

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ ЭКСПЕРТНОЙ КОМИССИИ

диссертационного совета Д 521.103.01 при АННО ВО НИЦ  
«Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»  
по диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
РОДИЧКИНОЙ Валерии Руслановны на тему: «СЕКРЕТОРНЫЙ  
ФЕНОТИП, АССОЦИИРОВАННЫЙ СО СТАРЕНИЕМ (SASP):  
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИНВОЛЮЦИИ КЛЕТОК  
ЭНДОМЕТРИЯ IN VITRO»

Для рассмотрения работы В.Р. Родичкиной была создана комиссия из членов диссертационного совета в составе: з.д.н. РФ, д.м.н., проф. Г.А. Рыжак (председатель); з.д.н. РФ, д.б.н., проф. А.В. Арутюнян; д.б.н. И.Г. Попович.

Комиссия ознакомилась с диссертацией и представленными документами.

Работа выполнена в лаборатории функциональной морфологии отдела клеточной биологии и патологии Автономной научной некоммерческой организации высшего образования Научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» (АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии») при участии научного руководителя з.д.н. РФ, д.м.н., проф. И.М. Кветного.

Диссертация была апробирована 27 марта 2020 г. протокол № 3 на совместном заседании отделов биogerонтологии, клеточной биологии и патологии, клинической геронтологии и гериатрии АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» и рекомендована к защите в Диссертационном совете Д 521.103.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций по специальности: 14.01.30 – геронтология и гериатрия.

**Актуальность исследования.** Современные представления о механизмах возникновения и развития заболеваний человека за последние 20 лет значительно расширились – от классических локальных этиопатогенетических представлений до анализа роли и влияния более 1000 биологически активных сигнальных молекул, синтезируемых различными клетками организма.

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- $\kappa$ B, IL-1, IL-6, IL-8, TGF $\beta$ .

«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  $\gamma$ 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 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-1a, NF- $\kappa$ B, MMP3; два

классических маркера клеточного старения – p16, 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.

**Наиболее значимые результаты, полученные в работе.** При переходе от молодого к старшему репродуктивному возрасту усиливается экспрессия белков IL-1a, p65, PCNA и TERF-1 в клеточной культуре эндометрия. Экспрессия белков IL-8, SIRT1, SIRT6, Ki-67, CALR в клеточной культуре эндометрия уменьшается с увеличением репродуктивного возраста. Экспрессия белков p53 и p16 в нормальной клеточной культуре эндометрия не идентифицируется или находится на незначительных уровнях.

После воздействия генотоксического стресса значительно увеличивается экспрессия белков, ответственных за регулировку клеточного цикла и ассоциированных со старением - TGFβ, IL-6, IL-8, IL-1a, MMP3, p16, p53, p65, BCL-2, при этом экспрессия PCNA, SIRT1,6, TERF-1 снижается, а экспрессия белка Ki-67 – ключевого маркера клеточной пролиферации находится на незначительном уровне.

В клеточной культуре эндометрия под воздействием генотоксического стресса в группе старшего репродуктивного возраста экспрессия белков IL-1a и p53 увеличивается, а TERF-1 снижается по сравнению с группой молодого репродуктивного возраста.

Усиление экспрессии белка IL-1a коррелирует с высокими уровнями экспрессии белков p65, p16 и p53. Обратная пропорциональная зависимость показателей экспрессии характерна для SIRT1 и p53, p16 и Ki-67.

Фенотип SASP, характерный для инфламэйджинга, может быть существенно расширен с включением в него таких молекул как Ki-67, PCNA, SIRT-1, SIRT-6, TERF, CALR, экспрессия которых достоверно ассоциирована с развитием генотоксического стресса.

**Новизна работы.** В работе впервые проведено сравнительное изучение экспрессии ключевых сигнальных молекул, задействованных в механизмах старения: TGFβ, 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 $\beta$ , IL-6, MMP3, BCL-2 в эндометрии не зависела от возраста. Экспрессия белков p53 и p16 в нормальной эндометрии была незначительна в обеих возрастных группах.

Впервые было обнаружено статистически значимое увеличение экспрессии белков TGF $\beta$ , 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 и теоретическая 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.

***Результаты исследования используются*** в научно-исследовательской работе АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии».

***Рекомендации для дальнейшего использования результатов, полученных в работе.*** «Клеточное старение» способствует прогрессирующему снижению репродуктивной функции у женщин, снижая качество ооцитов, нарушая регуляторные механизмы в тканях репродуктивной системы, таких как желтое тело, яичники, фаллопиевы трубы и матка, и увеличению риска возникновения осложнений во время беременности. Необходимо продолжить исследования в данной области для расширения знаний о влиянии процессов инфламэйджинга на репродуктивную функцию с целью достижения эффективной регуляции беременности и преодоления снижения фертильности, связанной со старением. 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.

По материалам диссертации Родичкиной В.Р. опубликована 21 научная работа: в том числе 11 статей в журналах, рекомендованных ВАК Министерством науки и высшего образования Российской Федерации для опубликования материалов диссертационных исследований, 10 тезисов докладов.

**Заключение.** Проведенные исследования свидетельствуют о важной роли сигнальных молекул, продуцируемых паракринно в клетках эндометрия, в регуляции процессов старения.

При этом фенотип клеток, характеризующий явление инфламэйджинга должен быть существенно расширен с включением в него вышеизученных молекул. Полученные нами данные впервые показывают их ключевое значение в развитии инфламэйджинга.

Паракринные факторы, включая TGF- $\beta$  имеют решающее значение для регуляции MMPs в эндометрии. Экспрессия белка TGF- $\beta$  статистически значимо отличается в группе при воздействии генотоксического стресса по сравнению с группой контроля как до 30 лет, так и в группе старшего репродуктивного возраста. Аналогичная динамика регистрируется и при оценке показателя относительной площади экспрессии для MMP3. Напротив, воспалительные цитокины, такие как IL-1 $\alpha$ , могут блокировать регуляцию MMP-3. Повреждение ДНК при ультрафиолетовом облучении стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6 и IL-8, активируя сигнальный путь NF- $\kappa$ B, блокируя клеточный цикл, индуцируя и поддерживая фенотип клеточного старения. При воздействии генотоксического стресса наблюдаются наибольшие значения экспрессии p65 (NF- $\kappa$ B) в группах до и после 30 лет, которые статистически значимо превосходят аналогичные показатели в группах контроля в 7,2 и 2,9 раз, соответственно.

Клеточный ответ на генотоксические агенты включает повышение уровня и активности белка-супрессора опухоли p53. Известно, что после активации p53 ингибирует репликацию генома в неблагоприятных условиях, регулируя прогрессирование клеточного цикла и жизнеспособность клеток, тем самым предотвращая пролиферацию клеток с поврежденными генами.

При воздействии генотоксического стресса относительная площадь экспрессии SIRT-1 статистически достоверно снижается, при этом наблюдается значительное усиление экспрессии белка p53. SIRT1, деацетилируя p53, подавляет его транскрипционную активность, предотвращая тем самым апоптоз.

Ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA) является высококонсервативным клеточным белком, который функционирует как в репликации ДНК, так и в репарации ДНК. При воздействии генотоксического стресса на клеточную культуру эндометрия, зарегистрировано снижение уровней PCNA через 72 часа. Эти данные свидетельствуют о сложном клеточном ответе на повреждение ДНК, при котором p53 временно активирует экспрессию PCNA с целью ограниченной репарации ДНК. В популяции нерастущих клеток с пониженным уровнем PCNA этот путь может иметь решающее значение для выживания после повреждения ДНК.

Стареющие клетки используют различные механизмы выживания, чтобы оставаться жизнеспособными после повреждения ДНК. Такие механизмы включают различные сигнальные пути, участвующие в регуляции баланса выживания и апоптоза. Эти особенности делают стареющие клетки гораздо более зависимыми от путей выживания, чем их нестареющие аналоги, что служит обоснованием для разработки сенолитических препаратов, которые нацелены на устранение стареющих клеток без воздействия на покоящиеся и пролиферирующие клетки.

***В качестве официальных оппонентов предлагаются:***

Полевщиков Александр Витальевич, доктор биологических наук, профессор, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», отдел иммунологии, заведующий отделом.

Виноградова Ирина Анатольевна, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», кафедра фармакологии, организации и экономики фармации медицинского института, заведующая кафедрой.

В качестве ведущей организации предлагается ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Предлагается список специалистов, которым необходимо направить автореферат в дополнение к основному списку рассылки:

ФИО, ученая степень, звание	Должность, место работы
Ильницкий Андрей Николаевич, д.м.н., проф.	Зав. кафедрой терапии, гериатрии и антивозрастной медицины Академии постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России.
Павлова Татьяна Васильевна, д.м.н., проф.	Зав. кафедрой патологии, АОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»
Марков Александр Георгиевич, д.б.н., проф.	Зав. кафедрой общей физиологии, ФГОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»
Ноздрачев Александр Данилович, академик РАН, д.б.н., проф.	Профессор кафедры общей физиологии, ФГОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»
Федорина Татьяна Александровна	Зав. кафедрой патологии, ФГОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет»

Предполагаемый срок защиты:

«20» ноября 2020 г.

**Председатель комиссии:**

заслуженный деятель науки РФ,  
доктор медицинских наук, профессор



Г.А. Рыжак

**Члены комиссии:**

заслуженный деятель науки РФ,  
доктор биологических наук, профессор  
доктор биологических наук



А.В. Арутюнян  
И.Г. Попович

Подписи з.д.н. РФ, проф., д.м.н. Г.А. Рыжак,  
з.д.н. РФ, проф., д.б.н. А.В. Арутюняна,  
д.б.н. И.Г. Попович заверяю  
начальник о/к АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский  
институт биорегуляции и геронтологии»

«14» сентября 2020 г.



М.В. Соколова