

**АННО ВО НИЦ «САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ
ИНСТИТУТ БИОРЕГУЛЯЦИИ И ГЕРОНТОЛОГИИ»**

На правах рукописи

РОДИЧКИНА

Валерия Руслановна

**СЕКРЕТОРНЫЙ ФЕНОТИП, АССОЦИИРОВАННЫЙ
СО СТАРЕНИЕМ (SASP): МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
ИНВОЛЮЦИИ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ *IN VITRO***

14.01.30 – геронтология и гериатрия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2020

Работа выполнена в лаборатории функциональной морфологии отдела клеточной биологии и патологии АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»

Научный руководитель:

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

Официальные оппоненты:

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

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится «__» _____ 2020 г. в 14.00 часов на заседании Диссертационного Совета Д 521.103.01 в АННО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» по адресу: 197110, Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3.

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

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета,
доктор биологических наук,
профессор

Козина Людмила Семеновна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

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 [Кветной И.М., Полякова В.О., Крылова Ю.С. и др. 2018].

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 [Koumei S., Iwata H. 2017]. 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 [Rodriguez-Garcia M., Fortier J.M., Barr F.D., et al. 2018]. Наиболее изученными маркерами иммунологического старения являются NF-κB, IL-1, IL-6, IL-8, TGFβ [Childs B.G., Gluscevic M., Baker, D.J., et al. 2017].

«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 [Liu S., Uppal H., Demaria M., et al. 2015].

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 [Franceschi C, Campisi J., 2014]. 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 [Gruver A., Hudson L., Sempowski G. 2014]. 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 [Bahrami E., Witzel M., Racek T., et al. 2017].

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 [Zhao H., Traganos F., Darzynkiewicz Z. 2010].

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 [Xia S., Zhang X., Zheng S., et al. 2016]. 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 [Childs B.G., Gluscevic M., Baker, D.J., et al. 2017]; два классических маркера клеточного старения – p16 [Hall B.M., Balan V., Gleiberman A.S., et al. 2016] и p53 [Ranjan A., Iwakuma T. 2018], а также провести исследования экспрессии молекул, которые могут быть задействованы в механизмах старения, а именно Ki-67 [Kitson S., Sivalingam V.N., Bolton J., et al. 2017], PCNA [Mailand N., Gibbs-Seymour I., Bekker-Jensen S. 2013], Bcl-2 [Santamaria X., Mas A., Cervelló I., et al. 2018], SIRT1,6 [Tatone C., Di Emidio G., Barbonetti A., et al. 2018], TEF-1 [Hohensinner P.J., Kaun C., Buchberger E., et al. 2016], CALR [Eggleton P., Bremer E., Dudek E., et al. 2016].

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.

Цель и задачи исследования

Целью диссертационного исследования является изучение экспрессии различных сигнальных молекул в клетках эндометрия и их вклада в механизм инфламэйджинга и формирования SASP фенотипа.

Для достижения указанной цели поставлены и последовательно решены следующие задачи:

1. Создать модель инфламэйджинга («воспалительного старения») клеточной культуры эндометрия.
2. Верифицировать экспрессию маркеров, ассоциированных с фенотипом SASP, в клеточной культуре эндометрия.
3. Определить экспрессию маркеров, характерных для клеточного старения и провести корреляционный анализ с экспрессией маркеров инфламэйджинга.
4. Оценить возрастную динамику экспрессии изучаемых маркеров в исследуемых группах (молодой репродуктивный возраст и старший репродуктивный возраст).
5. На основании проведенных исследований расширить спектр сигнальных молекул, формирующих SASP фенотип и уточнить их вклад в механизм развития инфламэйджинга женской репродуктивной системы.

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, TERC-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 TERC-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 нормальной 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, TERC-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 TERC-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.

Положения, выносимые на защиту

1. При переходе от молодого к старшему репродуктивному возрасту усиливается экспрессия белков IL-1a, p65, PCNA и TERC-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.

2. После воздействия генотоксического стресса значительно увеличивается экспрессия белков, ответственных за регулировку клеточного цикла и ассоциированных со старением - TGF β , IL-6, IL-8, IL-1a, MMP3, p16, p53, p65, BCL-2, при этом экспрессия PCNA, SIRT1,6, TERC-1 снижается, а экспрессия белка Ki-67 – ключевого маркера клеточной пролиферации находится на незначительном уровне.
3. В клеточной культуре эндометрия под воздействием генотоксического стресса в группе старшего репродуктивного возраста экспрессия белков IL-1a и p53 увеличивается, а TERC-1 снижается по сравнению с группой молодого репродуктивного возраста.
4. 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.
5. Фенотип SASP, характерный для инфламэйджинга, может быть существенно расширен с включением в него таких молекул как Ki-67, PCNA, SIRT-1, SIRT-6, TERC, CALR, экспрессия которых достоверно ассоциирована с развитием генотоксического стресса.

Связь с научно-исследовательской работой института

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

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации 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.

Апробация и реализация диссертации

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).

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%.

Структура и объем диссертации

Диссертация 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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение клеточной культуры эндометрия

Для создания культур клеток материал эндометрия (n=20) был получен в поликлинике ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта» путем пайпель-биопсии при проведении врачами-гинекологами обследования, предусмотренного стандартом оказания медицинских услуг для выявления причин бесплодия.

Измельченные фрагменты ткани эндометрия отмывали DPBS и обрабатывали раствором 0,2% коллагеназы II типа. После оценки жизнеспособности клеток супернатант переносился в культуральный флакон в концентрации 1×10^3 клеток в мл. Культура поддерживалась при температуре 37°C, в атмосфере 5% CO₂. Смена культуральной среды DMEM + 15%FBS (Sigma, США) производилась каждые 2 дня. По достижении

монослоя, клетки пересевали с помощью смеси трипсина-версена (Gibco, США).

Материал был разделен на 2 группы: молодой репродуктивный возраст (до 30 лет) (n=10); старший репродуктивный возраст (после 30 лет) (n=10). Все пациентки имели нормальные менструальные циклы. Пациентки не получали гормональную терапию.

Были изучены 4 группы клеточной культуры эндометрия:

1-я контрольная группа – клеточная культура эндометрия (молодой репродуктивный возраст, <30 лет);

2-я контрольная группа (старший репродуктивный возраст, >30 лет);

3-я группа – модель инфламэйджинга (воздействие генотоксического стресса, <30 лет);

4-я группа – модель инфламэйджинга (воздействие генотоксического стресса, >30 лет).

Моделирование инфламэйджинга (воздействие генотоксического стресса)

Для проведения исследования за основу взяты и модифицированы протоколы работ Zhao H., Traganos F., Darzynkiewicz Z. (2010) и Bahrami E., Witzel M., Racek T., et al. (2017). Культура клеток эндометрия 1 пассажа по достижении 80% монослоя подвергалась генотоксическому стрессу в течение 30 минут воздействием УФ-облучения лампы Philips TUV 8W (Philips, Нидерланды), которая излучает ультрафиолетовый свет с длиной волны 253,7 нм (УФ-С).

Окрашивание препаратов культуры эндометрия человека иммуноцитохимическим методом

Клетки фиксировали в 4% растворе параформальдегида на PBS при комнатной температуре в течение 15 минут. Пермеабиллизацию клеток проводили 0,1% раствором Triton X-100 (Биолот, Россия), разведенном в PBS в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем клетки блокировали от неспецифического связывания в 1% бычьим сывороточном альбумине на PBS, pH 7,5 в течение 15 минут. Верификация экспрессии сигнальных молекул (биомаркеров) молекул осуществлялось иммуноцитохимическим методом с использованием первичных антител: TGF β (1:100, Abcam), IL-1 α (1:100, Abcam), IL-6 (1:500, Abcam), IL-8 (1:2000, Abcam), p65 (1:100, Abcam), MMP3 (1:250, Abcam), p16 (1:100, Abcam), p53 (1:50, Dako), Ki-67 (1:50, Dako), PCNA (1:400, Abcam), BCL-2 (1:100, Abcam), SIRT-1 (1:250, Abcam), SIRT-6 (1:100, Abcam), TERF-1 (1:100, Abcam), CALR (1:200, Abcam). В качестве вторичных антител использовали конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 647 (1:1000, Abcam). Ядра клеток

визуализировали окрашиванием Hoechst 33258 (1:100, Sigma) в течение 1 минуты.

Экспрессию маркеров клеточного и воспалительного старения исследовали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus FluoView 1000 (Olympus, Япония).

Морфометрический анализ

Для анализа полученных результатов использовали конфокальный микроскоп Olympus FluoView 1000 (Olympus, Япония) и программное обеспечение «Videotest Morphology 5.2». В каждом случае анализировали 5 полей зрения при увеличении 400.

Площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах. Этот параметр характеризует количество клеток, в которых локализуется исследуемый маркер.

Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка проводилась в программе «Excel 2016 Microsoft Office 2016» и в аналитической программе «Statistica 7.0».

Для выборок, где разброс был значительным, применяли процедуры множественных сравнений с помощью критерия Манна–Уитни. Для групп с незначительным разбросом применяли t-критерий Стьюдента. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии различий) принимали равным 0,01.

Оценку различий между выборками проводили с использованием параметрического t-критерия Стьюдента (при нормальном распределении данных), непараметрического U-критерия Манна-Уитни (в случае отсутствия нормального распределения данных).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведена модификация моделирования инфламэйджинга с использованием ультрафиолетового излучения в качестве генотоксического фактора. При облучении клеточной культуры эндометрия в течение 30 минут ультрафиолетом через 72 часа выявлена экспрессия маркеров, ассоциированных с фенотипом SASP (рисунок 1).

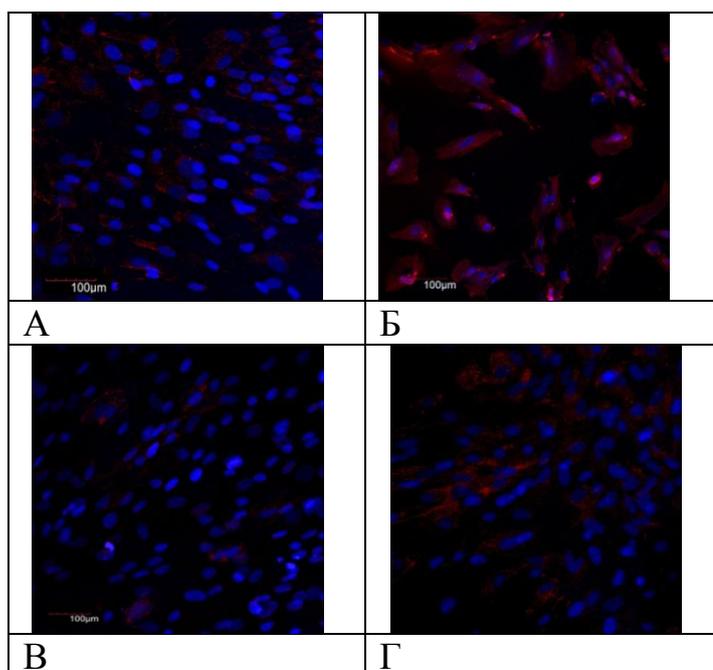


Рисунок 1. Экспрессия IL-8 в культуре клеток эндометрия, иммунофлуоресцентная конфокальная микроскопия, $\times 400$. Для окраски ядер использовали Hoechst 33258 (синяя флуоресценция). Визуализацию белка проводили с помощью вторичных антител, конъюгированных с AlexaFluor 647 (красная флуоресценция):

А – контроль (<30 лет); Б – воздействие генотоксического стресса (<30 лет);
В – контроль (>30 лет); Г – воздействие генотоксического стресса (>30 лет).

Зафиксировано статистически значимое увеличение экспрессии белков-маркеров SASP: TGF β , IL-6, IL-8, IL-1a, MMP3 и p65 в клеточной культуре эндометрия молодого и старшего репродуктивного возраста в модели инфламэйджинга (при воздействии генотоксического стресса).

Таблица 1.

Относительная площадь экспрессии маркеров SASP в культуре клеток эндометрия молодого и старшего репродуктивного возраста в норме и при воздействии генотоксического стресса

Маркер	Контроль ($\bar{x} \pm \sigma$)		Модель инфламэйджинга ($\bar{x} \pm \sigma$)	
	До 30 лет	После 30 лет	До 30 лет	После 30 лет
TGF β	5,34 \pm 1,76	7,45 \pm 1,26	18,28 \pm 2,04*	20,16 \pm 1,01*
IL-1a	2,23 \pm 0,56	3,62 \pm 1,69	18,45 \pm 2,17*	26,13 \pm 2,8*
IL-6	3,2 \pm 0,39	4,13 \pm 0,91	9,86 \pm 0,89*	12,26 \pm 3,59*
IL-8	3,17 \pm 0,97	1,38 \pm 0,35	18,66 \pm 5,16*	17,93 \pm 1,51*
MMP3	12,22 \pm 4,9	14,26 \pm 2,39	25,65 \pm 4,90*	27,13 \pm 6,9*
p65	2,73 \pm 0,56	6,62 \pm 2,01	16,46 \pm 3,67*	23,73 \pm 4,5*

* $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля.

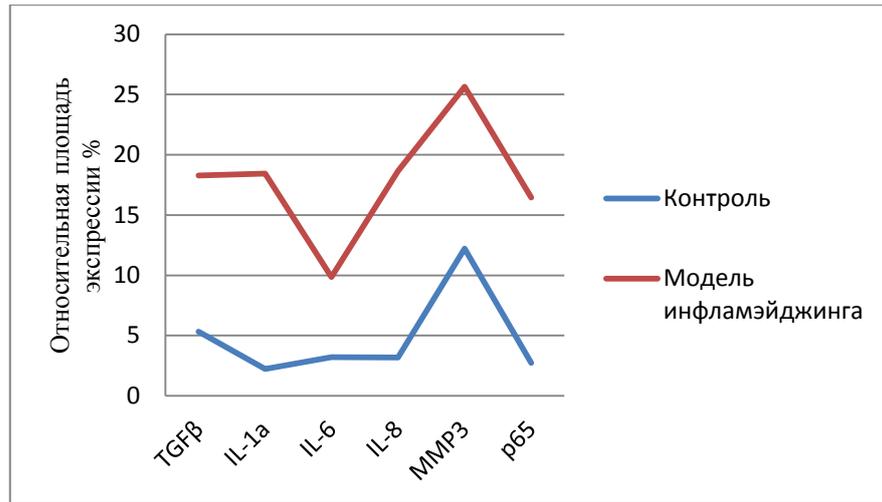


Рисунок 2. Сравнение показателей относительной площади экспрессии маркеров SASP в культуре клеток эндометрия молодого репродуктивного возраста (до 30 лет) в норме и при воздействии генотоксического стресса.

Значения показателей относительной площади экспрессии белков TGFβ, IL-6, IL-8, IL-1a, MMP3 и p65 статистически значимо отличаются в группе при воздействии генотоксического стресса по сравнению с группой контроля как до 30 лет, так и в группе старшего репродуктивного возраста (рисунок 2, 3).

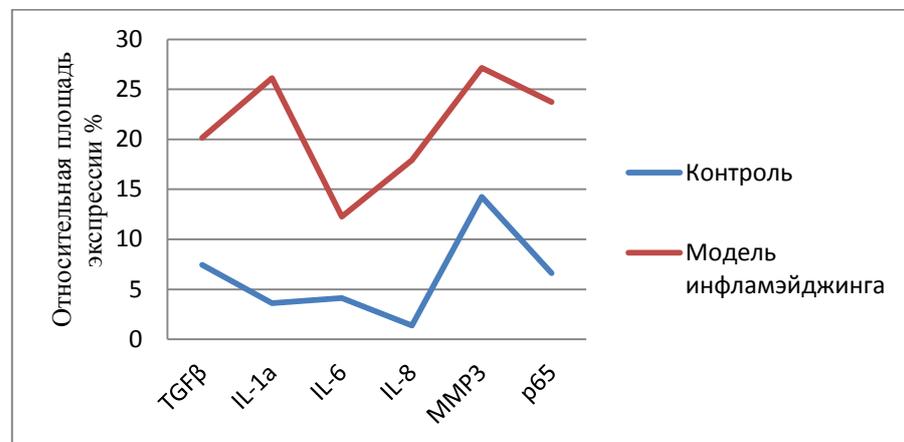


Рисунок 3. Сравнение показателей относительной площади экспрессии маркеров SASP в культуре клеток эндометрия старшего репродуктивного возраста (после 30 лет) в норме и при воздействии генотоксического стресса.

При исследовании молекул IL-8 (рис.5), 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 (рисунок 4), p65, PCNA и TERF-1 статистически значимо повышалась с возрастом. Концентрация TGFβ, IL-6, MMP3, BCL-2 в эндометрии не зависела от возраста.

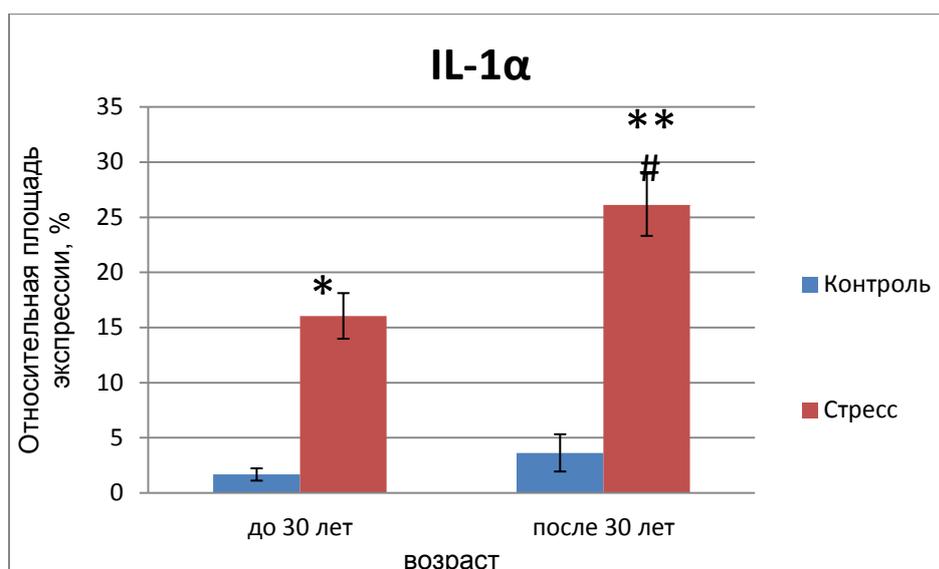


Рисунок 4. Сравнение показателей относительной площади экспрессии IL-1α в культуре клеток эндометрия в контрольных группах и при воздействии генотоксического стресса.

* - $p < 0.05$ по сравнению с группой контроля до 30 лет.

** - $p < 0.05$ по сравнению с группой контроля после 30 лет.

- $p < 0.05$ по сравнению с группой до 30 лет.

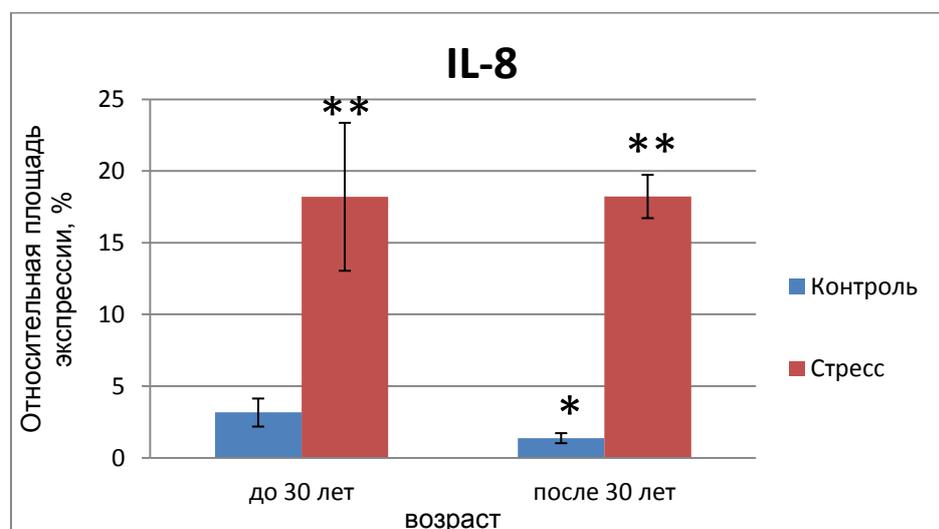


Рисунок 5. Сравнение показателей относительной площади экспрессии IL-8 в культуре клеток эндометрия в норме и при воздействии генотоксического стресса.

* - $p < 0.05$ по сравнению с группой контроля до 30 лет.

** - $p < 0.05$ по сравнению с группой контроля после 30 лет.

Выявлено усиление экспрессии маркеров p16, p53, BCL-2, характерных для клеточного старения, в клеточной культуре эндометрия молодого и старшего репродуктивного возраста при воздействии генотоксического

стресса, а также снижение экспрессии маркеров Ki-67, PCNA, SIRT-1, SIRT-6, TERF-1.

Такая динамика свидетельствует о наличии сигнальных механизмов регуляции пролиферативной активности клеток в ответ на генотоксический стресс посредством изученных молекул и предполагает их взаимосвязь с общепринятыми маркерами SASP.

Таблица 2.

Относительная площадь экспрессии предполагаемых маркеров инфламэйджинга в культуре клеток эндометрия молодого и старшего репродуктивного возраста в норме и при воздействии генотоксического стресса

Маркер	Контроль ($\bar{x} \pm \sigma$)		Модель инфламэйджинга ($\bar{x} \pm \sigma$)	
	До 30 лет	После 30 лет	До 30 лет	После 30 лет
Ki-67	22,48±4,12	13,73±3,93	0,65±0,6*	0*
PCNA	7,74±1,15	13,34±3,93	4,45±1,62*	5,31±2,24*
Bcl-2	6,03±0,56	7,3±1,11	9,76±0,81*	12,84±2,43*
SIRT-1	8,7±0,81	7,03±0,64	2,29±0,72*	1,76±0,42*
SIRT-6	6,05±1,05	6,05±1,05	2,65±0,55*	2,65±0,55*
CALR	8,54±0,71	6,94±0,55	9,25±0,65	9,91±0,54
TERF-1	2,06±0,2	3,08±0,7	1,15±0,4*	0,43±0,2*
p16	0	0	8,21±1,86*	14,46±3,97*
p53	0,38±0,3	0,42±0,39	4,95±1,58*	13,04±3,24*

* $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля.

При исследовании молекул IL-1a, p65, PCNA и TERF-1 в клеточной культуре эндометрия впервые было обнаружено, что при переходе от молодого к старшему репродуктивному возрасту их концентрация статистически значимо повышалась с возрастом. Экспрессия белков p53 и p16 в нормальной эндометрии была незначительна в контроле обеих возрастных групп.

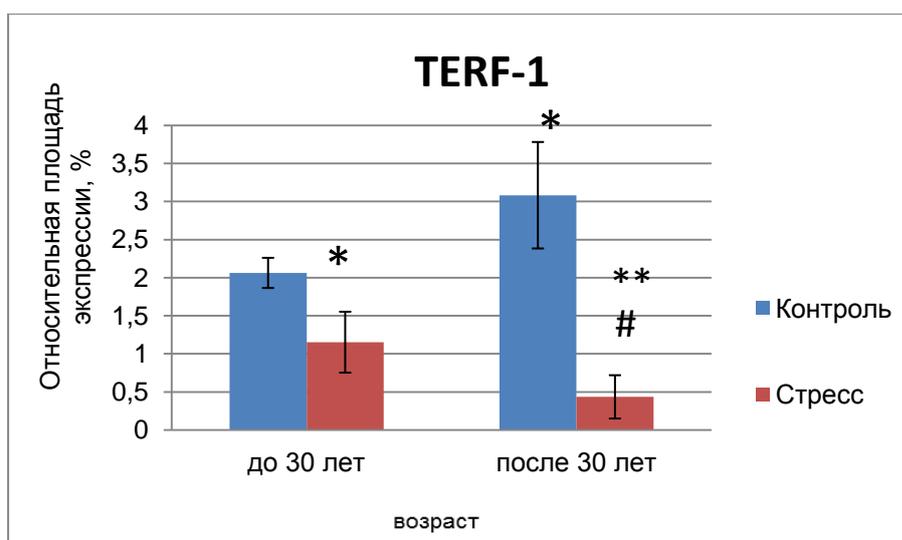


Рисунок 6. Сравнение показателей относительной площади экспрессии TERF-1 в культуре клеток эндометрия в контрольной и исследуемых группах и при воздействии генотоксического стресса.

* - $p < 0.05$ по сравнению с группой контроля до 30 лет.

** - $p < 0.05$ по сравнению с группой контроля после 30 лет.

- $p < 0.05$ по сравнению с группой до 30 лет.

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

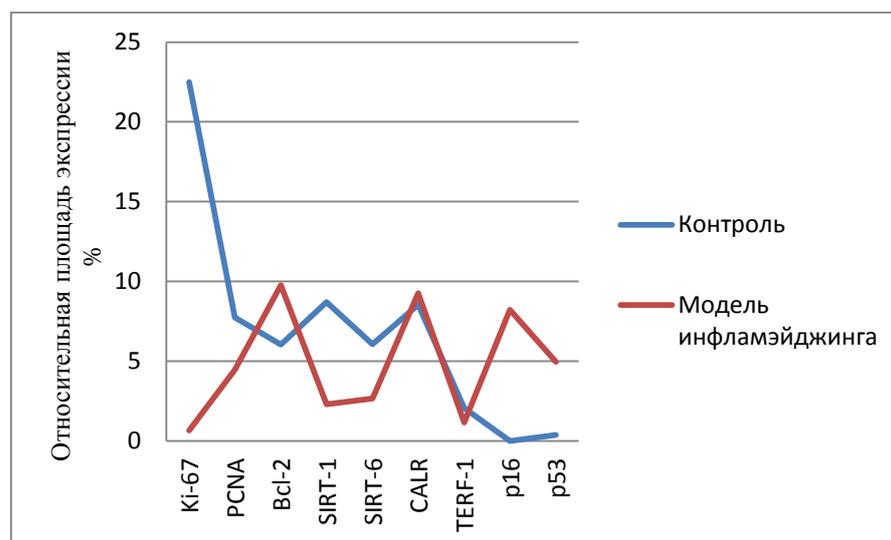


Рисунок 7. Сравнение показателей относительной площади экспрессии предполагаемых маркеров инфламэйджинга в культуре клеток эндометрия молодого репродуктивного возраста (до 30 лет) в норме и при воздействии генотоксического стресса.

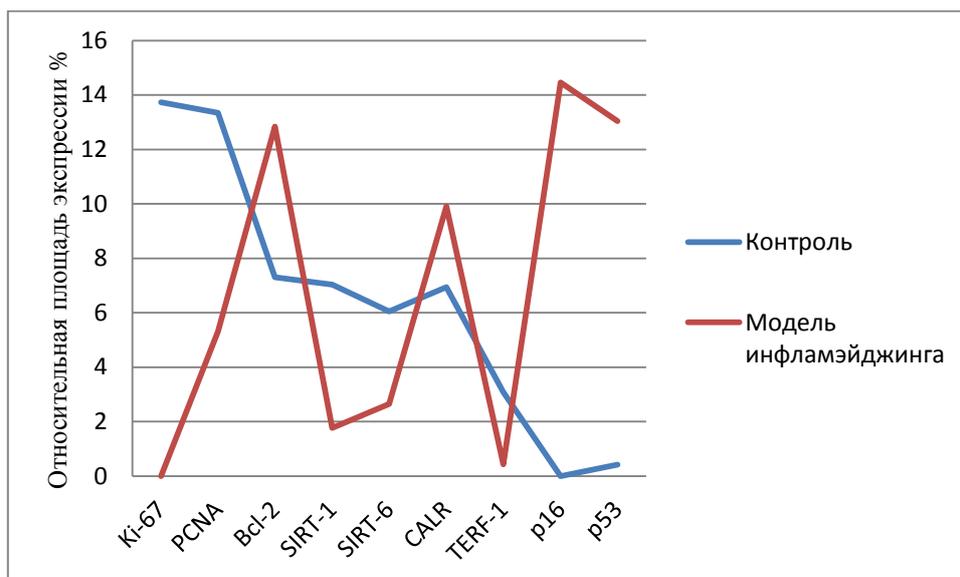


Рисунок 8. Сравнение показателей относительной площади экспрессии предполагаемых маркеров инфламэйджинга в культуре клеток эндометрия старшего репродуктивного возраста (после 30 лет) в норме и при воздействии генотоксического стресса.

Также впервые было продемонстрировано статистически значимое увеличение экспрессии белков IL-1a и p53 и снижение TERC-1 (рис. 6) в клеточной культуре эндометрия под воздействием генотоксического стресса в группе старшего репродуктивного возраста по сравнению с группой молодого репродуктивного возраста.

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- β имеют решающее значение для регуляции MMPs в эндометрии. Экспрессия белка TGF- β 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 α , могут блокировать регуляцию MMP-3. [Meola J., Rosa e Silva J.C., Dentillo D.B., et al. 2010]. Повреждение ДНК при ультрафиолетовом облучении стимулирует продукцию

провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6 и IL-8, активируя сигнальный путь NF-κB, блокируя клеточный цикл, индуцируя и поддерживая фенотип клеточного старения [Freund A., Orjalo A. V., Desprez P.-Y., et al. 2010]. При воздействии генотоксического стресса наблюдаются наибольшие значения экспрессии p65 (NF-κB) 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 [Xu J, Morris GF., 1999].

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 [Ong A.L., Ramasamy T.S. 2018].

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 [Xu J., Morris G.F. 1999]. В популяции нерастаущих 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 [Pistritto G., Trisciuglio D., Ceci C., et al. 2016]. 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.

ВЫВОДЫ

1. Впервые экспериментально создана модель инфламэйджинга клеточной культуры эндометрия на основе модификации моделирования инфламэйджинга с использованием ультрафиолетового излучения в качестве генотоксического фактора. При облучении клеточной культуры эндометрия в течение 30 минут ультрафиолетом через 72 часа выявлена экспрессия маркеров, ассоциированных с фенотипом SASP.

2. Впервые обнаружено статистически значимое увеличение экспрессии белков-маркеров SASP: TGF β , IL-6, IL-8, IL-1a, MMP3 и p65 в клеточной культуре эндометрия молодого и старшего репродуктивного возраста в модели инфламэйджинга (при воздействии генотоксического стресса).

3. Выявлено усиление экспрессии маркеров p16, p53, BCL-2, характерных для клеточного старения, в клеточной культуре эндометрия молодого и старшего репродуктивного возраста при воздействии генотоксического стресса, а также снижение экспрессии маркеров Ki-67, PCNA, SIRT-1, SIRT-6, TERF-1. Такая динамика свидетельствует о наличии сигнальных механизмов регуляции пролиферативной активности клеток в ответ на генотоксический стресс посредством изученных молекул и предполагает их взаимосвязь с общепринятыми маркерами SASP.

4. При исследовании экспрессии молекул IL-8, SIRT-1, SIRT-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. Значения показателя относительной площади экспрессии для IL-8 уменьшились в 2,3 раза, для SIRT-1 - в 1,3 раза, SIRT-6 - в 1,6 раз, Ki-67 - в 1,5 раз, а CALR - в 1,2 раза в группе после 30 лет по сравнению с группой младшего репродуктивного возраста. При этом экспрессия молекул IL-1a, p65, PCNA и TERF-1 статистически значимо повышалась с возрастом в 2,1; 3; 1,7 и 1,5 раза, соответственно.

5. Фенотип клеток, характеризующий явление инфламэйджинга может быть существенно расширен с включением в него вышеизученных молекул – Ki-67, PCNA, SIRT-1, SIRT-6, TERF, CALR. Полученные нами данные впервые показывают их ключевое значение в развитии инфламэйджинга.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Министерством науки и высшего образования Российской Федерации

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. Яролинская, 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. Inflammation of female reproductive system: molecular landscape / V. Rodichkina, I. Kvetnoy, V. Polyakova, A. Arutjunyan, R. Nasyrov, D. Ivanov // Current Aging Science. 2020. Vol. 18, N 2. P. 134-137.

Тезисы докладов

12. Верификация кисспептина и его рецептора в органах женской репродуктивной системы плода человека на разных сроках развития / В.Р. Родичкина, Т.С. Клейменова, А.О. Дробинцева, В.О. Полякова // Матер. международной научно-практической молодёжной конф. «Наука XXI века: новый подход». – Санкт-Петербург. – 2016. – С. 9-12.
13. Иммуногистохимическая верификация белков апоптоза в яичниках человека в перинатальном периоде и раннем постнатальном онтогенезе / В.Р. Родичкина, А.О. Дробинцева, О.Л. Красногорская, В.О. Полякова // Тез. докл. конгресса с международным участием «Здоровые дети — будущее страны» (Санкт-Петербург, 2018). Детская медицина Северо-Запада. 2018. Т. 7. № 1. С. 373-374.
14. Родичкина, В.Р. Иммуногистохимическая верификация системы KISS1/KISS1R в органах плода человека / В.Р. Родичкина, А.О. Дробинцева // Матер. международной конференции «Репродуктивная медицина: взгляд молодых». Санкт-Петербург. 2016. С. 78-79.
15. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия: визуализация кисспептинов в перинатальном периоде развития человека / А.О. Дробинцева, В.О. Полякова, Ю.С. Крылова, В.Р. Родичкина, Т.С. Клейменова, Н.А. Сидорова, И.М. Кветной // Тез. докл. Конгресса с международным участием «Здоровые дети – будущее страны» (Санкт-Петербург, 2018). Детская медицина Северо-Запада. – 2018. – Т. 7, № 1. – С. 375-376.
16. Получение культуры эндометриальных клеток от пациенток с наружным генитальным эндометриозом / Т.С. Клейменова, В.Р. Родичкина, А.О. Дробинцева, В.О. Полякова // Матер. XV Международной научно-практической конф. «Фундаментальные и прикладные исследования в современном мире. – Москва. – 2016. – С. 160-162.
17. Родичкина, В.Р. Особенности гиперплазии эндометрия у пациенток с вторичным бесплодием, ассоциированным с наружным генитальным эндометриозом и миомой матки / В.Р. Родичкина, Г.Х. Толибова, Т.Г. Траль, // В сб.: Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний Материалы конгресса. 2018. С. 66-67.
18. Родичкина, В.Р. Экспрессия кисспептина и его рецепторов в фетальных органах женской репродуктивной системы человека / В.Р. Родичкина, А.О. Дробинцева, В.О. Полякова // Матер. XI Международного конгресса по репродуктивной медицине. 2017 Москва. С. 52-54.
19. Экспрессия рецепторов эстрогена и прогестерона в эндометрии в течение нормального овариального цикла / Г.Х. Толибова, Т.Г. Траль, Т.С.

- Клейменова, В.Р. Родичкина // В сб.: XI международный конгресс по репродуктивной медицине. 2017. С. 410-411.
20. Identification of kisspeptins and matrix metalloproteinases in endometrial cell culture from patients with endometriosis / Kleimenova T., Drobintseva A., Polyakova V., Rodichkina V. // Abstracts from the ISGE World Congress 2018, 7-10 march 2018, Florence, Italy. P.265.
21. *Rodichkina, V.R.* Inflammaging: SASP as molecular landscape of cell senescence / V.R. Rodichkina, I.M. Kvetnoy // 31st European Congress of Pathology. France. 2019. P.381.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ILs	интерлейкины
MMPs	матриксные металлопротеиназы
NFκB	транскрипционный фактор
RAS	малые G-белки (малые ГТФазы)
SASP	секреторный фенотип, ассоциированный со старением

РОДИЧКИНА Валерия Руслановна СЕКРЕТОРНЫЙ ФЕНОТИП, АССОЦИИРОВАННЫЙ СО СТАРЕНИЕМ (SASP): МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИНВОЛЮЦИИ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ *IN VITRO*// Автореф. дис. канд. биол. наук: 14.01.30 – геронтология и гериатрия, СПб. – 2020. – 21 с.

Подписано в печать «__» _____ 2020 г. Формат 60*84 1/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Печ. л. 1,0.

Тираж 100 экз. Заказ ____.

Отпечатано с готового оригинал-макета
в типографии Издательства СПбГЭТУ «ЛЭТИ»

Издательство СПбГЭТУ «ЛЭТИ»

197376, Санкт-Петербург, ул. профессора Попова, 5

УКАЗАТЕЛЬ ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Кветной И.М., Полякова В.О., Крылова Ю.С., Дробинцева А.О., Петросян М.А. Молекулярная морфология: современные методологические подходы изучения перинатального развития человека в норме и патологии // *Детская медицина Северо-Запада*. 2018. № 1. С. 261; Bahrami E., Witzel M., Racek T., Puchalka J., Hollizeck S., Greif-Kohistani N., Kotlarz D., Horny H.P., Feederle R., Schmidt H., Sherkat R., Steinemann D., Göhring G., Schlegelbeger B., Albert M.H., Al-Herz W., Klein C. Myb-like, SWIRM, and MPN domains 1 (MYSM1) deficiency: Genotoxic stress-associated bone marrow failure and developmental aberrations // *J Allergy Clin Immunol*. 2017. Vol. 140. № 4. P. 1112-1119; Baker D., Childs B., Durik M., Wijers M., Sieben C., Zhong J., Saltness R., Jeganathan K., Verzosa G., Pezeshki A. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan // *Nature*. 2016. № 530. P. 184-189; Childs B.G., Gluscevic M., Baker D.J., Laberge R.-M., Marquess D., Dananberg J., van Deursen J. M. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing // *Nature Reviews Drug Discovery*. 2017. Vol. 16. № 10. P. 718-735; Eggleton P., Bremer E., Dudek E., Michalak M. Calreticulin, a therapeutic target? // *Expert Opin Ther Targets*. 2016. Vol. 20. № 9. P. 1137-1147; Gruver A., Hudson L., Sempowski G. Immunosenescence of ageing // *J Pathol*. 2007. № 211. P. 144; Franceschi C., Campisi J. Chronic inflammation (Inflammaging) and its potential contribution to age-associated Diseases // *Biological Science*. 2014. № 1. P. 4-9; Freund A., Orjalo A. V., Desprez P.-Y., Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences // *Trends in Molecular Medicine*. 2010. Vol. 16. № 5. P. 238-246; Hall B.M., Balan V., Gleiberman A.S., Strom E., Krasnov P., Virtuoso L.P., Rydkina E., Vujcic S., Balan K., Gitlin I., Leonova K., Polinsky A., Chernova O.B., Gudkov A.V. Aging of mice is associated with p16(Ink4a)- and β -galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells // *Aging*. 2016. Vol.8. № 7. P. 1294-1315; He S., Sharpless N.E. Senescence in health and disease // *Cell*. 2017. Vol. 169. № 6. P. 1000-1011; Hohensinner P.J., Kaun C., Buchberger E., Ebenbauer B., Demyanets S., Huk I., Eppel W., Maurer G., Huber K., Wojta J. Age intrinsic loss of telomere protection via TRF1 reduction in endothelial cells // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016. Vol. 1863. P. 360-367; Keefe D.L. Telomeres, Reproductive Aging, and Genomic Instability During Early Development // *Reprod Sci*. 2016. № 12. P. 1612-1615; Kitson S., Sivalingam V.N., Bolton J., McVey R., Nickkho-Amiry M.2, Powell M.E., Leary A., Nijman H.W., Nout R.A., Bosse T., Renehan A.G., Kitchener H.C., Edmondson R.J., Crosbie E.J. Ki-67 in endometrial cancer: scoring optimization and prognostic relevance for window studies // *Modern Pathology*. 2017. № 30. P. 459-468; Liu S., Uppal H., Demaria M., et al. Simvastatin suppresses breast cancer cell proliferation induced by senescent cells // *Scientific Reports*. 2015. № 5 Article number: 17895.; Mailand N., Gibbs-Seymour I., Bekker-Jensen S. Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability // *Nature Rev. Mol. Cell Biol*. 2013. Vol. 14. № 5. P. 269-282; Meola, J., Rosa e Silva J.C., Dentillo D.B., da Silva W.A., Veiga-Castelli L.C., de Souza Bernardes L.A., Ferriani R.A., de Paz C.C., Giuliatti S Martelli L. Differentially expressed genes in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis // *Fertility and Sterility*. 2010. Vol. 93. № 6. P. 1750-1773; Ong A.L., Ramasamy T.S. Role of Sirtuin1-p53 regulatory axis in aging, cancer and cellular reprogramming // *Ageing Res Rev*. 2018. № 43. P. 64-80; Pistritto G., Trisciuglio D., Ceci C., Garufi A., D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies // *Aging*. 2016. Vol. 8. № 4. P. 603-619; Ranjan A., Iwakuma T. Emerging Non-Canonical Functions and Regulation of p53 // *Int. J. Mol. Sci*. 2018. Vol. 19. № 4. P. 1015; Santamaria X., Mas A., Cervelló I., Taylor H., Simon C. Uterine stem cells: from basic research to advanced cell therapies // *Hum Reprod Update*. 2018. Vol. 24. № 6. P. 673-693; Tatone C., Di Emidio G., Barbonetti A., Carta G., Luciano A.M., Falone S., Amicarelli F. Sirtuins in gamete biology and reproductive physiology: emerging roles and therapeutic potential in female and male infertility // *Hum Reprod Update*. 2018. Vol. 24. № 3. P. 267-289; Xia S., Zhang X., Zheng S., Khanabdali R., Kalionis B., Wu J., Wan W., Tai X. An Update on Inflamm-Aging: Mechanisms, Prevention, and Treatment // *J Immunol Res*. 2016. № 8426874; Xu J., Morris G.F. p53-mediated regulation of proliferating cell nuclear antigen expression in cells exposed to ionizing radiation // *Mol Cell Biol*. 1999. Vol. 19. № 1. P.12-20; Zhao H., Traganos F., Darzynkiewicz Z. Kinetics of the UV-induced DNA damage response in relation to cell cycle phase. Correlation with DNA replication // *Cytometry A*. 2010. Vol. 77. № 3. P. 285-293.