

На правах рукописи

**ГРИГОРЯН
Инна Юрьевна**

**ЭКСПРЕССИЯ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ
В КЛЕТКАХ ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА
ПРИ СТАРЕНИИ *IN VITRO***

14.01.30 – геронтология и гериатрия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2018

Работа выполнена в отделе клеточной биологии и патологии
Автономной научной некоммерческой организации
высшего образования научно-исследовательский центр
«Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»

Научный руководитель:

заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор
Кветной Игорь Моисеевич

Научный консультант:

профессор РАН,
доктор биологических наук, профессор
Полякова Виктория Олеговна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, доцент Ильницкий Андрей Николаевич,
заведующий кафедрой терапии, гериатрии и антивозрастной медицины
ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации» ФМБА России.

доктор биологических наук, профессор Белушкина Наталья Николаевна,
старший научный сотрудник лаборатории регенеративной биомедицины
ФГБУН "Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН"

Ведущая научная организация:

ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ.

Защита диссертации состоится «18» мая 2018 г. в 14.00 часов
на заседании Диссертационного Совета Д 521.103.01 в АННО ВО НИЦ
«Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» по адресу:
197119, Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте АННО
ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»
<http://www.gerontology.ru>.

Автореферат разослан « » 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета,
доктор биологических наук,
профессор

Козина Людмила Семеновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Изучение молекулярно-клеточных механизмов нейроиммуноэндокринной регуляции функциональной активности эндометрия при его возрастной инволюции является актуальной задачей молекулярной и репродуктивной медицины, т.к. при нарушении функции эндометрия возникает ряд таких социально-значимых заболеваний как бесплодие и онкологическая патология репродуктивной системы женщин [Артымук Н.В. и др., 2007].

Понимание молекулярных механизмов нейроиммуноэндокринной регуляции функций эндометрия в норме, при старении и патологии позволит разработать новые, эффективные и безопасные способы диагностики и лечения указанных заболеваний [Пальцев М.А., Кветной И.М., 2014]. Циклические изменения эндометрия во время менструального цикла обусловлены функционированием нейроиммуноэндокринной системы, молекулярные связи в которой с возрастом нарушаются. Эти молекулярно-клеточные проявления старения регуляторных систем организма лежат в основе возрастной инволюции эндометрия и являются одной из причин развития гиперпластических процессов [Tilly J.L., Sinclair D.A., 2013].

Нервная и эндокринная системы объединяются гипоталамусом, нейросекреторные клетки которого занимают промежуточное положение между нервными и железистыми. Различают 2 вида гипоталамических секретов, влияющих на гормонообразующие функции гипофиза - релизинг-факторы и ингибирующие факторы. Гипоталамус осуществляет свое влияние на периферический эндокринный аппарат через гипофиз, который, в свою очередь, выделяет гонадотропные гормоны (фолликулостимулирующий, лютеинизирующий и пролактин). До периода полового созревания базальная секреция гонадотропных гормонов происходит без участия гипоталамуса.

При достижении половой зрелости гипоталамические секреты обуславливают последовательное (циклическое) повышение продукции гонадотропных гормонов, что обеспечивает рост и созревание фолликула, овуляцию, образование желтого тела и сопровождается повышением количества эстрогенов в 1 фазу. При старении женской репродуктивной системы уровень синтеза гипофизарных и гипоталамических гормонов изменяется, а чувствительность к ним клеток-мишеней снижается [Cho N.H. et al., 2004].

Установлено, что гиперпластические изменения в эндометрии возникают в результате нарушения нейроэндокринной регуляции, вследствие чего резко изменяется соотношение гонадотропных и половых гормонов. В

основе образования гиперплазий эндометрия может лежать возрастное нарушение овуляции. По мере старения организма увеличивается активность гипоталамического центра, регулирующего секрецию фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) [Priyanka H.P. et al., 2013].

Секреция ФСГ возрастает, вызывая компенсаторное усиление деятельности яичников: яичники начинают в возрастающем количестве выделять вместо классических эстрогенов (эстрадиола и эстрона) так называемые неклассические фенолстероиды. В последних работах В.Я. Бохмана имеется сообщение о том, что источником гиперэстрогении (особенно в менопаузе) следует считать избыточную массу тела и обусловленную этим повышенную ароматизацию андрогенов в эстрогены в жировой ткани. Таким образом, неспецифические для репродуктивной системы нарушения жирового обмена опосредовано, через измененный стероидогенез, приводят к гиперэстрогении и возникновению гиперпластических процессов эндометрия.

Уровень экспрессии сигнальных молекул эндометрия отражает его функциональное состояние в норме, при старении и различной патологии. Кроме того, верифицированные в эндометрии молекулярные маркеры позволяют проследить процессы нейроиммуноэндокринной регуляции эндометрия, что является важнейшим условием его нормального функционирования. Так, в норме в эндометрии человека синтезируются эстроген, прогестерон, эстрадиол, прогестин, молекулы клеточной адгезии, факторы роста, цитокины, маркеры различных субпопуляций иммунных клеток, муцины и белки теплового шока.

Изменение уровня экспрессии указанных сигнальных молекул лежит в основе таких социально-значимых заболеваний и возрастной патологии как эндометриоз, новообразования эндометрия и бесплодие. Понимание фундаментальных молекулярных механизмов регуляции функций эндометрия широко используется для решения актуальных задач акушерства и гинекологии и молекулярной медицины. Однако в настоящее время вопрос о том, какие именно сигнальные молекулы участвуют в процессе старения эндометрия, до сих пор остается недостаточно изученным.

Цель и задачи исследования

Целью диссертационного исследования явилось изучение возрастных особенностей экспрессии сигнальных молекул в эндометрии при его старении.

Для достижения указанной цели были поставлены и последовательно решены следующие задачи:

1. Оценить динамику экспрессии маркеров к эстрогенам и прогестерону в эндометрии женщин разного возраста.
2. Изучить пролиферативную способность эндометрия по экспрессии маркера Ki67 в эндометрии женщин разного возраста.
3. Охарактеризовать особенности апоптоза (белки Fas-L, p53, Caspase-3) в эндометрии женщин разного возраста.
4. Оценить экспрессию функционального потенциала клеток эндометрия у женщин разного возраста по количеству CD34⁺ полипотентных клеток.
5. Разработать новые подходы к молекулярной диагностике возрастных изменений эндометрия.

Научная новизна

Впервые показано, что с возрастом в эндометрии изменяется экспрессия различных сигнальных молекул, участвующих в регуляции пролиферации (Ki67), апоптоза (Fas-L, p53, Caspase-3), эндокринных взаимоотношениях (рецепторы к прогестерону и эстрогену), неоваскулогенезе (CD34).

Установлено, что наибольшим возрастным изменениям, в 6-8 раз, подвержена экспрессия молекул Ki67 и CD34 у женщин при переходе от среднего к пожилому возрасту (ранняя менопауза). Впервые сделано заключение о том, что снижение пролиферативной активности эндометрия, обусловленное нарушением процесса неоваскулогенеза, является одной из причин ускоренного старения и снижения функциональной активности эндометрия. Кроме того, впервые показано возрастное нарастание процесса апоптоза в эндометрии, характеризующееся гиперэкспрессией молекул p53 и Caspase-3.

Полученные данные впервые позволили установить, что восприимчивость к гормонам в эндометрии у женщин с возрастом снижается. Установлено, что в эндометрии женщин пожилого возраста количество рецепторов к эстрогенам и прогестерону в 2 раза ниже по сравнению с данными показателями у молодых женщин, что указывает на нарушение эндокринной функции этой ткани. Эти данные позволили дополнить сведения об атрезии фолликулов в менопаузальном периоде, которые, не достигая зрелости, погибают. Проведенное нами исследование позволило установить, что на молекулярном уровне атрезия фолликулов связана со снижением экспрессии рецепторов к эстрогенам и прогестерону. Установленное нами уменьшение количества рецепторов к гормонам в эндометрии снижает риск развития гиперплазии и онкологических

заболеваний эндометрия у женщин среднего и пожилого возраста по сравнению с молодыми женщинами.

Практическая значимость

Установлено, что пролиферативный маркер Ki67, проапоптотический протеин p53 и рецепторы к эстрогену и прогестерону являются наиболее значимыми маркерами для оценки возрастных изменений функции эндометрия. Значительные изменения экспрессии сигнальных молекул, отражающих процессы клеточного обновления - Ki67 и p53, вероятно, связано с тем, что с возрастом происходит смещение процессов клеточного обновления эндометрия в сторону усиления клеточной гибели, снижения способности клеток к делению и увеличения вероятности образования опухолей или других заболеваний эндометрия.

Установлено, что с возрастом происходит снижение пролиферативного потенциала эндометрия, т.е. снижение экспрессии маркеров CD34 и Ki67. Важно отметить, что дисбаланс между пролиферацией и апоптозом является важным фактором в развитии различных форм патологий эндометрия, особенно в пожилом возрасте.

Полученные данные позволили установить, что восприимчивость к гормонам в эндометрии у женщин с возрастом снижается. Гормонально-рецепторный статус – важнейшая характеристика, определяющая клиническое течение эндометриальной патологии, в частности, выживаемость больных эндометриоидным раком тела матки.

Положения, выносимые на защиту

1. При переходе от молодого (фертильного) к пожилому (менопаузальному) возрасту в эндометрии наблюдается снижение экспрессии рецепторов к эстрогенам и прогестерону, причем для рецепторов к эстрогенам этот процесс более выражен. Это свидетельствует о снижении эндокринной функции эндометрия при старении.
2. Экспрессия пролиферотропного протеина Ki67 в эндометрии при переходе от молодого к среднему возрасту снижается в 2 раза, а при переходе от среднего к пожилому – в 8 раз. Таким образом, период менопаузы характеризуется резким снижением процессов клеточного обновления в эндометрии.
3. При оценке возрастной динамики апоптоза в эндометрии было установлено, что у женщин пожилого возраста по сравнению с молодым и зрелым возрастом повышается экспрессия p53 и Caspase-3,

однако экспрессия Fas-L не изменяется. Таким образом, в пожилом возрасте возрастает интенсивность апоптоза в эндометрии, при этом, иммунологическая функция эндометрия (по оценке экспрессии Fas-L не нарушается).

4. С возрастом в эндометрии резко снижается численность субпопуляции CD34⁺ полипотентных клеток, что указывает, с одной стороны, на снижение способности эндометриальных клеток к дифференцировке и с другой стороны – на замедление процессов неоваскулогенеза.

Связь с научно-исследовательской работой Института

Диссертационная работа является научной темой, выполняемой по основному плану НИР АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии».

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 3 глав, обсуждения, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Текст диссертации изложен на 105 страницах, иллюстрирован 18 рисунками. Список литературы содержит 159 источников, из них отечественных – 63, зарубежных – 96.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования материалов диссертационных исследований, 1 монография, 7 тезисов докладов.

Апробация и реализация диссертации

Материалы диссертации доложены на XIX Международной научно-практической конференции «Пожилой больной. Качество жизни» (Санкт-Петербург, 2014); на Международной научно-практической конференции «Пушковские чтения» (Санкт-Петербург, 2014); на Международном научно-практическом форуме «Старшее поколение» (Санкт-Петербург, 2015); Российской научно-практической конференции с международным участием «Проблемы возрастной патологии в арктическом регионе: биологические, клинические и социальные аспекты», (Якутия, 2016); Научно-практической конференции «Инновационные российские технологии в геронтологии и гериатрии», посвященной 25-летию Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии (Санкт-Петербург, 2017).

Личный вклад автора

Личный вклад автора в диссертационное исследование состоял в планировании, проведении экспериментов, статистической обработке и анализе данных по экспрессии различных сигнальных молекул в клетках эндометрия при его старении в культуре. В ходе выполнения исследования отработана и стандартизирована методика создания первичной культуры эндометрия человека с последующим применением метода иммуноцитохимии и световой микроскопии.

Автор принимала участие во всех экспериментах, включавших культивирование клеток, их окрашивание, микроскопию, морфометрию и статистический анализ данных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика исследуемого материала

Для создания культур клеток эндометриальная ткань была получена из матки женщин при профилактическом обследовании в ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта» (Санкт-Петербург, Россия). В соответствии с возрастной классификацией ВОЗ женщины были разделены на 3 возрастные группы: молодой возраст (22-35 лет, 55 человек), средний (45-55 лет, 53 человека) и пожилой возраст (60-74 года, 40 человек). Таким образом, в исследовании участвовало 148 человек.

От каждой женщины получали по 3 образца эндометрия. Молодые женщины служили контрольной группой, относительно которой оценивали возрастные изменения экспрессии сигнальных молекул эндометрия у женщин двух других групп. У молодых женщин, имеющих нормальный менструальный цикл, эндометрий забирали на 13 день от начала цикла. У женщин среднего возраста (предклимактерический период) постоянного менструального цикла зарегистрировать не удалось. У большинства пациенток цикл был с перерывами в 2-3 месяца, однако забор материала также осуществлялся на 13 день от начала цикла. У женщин пожилого возраста, вступивших в климактерический период, забор материала осуществлялся без учета цикла. Возрастная группа 36-44 года была нами исключена из рассмотрения, поскольку старение репродуктивной системы у женщин имеет значительные индивидуальные особенности, которые наиболее выражены именно в этом периоде.

Культивирование клеток

Для получения клеточной суспензии ткань эндометрия измельчали на фрагменты около 1 мм и затем подвергали ферментативной обработке 0,1% раствором коллагеназы I типа (Gibco). Время инкубации ткани составило 20–30 мин при комнатной температуре. Затем действие фермента нейтрализовали добавлением питательной среды DMEM/F12 с 10% эмбриональной телячьей сывороткой, после чего суспензию центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин. Полученный осадок ресуспензировали в ростовой среде DMEM/F12 с 15% эмбриональной телячьей сыворотки. Далее суспензию эндометриальных клеток переносили в культуральные флаконы объемом 25 см³ (Биолот). Посевная концентрация составляла 1 млн клеток на см².

Культивирование эндометриальных клеток человека проводили во всех случаях в идентичных условиях, в среде DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и гентамицина (50 мкг/мл). Выделение первичной культуры проводилось на чашках Петри (Sarstedt) обработанных раствором фибриногена (Gibco), последующее культивирование проводилось во флаконах с обработанной поверхностью объемом 50 мл (Sarstedt 25 см²). Клетки выращивались в 5 мл культуральной среды на флакон и в 3 мл культуральной среды на чашку Петри диаметром 3,5 см, в 1 мл на одну лунку 24-луночного плншета.

Через 5-7 дней первичная культура достигала монослоя и проводилась процедура ее пересевания по следующей методике: культуральная среда удалялась из чашки Петри (флакона) с помощью стерильной пипетки. Для удаления остатков среды и мертвых клеток проводилась промывка в двух сменах DPBS без Ca²⁺ и Mg²⁺ по 3 мл на чашку Петри и по 5 мл на флакон. Для снятия клеток с подложки использовался раствор версена (Биолот), который добавляли по 500 мкл на чашку Петри и по 1 мл на флакон, время действия 3-5 мин при температуре 37°C. Открепление клеток контролировалось под микроскопом. Для блокирования ферментативной реакции добавляли культуральную среду по 3 мл на чашку Петри и по 5 мл на флакон. Затем суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 1G. Этот пассаж считали нулевым. Посевная концентрация составляла примерно 3x10⁵.

В течение первых трех дней каждые 24 часа проводили смену среды. Клетки культивировали в стандартных условиях при 37° С и 5% CO₂. Смену среды проводили каждые 2–3 дня. По достижении клетками 80% конфлюэнтного монослоя их рассевали с концентрацией 150–200 клеток на см². Пересев проводили с помощью 0,25% раствора трипсина с ЭДТА.

Клетки выращивали до 3 пассажа. Все полученные данные подвергали морфометрическому и иммуоцитохимическому анализу.

Имуоцитохимический метод

Для определения экспрессии сигнальных молекул культивируемые эндометриальные клетки были исследованы методом иммуоцитохимии. Клетки дважды промывали в фосфатно-солевом буфере (pH 7,5) в течение 5 мин. Затем клетки фиксировали 96% этиловым спиртом, охлажденным до -20°C . Блокада эндогенной пероксидазы проводилась следующим образом. Чашки Петри с культурами заливали 2 мл 3% водного раствора перекиси водорода (H_2O_2) на 15 мин, а затем дважды промывали в фосфатно-солевом буфере (pH 7,5) по 5 мин. Далее образцы инкубировали с первичными (специфичными) антителами. В качестве первичных антител были взяты моноклональные мышинные антитела к рецептору эстрогена (ER) (Dako, 1:30), рецептору прогестерона (PR) (Novocastra, 1:50), Fas-L (Dako, 1:100), p53 (Dako, 1:50), Caspase-3 (Novocastra, 1:150), CD34 (Dako, 1:75), Ki67 (Dako, 1:50). Инкубацию со всеми антителами проводили при комнатной температуре в течение 1ч. Затем следовала промывка в двух сменах фосфатно-солевого буфера по 5 мин и инкубирование 30 мин со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой (EnVision Detection System, Peroxidase/DAB, Rabbit, Mouse). В качестве вторичных антител использовали универсальный набор, содержащий биотинилированные антимышьи иммуноглобулины (EnVision Detection System, Peroxidase/DAB, Mouse). Для выявления пероксидазы хрена применяли диаминобензидин. Проявление реакции контролировали под микроскопом.

Выбор использованных в работе маркеров к сигнальным молекулам был обусловлен их информативностью в ткани эндометрия. Так маркер пролиферации клеток Ki67 и проапоптотический протеин p53 характеризуют процессы клеточного обновления в эндометрии в норме и гиперплазии. Fas-L играет важную роль в регуляции иммунного ответа и развития патологий в эндометрии таких, как гиперплазия эндометрия, образование железистых полипов. CD34 характеризует ангиогенез, который необходим для обеспечения пролиферации и репарации эндометрия в течение менструального цикла. Как было сказано, функциональная активность эндометрия в большей степени зависит от гормональных воздействий. В связи с этим мы проводили оценку экспрессии рецепторов к эстрогену и прогестерону. Отношение ER/PR используется для определения бесплодия и гиперплазии. Каспаза-3 играет важную роль при заболеваниях, связанных с

нарушением апоптоза, в первую очередь, в развитии злокачественных опухолей и других неопластических процессов.

Морфометрические исследования и компьютерный анализ микроскопических изображений

Для оценки результатов иммуногистохимического окрашивания проводили морфометрическое исследование с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящей из микроскопа Nikon Eclipse E400, цифровой камеры Nikon DXM1200, персонального компьютера на базе Intel Pentium 4 и программного обеспечения Vidiotest Morphology 5.0». В каждом случае анализировали 5 полей зрения при увеличении 400. Относительную площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах.

Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка всех экспериментальных данных включала в себя подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала для каждой выборки и проводилась в Statistica 7.0. Для анализа вида распределения использовали критерий Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's W-test). Для проверки статистической однородности нескольких выборок были использованы непараметрические процедуры однофакторного дисперсионного анализа (критерий Крускала-Уоллиса). В случаях, когда дисперсионный анализ выявлял статистически значимую неоднородность нескольких выборок, для последующего выявления неоднородных групп применяли процедуры множественных сравнений с помощью критерия Манна-Уитни. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии различий) принимали равным 0,05.

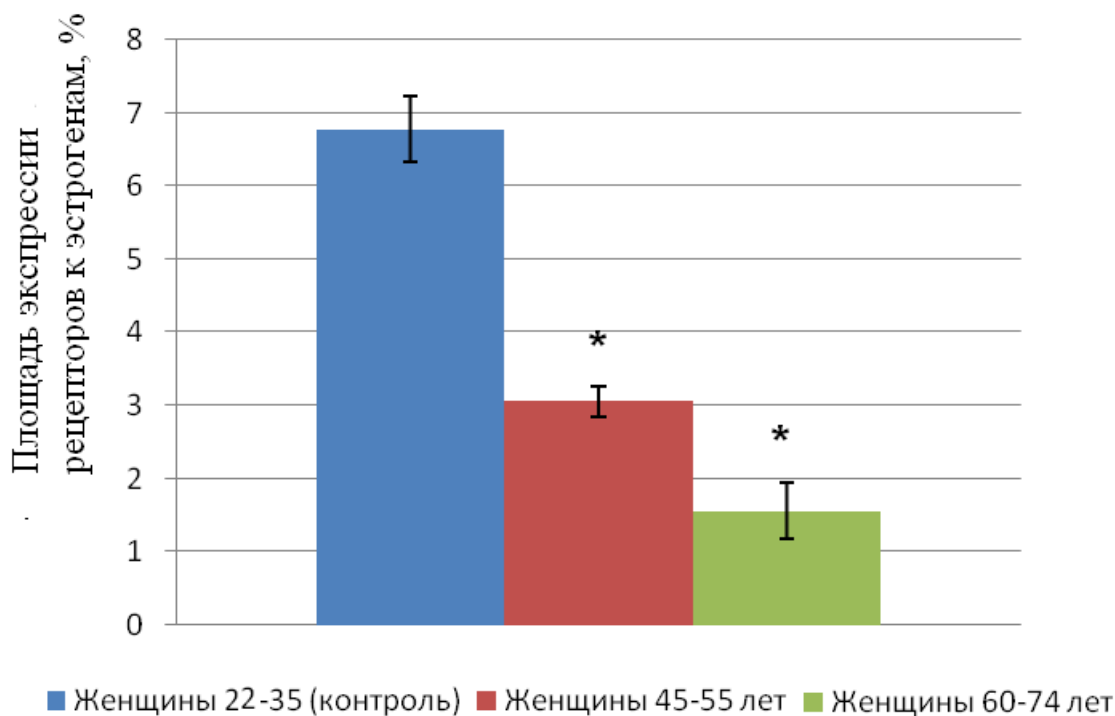
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия рецепторов к эстрогенам в эндометрии женщин разного возраста

На рисунке 1 представлена площадь экспрессии рецепторов к эстрогенам у женщин трех возрастных групп. Наиболее интенсивный уровень экспрессии рецепторов к эстрогенам наблюдался у молодых женщин в возрасте от 22 до 35 лет и составил $6,78 \pm 0,45\%$. У женщин среднего возраста (45-55 лет) и у женщин пожилого возраста (60-74 года) наблюдалось существенное снижение уровня экспрессии рецепторов к

эстрогенам в 2, 21 и в 4, 34 раза соответственно по сравнению с контрольной группой.

Как видно из графика, с возрастом количество рецепторов к эстрогенам в ткани эндометрия существенно снижается, что свидетельствует о снижении чувствительности ткани эндометрия к эстрогенам.



* - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в контроле
Рисунок 1. Площадь экспрессии рецепторов к эстрогенам (ER) в эндометрии у женщин разного возраста.

На рисунках 2А и 2Б представлены микрофотографии культуры клеток эндометрия у молодых женщин (22-35 лет) и женщин в предклимактерическом периоде (45-55 лет), окрашенные антителами к рецепторам эстрогенов. Более интенсивная окраска на рисунке 2А свидетельствует о более интенсивном уровне экспрессии рецепторов к эстрогенам у молодых женщин, по сравнению с уровнем экспрессии рецепторов к эстрогенам у женщин среднего возраста (рисунок 2Б).

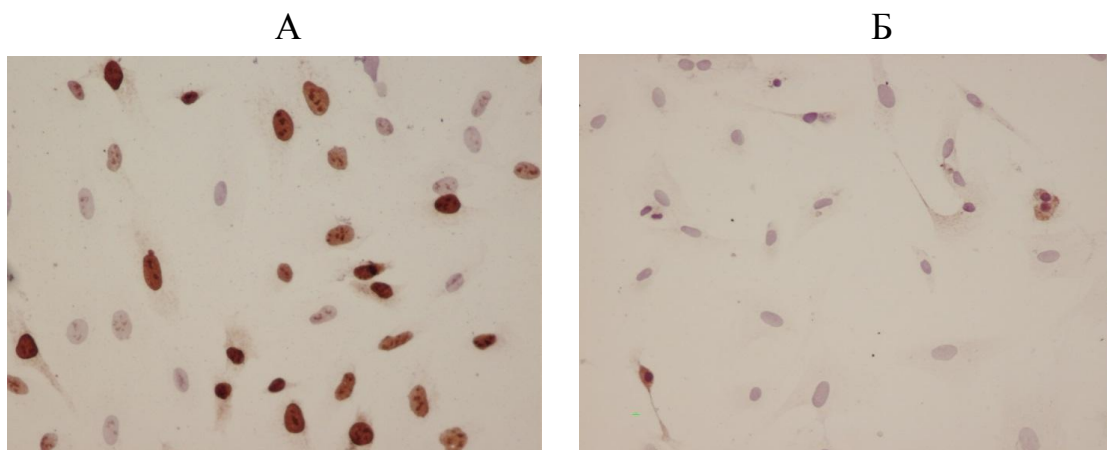
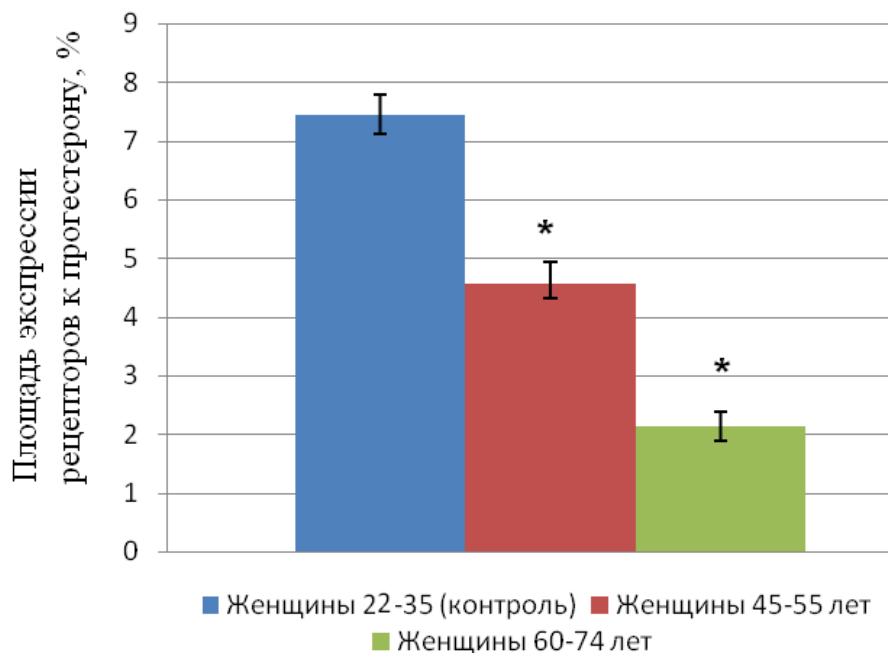


Рисунок 2. Экспрессия рецепторов к эстрогенам в эндометрии, иммуноцитохимия, $\times 400$: А - женщины в возрасте 22-35 лет, Б - женщины в возрасте 45-55 лет.

Экспрессия рецепторов к прогестерону в эндометрии женщин разного возраста

На рисунке 3 представлена площадь экспрессии рецепторов к прогестерону у женщин трех возрастных групп. Наиболее интенсивный уровень экспрессии наблюдался у женщин в возрасте от 22 до 35 лет и составил $7,45 \pm 0,34\%$.

При этом у женщин в предклимактерическом периоде (45-55 лет) и женщин в климактерическом периоде (60-74 года) наблюдалось значительное снижение уровня экспрессии рецепторов к прогестерону в 1,63 (до $4,57 \pm 0,37\%$) и 3,5 раза (до $2,13 \pm 0,25\%$) соответственно.



* - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в контроле
Рисунок 3. Площадь экспрессии рецепторов к прогестерону (PR) в эндометрии у женщин разного возраста.

Экспрессия Fas-L в эндометрии женщин разного возраста

Нами была изучена экспрессия Fas-L у женщин трех возрастных групп. Уровень экспрессии у женщин в возрасте 22-35 лет и 45-55 лет находится на одинаковом уровне и составляет $0,83 \pm 0,09\%$ и $0,84 \pm 0,22\%$ соответственно. При этом у женщин пожилого возраста (60-74 года) наблюдалось незначительное снижение уровня экспрессии Fas-L по сравнению с молодыми женщинами и женщинами среднего возраста.

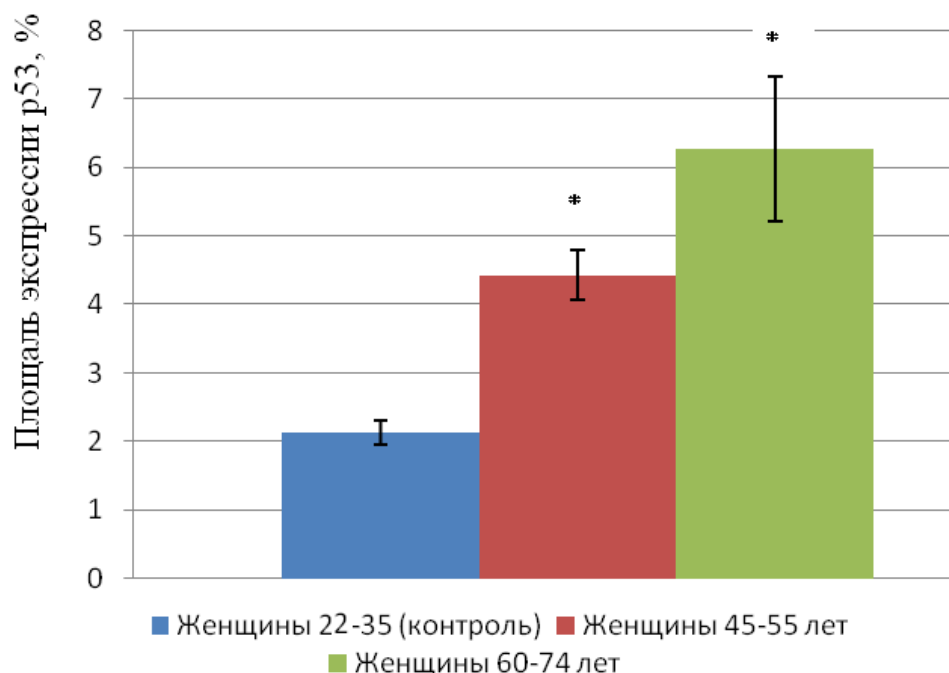
Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что регуляция апоптоза клетками иммунной системы в эндометрии с возрастом не изменяется, что свидетельствует о том, что Fas-L не является информативным показателем при изучении этого процесса у женщин различных возрастных групп.

Экспрессия p53 в эндометрии женщин разного возраста

На рисунке 10 представлена площадь экспрессии проапоптотического протеина p53 у женщин трех возрастных групп. Уровень экспрессии этого белка у женщин в возрасте от 22 до 35 лет составляет $2,13 \pm 0,18\%$.

При этом у женщин в среднем возрасте (45-55 лет) и пожилом возрасте (60-74 года) наблюдалось значительное повышение уровня экспрессии белка p53 в 2,1 и 3,1 раза соответственно по сравнению с уровнем исследуемого

маркера у молодых женщин, что свидетельствует об увеличении апоптотических процессов в эндометрии.



* - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в контроле

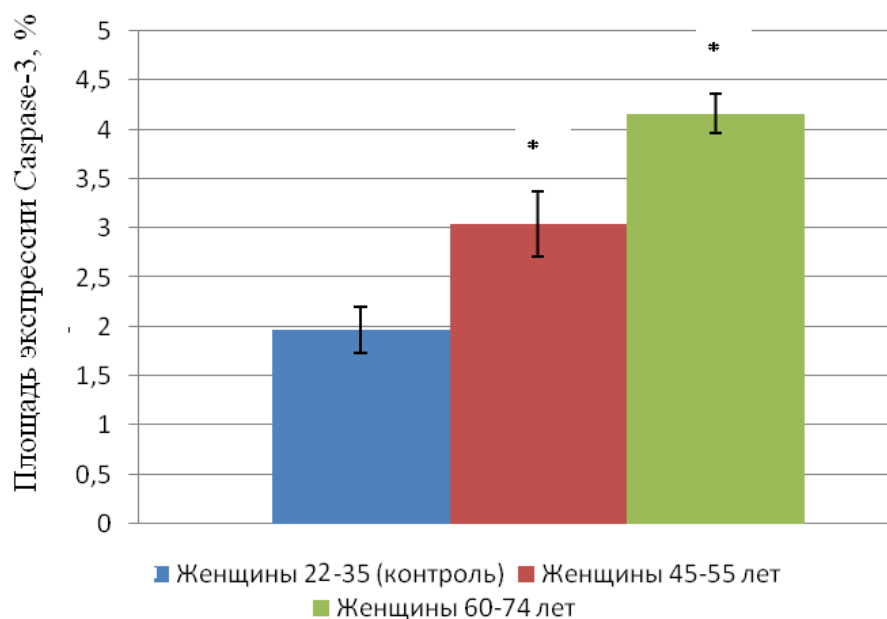
Рисунок 4. Площадь экспрессии p53 в эндометрии у женщин разного возраста.

Экспрессия Caspase-3 в эндометрии женщин разного возраста

При изучении площади экспрессии Caspase-3 выявлено достоверное увеличение уровня апоптоза в культурах клеток эндометрия при старении (рисунок 5).

Полученные данные позволяет предположить, что повышение количества клеток эндометрия, входящих в апоптоз свидетельствует о снижении его функциональной активности, так как количество функционально активных клеток при этом снижается.

На рисунке 5 представлена площадь экспрессии Caspase - 3, белка, экспрессия которого индуцируется прогестероном, принимающего участие в реализации программы апоптоза в клетках у женщин трех возрастных групп. В наименьшей степени уровень экспрессии этой сигнальной молекулы наблюдался у женщин в возрасте от 22 до 35 лет и составил $1,97 \pm 0,24\%$. При этом, у женщин среднего возраста (45-55 лет) и женщин пожилого возраста (60-74 года) наблюдалось значительное повышение уровня экспрессии Caspase-3 в 1,54 (до $3,04 \pm 0,33\%$) и 2,11 раза (до $4,16 \pm 0,20\%$) соответственно.



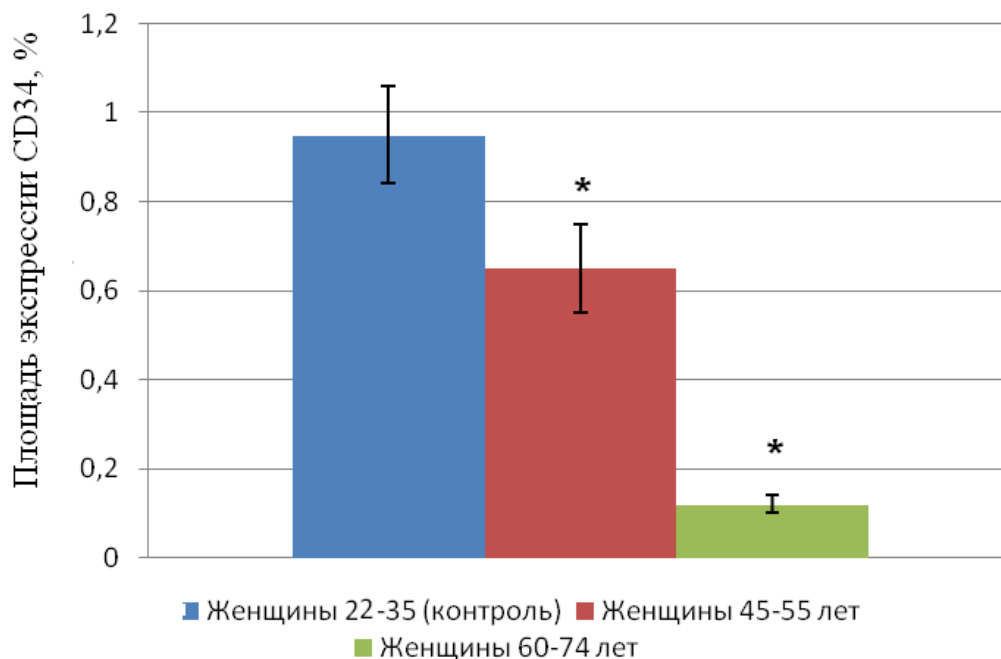
* - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в контроле

Рисунок 5. Площадь экспрессии Caspase-3 в эндометрии у женщин разного возраста.

Экспрессия CD34 в эндометрии женщин разного возраста

На рисунке 6 представлена площадь экспрессии молекулы CD34 у женщин трех возрастных групп. Наиболее интенсивный уровень экспрессии наблюдался у женщин в возрасте от 22 до 35 лет и составил $0,95 \pm 0,11\%$. При этом, у женщин среднего возраста (45-55 лет) и у женщин пожилого возраста (60-74 года) наблюдалось выраженное снижение уровня экспрессии молекулы CD34 в 1,46 раза (до $0,65 \pm 0,11\%$) и 7,91 раза (до $0,12 \pm 0,02\%$) соответственно.

На основании полученных данных можно предположить, что с возрастом нарушается васкуляризация клеток эндометрия, поскольку сигнальная молекула CD34 является маркером неоваскулогенеза. Снижение интенсивности экспрессии данной сигнальной молекулы может служить одной из причин снижения функциональной активности эндометрия, и, как следствие уменьшает вероятность инвазии бластоцисты.



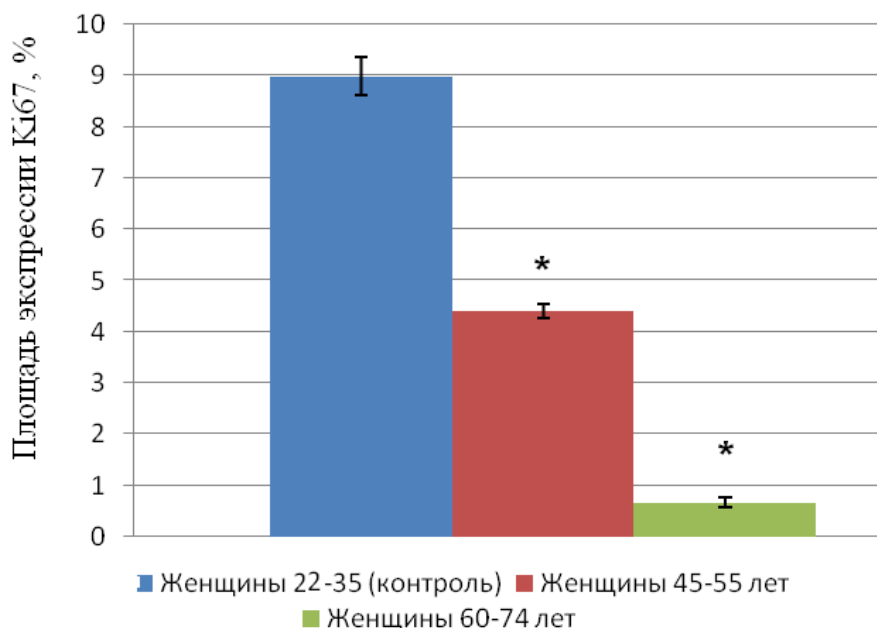
* - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в контроле

Рисунок 6. Площадь экспрессии CD34 в эндометрии у женщин разного возраста.

Экспрессия Ki67 в эндометрии женщин разного возраста

На рисунке 7 представлена площадь экспрессии пролиферативного протеина Ki67 у женщин трех возрастных групп. Наиболее интенсивный уровень экспрессии наблюдался у женщин в возрасте от 22 до 35 лет и составил $8,99 \pm 0,38\%$.

При этом у женщин среднего возраста (45-55 лет) и у женщин в пожилого возраста (60-74 года) наблюдалось значительное снижение интенсивности процессов клеточного обновления, что выражалось в снижении уровня экспрессии белка Ki67 в 2,03 раза (до $4,41 \pm 0,13\%$) и 13,41 раза (до $0,67 \pm 0,09\%$) соответственно.



* - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в контроле

Рисунок 7. Площадь экспрессии Ki67 в эндометрии женщин разного возраста.

Полученные данные позволяют сделать вывод об ослаблении пролиферативной способности клеток эндометрия с возрастом. Об этом свидетельствует значительное уменьшение площади экспрессии пролиферотропного протеина Ki67 у женщин в среднем и пожилом возрасте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нарушение репродуктивной функции у женщин разного возраста является актуальной проблемой современной медицины. Прогнозируемое снижение репродуктивного потенциала в России определяет не только медицинскую, но и социально-экономическую актуальность проблемы оптимизации репродуктивного здоровья женщин [Ковязин В.А., 2005]. Эндометрий является динамически реконструирующейся тканью, которая, реагируя на половые стероидные гормоны, претерпевает рост и трансформацию, отторгаясь и регенерируя более 400 раз в течение активного репродуктивного периода женщины. Эти изменения носят циклический характер и строго подчиняются воздействиям системы гипоталамус-гипофиз-яичники. С возрастом частота патологии эндометрия увеличивается [Махина Е.В. и др., 2014]. Своевременная коррекция выявленных нарушений, которая базируется на определении функциональной активности эндокринной системы на молекулярно-клеточном уровне открывает новые перспективы для диагностики и коррекции нарушений системы репродукции в различные

возрастные периоды. Для идентификации нормального и патологического функционирования эндометрия у женщин разного возраста необходимо изучение изменения гормональной активности, экспрессии молекул апоптоза и пролиферации [Taylor L.J. et al., 2003]. В связи с этим целью работы явилось изучение функциональной активности эндометрия и выявление наиболее значимых маркеров возрастных особенностей эндометрия у женщин разного возраста.

Первая часть работы была посвящена изучению возрастных особенностей эндокринной функции эндометрия. Известно, что пролиферация и дифференциация эндометрия контролируется стероидными гормонами яичника. Эстрогены стимулируют пролиферацию как желез, так и стромы, тогда как прогестерон ингибирует рост железистых клеток и индуцирует децидуальные изменения в стромальных клетках [Sidonia C. Set al., 2011].

В норме в репродуктивном цикле характерны следующие закономерности: возрастающая секреция эстрогенов в фазу селекции и развития фолликулов; выработка значительных количеств прогестина в секреторную фазу цикла, что совпадает по времени с имплантацией. Наиболее интенсивный уровень экспрессии рецепторов к эстрогенам наблюдался у молодых женщин. При этом, у женщин в предклимактерическом периоде (45-55 лет) и женщин в климактерическом периоде (60-74 года) наблюдалось существенное понижение уровня экспрессии рецепторов к эстрогенам и прогестеронам.

Возрастное снижение уровня прогестерона, который в норме вызывает циклические секреторные преобразования эндометрия, могло бы вызывать пролиферативные изменения в слизистой оболочке матки. Однако, выявленное нами снижение уровня рецепторов к эстрогенам в эндометрии, вероятно, компенсирует развитие этого процесса.

В репродуктивном и пременопаузальном периодах часто отмечается персистенция фолликулов. Однако может иметь место и атрезия одного или нескольких фолликулов, которые, не достигая зрелости, погибают, что приводит к снижению секреции эстрогенов, что, в свою очередь, стимулирует секрецию гонадотропинов и вызывает рост новых фолликулов и новое повышение эстрогенов. При атрезии фолликулов секреция эстрогенов волнообразная, не достигает высоких уровней, в то же время отмечается относительный избыток эстрогенов из-за снижения антиэстрогенного влияния прогестерона.

Во второй части работы была изучена роль апоптоза в старении эндометриальной ткани. Апоптоз играет важную роль в координации

функций женской репродуктивной системы в физиологических условиях, в частности, в процессах фолликулогенеза, регресса желтого тела, циклической инволюции функционального слоя эндометрия. Апоптотические процессы преимущественно наблюдаются в позднюю секреторную фазу и в фазу менструации. Caspase-3, p53 и Fas-L является ведущими эффекторными белками каскада апоптоза, которые экспрессируются во всех тканях.

Активация Caspase-3 сопровождается повышением активности белков-ингибиторов клеточного цикла. Уровень экспрессии Fas-L у женщин в возрасте от 22-35 до 45-55 лет находится на одинаковом уровне. При этом у женщин пожилого возраста (60-74 года) наблюдалось незначительное снижение уровня экспрессии Fas-L по сравнению с молодыми женщинами и женщинами среднего возраста. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что с возрастом уровень экспрессии сигнальной молекулы Fas-L практически не изменяется.

Уровень экспрессии p53 в эндометрии женщин молодого возраста был достоверно ниже, чем у женщин среднего и пожилого возраста. Следует отметить, что наиболее выраженное усиление экспрессии p53 в эндометрии наблюдалось у женщин пожилого возраста. Площадь экспрессии Caspase-3 была минимальной у женщин в возрасте от 22 до 35 лет. При этом, у женщин среднего возраста (45-55 лет) и у женщин пожилого возраста (60-74 года) наблюдалось значительное повышение уровня экспрессии Caspase-3.

Заключительный этап исследования был посвящен изучению процессов пролиферации и неоваскулогенеза в эндометрии женщин разного возраста. Наиболее интенсивная экспрессия CD34 наблюдалась у женщин в возрасте от 22 до 35 лет. При этом, у женщин среднего возраста (45-55 лет) и у женщин пожилого возраста (60-74 года) наблюдалось выраженное снижение уровня экспрессии молекулы CD34. На основании полученных данных можно предположить, что с возрастом нарушается васкуляризация клеток эндометрия, поскольку сигнальная молекула CD34 является маркером неоваскулогенеза.

Снижение интенсивности экспрессии данной сигнальной молекулы может служить одной из причин снижения функциональной активности эндометрия. Белок Ki67 является общепризнанным и широко используемым маркером пролиферации, связанным с делением клетки и, соответственно, позволяет оценить пролиферативный потенциал клеток образца ткани [Mitselou A. et al., 2003]. Наиболее интенсивная экспрессия Ki67 наблюдалась у женщин в возрасте от 22 до 35 лет. При этом, у женщин среднего возраста (45-55 лет) и у женщин пожилого возраста (60-74 года) выявлено значительное снижение уровня экспрессии белка Ki67. Полученные данные

позволяют сделать вывод об уменьшении пролиферативной способности клеток эндометрия с возрастом.

Таким образом, при старении репродуктивной системы у женщин в эндометрии происходит изменение экспрессии ряда сигнальных молекул, участвующих в процессах пролиферации, апоптоза, выполняющих эндокринную функцию. Оценка экспрессии описанных в работе молекул может служить маркером для диагностики ускоренного старения эндометрия и различных нарушений репродуктивной функции женщин, особенно в предклимактерическом периоде.

ВЫВОДЫ

1. С возрастом происходит снижение эндокринной функции эндометрия. У женщин среднего и пожилого возраста в эндометрии наблюдается снижение экспрессии рецепторов к прогестерону соответственно в 1,6 и 3,5 раза по сравнению с женщинами молодого возраста.
2. У женщин среднего возраста в эндометрии наблюдается снижение экспрессии рецепторов к эстрогену в 2,2 раза по сравнению с молодыми женщинами. При переходе от среднего к пожилому возрасту этот процесс усугубляется и экспрессия рецепторов к эстрогену снижается в 4,3 раза.
3. Пролиферативный потенциал эндометрия, оцениваемый по экспрессии маркера Ki67, является одним из показателей, наиболее сильно изменяющихся с возрастом. Так, экспрессия Ki67 у женщин среднего и пожилого возраста соответственно в 2 раза и в 8 раз ниже по сравнению с молодыми женщинами.
4. Возрастные особенности процессов апоптоза в эндометрии затрагивают изменение экспрессии белков p53, Caspase-3, но не Fas-L. Возрастное повышение каспаз-зависимого апоптоза, выявленное по увеличению синтеза белков p53, Caspase-3 указывает на снижение популяции эндометриальных клеток в период менопаузы. Однако, при этом иммунологическая функция оставшихся эндометриальных клеток, исследуемая по экспрессии Fas-L, не изменяется.
5. У женщин пожилого возраста и среднего возраста экспрессия транскрипционного фактора p53 возрастает соответственно в 2,1 и 3,1 раза по сравнению с женщинами молодого возраста. У женщин среднего

возраста в эндометрии наблюдается усиление экспрессии Caspase-3 в 1,5 раза по сравнению с молодыми женщинами. При переходе от среднего к пожилому возрасту, экспрессия этого маркера клеточной гибели снижается в 2,4 раза.

6. Проведенные исследования позволили установить, что при старении репродуктивной системы у женщин в эндометрии происходит изменение экспрессии ряда сигнальных молекул, участвующих в процессах пролиферации, апоптоза и регуляции паракринной секреции гормонов. Оценка экспрессии вышеуказанных молекул может служить маркером для диагностики ускоренного старения эндометрия и различных нарушений репродуктивной функции женщин, ассоциированных с возрастом.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Проведенные исследования позволяют рекомендовать оптимизировать диагностику состояния эндометрия, которая должна включать в себя биопсию ткани с последующим исследованием в культуре эндометриальных клеток экспрессии сигнальных молекул.
2. Полученные данные по возрастной динамике экспрессии сигнальных молекул эндометрия Caspase-3, CD34, Ki67, p53 могут быть рекомендованы для оптимизации диагностики функционального состояния эндометрия у женщин фертильного и предклимактерического возраста.
3. Исследование экспрессии рецепторов к эстрогенам и прогестеронам в эндометрии у женщин разного возраста может быть использовано для изучения гормонально-рецепторного статуса совместно с изучением уровня стероидных гормонов (прогестерон и эстроген) в крови и оценки экспрессии сигнальных молекул в культуре клеток эндометрия при их старении *in vitro* после взятия биопсии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Возрастные особенности профиля сигнальных молекул эндометрия: перспективы применения в гинекологии / И.Ю. Григорян, В.О. Полякова, Н.С. Линькова, Е.О. Куканова, Е.М. Пальцева // Молекулярная медицина. – 2015. – №3. – С. 48-52.
2. Молекулярные аспекты хронического эндометрита у женщин разного возраста / И.Ю. Григорян, Н.С. Линькова, К.Л. Козлов, С.У. Мурсалов // Молекулярная медицина. – 2016. – № 1. – С. 44-49.
3. Сигнальные молекулы эндометрия: геронтологические и общепатологические аспекты / И.Ю. Григорян, Н.С. Линькова, В.О. Полякова, Е.М. Пальцева, К.Л. Козлов // Успехи геронтологии. – 2015. – Т. 28, №3. – С. 453-461.

Монография

4. Молекулярные механизмы заболеваний репродуктивной системы. / М.А. Пальцев, Э.К. Айламазян, И.М. Кветной, В.А. Печеникова, В.О. Полякова, И.Ю. Григорян // Санкт-Петербург, Эко-Вектор, 2017, 255 с.

Тезисы докладов

5. Григорян, И.Ю. Возрастная динамика экспрессии рецепторов к прогестерону и эстрогену в эндометрии / И.Ю. Григорян // Российская научно-практическая конференция с международным участием «Проблемы возрастной патологии в арктическом регионе: биологические, клинические и социальные аспекты». 2016. – С. 137-138.
6. Григорян, И.Ю. Возрастная динамика экспрессии факторов роста в эндометрии / И.Ю. Григорян, Ю.С. Крылова // Пушкинские чтения. – СПб, 2014. – С. 48.
7. Григорян, И.Ю. Возрастные особенности процессов пролиферации и неоваскулогенеза в эндометрии / И.Ю. Григорян, Н.С. Линькова // Российская научно-практическая конференция с международным участием «Проблемы возрастной патологии в арктическом регионе: биологические, клинические и социальные аспекты». 2016. С. 138-139.
8. Григорян, И.Ю. Пролиферативный потенциал клеток эндометрия человека при старении *in vitro* / И.Ю. Григорян, К.Л. Козлов, Н.С. Линькова // XIX Международная научно-практическая конференция «Пожилой больной. Качество жизни». СПб., 2014. – С. 77.
9. Григорян, И.Ю. Роль маркеров апоптоза в диагностике патологии эндометрия у женщин разного возраста / И.Ю. Григорян // Научно-практическая конференция «Инновационные российские технологии в геронтологии и гериатрии», посвященная 25-летию Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии. СПб., 2017. – С. 22-23.

10. Григорян, И.Ю. Экспрессия Caspase-3 в эндометрии женщин разного возраста / И.Ю. Григорян, В.О. Полякова, И.М. Кветной // Российская научно-практическая конференция с международным участием «Проблемы возрастной патологии в арктическом регионе: биологические, клинические и социальные аспекты». 2016. С. 140-141.
11. Григорян, И.Ю. Экспрессия транскрипционных факторов в ткани эндометрия у женщин репродуктивного возраста / И.Ю. Григорян, Ю.С. Крылова // Международный форум «Старшее поколение» СПб., 2015. – С. 82.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ФСГ	Фолликулостимулирующий гормон
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота
CD	Кластер дифференцировки
DMEM	Среда Игла в модификации Дульбекко
ER	Рецепторы к эстрогену
PR	Рецепторы к прогестерону

Григорян Инна Юрьевна ЭКСПРЕССИЯ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ В КЛЕТКАХ ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА ПРИ СТАРЕНИИ *IN VITRO*//Автореф. дис. канд. биол. наук: 14.01.30. – СПб., 2018. – 24 с.

Подписано в печать « ____ » _____ 2018. Формат 60*84 1/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Печ. л. 2,0.

Тираж 100 экз. Заказ _____.

Отпечатано с готового оригинал-макета.

ЗАО «Принт - Экспресс»

197376, С.-Петербург, ул. Большая Монетная, 5 лит. А

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Артымук Н.В. и др. Молекулярно-генетические аспекты рака эндометрия у женщин с нейроэндокринными нарушениями// Сибирский онкологический журнал. 2007. Приложение 5-7. С. 21-25; **Бохман Я.В.** Руководство по онкогинекологии. Л., Медицина, 1989. 464 с.; **Ковязин В.А.** Иммуногистохимическое исследование пролиферативных, гиперпластических и неопластических процессов в эндометрии // Автореф. дис. канд. мед. наук. М., 2005. 19с.; **Махина Е.В. и др.** Диагностическая и прогностическая значимость оценки пролиферативной активности клеточных популяций эндометрия при гиперпластических и неопластических процессах. // Фундаментальные исследования. 2014. №10-12. С. 420-427.; **Пальцев М.А., Кветной И.М.** Руководство по нейроиммуноэндокринологии. 3-е изд. М., Шико, 2014. 752 с.; **Cho N.H. et al.** Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium// Fertil Steril. 2004. Vol. 81, N 2. P. 403-407.; **Mitselou A. et al.** Immunohistochemical study of apoptosis-related Bcl-2 protein and its correlation with proliferation indices (Ki67, PCNA), tumor suppressor genes (p53, pRb), the oncogene c-erbB-2, sex steroid hormone receptors and other clinicopathological features, in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium // In Vivo. 2003. Vol. 17 (5). P. 469–477.; **Tilly J.L., Sinclair D.A.** Germline energetics, aging, and female infertility// Cell Metab. 2013. Vol. 17, N 6. P. 838-850.; **Taylor L.J. et al.** The- differential expression of estrogen receptors, progesterone receptors, Bcl-2 and Ki67 in endometrial polyps. // BJOG. 2003. Vol. 110(9). P. 794-798.; **Priyanka H.P. et al.** Menstrual cycle and reproductive aging alters immune reactivity, NGF expression, antioxidant enzyme activities, and intracellular signaling pathways in the peripheral blood mononuclear cells of healthy women// Brain Behav Immun. 2013. Vol. 32. P. 131-143. ; **Sidonia C. S. et al.** Endometrial carcinomas: correlation between ER, PR, Ki67 status and histopathological prognostic parameters. Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie. 2011. Vol. 52, N 2. P. 631-636.