

УТВЕРЖДАЮ:

Директор

Автономной научной
некоммерческой организации
высшего образования научно-
исследовательский центр

"Санкт-Петербургский институт

биорегуляции и геронтологии

з.д.н. РФ, академик РАН,

доктор медицинских наук, профессор

В.Х. Хавинсон

20 сентября 2023 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Автономной научной некоммерческой организации высшего образования научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»

Диссертация «Пептидная регуляция дифференцировки и старения хондроцитов» выполнена в лаборатории молекулярных механизмов старения отдела биogerонтологии АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии». В период подготовки диссертации и по настоящее время соискатель Мякишева Светлана Николаевна работает в АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» научным сотрудником. С.Н. Мякишева в 1996 г. окончила ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная медицинская академия имени И.И. Мечникова», специальность – медико-профилактическое дело, квалификация – врач-гигиенист, эпидемиолог.

С.Н. Мякишева является соискателем АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» без окончания аспирантуры. Справка о сдаче кандидатских экзаменов АПО-236 от 11.09.2023 г. выдана в Академии постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России. Научный руководитель: з.д.н. РФ, д.м.н., профессор Рыжак Галина Анатольевна – заведующая лабораторией возрастной клинической патологии отдела клинической геронтологии и гериатрии, заместитель директора АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» по научной работе и новым технологиям.

По итогам обсуждения диссертации Мякишевой Светланы Николаевны «Пептидная регуляция дифференцировки и старения хондроцитов» принято следующее заключение.

Представленная диссертационная работа Мякишевой Светланы Николаевны состоит из введения, содержащего актуальность проведенной

работы, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждений, заключения, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Текст диссертации изложен на 91 странице, содержит 15 рисунков, 2 таблицы. Список литературы содержит 135 источников, из них на русском языке – 14, на английском языке – 121.

Диссертационная работа С.Н. Мякишевой выполнена на высоком научном уровне с использованием современных экспериментальных методов. Все результаты, представленные в диссертации, получены при непосредственном участии автора.

Личный вклад автора в диссертационное исследование состоял в разработке дизайна исследования, проведении экспериментов, статистической обработке и анализе данных. Автор принимала участие во всех исследованиях, включавших в себя культивирование клеток, иммуноцитохимическое исследование культур хондроцитов, лазерную сканирующую конфокальную микроскопию, морфометрию, ПЦР в режиме реального времени. Автор также принимала участие в анализе данных, статистической обработке полученных результатов исследования, написании статей, тезисов, выступлениях с докладами на международных и отечественных конференциях.

Актуальность. Патология опорно-двигательного аппарата является одной из наиболее часто встречающихся у лиц пожилого и старческого возраста. Известно, что остеоартрит (ОА) встречается у 60% лиц старше 60 лет и у 80% людей старше 75 лет. ОА приводит к нарушению двигательной активности, необходимости эндопротезирования и, в конечном итоге, к социальной дезадаптации и инвалидизации. Поиск эффективных и безопасных пептидных биорегуляторов для нормализации функций хрящевой ткани у лиц старших возрастных групп является актуальной задачей биогеронтологии. Перспективными геро- и хондропротекторами являются полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей (ППКХ) и пептид AED (H-Ala-Glu-Asp-H), входящий в его состав.

ППКХ и входящий в его состав трипептид AED показали высокую эффективность в экспериментальных моделях заболеваний опорно-двигательного аппарата (ОА, остеопороз, остеохондроз и др.) *in vivo*. Пептид AED нормализовал плотность костной ткани при остеопорозе за счет регуляции функции кальцитонинпродуцирующих клеток щитовидной железы. Механизмом действия ППКХ и пептида AED является их способность снижать синтез проапоптотического белка p53 и повышать синтез белка пролиферации PCNA в хондроцитах. Молекулярный механизм

хондропротекторной активности пептидов при клеточном старении в настоящее время не изучен. В связи с этим изучение влияния ППКХ и пептида AED на функциональную активность хондроцитов при старении *in vitro* является актуальной задачей биогеронтологии.

Научная новизна. В работе впервые показано, что пептид AED в эффективной концентрации 200 нг/мл повышал количество хондроцитов в культурах, полученных от молодых и старых крыс, соответственно в 1,4-1,8 и 1,6-2,1 раза по сравнению с контролем. ППКХ в эффективной концентрации 2000 нг/мл стимулировал пролиферацию хондроцитов в культурах, полученных от молодых и старых крыс, соответственно в 1,7-2,2 и 1,8-2,5 раза по сравнению с контролем. Впервые изучено влияние ППКХ и пептида AED на экспрессию генов SOX9, COL2A1, COMP, ACAN и синтез белков хондрогенной дифференцировки SOX9, агрекана, коллагена II типа и COMP в культуре МСК человека при репликативном старении. Пептид AED в концентрации 200 нг/мл активирует экспрессию генов и синтез всех исследуемых белков при старении МСК. Для ППКХ этот эффект достигается в концентрации 2000 нг/мл. Впервые охарактеризован SASP хондроцитов и проведена сравнительная оценка влияния пептида AED и ППКХ на этот показатель. Установлено, что SASP хондроцитов характеризуется повышением синтеза проапоптотических белков p16, p21, p53, провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 α , и снижением синтеза SIRT1. Впервые установлено, что пептиды AED и ППКХ нормализуют синтез молекул, формирующих секреторный фенотип хондроцитов, ассоциированный со старением. Установлено, что молекулярные механизмы геро- и хондропротекторного действия ППКХ и пептида AED обусловлены снижением синтеза проапоптотических белков p16, p21, p53, провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 α и повышением экспрессии гистоновой деацетилазы SIRT1 в хондроцитах.

Практическая значимость. Исследование влияния ППКХ и пептида AED на пролиферацию хондроцитов, полученных от молодых и старых крыс, на экспрессию генов и синтез белков хондрогенной дифференцировки МСК человека, а также влияния ППКХ и пептида AED на SASP хондроцитов позволило установить, что ППКХ и пептид AED обладают геро- и хондропротекторными свойствами в исследованиях *in vitro*. Эти эффекты пептидов достигаются за счет снижения синтеза проапоптотических белков p16, p21, p53, провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 α и увеличения экспрессии фермента SIRT1, регулирующего активность транскрипционных факторов в хондроцитах. Полученные результаты демонстрируют перспективы применения изученных веществ в качестве хондро- и

геропротекторных препаратов нового поколения, эффективно стимулирующих репарацию хрящевой ткани при ее старении и ассоциированных с возрастом заболеваниями, в том числе ОА.

Достоверность полученных результатов подтверждается корректной, общепринятой статистической обработкой результатов экспериментальных измерений, а также положительными результатами практического использования данных, представленных в настоящем диссертационном исследовании.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем. По материалам диссертации опубликованы 10 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования материалов диссертационных исследований и международных журналах, входящих в базы данных PubMed, Web of Science, Scopus, 1 статья в сборнике и 5 тезисов докладов. Наиболее значимые работы:

1. Linkova N., Khavinson V., Diatlova A., Myakisheva S., Ryzhak G. Peptide Regulation of Chondrogenic Stem Cell Differentiation. Int. J. Mol. Sci. Special Issue «New Trend in the Research of Short Peptides». 2023. Vol. 24. P. 8415. <https://doi.org/10.3390/ijms24098415>.
2. Мякишева С.Н., Линькова Н.С., Кожевникова Е.О., Полякова В.О., Рыжак Г.А. Пептиды предотвращают формирование секреторного фенотипа хондроцитов, ассоциированного со старением // Успехи геронтологии. 2023. Т. 36. № 2. С. 234–238.
3. Мякишева С.Н., Линькова Н.С., Дятлова А.С., Полякова В.О., Рыжак Г.А. Влияние пептидов на хондрогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток человека при репликативном старении // Успехи геронтологии. 2023. Т. 36. № 2. С. 383–390.
4. Мякишева С.Н., Линькова Н.С., Кожевникова Е.О., Рыжак Г.А. Секреторный фенотип хондроцитов, ассоциированный со старением: роль в патогенезе остеоартрита и перспективы пептидной биорегуляции// Успехи геронтологии. 2023. Т. 36. № 2. С. 313–323.

Апробация и реализация диссертации. Основные результаты диссертационного исследования были доложены на XV Научно-практической конференции «Пушковские чтения – 2019. Актуальные вопросы геронтологии и гериатрии» (Санкт-Петербург, 2019); на IV международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии» (Сочи, 2021); на XV Международном форуме «Старшее поколение» (Санкт-Петербург, 2022); на Юбилейной научно-практической конференции «ИЭПиТ 2022. Вчера, сегодня, завтра» (Сухум, Абхазия, 2022).

Соответствие диссертации заявленной специальности. Диссертация «Пептидная регуляция дифференцировки и старения хондроцитов» соответствует паспорту специальности 3.1.31. - Геронтология и гериатрия (биологические науки), и областям исследования: пункту 2 -

Изучение процессов формирования биологического и хронологического возраста, старения и старости. Основные механизмы физиологического, преждевременного, патологического старения, а также пункту 4 - Разработка принципов профилактической геронтологии и гериатрии, методов и средств профилактики преждевременного старения. Обоснование принципов, разработка методов и средств увеличения продолжительности жизни и продления активного периода жизни.

По актуальности, новизне, научной и практической значимости, объему исследований, глубине анализа и обобщения материала диссертационная работа Мякишевой Светланы Николаевны полностью соответствует требованиям п. 9 и п. 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней...», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. в актуальной редакции, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.31 – Геронтология и гериатрия. Диссертация «Пептидная регуляция дифференцировки и старения хондроцитов» Мякишевой Светланы Николаевны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.31 – Геронтология и гериатрия. Заключение принято на заседании Проблемной комиссии АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии». Присутствовало на заседании - 11 чел. Результаты голосования: «за» - 07 чел., «против» - 0 чел., «воздержалось» - 0 чел., протокол №8 от 14 сентября 2023 г.

Заместитель Председателя Проблемной комиссии
АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт
биорегуляции и геронтологии»
доктор биол. наук

И.Г. Попович

Ответственный секретарь Проблемной комиссии
АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт
биорегуляции и геронтологии»
засл. деят. науки РФ,
доктор биол. наук, профессор

Т.В. Кветная

Подписи з.д.н. РФ, д.б.н., проф. Т.В. Кветной, д.б.н. И.Г. Попович заверяю.

Начальник ОК АННО ВО НИЦ «СПБИИЗ



М.В. Соколова

197110, Россия, Санкт-Петербург, пр. Динамо, д. 3;
телефон (рабочий): +7 (812) 230 – 00-49
адрес электронной почты: ibg@gerontology.ru
«19» сентября 2023 г.