

**Заключение экспертной комиссии диссертационного совета
Д 521.103.01 01 при Автономной научной некоммерческой организации
высшего образования Научно-исследовательский центр
«Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»
по диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук ГРИГОРЯН Инны Юрьевны
на тему: «Экспрессия сигнальных молекул в клетках эндометрия человека
при старении *in vitro*»**

Для рассмотрения работы И.Ю. Григорян была создана комиссия из членов диссертационного совета в составе: з.д.н. РФ, д.м.н., проф. Г.А. Рыжак (председатель), 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 Автономной научной некоммерческой организации высшего образования Научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» (АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии») под руководством з.д.н. РФ, д.м.н., проф. И.М. Кветного и проф. РАН, д.б.н., проф. В.О. Поляковой.

Диссертация была апробирована 20 ноября 2017г. протокол № 6 на совместном заседании отделов биogerонтологии, клеточной биологии и патологии, клинической геронтологии и гериатрии АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» и рекомендована к защите на Диссертационном совете Д 521.103.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций по специальности 14.01.30 - геронтология и гериатрия.

Актуальность исследования. 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. 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. 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.

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.

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).

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 старение эндометрия, до сих пор остается недостаточно изученным.

Наиболее значимые результаты, полученные в работе. 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. 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. 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). 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.

Достоверность работы обеспечена достаточным объемом экспериментальных исследований, применением адекватных поставленным задачам современных методов исследования (иммуноцитохимический метод, культивирование клеток, морфометрические исследования, компьютерный анализ микроскопических изображений) и методов математико-статистической обработки полученных данных.

Новизна работы. 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.

Теоретическая значимость. На основе проведенного И.Ю. Григорян исследования объяснен молекулярный механизм старения ткани эндометрия.

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 эндометриальным раком тела матки.

Результаты исследования используются в научно-исследовательской работе в АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» и ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта».

Полученные соискателем результаты могут быть рекомендованы для использования в научно-исследовательской работе по изучению старения эндометрия, а также в учебном процессе по программам магистерской подготовки по специальностям «биология», в программах последипломного образования врачей по специальности «гериатрия и гериатрия».

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 и 7 тезисов докладов. Автореферат и опубликованные по теме диссертации научные работы полностью отражают основные научные результаты диссертационного исследования.

Заключение. На основании вышеизложенного, диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук Григорян Инны Юрьевны на тему: «Экспрессия сигнальных молекул в клетках эндометрия человека при старении *in*

in vitro» может быть оценена как законченная самостоятельная научно-квалификационная работа, которая полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., (в ред. Постановления Правительства РФ [от 21.04. 2016 г. № 335](#)), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, содержит решение актуальной для современной геронтологии и гериатрии задачи: изучению новых аспектов молекулярных механизмов старения эндометрия и может быть принята к защите по специальности 14.01.30 – геронтология и гериатрия (биологические науки).

В качестве официальных оппонентов предлагаются:

Ильницкий Андрей Николаевич, доктор медицинских наук, доцент заведующий кафедрой терапии, гериатрии и антивозрастной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования Института повышения квалификации Федерального медико-биологического агентства, 125371, Москва, Волоколамское шоссе, д. 91.

Белушкина Наталья Николаевна доктор биологических наук, профессор, старший научный сотрудник лаборатории регенеративной биомедицины Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля" Российской академии наук, 119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4.

Предлагается направить работу Григорян Инны Юрьевны «Экспрессия сигнальных молекул в клетках эндометрия человека при старении *in vitro*» на отзыв Ведущего учреждения в Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации (ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ), 194044, г. Санкт-Петербург, ул. академика Лебедева, 6.

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

1.	Гзгзян Александр Мкртычевич, доктор медицинских наук	руководитель отделения вспомогательных репродуктивных технологий ФГБНУ "НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д.3
2.	Захарова Наталья Олеговна, доктор медицинских наук, профессор	профессор кафедры геронтологии, гериатрии и эндокринологии Самарского государственного медицинского университета, 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89

3.	Прощаев Кирилл Иванович, доктор медицинских наук, профессор	профессор кафедры терапии, гериатрии и антивозрастной медицины ФГБОУ ДПО Института повышения квалификации ФМБА РФ, 125371, Москва, Волоколамское шоссе, д. 91.
4.	Насыров Руслан Абдуллаевич, доктор медицинских наук, профессор	заведующий кафедрой патологической анатомии Санкт- Петербургского государственного педиатрического медицинского университета, 194100, Санкт-Петербург, Литовская ул.,2
5.	Марков Александр Георгиевич, доктор биологических наук, профессор	заведующий кафедрой физиологии Санкт-Петербургского государственного университета 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

Предполагаемый срок защиты:

«11» мая 2018 г.

Председатель комиссии:

з.д.н. РФ, доктор медицинских наук, профессор
Г.А. Рыжак



Члены комиссии:

доктор биологических наук, профессор
А.В. Арутюнян

доктор биологических наук
И.Г. Попович

«26» февраля 2018 г.