комплексный мониторинг показателей и маркеров биологического возраста, показывающих функциональные изменения в стареющем организме, в целях разработки перспектив защиты здоровья, задержки старения, нахождения новых подходов к омоложению для пожилых людей и поддержки здорового старения и продления активной жизни. ■

Конфликт интересов: все авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Hamczyk MR, Nevado RM, Baretto A, et al. Biological Versus Chronological Aging. JACC Focus Seminar. *J Am Coll Cardiol*. 2020;75(8):919-930. doi: 10.1016/j.jacc.2019.11.062
2. Bunning BJ, Contrepas K, Lee-McMullen B, et al. Global metabolic profiling to model biological processes of aging in twins. *Aging Cell*. 2020;19(1):e13073. doi: 10.1111/ace1.13073
3. Hertel J, Friedrich N, Wittfeld K, et al. Measuring Biological Age via Metabonomics: The Metabolic Age Score. *J Proteome Res*. 2016;15(2):400-410. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00561
4. Belsky DW, Caspi A, Arseneault L, et al. Quantification of the pace of biological aging in humans through a blood test, the DunedinPoAm DNA methylation algorithm. *Elife*. 2020;9. doi: 10.7554/eLife.54870
5. Fang Y, Zhu L, An N, et al. Blood autophagy defect causes accelerated non-hematopoietic organ aging. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(14):4910-4922. doi: 10.18632/aging.102086
6. Hansen M, Rubinstein DC, Walker DW. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(9):579-593. doi: 10.1038/s41580-018-0033-y
7. Kiss T, Tarantini S, Csipo T, et al. Circulating anti-geronic factors from heterochronic parabiosis promote vascular rejuvenation in aged mice: transcriptional footprint of mitochondrial protection, attenuation of oxidative stress, and rescue of endothelial function by young blood. *Geroscience*. 2020;42(2):727-748. doi: 10.1007/s11357-020-00180-6
8. Dolgin E. Send in the senolytics. *Nature Biotechnology*. 2020;38(12):1371-1377. doi: 10.1038/s41587-020-00750-1
9. Chin CD, Cheung YK, Laksanasopin T, et al. Mobile device for disease diagnosis and data tracking in resource-limited settings. *Clin Chem*. 2013; 59(4):629-640. doi: 10.1373/clinchem.2012.199596
10. Hernández-Neuta I, Neumann F, Brightmeyer J, et al. Smartphone-based clinical diagnostics: towards democratization of evidence-based health care. *J Intern Med*. 2019;285(1):19-39. doi: 10.1111/joim.12820
11. Castillo L, MacCallum DM. Cytokine measurement using cytometric bead arrays. *Methods Mol Biol*. 2012;845:425-434. doi: 10.1007/978-1-61779-539-8_29
12. Subrahmanyam PB, Maecker HT. CyTOF Measurement of Immunocompetence Across Major Immune Cell Types. *Curr Protoc Cytom*. 2017;82:59.54.51-59.54.12. doi: 10.1002/cpcy.27
13. Han G, Spitzer MH, Bendall SC, et al. Metal-isotope-tagged monoclonal antibodies for high-dimensional mass cytometry. *Nat Protoc*. 2018;13 (10):2121-2148. doi: 10.1038/s41596-018-0016-7
14. Zannas AS, Jia M, Hafner K, et al. Epigenetic upregulation of FKBP5 by aging and stress contributes to NF-κB-driven inflammation and cardiovascular risk. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(23):11370-11379. doi: 10.1073/pnas.1816847116
15. Cheung P, Vallania F, Warsinske HC, et al. Single-Cell Chromatin Modification Profiling Reveals Increased Epigenetic Variations

- with Aging. *Cell*. 2018;173 (6): 1385-1397, e1314. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.079
16. Levine ME, Lu AT, Quach A, et al. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging* (Albany NY). 2018;10(4):573-591. doi: 10.18632/aging.101414
 17. Silva-Palacios A, Ostolga-Chavarria M, Zazueta C, Konigsberg M. Nrf2: Molecular and epigenetic regulation during aging. *Ageing Res Rev*. 2018;47:31-40. doi: 10.1016/j.arr.2018.06.003
 18. Lu AT, Quach A, Wilson JG, et al. DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan. *Aging* (Albany NY). 2019;11(2): 303-327. doi: 10.18632/aging.101684
 19. Bialek S, Boundy E, Bowen V, et al. Severe Outcomes Among Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) - United States, February 12-March 16, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2020;69(12):343-346. doi: 10.15585/mmwr.mm6912e2
 20. Lauc G, Sinclair D. Biomarkers of biological age as predictors of COVID-19 disease severity. *Aging* (Albany NY). 2020;12(8):6490-6491. doi: 10.18632/aging.103052
 21. Berezina TN, Rybtsov SA. The influence of quarantine on the indicators of biopsychological age in Russia (longitudinal study). *Journal of Modern Foreign Psychology*. 2021;10(1):57-69. (In Russ.). [Березина Т.Н., Рыбцов С.А. Влияние карантина на показатели биопсихологического возраста в России (лонгитюдное исследование). *Современная зарубежная психология*. 2021;10(1):57-69]. doi: 10.17759/jmfp.2021100106
 22. Atkins JL, Masoli JAH, Delgado J, et al. Preexisting Comorbidities Predicting COVID-19 and Mortality in the UK Biobank Community Cohort. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2020;75(11):2224-2230. doi: 10.1093/gerona/glaa183
 23. Franzen J, Nüchtern S, Tharmapalan V, et al. Epigenetic clocks are not accelerated in COVID-19 patients. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(17):9306. doi.org/10.3390/ijms22179306
 24. Rybtsova NN, Berezina TN, Kagansky AM, Rybtsov SA. Can blood-circulating factors unveil and delay your biological aging? *Biomedicines*. 2020;8(12):615. doi:https://doi.org/10.3390/biomedicines8120615
 25. Nehme J, Borghesan M, Mackedenski S, et al. Cellular senescence as a potential mediator of COVID-19 severity in the elderly. *Aging Cell*. 2020;19(10): e13237. doi: 10.1111/acel.13237
 26. Ovadya Y, Landsberger T, Leins H, et al. Impaired immune surveillance accelerates accumulation of senescent cells and aging. *Nature Communications*. 2018;9(1):5435. doi: 10.1038/s41467-018-07825-3
 27. Tsai, S, Clemente-Casares X, Zhou AC, et al. Insulin Receptor-Mediated Stimulation Boosts T Cell Immunity during Inflammation and Infection. *Cell Metab*. 2018;28(6):922-934. e924. doi: 10.1016/j.cmet.2018.08.003
 28. Berezina TN, Rybtsova NN, Rybtsov SA. Comparative Dynamics of Individual Ageing Among the Investigative Type of Professionals Living in Russia and Russian Migrants to the EU Countries. *European Journal of Investigation in Health, Psychology and Education*. 2020;10(3):749-762. doi:https://doi.org/10.3390/ejihpe10030055
 29. Berezina TN, Buzanov KE, Zinatullina AM, et al. The expectation of retirement as a psychological stress that affects the biological age in the person of the Russian Federation. *Religación. Revista de Ciencias Sociales y Humanidades*. 2019;4(18):192-198.
 30. Berezina TN, Stelmakh SA, Dergacheva EV. The effect of retirement stress on the biopsychological age in Russia and the Republic of Kazakhstan: a cross-cultural study. *Psychologist*. 2019;5. doi: 10.25136/2409-8701.2019.5.31159
 31. Voitenko VP, Tokar AV. The assessment of biological age and sex differences of human aging. *Exp Aging Res*. 1983;9(4):239-244. doi: 10.1080/03610738308258458
 32. Voitenko VP. Biological age. In: *Physiological mechanisms of aging*. Moscow, 1982:144-156.
 33. Pyrkov TV, Sokolov IS, Fedichev PO. Deep longitudinal phenotyping of wearable sensor data reveals independent markers of longevity, stress, and resilience. *Aging* (Albany NY). 2021;13(6):7900-7913. doi: 10.18632/aging.202816
 34. Kuo CL, Pilling LC, Atkins JC, et al. COVID-19 severity is predicted by earlier evidence of accelerated aging. *MedRxiv*, 2020. doi: 10.1101/2020.07.10.20147777
 35. Hewitt J, Carter B, Vilches-Moraga A, et al. The effect of frailty on survival in patients with COVID-19 (COPE): a multicentre, European, observational cohort study. *Lancet Public Health*. 2020;5(8): e444-e451. doi: 10.1016/s2468-2667(20)30146-8
 36. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*. 2013;14(10): R115. doi: 10.1186/gb-2013-14-10-r115
 37. Hannum G, Guinney J, Zhao L, et al. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell*. 2013;49(2):359-367. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.016
 38. Chen BH, Marioni RE, Colicino E, et al. DNA methylation-based measures of biological age: meta-analysis predicting time to death. *Aging* (Albany NY). 2016;8(9):1844-1865. doi: 10.18632/aging.101020
 39. Marioni RE, Shah S, McRae AF, et al. DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biol*. 2015;16(1):25. doi: 10.1186/s13059-015-0584-6
 40. Zhang Y, Wilson R, Heiss J, et al. DNA methylation signatures in peripheral blood strongly predict all-cause mortality. *Nat Commun*. 2017;8:14617. doi: 10.1038/ncomms14617
 41. Berezina T. Distribution of biomarkers of aging in people with different personality types. (In Russ.). E3S Web of Conferences 2020 (210). Article Number 17028. doi: 10.1051/e3sconf/202021017028
 42. Yegorov YE, Poznyak AV, Nikiforov NG, et al. The Link between Chronic Stress and Accelerated Aging. *Biomedicines*. 2020;8(7). doi: 10.3390/biomedicines8070198
 43. Crosswell AD, Suresh M, Puterman E, et al. Advancing Research on Psychosocial Stress and Aging with the Health and Retirement Study: Looking Back to Launch the Field Forward. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*. 2020;75(5): 970-980. doi: 10.1093/geronb/gby106
 44. Madore C, Yin Z, Leibowitz J, Butovsky O. Microglia, Lifestyle Stress, and Neurodegeneration. *Immunity*. 2020;52(2):222-240. doi: 10.1016/j.immuni.2019.12.003
 45. Berezina TN. Differences in individual life path choices affecting life expectancy and health in Russia. *E3s Web of Conferences*, 2020;210(17032):10. doi:https://doi.org/10.1051/e3sconf/202021017032
 46. Berezina TN. Psychological factors in the development of cardiovascular diseases at different stages of life. *Psychiatry, Psychotherapy and Clinical Psychology*. 2020;11(1):75-84. doi: 10.34883/PI.2020.11.1.007
 47. Prattichizzo F, Giuliani A, Mensa E, et al. Pleiotropic effects of metformin: Shaping the microbiome to manage type 2 diabetes and postpone ageing. *Ageing Res Rev*. 2018;48:87-98. doi: 10.1016/j.arr.2018.10.003
 48. Wang B, Kohli J, Demaria M. Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? *Trends Cancer*. 2020. doi: 10.1016/j.trecan.2020.05.004
 49. Franceschi C, Garagnani P, Morsiani C, et al. The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:61. doi: 10.3389/fmed.2018.00061
 50. Zhavoronkov A. Geroprotective and senoremediative strategies to reduce the comorbidity, infection rates, severity, and lethality in gerophilic and gerolavic infections. *Aging* (Albany NY). 2020;12(8):6492-6510. doi: 10.18632/aging.102988
 51. Bhatt AS, DeVore AD, Hernandez AF, Mentz RJ. Can Vaccinations Improve Heart Failure Outcomes?: Contemporary Data and Future Directions. *JACC Heart Fail*. 2017;5(3):194-203. doi: 10.1016/j.jchf.2016.12.007
 52. Qato DM, Alexander GC, Conti RM, et al. Use of prescription and over-the-counter medications and dietary supplements among older adults in the United States. *Jama*. 2008;300 (24):2867-2878. doi: 10.1001/jama.2008.892
 53. Moskalev A. The challenges of estimating biological age. *Elife*. 2020;9. doi: 10.7554/eLife.54969
 54. Boerman EM, Segal SS. Depressed perivascular sensory innervation of mouse mesenteric arteries with advanced age. *J Physiol*. 2016;594 (8):2323-2338. doi: 10.1113/jp270710
 55. Gan KJ, Südhof TC. Specific factors in blood from young but not old mice directly promote synapse formation and NMDA-receptor recruitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(25):12524. doi: 10.1073/pnas.1902672116
 56. Morgentaler A. Nerve growth factor as a new treatment for testosterone deficiency? *EBioMedicine*. 2018;36:10-11. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.09.017
 57. Lou G, Zhang Q, Xiao F, et al. Intranasal TAT-haFGF Improves Cognition and Amyloid- β Pathology in an A β PP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2016;51(4):985-990. doi: 10.3233/jad-151121
 58. Luo J, Yang Y, Zhang T, et al. Nasal delivery of nerve growth factor rescue hypogonadism by up-regulating GnRH and testosterone in aging male mice. *EBioMedicine*. 2018;35:295-306. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.08.021
 59. Moreno-García A, Kun A, Calero O, et al. An Overview of the Role of Lipofuscin in Age-Related Neurodegeneration. *Front Neurosci*. 2018;12:464. doi: 10.3389/fnins.2018.00464
 60. Feng FK, E LL, Kong XP, et al. Lipofuscin in saliva and plasma and its association with age in healthy adults. *Aging Clin Exp Res*. 2015;27(5):573-580. doi: 10.1007/s40520-015-0326-3
 61. Sinha M, Jang YC, Oh J, et al. Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle. *Science*. 2014;344 (6184): 649-652. doi: 10.1126/science.1251152
 62. Katsimpardi L, Litterman NK, Schein PA, et al. Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young

- systemic factors. *Science*. 2014;344 (6184):630-634. doi: 10.1126/science.1251141
63. Ozek C, Krolewski RC, Buchanan SM, Rubin LL. Growth Differentiation Factor 11 treatment leads to neuronal and vascular improvements in the hippocampus of aged mice. *Sci Rep*. 2018; 8(1):17293. doi: 10.1038/s41598-018-35716-6
64. Roh JD, Hobson R, Chaudhari V, et al. Activin type II receptor signaling in cardiac aging and heart failure. *Sci Transl Med*. 2019;11(482):eaau8680. doi: 10.1126/scitranslmed.aau8680
65. Latres E, Mastaitis J, Fury W, et al. Activin A more prominently regulates muscle mass in primates than does GDF8. *Nat Commun*. 2017;8:15153. doi: 10.1038/ncomms15153
66. Suh J, Kim NK, Lee SH, et al. GDF11 promotes osteogenesis as opposed to MSTN, and follistatin, a MSTN/GDF11 inhibitor, increases muscle mass but weakens bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(9):4910-4920. doi: 10.1073/pnas.1916034117
67. Vinel C, Lukjanenko L, Batut A, et al. The exerkine apelin reverses age-associated sarcopenia. *Nat Med*. 2018;24 (9):1360-1371. doi: 10.1038/s41591-018-0131-6
68. Jackson M, Fidanza A, Taylor AH, et al. Modulation of APLNR Signaling Is Required during the Development and Maintenance of the Hematopoietic System. *Stem Cell Reports*. 2021;16(4):727-740. doi: 10.1016/j.stemcr.2021.02.003
69. Yu QC, Hirst CE, Costa M, et al. APELIN promotes hematopoiesis from human embryonic stem cells. *Blood*. 2012;119 (26): 6243-6254. doi: 10.1182/blood-2011-12-396093
70. Yang YR, Kabir MH, Park JH, et al. Plasma proteomic profiling of young and old mice reveals cadherin-13 prevents age-related bone loss. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(9):8652-8668. doi: 10.18632/aging.103184
71. Zhang WB, Aleksic S, Gao T, et al. Insulin-like Growth Factor-1 and IGF Binding Proteins Predict All-Cause Mortality and Morbidity in Older Adults. *Cells*. 2020;9 (6):1368. doi: 10.3390/cells9061368
72. Kong H, Chandel NS. To Claim Growth Turf, mTOR Says SOD Off. *Mol Cell*. 2018;70(3):383-384. doi: 10.1016/j.molcel.2018.04.015
73. Mehdipour M, Etienne J, Chen CC, et al. Rejuvenation of brain, liver and muscle by simultaneous pharmacological modulation of two signaling determinants, that change in opposite directions with age. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(15):5628-5645. doi: 10.18632/aging.102148
74. Elabd C, Cousin W, Upadhyayula P, et al. Oxytocin is an age-specific circulating hormone that is necessary for muscle maintenance and regeneration. *Nat Commun*. 2014;5:4082. doi: 10.1038/ncomms5082
75. Nasi S, Ehirchiou D, Chatzianastasiou A, et al. The protective role of the 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST)-hydrogen sulfide (H2S) pathway against experimental osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2020;22(1):49. doi: 10.1186/s13075-020-02147-6
76. Qabazard B, Sturzenbaum SR. H2S: A New Approach to Lifespan Enhancement and Healthy Ageing? *Handb Exp Pharmacol*. 2015;230:269-287. doi: 10.1007/978-3-319-18144-8_14
77. Fujita Y, Taniguchi Y, Shinkai S, et al. Secreted growth differentiation factor 15 as a potential biomarker for mitochondrial dysfunctions in aging and age-related disorders. *Geriatr Gerontol Int*. 16 Suppl., 2016;1:17-29. doi: 10.1111/ggi.12724
78. Mills KF, Yoshida S, Stein LR, et al. Long-Term Administration of Nicotinamide Mononucleotide Mitigates Age-Associated Physiological Decline in Mice. *Cell Metab*. 2016;24 (6):795-806. doi: 10.1016/j.cmet.2016.09.013
79. Camacho-Pereira J, Tarragó MG, et al. CD38 Dictates Age-Related NAD Decline and Mitochondrial Dysfunction through an SIRT3-Dependent Mechanism. *Cell Metab*. 2016;23(6):1127-1139. doi: 10.1016/j.cmet.2016.05.006
80. Yoshida M, Satoh A, Lin JB, et al. Extracellular Vesicle-Contained eNAMPT Delays Aging and Extends Lifespan in Mice. *Cell Metab*. 2019;30(2):329-342. e325. doi: 10.1016/j.cmet.2019.05.015
81. Lewis-McDougall FC, Ruchaya PJ, Domenjo-Vila E, et al. Aged-senescent cells contribute to impaired heart regeneration. *Aging Cell*. 2019;18 (3):e12931. doi: 10.1111/acer.12931
82. West MD, Sternberg H, Labat I, et al. Toward a unified theory of aging and regeneration. *Regen Med*. 2019;14 (9):867-886. doi: 10.2217/rme-2019-0062
83. Kim DH, Bang E, Arulkumar R, et al. Senoinflammation: A major mediator underlying age-related metabolic dysregulation. *Exp Gerontol*. 2020;134:110891. doi: 10.1016/j.exger.2020.110891
84. Zheng Z, Peng F, Xu B, et al. Risk factors of critical & mortal COVID-19 cases: A systematic literature review and meta-analysis. *J Infect*. 2020;81(2):e16-e25. doi: 10.1016/j.jinf.2020.04.021
85. Willard C. How anti-ageing drugs could boost COVID vaccines in older people. *Nature*. 2020;586(7829):352-354. doi: 10.1038/d41586-020-02856-7
86. Santesmasses D, Castro JP, Zenin AA, et al. COVID-19 is an emergent disease of aging. *Aging Cell*. 2020;19(10):e13230. doi: 10.1111/acer.13230
87. Rodewald HR. The thymus in the age of retirement. *Nature*. 1998;396(6712): 630-631. doi: 10.1038/25251
88. Thomas R, Wang W, Su D M. Contributions of Age-Related Thymic Involution to Immunosenescence and Inflammaging. *Immun Ageing*. 2020;17:2. doi: 10.1186/s12979-020-0173-8
89. Aw D, Hilliard L, Nishikawa Y, et al. Disorganization of the splenic microanatomy in ageing mice. *Immunology*. 2016;148(1): 92-101. doi: 10.1111/imm.12590
90. Kale A, Sharma A, Stolzing A, et al. Role of immune cells in the removal of deleterious senescent cells. *Immun Ageing*. 2020;17:16. doi: 10.1186/s12979-020-00187-9
91. Baz-Martinez M, Da Silva-Álvarez S, Rodríguez E, et al. Cell senescence is an antiviral defense mechanism. *Sci Rep*. 2016;6:37007. doi: 10.1038/srep37007
92. Panneer Selvam S, Roth BM, Nganga R, et al. Balance between senescence and apoptosis is regulated by telomere damage—induced association between p16 and caspase-3. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293 (25):9784-9800. doi:https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003506
93. Orzalli MH, Kagan JC. Apoptosis and Necroptosis as Host Defense Strategies to Prevent Viral Infection. *Trends Cell Biol*. 2017;27(11):800-809. doi: 10.1016/j.tcb.2017.05.007
94. Zheng Y, Liu X, Le W, et al. A human circulating immune cell landscape in aging and COVID-19. *Protein Cell*. 2020;11(10):740-770. doi: 10.1007/s13238-020-00762-2
95. Ruan Q, Yang K, Wang W, et al. Correction to: Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med*. 2020;46(6):1294-1297. doi: 10.1007/s00134-020-06028-z
96. Sargiacomo C, Sotgia F, Lisanti MP. COVID-19 and chronological aging: senolytics and other anti-aging drugs for the treatment or prevention of corona virus infection? *Aging (Albany NY)*. 2020;12 (8):6511-6517. doi: 10.18632/aging.103001
97. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*. 2020;20 (6):363-374. doi: 10.1038/s41577-020-0311-8
98. Piber D, Olmstead R, Cho JHJ, et al. Inflammaging: Age and Systemic, Cellular, and Nuclear Inflammatory Biology in Older Adults. *Journals of Gerontology – Series A Biological Sciences and Medical Sciences*. 2019;74 (11):1716-1724. doi: 10.1093/gerona/glz130
99. Biver E, Berenbaum F, Valdes AM, et al. Gut microbiota and osteoarthritis management: an expert consensus of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO). *Ageing Res Rev*. 2019;100946. doi: 10.1016/j.arr.2019.100946
100. Willis SA, Sargeant JA, Yates T, et al. Acute Hyperenergetic, High-Fat Feeding Increases Circulating FGF21, LECT2, and Fetuin-A in Healthy Men. *J Nutr*. 2020;150(5):1076-1085. doi: 10.1093/jn/nxz333
101. Moeller M, Pink C, Endlich N, et al. Mortality is associated with inflammation, anemia, specific diseases and treatments, and molecular markers. *PLoS One*. 2017;12 (4):e0175909. doi: 10.1371/journal.pone.0175909
102. Hojyo S, Uchida M, Tanaka K, et al. How COVID-19 induces cytokine storm with high mortality. *Inflamm Regen*. 2020;40:37. doi: 10.1186/s41232-020-00146-3
103. Villeda SA, Plambeck KE, Middeldorp J, et al. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nat Med*. 2014;20(6):659-663. doi: 10.1038/nm.3569
104. Zhao J, Legge K, Perlman S. Age-related increases in PGD(2) expression impair respiratory DC migration, resulting in diminished T cell responses upon respiratory virus infection in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(12):4921-4930. doi: 10.1172/jci59777
105. Gschwandtner M, Derler R, Midwood KS. More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. *Front Immunol*. 2019;10, 2759. doi: 10.3389/fimmu.2019.02759
106. Mulholland BS, Forwood MR, Morrison NA. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1/CCL2) Drives Activation of Bone Remodelling and Skeletal Metastasis. *Curr Osteoporosis Rep*. 2019;17 (6):538-547. doi: 10.1007/s11914-019-00545-7
107. Joly-Amado A, Hunter J, Quadri Z, et al. CCL2 Overexpression in the Brain Promotes Glial Activation and Accelerates Tau Pathology in a Mouse Model of Tauopathy. *Front Immunol*. 2020;11:997. doi: 10.3389/fimmu.2020.00997
108. Yousefzadeh MJ, Schafer MJ, Noren Hooten N, et al. Circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 as a potential measure of biological age in mice and frailty in humans. *Aging Cell*. 2018;17(2):e12706. doi: 10.1111/acer.12706

109. Kawamoto D, Amado PPL, Albuquerque-Souza E, et al. Chemokines and cytokines profile in whole saliva of patients with periodontitis. *Cytokine*. 2020;135:155197. doi: 10.1016/j.cyt.2020.155197
110. Wang F, Ye Y, Luo ZY, et al. Diverse expression of TNF- α and CCL27 in serum and blister of Stevens – Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis. *Clinical and Translational Allergy*. 2018;8(1):12. doi: 10.1186/s13601-018-0199-6
111. Riis JL, Johansen C, Vestergaard C, et al. Kinetics and differential expression of the skin-related chemokines CCL27 and CCL17 in psoriasis, atopic dermatitis and allergic contact dermatitis. *Exp Dermatol*. 2011;20(10):789-794. doi: 10.1111/j.1600-0625.2011.01323.x
112. Wang WT, Lee SS, Wang YC, et al. Impaired cutaneous T-cell attracting chemokine elevation and adipose-derived stromal cell migration in a high-glucose environment cause poor diabetic wound healing. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 2018;34(10):539-546. doi: https://doi.org/10.1016/j.kjms.2018.05.002
113. Stout-Delgado HW, Du W, Shirali AC, et al. Aging promotes neutrophil-induced mortality by augmenting IL-17 production during viral infection. *Cell Host Microbe*. 2009;6(5):446-456. doi: 10.1016/j.chom.2009.09.011
114. Li Q, Ding S, Wang YM, et al. Age-associated alteration in Th17 cell response is related to endothelial cell senescence and atherosclerotic cerebral infarction. *Am J Transl Res*. 2017;9(11):5160-5168.
115. Blauvelt A, Chiricozzi A. The Immunologic Role of IL-17 in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Pathogenesis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2018;55(3):379-390. doi: 10.1007/s12016-018-8702-3
116. Cătană CS, Berindan Neagoe I, Cozma V, et al. Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2015;21(19):5823-5830. doi: 10.3748/wjg.v21.i19.5823
117. Abdel-Moneim A, Bakery HH, Allam G. The potential pathogenic role of IL-17/Th17 cells in both type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother*. 2018;101:287-292. doi: 10.1016/j.biopha.2018.02.103
118. Rybtsov SA, Lagarkova MA. Development of Hematopoietic Stem Cells in the Early Mammalian Embryo. *Biochemistry (Mosc.)*. 2019;84(3):190-204. doi: 10.1134/s0006297919030027
119. Peshkova IO, Aghayev T, Fatkhullina AR, et al. IL-27 receptor-regulated stress myelopoiesis drives abdominal aortic aneurysm development. *Nat Commun*. 2019;10(1):5046. doi: 10.1038/s41467-019-13017-4
120. He H, Xu P, Zhang X, et al. Aging-induced IL27Ra Signaling Impairs Hematopoietic Stem Cells. *Blood*. 2020; 9;136(2):183-198. doi: 10.1182/blood.2019003910
121. Miura K, Saita E, Suzuki-Sugihara N, et al. Plasma interleukin-27 levels in patients with coronary artery disease. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96 (43), e8260. doi: 10.1097/md.00000000000008260
122. Yousef H, Czupalla CJ, Lee D, et al. Aged blood impairs hippocampal neural precursor activity and activates microglia via brain endothelial cell VCAM1. *Nat Med*. 2019;25(6):988-1000. doi: 10.1038/s41591-019-0440-4
123. Lee WJ, Chen LK, Liang CK, et al. Soluble ICAM-1, Independent of IL-6, Is Associated with Prevalent Frailty in Community-Dwelling Elderly Taiwanese People. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157877. doi: 10.1371/journal.pone.0157877
124. Gragnano F, Sperlongano S, Golia E, et al. The Role of von Willebrand Factor in Vascular Inflammation: From Pathogenesis to Targeted Therapy. *Mediators Inflamm*. 2017;5620314. doi: 10.1155/2017/5620314
125. Wu MD, Atkinson TM, Lindner JR. Platelets and von Willebrand factor in atherogenesis. *Blood*. 2017;129 (11):1415-1419. doi: 10.1182/blood-2016-07-692673
126. Prata L, Ovsyannikova IG, Tchkonja T, Kirkland JL. Senescent cell clearance by the immune system: Emerging therapeutic opportunities. *Semin Immunol*. 2018;40:101275. doi: 10.1016/j.smim.2019.04.003
127. Chirco KR, Potempa LA. C-Reactive Protein As a Mediator of Complement Activation and Inflammatory Signaling in Age-Related Macular Degeneration. *Front Immunol*. 2018;9:539. doi: 10.3389/fimmu.2018.00539
128. Lee S, Choe JW, Kim HK, Sung J. High-sensitivity C-reactive protein and cancer. *J Epidemiol*. 2011;21(3):161-168. doi: 10.2188/jea.je20100128
129. Liao C, Gao W, Cao W, et al. Associations of Metabolic/Obesity Phenotypes with Insulin Resistance and C-Reactive Protein: Results from the CNTR. Study. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2021;14:1141-1151. doi: 10.2147/dms.s298499
130. Cui C, Sun J, Pawitan Y, et al. Creatinine and C-reactive protein in amyotrophic lateral sclerosis, multiple sclerosis and Parkinson's disease. *Brain Commun*. 2020;2 (2):fcaa152. doi: 10.1093/braincomms/fcaa152
131. Foster MC, Inker LA, Levey AS, et al. Novel filtration markers as predictors of all-cause and cardiovascular mortality in US adults. *Am J Kidney Dis*. 2013;62(1):42-51. doi: 10.1053/j.ajkd.2013.01.016
132. Liu ZY, Shen YY, Ji LJ, et al. Association between serum β 2-microglobulin levels and frailty in an elderly Chinese population: results from RuLAS. *Clin Interv Aging*. 2017;12:1725-1729. doi: 10.2147/cia.s142507
133. Rebo J, Mehdipour M, Gathwala R, et al. A single heterochronic blood exchange reveals rapid inhibition of multiple tissues by old blood. *Nat Commun*. 2016;7:13363. doi: 10.1038/ncomms13363
134. Spencer ME, Jain A, Matteini A, et al. Serum levels of the immune activation marker neopterin change with age and gender and are modified by race, BMI, and percentage of body fat. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010;65(8): 858-865. doi: 10.1093/gerona/glq066
135. Zhang B, Gems D. Gross ways to live long: Parasitic worms as an anti-inflammaging therapy? *Elife*. 2021;10. doi: 10.7554/eLife.65180
136. Castellano JM, Mosher KI, Abbey RJ, et al. Human umbilical cord plasma proteins revitalize hippocampal function in aged mice. *Nature*. 2017;544(7651):488-492. doi: 10.1038/nature22067
137. Luo H, Xiang Y, Qu X, et al. Apelin-13 Suppresses Neuroinflammation Against Cognitive Deficit in a Streptozotocin-Induced Rat Model of Alzheimer's Disease Through Activation of BDNF-TrkB Signaling Pathway. *Front Pharmacol*. 2019;10:395. doi: 10.3389/fphar.2019.00395
138. Zhou H, Yang R, Wang W, et al. Fc-apelin fusion protein attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury in mice. *Scientific Reports*. 2018;8(1):11428. doi: 10.1038/s41598-018-29491-7
139. Guo Y, Li P, Gao L, et al. Kallistatin reduces vascular senescence and aging by regulating microRNA-34a-SIRT1 pathway. *Aging Cell*. 2017;16(4):837-846. doi: 10.1111/acer.12615
140. Biran A, Zada L, Abou Karam P, et al. Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging Cell*. 2017;16(4):661-671. doi: 10.1111/acer.12592
141. Rasmussen LJH, Caspi A, Ambler A, et al. Association Between Elevated suPAR, a New Biomarker of Inflammation, and Accelerated Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2021;18;76(2):318-327. doi: 10.1093/gerona/glaa178
142. Leng SX, McElhaney JE, Walston JD. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2008;63(8): 879-884. doi: 10.1093/gerona/63.8.879
143. Zhang S, Hu B, Xia X, et al. Highly Sensitive Detection of PCV2 Based on Tyramide Signals and GNPL Amplification. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2019;24(23):4364. doi: 10.3390/molecules24234364
144. Wang JY, Chen MH, Sheng ZC. Development of colloidal gold immunochromatographic signal-amplifying system for ultrasensitive detection of Escherichia coli O157:H7 in milk. *RSC Advances*. 2015;5(76):62300-62305. doi: 10.1039/c5ra13279g
145. Sun W, Hu X, Liu J, et al. A novel multi-walled carbon nanotube-based antibody conjugate for quantitative and semi-quantitative lateral flow assays. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2017;81(10): 1874-1882. doi: 10.1080/09168451.2017.1365590
146. Ohmuro-Matsuyama Y, Ueda H. Homogeneous Noncompetitive Luminescent Immunodetection of Small Molecules by Ternary Protein Fragment Complementation. *Anal Chem*. 2018;90(5):3001-3004. doi: 10.1021/acs.analchem.7b05140
147. Baraket A, Lee M, Zine N, et al. A fully integrated electrochemical biosensor platform fabrication process for cytokines detection. *Biosens Bioelectron*. 2017;93:170-175. doi: 10.1016/j.bios.2016.09.023
148. Platcek M, Lu Q, Tran H, Xie W. Comparative Analysis of Multiple Immunoassays for Cytokine Profiling in Drug Discovery. *SLAS Discov*. 2020;25(10):1197-1213. doi: 10.1177/2472555220954389
149. Lombardelli L, Logiodice F, Kullolli O, Piccinni M P. Evaluation of Secreted Cytokines by Multiplex Bead-Based Assay (X MAP Technology, Luminex). *Methods Mol Biol*. 2021;2285:121-130. doi: 10.1007/978-1-0716-1311-5_10
150. Severins I, Szczepaniak M, Joo C. Multiplex Single-Molecule DNA Barcoding Using an Oligonucleotide Ligation Assay. *Biophys J*. 2018;115(6):957-967. doi: 10.1016/j.bpj.2018.08.013
151. Zhang Y, Lai BS, Juhas M. Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications. *Molecules*. 2019;24(5):941. doi: 10.3390/molecules24050941