

УТВЕРЖДАЮ:

Директор
Автономной научной
некоммерческой организации
высшего образования Научно-
исследовательский центр
"Санкт-Петербургский институт
биорегуляции и геронтологии
з.д.н. РФ, член-корр. РАН,
доктор медицинских наук, профессор
В.Х. Хавинсон

«04»  2020 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Автономной научной некоммерческой организации
высшего образования Научно-исследовательского центра
«Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»**

Диссертация «Секреторный фенотип, ассоциированный со старением (SASP): молекулярные механизмы инволюции клеток эндометрия *in vitro*» выполнена в лаборатории функциональной морфологии отдела клеточной биологии и патологии АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии».

В период подготовки диссертации соискатель Родичкина Валерия Руслановна работает научным сотрудником в АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» в лаборатории функциональной морфологии.

В.Р. Родичкина является соискателем АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» без окончания аспирантуры. Научный руководитель – заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор медицинских наук Кветной Игорь Моисеевич – работает руководителем отдела клеточной биологии и патологии АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии».

По итогам обсуждения диссертации Родичкиной Валерии Руслановны «Секреторный фенотип, ассоциированный со старением (SASP): молекулярные механизмы инволюции клеток эндометрия *in vitro*» принято следующее заключение:

Представленная диссертационная работа Родичкиной Валерии Руслановны состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Текст диссертации изложен на 111 страницах и иллюстрирован 31 рисунками. Список литературы содержит 177 источников, из них на русском языке – 5, на английском – 172.

Диссертационная работа Родичкиной В.Р. выполнена на высоком научном уровне с использованием современных экспериментальных методов.

Все результаты, представленные в диссертации, получены при непосредственном участии автора.

Личный вклад автора Личный вклад автора в диссертационное исследование состоял в составлении дизайна работы, проведении опытов, статистической обработке и анализе полученных данных. Автор самостоятельно выполнила выделение и последующее культивирование клеток эндометрия, индуцирование генотоксического стресса, иммунофлуоресцентное окрашивание, визуализацию образцов с помощью световой и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, морфометрию, статистическую обработку и анализ данных сравнительного изучения экспрессии маркеров SASP в клетках эндометрия женщин молодого и старшего репродуктивного возраста. Автором самостоятельно написан текст диссертации, вклад в подготовку статей и тезисов докладов превышает 75%.

Актуальность. Бурное развитие и широкое внедрение в биомедицину молекулярно-биологических методов верификации экспрессии генов, кодирующих синтез сигнальных молекул, гормонов, цитокинов, ферментов и других факторов позволили создать новое прикладное направление – *молекулярную морфологию* и, тем самым, значительно расширить возможности рутинной гистологической диагностики.

Знание нарушений экспрессии конкретных сигнальных молекул, от которых зависит развитие, прогноз и таргетная терапия болезней позволяет повысить объективизацию диагностики, оценить прогноз заболевания, избрать патогенетический метод лечения социально-значимой патологии.

Старение – сложный биологический процесс, основным аспектом которого является накопление соматических изменений в организме в течение жизни. Поздний репродуктивный возраст ассоциирован с бесплодием и возможными осложнениями наступления и течения беременности. Старение на клеточном и органном уровнях негативно влияет на репродуктивную функцию. Доказано, что иммунные клетки играют ключевую роль в функционировании репродуктивной системы, наступлении и течении беременности. Наиболее изученными маркерами иммунологического старения являются NF-κB, IL-1, IL-6, IL-8, TGFβ.

«Клеточное старение» - это состояние, при котором клетки подвергаются необратимой остановке клеточного цикла в ответ на различные клеточные стрессы. Как только клетки начинают стареть, они становятся устойчивы к любым мутагенам, включая онкогенные факторы. Поэтому предполагается, что клеточное старение является мощным противоопухолевым механизмом.

Необратимый арест клеточного цикла считается основной характеристикой стареющих клеток, но недавние исследования выявили

дополнительные особенности, характеризующие данный тип клеток. Стареющие клетки экспрессируют провоспалительные цитокины, факторы роста и матриксные металлопротеиназы, которые в совокупности формируют ассоциированный со старением секреторный фенотип (SASP). Такие клетки жизнеспособны *in vitro*, в отличие от апоптотических клеток, которые подвергаются запрограммированной клеточной гибели. Некоторые SASP факторы играют важную роль в возникновении устойчивой остановки клеточного цикла в стареющих клетках, и предположительно, способствуют опухолевой супрессии при клеточном старении. Тем не менее, многие SASP факторы могут вызвать хроническое воспаление и/или онкогенез, в зависимости от биологического контекста.

В 2014 году С. Franceschi был предложен новый термин «инфламэйджинг» (“inflammaging”), который характеризует хроническое, слабовыраженное воспалительное состояние, протекающее бессимптомно и являющееся деструктивным для организма. По основным признакам инфламэйджинг значительно отличается от острого воспаления.

Особенностью клеток с фенотипом SASP является его динамичное развитие с течением времени. Генетические изменения, такие как потеря p53 или усиление онкогенного RAS, приводят к более быстрому приобретению фенотипа SASP, что позволяет предположить, что SASP является специфической программой, запускаемой генотоксическим стрессом. В культуре клетки приобретают полный SASP через 3-5 дней после индукции старения, и рост клеток прекращается в течение 24 часов после повреждения. Не все факторы SASP начинают секретироваться одновременно. Этот постепенный фенотипический переход является признаком, сохраняемым между типами клеток и индукторами старения. По данным литературы, остановка клеточного цикла в фазе G1 и уменьшение количества клеток в фазе G2-M во всех клетках наблюдается через 6 часов после УФ-облучения. Общепринятой моделью генотоксического стресса является УФ-облучение, которое запускает реакцию повреждения ДНК (DDR), что рассматривается как индукция γ H2AX не только в клетках S-, но и в клетках G1-фазы.

Одним из сдерживающих факторов исследований в области инфламэйджинга является отсутствие признанных, точных и надежных биологических маркеров. Основными характеристиками биологических маркеров старения являются следующие: (1) маркер связан с возрастом; (2) экспрессия маркера не изменяется с заболеванием; (3) маркер не изменяется с метаболическими и питательными условиями; (4) на маркер влияют процессы старения; (5) маркер не изменяется в иммортализованных клетках. Расширение исследований биологических маркеров старения позволит уточнить молекулярные механизмы инфламэйджинга и определить роль данного феномена в процессе общего старения организма.

Известно большое количество молекул и сигнальных путей, задействованных в механизмы старения. Однако вовлеченность этих факторов в процессы инфламэйджинга и их роль в репродуктивном старении остается недостаточно изученной. Для определения тканевой и возрастной экспрессии маркеров старения, необходимо проанализировать панель из маркеров характерных для SASP: TGF β , IL-6, IL-8, IL-1a, NF- κ B, MMP3 два классических маркера клеточного старения – p16 и p53, а также провести исследования экспрессии молекул, которые могут быть задействованы в механизмах старения, а именно Ki-67, PCNA, Bcl-2, SIRT1,6, TERF-1, CALR.

В настоящей работе проведено изучение экспрессии сигнальных молекул в клетках эндометрия при их старении *in vitro* для расширения представлений о формировании SASP фенотипа и его роли в механизмах инфламэйджинга репродуктивной системы человека.

Научная новизна. В работе впервые проведено сравнительное изучение экспрессии ключевых сигнальных молекул, задействованных в механизмах старения: TGF β , IL-6, IL-8, IL-1a, p65, MMP3, p16, p53, Ki-67, PCNA, BCL-2, SIRT1,6, TERF-1, CALR в клетках эндометрия в возрастном аспекте и при воздействии генотоксического стресса. При исследовании молекул IL-8, SIRT1,6, Ki-67, CALR в клеточной культуре эндометрия впервые было обнаружено, что при переходе от молодого к старшему репродуктивному возрасту их концентрация статистически значимо уменьшалась. При этом экспрессия молекул IL-1a, p65, PCNA и TERF-1 статистически значимо повышалась с возрастом. Концентрация TGF β , IL-6, MMP3, BCL-2 в эндометрии не зависела от возраста. Экспрессия белков p53 и p16 в нормальном эндометрии была незначительна в обеих возрастных группах.

Впервые было обнаружено статистически значимое увеличение экспрессии белков TGF β , IL-6, IL-8, IL-1a, MMP3, p16, p53, p65, BCL-2 и снижение экспрессии белков Ki-67, PCNA, SIRT1,6, TERF-1 в клеточной культуре эндометрия молодого и старшего репродуктивного возраста при воздействии генотоксического стресса. Впервые было продемонстрировано статистически значимое увеличение экспрессии белков IL-1a и p53 и снижение экспрессии белка TERF-1 в клеточной культуре эндометрия под воздействием генотоксического стресса в группе старшего репродуктивного возраста по сравнению с группой молодого репродуктивного возраста.

Практическая значимость. Результаты исследований особенностей экспрессии молекул, характерных для фенотипа SASP в клеточной культуре эндометрия существенно дополняют представления о механизмах инфламэйджинга, происходящих в репродуктивной системе в возрастном аспекте. Исследования ряда молекул, вовлечённых в механизмы старения и инфламэйджинга, позволяют расширить понятие о воспалительном старении и выявить новые сигнальные молекулы, характеризующие данный фенотип клеток.

Верификация новых сигнальных молекул, характеризующих фенотип SASP (которые могут рассматриваться в качестве потенциальных терапевтических мишеней) открывает перспективы для оптимизации и повышения эффективности профилактических и лечебных геропротекторных программ.

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 опубликована 21 научная работы: в том числе 11 статей в журналах, рекомендованных ВАК Министерством науки и высшего образования Российской Федерации для опубликования материалов диссертационных исследований, 10 тезисов докладов. Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Активность овариальной ароматазы: методы оценки и клиническое значение в протоколах экстракорпорального оплодотворения / П.П. Яковлев, Ю.С. Крылова, И.Д. Мекина, В.О. Полякова, И.М. Кветной, М.А. Тарасова, И.Ю. Коган, А.М. Гзгзян, В.Р. Родичкина // Журнал акушерства и женских болезней. – 2018. – Т. 67, № 2. – С. 61-69.
2. Новые подходы к оценке эндометриальной дисфункции / Э.К. Айламазян, Г.Х. Толибова, Т.Г. Траль, И.Ю. Коган, М.И. Ярмолинская, А.А. Цыпурдеева, В.Р. Родичкина, И.М. Кветной // Журнал акушерства и женских болезней. – 2017. – Т. 66, № 3. – С. 8-15.
3. Иммуногистохимическая верификация кисспептинов и их рецептора в органах плода человека в период внутриутробного развития / В.Р. Родичкина, Т.С. Клейменова, А.О. Дробинцева, В.О. Полякова, Р.П. Костюченко, И.М. Кветной // Онтогенез. – 2017. – Т. 48, № 3. – С. 203-210.
4. Кисспептины в ткани яичника человека в онтогенезе / А. О. Дробинцева, В. О. Полякова, В. Р. Родичкина, И. М. Кветной. // Успехи геронтологии. – 2019. – Т. 32, № 4. – С. 524-529.
5. Родичкина, В.Р. Изучение маркеров апоптоза в яичниках при внутриутробном развитии / В.Р. Родичкина, А.О. Дробинцева // Журнал акушерства и женских болезней. – 2017. – Т. 66, № 1. – С. 143-144.
6. Родичкина, В.Р. Оценка рецепторного профиля эндометрия у пациенток с неразвивающейся беременностью I триметра в анамнезе / В.Р. Родичкина, Г.Х. Толибова, Т.Г. Траль // Журнал акушерства и женских болезней. – 2016. – Т. 65, № 1. – С. 43-44.

7. Родичкина, В.Р. Inflammaging – молекулярно-клеточные механизмы старения женской репродуктивной системы /В.Р. Родичкина, И.М. Кветной, В.О. Полякова // Молекулярная медицина. – 2019. – Т. 17, №3. – С. 8-14.
8. Родичкина, В.Р. Иммуногистохимическая верификация системы KISS1/KISS1R в органах плода человека / В.Р. Родичкина, А.О. Дробинцева // Журнал акушерства и женских болезней. – 2016. – Т. 65, № 1. – С. 84-85.
9. Экспрессия сигнальных молекул в эндометрии человека: оптимизация имплантационной восприимчивости под действием аллогенного гидролизата плаценты / И.М. Кветной, Т.С. Клейменова, В.Р. Родичкина, А.О. Дробинцева, В.О. Полякова, А.А. Цыпурдеева, М.Р. Оразов, С.Р. Поликарпова // Молекулярная медицина. – 2018. – Т. 16, № 1. – С. 37-43.
10. Immunohistochemical verification of kisspeptins and their receptor in human fetal organs during prenatal development / Rodichkina V.R., Kostyuchenko R.P., Kleimenova T.S., Drobintseva A.O., Polyakova V.O., Kvetnoy I.M. // Russian Journal of Developmental Biology. – 2017. – Т. 48, № 3. – С. 169-175.
11. Inflammaging of female reproductive system: molecular landscape / V. Rodichkina, I. Kvetnoy, V. Polyakova, A. Arutjunyan, R. Nasyrov, D. Ivanov // Current Aging Science. 2020 (in press).

Апробация работы. Результаты диссертационного исследования доложены на Международной научно-практической молодёжной конференции «Наука XXI века: новый подход» (Санкт-Петербург, 2016); Международной конференции «Репродуктивная медицина: взгляд молодых» (Санкт-Петербург, 2016); XV Международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в современном мире (Москва, 2016); «XI Международном конгрессе по репродуктивной медицине» (Москва, 2017); XI Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Санкт-Петербург, 2017); XXXI Международном конгрессе с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» (Москва, 2018); Конгрессе с международным участием «Здоровые дети – будущее страны» (Санкт-Петербург, 2018); 18th ISGE World Congress 2018 (Florence, Italy, 2018); 31st European Congress of Pathology (Nice, France, 2019); XX Юбилейном Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и Дитя-2019» (Москва, 2019).

Соответствие диссертации специальности.

По актуальности, новизне, научной и практической значимости, объему исследований, глубине анализа и обобщения материала диссертационная работа Родичкиной Валерии Руслановны полностью соответствует требованиям п. 9 и п. 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней...» утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изм., утв. 21.04.2016 г. №335, от

01.10.2018 г. №1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.30 – геронтология и гериатрия.

Диссертация «Секреторный фенотип, ассоциированный со старением (SASP): молекулярные механизмы инволюции клеток эндометрия *in vitro*» Родичкиной Валерии Руслановны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.30 – геронтология и гериатрия.

Заключение принято на заседании Проблемной комиссии АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии». Присутствовало на заседании - 13 чел. Результаты голосования: «за» - 13 чел., «против» - 0 чел., «воздержалось» - 0 чел., протокол №03 от «27» марта 2020 г.

Председатель Проблемной комиссии
АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт
биорегуляции и геронтологии»
засл. деят. науки РФ, д.м.н., профессор



Г.А. Рыжак

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

Т.В. Кветная