

На правах рукописи



**ЗУГАИРОВА
Ольга Нуцаловна**

**ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ
И АПОПТОЗА ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ КЛЕТОК
ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

14.01.30 – геронтология и гериатрия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

18 ФЕВ 2010

Санкт-Петербург - 2010

Работа выполнена в отделе клеточной биологии и патологии
Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН

Научный руководитель:

доктор медицинских наук
Коновалов Сергей Сергеевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Кветная Татьяна Викторовна

доктор биологических наук
Белушкина Наталья Николаевна

Ведущая организация:

ГОУВПО «Санкт-Петербургская государственная медицинская
академия им. И.И. Мечникова» ФАЗСР

Защита диссертации состоится 26 «июня 2010 г. в 13
часов на заседании диссертационного совета Д 601.001.01 при Санкт-
Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН по
адресу: 197110, Россия, Санкт-Петербург, пр. Динамо, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке
Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН
(197110, Россия, Санкт-Петербург, пр. Динамо, д. 3).

Автореферат разослан «25 » июня 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета
доктор биологических наук, доцент

Козина Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Среди многообразия факторов, способных оказывать повреждающее действие на живой организм, особое место занимает ионизирующая радиация. Опасность негативного воздействия радиационного излучения связана с бурно развивающейся в последние десятилетия атомной энергетикой и широким применением в медицине радиоизотопных методов диагностики и лечения. Эффекты действия ионизирующего излучения запускают в живом организме каскад биохимических процессов, приводящих к преждевременному старению на всех уровнях организма – клеточном, тканевом, органном.

Учитывая эти обстоятельства, детальное изучение биологических эффектов радиации на жизнедеятельность организма человека приобретает все большую актуальность как для биомедицины в целом, так и для геронтологии в частности.

Щитовидная железа является самым радиочувствительным органом из всех жизненно важных органов. Поэтому важно провести сравнительное изучение эффектов облучения щитовидной железы в зависимости от возраста, так как функция щитовидной железы изменяется при старении организма, и ионизирующая радиация может еще более усугубить возникновение возрастных дисфункций, что существенным образом отразится как на взаимосвязанной деятельности нейроэндокринной системы, так и на функции других органов и систем, прежде всего, сердца и сосудов.

Помимо йодсодержащих гормонов, щитовидная железа продуцирует ряд биологически активных веществ, влияющих на различные физиологические процессы. В данной работе проведена оценка экспрессии двух таких веществ, являющихся маркерами основных биологических процессов, обеспечивающих функционирование щитовидной железы и лежащих в основе неопластической трансформации – пролиферации и апоптоза клеток. Такими биологически активными веществами являются белок

Ki-67 – клеточный маркер пролиферации, экспрессия которого неодинакова в клетках щитовидной железы людей разных возрастных групп [Saad A.G. et al., 2006], а также белок P53, осуществляющий контроль над течением процессов клеточного цикла, а также за отсутствием в геноме повреждений, которые могли бы привести к дальнейшему развитию патологии. P53-зависимый апоптоз – мощный селектор, позволяющий избежать накопления мутаций, а, в случае, когда они уже возникли, P53-зависимый апоптоз позволяет элиминировать такие потенциально опасные для организма клетки [Новиков В.С., 1996]. Белок P53 играет важную роль и в первичном ответе организма на действие радиации. Подтверждением этого являются результаты эксперимента по облучению мышей. Массовый апоптоз, происходящий в радиочувствительных тканях мышей P53-дикого типа вскоре после облучения гамма-излучением, не наблюдается у P53-негативных животных [Meritt A.J. et al., 1994; Cui Y.F. et al., 1995; Komarova E.A. et al., 1997; Hasegawa M. et al., 1998].

Цель и задачи исследования

Целью данной работы явилось изучение возрастной динамики процессов пролиферации и апоптоза фолликулярных клеток щитовидной железы у человека и крыс как при естественном, так и при индуцированном (радиационном) старении.

В рамках указанной цели были поставлены и последовательно решены следующие задачи:

1. Изучить корреляции между пролиферативной активностью и апоптозом клеток щитовидной железы у лиц пожилого и старческого возраста.
2. Оценить корреляции между пролиферативной активностью и апоптозом в щитовидной железе у крыс при индуцированном старении (действии ионизирующей радиации в сублетальных дозах).

3. Сравнить возрастную динамику пролиферативной активности и апоптотического потенциала клеток щитовидной железы у человека и крыс
4. Оценить повреждающий геротропный эффект ионизирующего излучения на щитовидную железу крыс и экстраполировать возможные последствия на щитовидную железу человека.

Научная новизна

Впервые проведено исследование уровня пролиферации тиреоцитов людей пожилого, старческого возраста и долгожителей, а также уровня пролиферации тиреоцитов облученных и необлученных крыс разных возрастных групп. Полученные данные свидетельствуют о том, что с возрастом, как у людей, так и у крыс, антипролиферативные процессы и апоптоз доминируют над процессами пролиферации в щитовидной железе, что является одной из причин старческой инволюции органа.

Установлено снижение экспрессии пролиферотропного белка Ki-67 на фоне увеличения экспрессии проапоптозного фактора P53. Подобные данные получены и при исследовании щитовидных желез крыс.

При воздействии ионизирующей радиации в щитовидных железах, как молодых, так и старых крыс резко возрастает антипролиферативная активность и, соответственно, уровень апоптоза. В то же время при общем снижении числа активно делящихся тиреоцитов, в некоторых клетках отмечается повышение концентрации белка пролиферации Ki-67, что отражается на очаговой интенсификации процессов пролиферации за счет клеток, сохранивших способность к росту и делению. Во всех возрастных группах животных баланс пролиферативной активности и апоптоза при индуцированном старении (после облучения) достоверно смещается в сторону антипролиферативной активности и клеточной гибели.

Практическая значимость

Полученные результаты позволяют расширить представления о механизмах возрастной инволюции щитовидной железы и разработать в дальнейшем пути профилактики радиационных повреждений, приводящих к преждевременному старению органа, что может существенным образом отразиться на деятельности нейроэндокринной системы, а также на работе других органов и систем, прежде всего, сердца и сосудов.

Положения, выносимые на защиту

1. Обнаружена корреляция между пролиферативной активностью и апоптозом клеток щитовидной железы у лиц пожилого и старческого возраста.
2. При естественном старении в щитовидной железе человека и крыс происходит смещение баланса процессов пролиферации и апоптоза в сторону антитролиферативных процессов и усиления апоптоза.
3. При индуцированном (радиационном) старении в щитовидной железе крыс зарегистрировано достоверное усиление процессов клеточной гибели, прежде всего, фолликулярных тиреоцитов. При этом выраженность процесса апоптоза усугубляется с увеличением возраста крыс, подвергнутых облучению.

Связь с научно-исследовательской работой Института

Диссертационная работа выполнялась в соответствии с планом НИР Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 3 глав, выводов и указателя литературы. Глава 1 (обзор литературы) представляет собой анализ данных литературы по функциональной морфологии щитовидной железы, а также особенностях экспрессии белков Ki-67 и P53, являющихся маркерами

пролиферации и апоптоза. Глава 2 посвящена описанию материалов и методов, используемых в данном исследовании. Глава 3 представляет собственные экспериментальные данные изучения возрастной динамики экспрессии белков Ki-67 и P53 в клетках щитовидных желез человека и крыс. В разделе «заключение» обсуждаются полученные результаты. Текст диссертации изложен на 103 страницах, иллюстрирован 26 рисунками. Список литературы содержит 156 источников, из которых отечественных – 25.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ. Из них 1 статья в журнале по перечню ВАК Минобрнауки РФ и 11 тезисов докладов.

Апробация и реализация диссертации

Материалы диссертации доложены на Весенней геронтологической конференции (Белгород, 2009); Геронтологических чтениях (Белгород - Новополоцк, 2009); IV Международном конгрессе «Человек, спорт, здоровье» (Санкт-Петербург, 2009); конференции «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, 2009).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика исследуемого материала

Объектом исследования послужили щитовидные железы людей разных возрастных групп, полученных при аутопсиях, проведенных в больнице св. Георгия (Санкт-Петербург). Весь материал был разделен на 3 группы:

1. Люди пожилого возраста (60-74 лет, $n = 43$);
2. Люди старческого возраста (75-89 лет, $n = 34$);
3. Долгожители (90 лет и старше, $n = 22$).

Также исследования были проведены на 40 самцах крыс линии Вистар. Все животные были разделены на 4 группы:

- 1 – необлученные крысы 3-месячного возраста (молодые животные);
- 2 – необлученные крысы 24-месячного возраста (старые животные);
- 3 – облученные крысы 3-месячного возраста (молодые животные);
- 4 – облученные крысы 24-месячного возраста (старые животные).

Гистологические методы

Фрагменты щитовидных желез фиксировали в нейтральном растворе формалина ($\text{pH}=7$), проводили через спирты, ксилолы и заливали в парафин по стандартной методике. Для морфологического изучения срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Гистохимические и иммуногистохимические методы

Для верификации экспрессии в тканях щитовидных желез белков Ki-67 и P53 был использован иммуногистохимический метод. Срезы толщиной 3-5 мкм помещали на предметные стекла, покрытые пленкой из поли-L-лизина. Использовали первичные моноклональные антитела к Ki-67 (1:500, Dako), P53 (1:500, Dako). В качестве вторых антител использовали биотинилированные антитела (Dako). Визуализацию окрасок проводили с применением комплекса авидина с биотинилированной пероксидазой (ABC-kit), с последующим проявлением пероксидазы хрена диаминобензидином (все реагенты от Dako).

Количественная оценка результатов исследования

Количественную оценку результатов исследования проводили с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящей из микроскопа Nikon Eclipse E400, цифровой камеры Nikon DXM1200, персонального компьютера на базе Intel Pentium 4, программного обеспечения «ACT-1» (версия 2.12) и «Видеотест-

Морфология» (версия 5.0). Определяли три параметра: оптическую плотность (в относительных единицах), среднюю яркость (в относительных единицах) и суммарную площадь иммуноокрашенных структур (в %).

Методы статистической обработки результатов исследования

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы Statistica 6.0. Для проверки неоднородности 3 групп использовали непараметрический критерий ANOVA Kruskal-Wallis; для оценки неоднородности 2 групп использовали непараметрический критерий Mann-Whitney U test. Для анализа распределения использовали критерий Шапиро-Уилка.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Верификация экспрессии белка Ki-67 в щитовидных железах людей разных возрастных групп

При светооптическом исследовании наблюдается снижение экспрессии белка Ki-67 в тиреоцитах людей с возрастом. У людей пожилого возраста она наблюдалась практически во всех тиреоцитах, тогда как в группе долгожителей лишь в единичных случаях.

Статистическая обработка данных подсчета оптической плотности иммуноокрашенных тиреоцитов выявила достоверное ($P < 0,05$) снижение оптической плотности тиреоцитов с экспрессией белка Ki-67 с возрастом: достоверные различия обнаружены между 1 и 3 группами людей ($P < 0,05$) (рис. 1а). Максимальное среднее значение этого показателя зафиксировано в группе людей пожилого возраста (0,185 y.e.), минимальное среднее значение оптической плотности установлено для группы долгожителей (0,113 y.e.).

Было проведено сравнение средних значений средней яркости для иммуноокрашенных тиреоцитов разных возрастных групп (рис. 1б). Значения данного показателя оказываются инвертированы, поскольку компьютерная программа Morphology 5.0. позволяет сравнить среднюю яркость с

абсолютным черным: чем ярче окрашена структура, тем ниже значение средней яркости.

Статистическая обработка данных выявила достоверное ($P<0,05$) снижение средней яркости тиреоцитов с экспрессией белка Ki-67 с возрастом: достоверные различия обнаружены между 1 и 3 группами людей ($P<0,05$). Максимальная яркость была зафиксирована в группе людей пожилого возраста (170,917 у.е.), минимальное среднее значение яркости установлено для группы долгожителей (194,663 у.е.).

Было проведено сравнение средних значений суммарной площади иммуноокрашенных тиреоцитов по маркеру Ki-67 для разных возрастных групп.

Статистическая обработка данных выявила достоверное ($P<0,05$) снижение значений суммарной площади иммуноокрашенных структур с возрастом: достоверные различия обнаружены между 1 и 3 группами людей ($P<0,05$) (рис. 1в). Наибольшее среднее значение иммуноокрашенных тиреоцитов наблюдается в группе людей пожилого возраста (57,154%), тогда как наименьшее значение этот показатель принимает в группе долгожителей (25,056%).

Верификация экспрессии белка Ki-67 в щитовидных железах крыс разных возрастных групп при индуцированном (радиационном) старении

Для верификации экспрессии белка Ki-67 в фолликулярных клетках щитовидных желез облученных и необлученных крыс были выбраны 2 возрастные группы: крысы 3-месячного возраста (молодые животные) и крысы в возрасте 24 месяцев (старые животные).

На срезах щитовидных желез облученных крыс обеих возрастных групп встречаемость окрашенных тиреоцитов визуально снижается по сравнению с необлученными крысами.

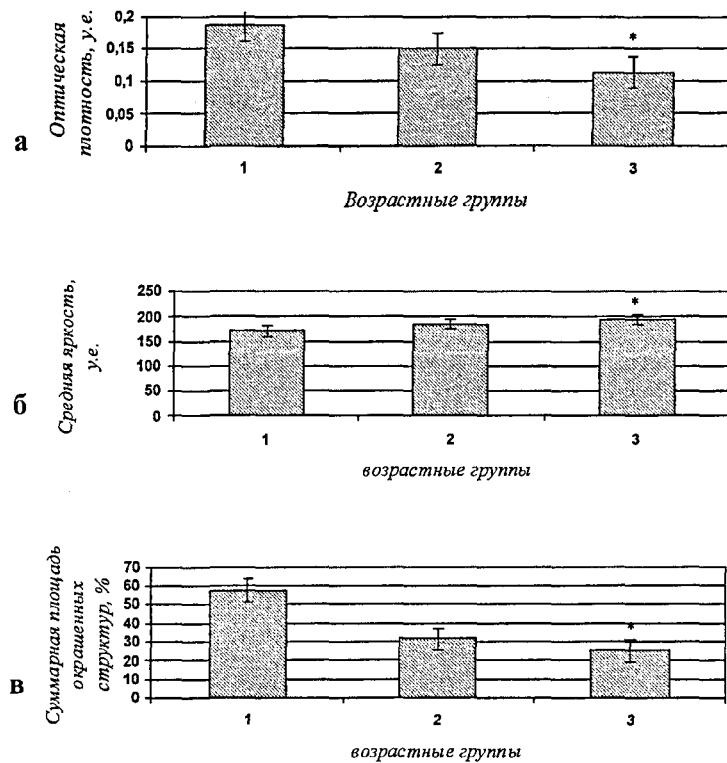


Рис. 1. Экспрессия белка Ki-67 в клетках щитовидной железы человека. Группа 1 - люди пожилого возраста; группа 2 - люди старческого возраста; группа 3 - долгожители. а - оптическая плотность иммуноокрашенных структур; * - достоверное отличие 1 группы от 3 ($P<0,05$); б - средняя яркость иммуноокрашенных структур; * - достоверное отличие 1 группы от 3 ($P<0,05$); в - суммарная площадь иммуноокрашенных структур, %; * - достоверное отличие 1 группы от 3 ($P<0,05$).

Оценивали два параметра: оптическую плотность и суммарную площадь иммуноокрашенных структур.

Подсчет суммарной площади иммуноокрашенных структур и последующая статистическая обработка полученных данных показали, что с вероятностью $P<0,05$ происходит снижение количества тиреоцитов, экспрессирующих белок Ki-67, в группе крыс, подвергшихся воздействию

ионизирующей радиации. В группе облученных молодых крыс этот показатель принимает значение $0,908 \pm 0,023\%$, в то время как для группы необлученных молодых крыс суммарная площадь иммуноокрашенных структур составляет $3,209 \pm 0,028\%$. Снижение суммарной площади иммуноокрашенных структур происходит и в группе крыс 24-месячного возраста. Здесь этот показатель для облученных животных принимает значение $0,798 \pm 0,013\%$, а для необлученных - $2,700 \pm 0,021\%$ (рис. 2а).

Подсчет оптической плотности иммуноокрашенных клеток выявил увеличение экспрессии белка Ki-67 в тиреоцитах крыс, подвергшихся воздействию ионизирующей радиации. При статистической обработке значений оптической плотности иммуноокрашенных тиреоцитов группы крыс 3-месячного возраста ($0,892 \pm 0,027$ у.е. для облученных животных и $0,702 \pm 0,019$ у.е. для необлученных) и группы крыс 24-месячного возраста ($1,013 \pm 0,041$ у.е. для облученных животных и $0,799 \pm 0,010$ у.е. для необлученных) было показано, что значения оптической плотности статистически значимо ($P < 0,05$) выше у облученных животных в каждой возрастной группе (рис. 2б).

Было проведено исследование уровня пролиферации тиреоцитов людей пожилого, старческого возраста и долгожителей, а также уровня пролиферации тиреоцитов облученных и необлученных крыс разных возрастных групп.

На основании оценки оптической плотности, средней яркости и суммарной площади иммуноокрашенных фолликулярных клеток щитовидных желез людей, можно сделать вывод о том, что с возрастом пролиферативные процессы в щитовидной железе становятся все менее выраженными, что и является одной из причин старческой инволюции органа.

Данные, полученные на крысах, показали, что уровень пролиферации ткани щитовидной железы также снижается с возрастом, но только за счет снижения количества клеток, экспрессирующих пролиферативный белок Ki-

67. После воздействия ионизирующей радиацией, количество клеток, способных к росту и делению, резко падает, но уровень экспрессии пролиферативного белка Ki-67 в оставшихся активных клетках повышается. Возможно, это является компенсацией.

После облучения сохраняется тенденция к снижению числа активно делящихся тиреоцитов и повышению в них концентрации белка пролиферации Ki-67.

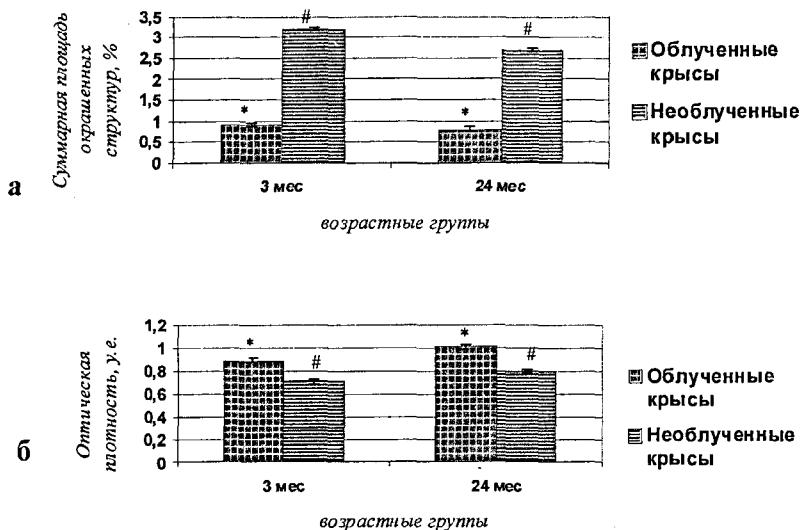


Рис. 2. Экспрессия белка Ki-67 в клетках щитовидной железы облученных и необлученных крыс разных возрастных групп. а - суммарная площадь иммуноокрашенных тиреоцитов, %; * - достоверное отличие групп облученных животных от необлученных ($P<0,05$); # - достоверное отличие групп крыс 24 месяцев от крыс 3 месяцев ($P<0,05$); б - оптическая плотность иммуноокрашенных тиреоцитов; * - достоверное отличие групп облученных животных от необлученных ($P<0,05$); # - достоверное отличие групп крыс 24 месяцев от крыс 3 месяцев ($P<0,05$).

Верификация экспрессии белка P53 в щитовидных железах людей разных возрастных групп

При светооптическом исследовании наблюдается увеличение экспрессии белка P53 в тиреоцитах людей с возрастом. Экспрессия белка P53

у людей пожилого возраста наблюдается в единичных случаях, тогда как в группе долгожителей практически во всех тиреоцитах.

Оценивали 3 параметра: оптическую плотность, среднюю яркость и суммарную площадь иммуноокрашенных структур.

Статистическая обработка данных оптической плотности иммуноокрашенных тиреоцитов выявила достоверное ($P<0,05$) увеличение оптической плотности тиреоцитов с экспрессией белка P53 с возрастом: достоверные различия ($P<0,05$) наблюдаются между 1 и 3 группами (рис. 3а). Минимальное среднее значение этого показателя было зафиксировано в группе людей пожилого возраста ($0,138 \pm 0,019$ у.е.), максимальное среднее значение оптической плотности установлено для группы долгожителей ($0,186 \pm 0,021$ у.е.).

Статистическая обработка данных средних значений средней яркости для разных возрастных групп выявила достоверное ($P<0,05$) увеличение средней яркости тиреоцитов с экспрессией белка P53 с возрастом: достоверные различия ($P<0,05$) наблюдаются между 1 и 3 группами (рис. 3б). Минимальная яркость была зафиксирована в группе людей пожилого возраста ($191,135 \pm 10,896$ у.е.), максимальное среднее значение яркости установлено для группы долгожителей ($163,106 \pm 13,787$ у.е.).

Подсчет суммарной площади иммуноокрашенных структур по белку P53 позволил сделать вывод о сохранении значения этого показателя на протяжении исследуемого отрезка онтогенеза человека (рис. 3в). Было проведено сравнение средних значений суммарной площади иммуноокрашенных структур по маркеру P53 для разных возрастных групп. Максимальное среднее значение (51,823%) выявлено для группы людей пожилого возраста, минимальное (39,867%) – для группы долгожителей. Тем не менее, тенденции к снижению экспрессии белка P53 не наблюдается, т.к. ошибки этих величин перекрываются между собой. Статистическая обработка данных также не выявила различий между тремя выборками ($P=0,49$).

Верификация экспрессии белка P53 в щитовидных железах облученных и необлученных крыс разных возрастных групп

Для верификации экспрессии белка P53 в фолликулярных клетках щитовидных желез облученных и необлученных крыс были выбраны 2 возрастные группы: крысы 3-месячного возраста и крысы 24-месячного возраста.

Проведен количественный анализ по 2 параметрам: оптическая плотность и суммарная площадь иммуноокрашенных структур.

Подсчет суммарной площади иммуноокрашенных структур и последующая статистическая обработка полученных данных показали, что с вероятностью $P<0,05$ количество тиреоцитов, экспрессирующих белок P53, увеличивается с возрастом, как среди облученных крыс, так и среди необлученных. В группе облученных крыс 3-месячного возраста этот показатель принимает значение $4,101 \pm 0,029\%$, в то время как для группы необлученных крыс 3-месячного возраста суммарная площадь иммуноокрашенных структур составляет $1,903 \pm 0,024\%$. Повышение суммарной площади иммуноокрашенных структур происходит и в группе крыс 24-месячного возраста. Здесь этот показатель для облученных животных принимает значение $5,295 \pm 0,021\%$, а для необлученных - $3,100 \pm 0,018\%$ (рис. 4а).

При статистической обработке значений оптической плотности иммуноокрашенных тиреоцитов группы крыс 3-месячного возраста ($1,105 \pm 0,018$ у.е. для облученных животных и $0,806 \pm 0,022$ у.е. для необлученных) и группы крыс 24-месячного возраста ($1,197 \pm 0,025$ у.е. для облученных животных и $0,999 \pm 0,038$ у.е. для необлученных) было показано, что значения оптической плотности статистически значимо ($P<0,05$) выше у облученных животных в каждой возрастной группе (рис. 4б).

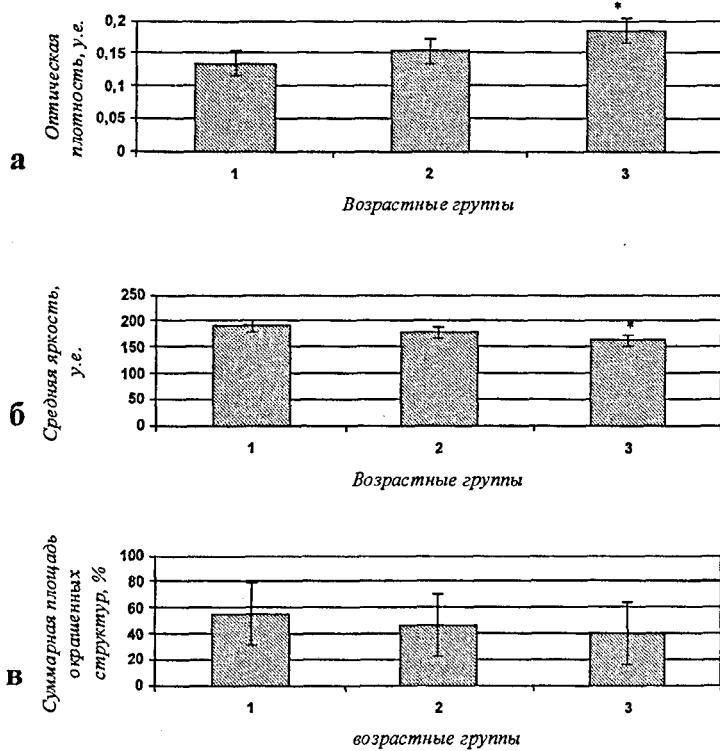


Рис. 3. Экспрессия белка P53 в клетках щитовидной железы человека. Группа 1 - люди пожилого возраста; группа 2 - люди старческого возраста; группа 3 - долгожители. а - оптическая плотность иммуноокрашенных структур; * - достоверное отличие 1 группы от 3 ($P<0,05$); б - средняя яркость иммуноокрашенных структур; * - достоверное отличие 1 группы от 3 ($P<0,05$); в - суммарная площадь иммуноокрашенных структур, %.

Было проведено исследование уровня апоптотической активности тиреоцитов людей пожилого, старческого возраста и долгожителей, а также уровня антипролиферативной активности тиреоцитов облученных и необлученных крыс разных возрастных групп.

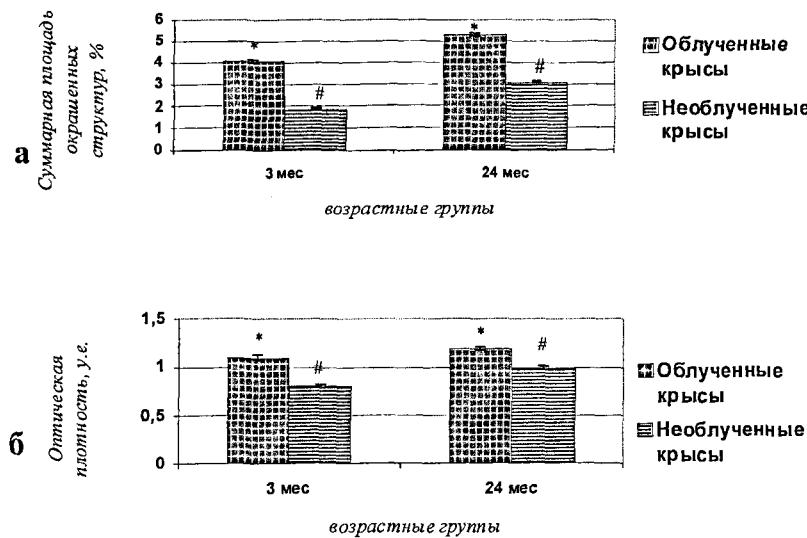


Рис. 4. Экспрессия белка P53 в клетках щитовидной железы облученных и необлученных крыс разных возрастных групп. а - суммарная площадь иммуноокрашенных тиреоцитов, %; * - достоверное отличие групп облученных животных от необлученных ($P<0,05$); # - достоверное отличие групп крыс 24 месяцев от крыс 3 месяцев ($P<0,05$); б - оптическая плотность иммуноокрашенных тиреоцитов; * - достоверное отличие групп облученных животных от необлученных ($P<0,05$); # - достоверное отличие групп крыс 24 месяцев от крыс 3 месяцев ($P<0,05$).

На основании оценки оптической плотности, средней яркости и суммарной площади иммуноокрашенных фолликулярных клеток щитовидных желез людей, можно сделать вывод о том, что экспрессия проапоптотического белка P53 и количество экспрессирующих этот белок клеток увеличивается с возрастом.

Данные, полученные на крысах, показали, что после воздействия ионизирующей радиацией экспрессия проапоптотического белка P53 в тиреоцитах и количество таких тиреоцитов резко увеличивается.

Оценка баланса пролиферации и апоптоза в разных возрастных группах людей, а также облученных и необлученных крыс

Оценка баланса пролиферации и апоптоза в тиреоцитах в разных возрастных группах проводилась на основании оценки уровней экспрессии белка пролиферации Ki-67 и проапоптотического белка P53 по двум параметрам: оптическая плотность и суммарная площадь иммуноокрашенных структур.

Баланс пролиферации и апоптоза на основании оценки оптической плотности у людей с возрастом смещается в сторону апоптоза (рис. 5а).

Экспрессия белка P53 коррелирует ($r = -0,977$) с экспрессией белка Ki-67. Значения разницы в уровнях экспрессии белков Ki-67 и P53 следующие: 0,047 – в группе людей пожилого возраста; -0,04 – в группе людей старческого возраста; -0,073 в группе долгожителей. Разница в уровнях экспрессии белков Ki-67 и P53 соотносится с возрастом человека: чем больше возраст пациента, тем больше экспрессия белка P53 превалирует над экспрессией белка Ki-67. Таким образом, с возрастом баланс пролиферации и антипролиферативной активности смещается в сторону антипролиферативной активности.

Баланс пролиферации и апоптоза на основании оценки суммарной площади иммуноокрашенных тиреоцитов у людей с возрастом изменяется, смещаясь в сторону апоптоза (рис. 5б).

Корреляционный анализ полученных данных показал, экспрессия белка Ki-67 коррелирует с экспрессией белка P53 ($r=0,966$). Значения разницы в уровнях экспрессии белков Ki-67 и P53 следующие: 2,331 – в группе людей пожилого возраста; -14,976 – в группе людей старческого возраста и -14,811 в группе долгожителей. Разница в уровнях экспрессии белков Ki-67 и P53 соотносится с возрастом человека: чем больше возраст пациента, тем больше экспрессия белка P53 превалирует над экспрессией белка Ki-67.

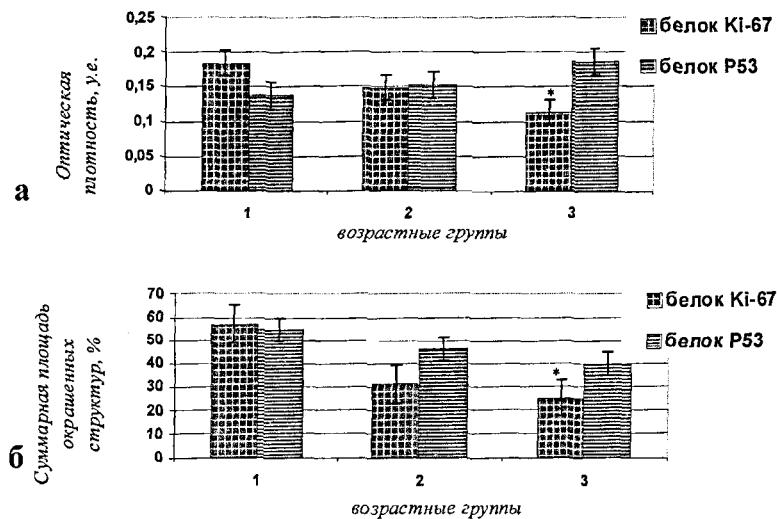


Рис. 5. Баланс уровней экспрессии Ki-67 и P53 у людей разных возрастных групп. Группа 1 - люди пожилого возраста; группа 2 - люди старческого возраста; группа 3 - долгожители. а - оптическая плотность иммуноокрашенных структур; * - достоверное отличие 1 группы от 3 ($P<0,05$); б - суммарная площадь иммуноокрашенных структур, %; * - достоверное отличие 1 группы от 3 ($P<0,05$).

Баланс пролиферации и апоптоза в щитовидной железе на основании оценки оптической плотности у необлученных крыс с возрастом изменяется; процесс апоптоза начинает сильнее доминировать над процессами пролиферации (рис. 6а).

Значения разницы в уровнях экспрессии белков Ki-67 и P53 следующие: $-0,104$ – в группе 3-месячного возраста и $-0,2$ – в группе крыс 24-месячного возраста. Разница в уровнях экспрессии белков Ki-67 и P53 соотносится с возрастом крыс: чем старше крыса, тем больше экспрессия белка P53 превалирует над экспрессией белка Ki-67.

Баланс пролиферации и апоптоза на основании оценки суммарной площади иммуноокрашенных тиреоцитов у необлученных крыс с возрастом смещается в сторону апоптоза (рис. 6б).

Значения разницы в уровнях экспрессии белков Ki-67 и P53 следующие: 1,306 – в группе крыс 3-месячного возраста; -0,4 – в группе крыс 24-месячного возраста. Разница в уровнях экспрессии белков Ki-67 и P53 соотносится с возрастом крыс: чем старше крыса, тем больше экспрессия белка P53 превалирует над экспрессией белка Ki-67.

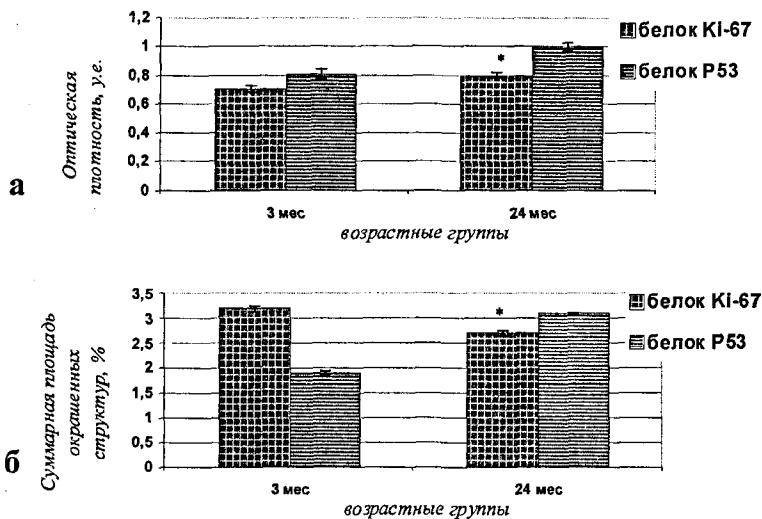


Рис. 6. Баланс уровней экспрессии Ki-67 и P53 у необлученных крыс разных возрастных групп. а - оптическая плотность иммуноокрашенных структур; * - достоверное отличие крыс 3 мес. от крыс 24 мес. ($P<0,05$); б - суммарная площадь иммуноокрашенных структур, %; * - достоверное отличие крыс 3 мес. от крыс 24 мес. ($P<0,05$).

Анализ параметров оптической плотности показал, что баланс пролиферации и апоптоза у облученных крыс 3 мес. по сравнению с необлученными крысами 3 мес. изменяется: процесс апоптоза начинает сильнее доминировать над процессами пролиферации (рис. 7а).

Значения разницы в уровнях экспрессии белков Ki-67 и P53 следующие: -0,104 в группе необлученных крыс 3-месячного возраста и -0,213 – в группе облученных крыс 3- месячного возраста.

Анализ оптических плотностей показал, что баланс пролиферации и апоптоза у облученных крыс 24 мес. изменяется по сравнению с необлученными крысами 24 мес. (рис. 7б).

Значения разницы в уровнях экспрессии белков Ki-67 и P53 следующие: -0,2 в группе необлученных крыс 24-месячного возраста и -0,184 – в группе облученных крыс 24-месячного возраста.

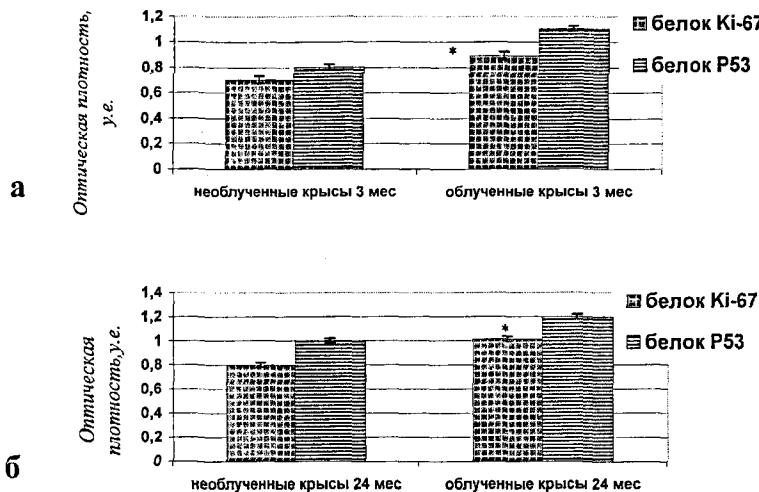


Рис. 7. Баланс уровней экспрессии Ki-67 и P53 по оптической плотности у облученных и необлученных крыс разных возрастных групп. * – достоверное отличие облученных животных от необлученных ($P<0,05$).

Анализ суммарной площади иммуноокрашенных структур показал, что баланс пролиферации и апоптоза у облученных крыс 3 мес. по сравнению с необлученными крысами 3 мес. смещается в сторону апоптоза (рис. 8а).

Значения разницы в уровнях экспрессии белков Ki-67 и P53 следующие: 1,306 в группе необлученных крыс 3-месячного возраста и -3,193 – в группе облученных крыс 3-месячного возраста.

Анализ суммарной площади иммуноокрашенных структур показал, что баланс пролиферации и апоптоза изменяется у облученных крыс 24 мес. по сравнению с необлученными крысами 24 мес. (рис. 8б).

Значения разницы в уровнях экспрессии белков Ki-67 и P53 следующие: -0,4 в группе необлученных крыс 24-месячного возраста и -4,497 в группе облученных крыс 24-месячного возраста.

Полученные данные указывают на то, что с возрастом, как у людей, так и у крыс, антипролиферативные процессы и апоптоз начинают доминировать над процессами пролиферации, что является одной из причин старческой инволюции органа.

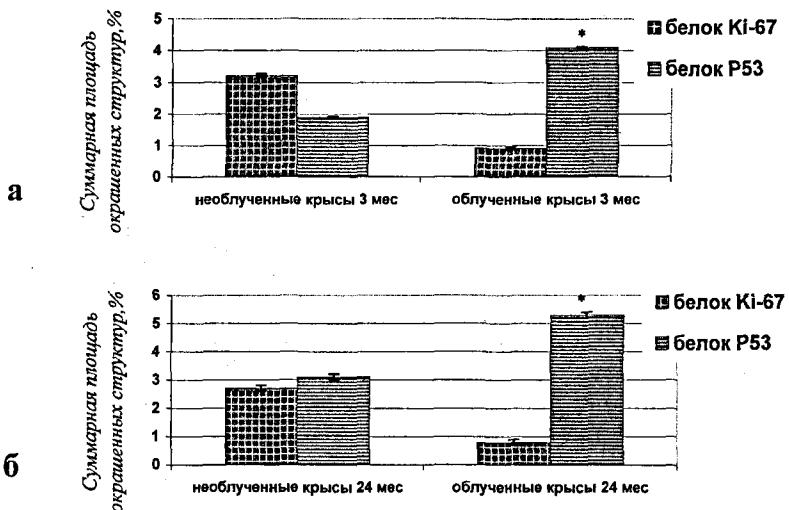


Рис. 8. Баланс уровней экспрессии Ki-67 и P53 по суммарной площади иммуноокрашенных структур у облученных и необлученных крыс разных возрастных групп. * - достоверное отличие облученных животных от необлученных ($P<0,05$).

У людей до 75 лет процессы пролиферации в щитовидной железе преобладают над процессами апоптоза, но к 90 годам антипролиферативные процессы и апоптоз окончательно доминируют над пролиферацией. На это указывает и снижение экспрессии пролиферативного белка Ki-67 на фоне увеличения экспрессии проапоптозного фактора P53, и снижение количества тиреоцитов, экспрессирующих белок Ki-67, на фоне увеличения количества

тиреоцитов, экспрессирующих белок P53. Подобные данные были получены и при исследовании щитовидных желез крыс.

При воздействии ионизирующей радиации в тиреоцитах как молодых, так и старых крыс резко увеличивается количество повреждений, возрастает антипролиферативная активность и, соответственно, возможный уровень апоптоза. В то же время количество клеток, способных к активному делению и росту, резко уменьшается. При этом наблюдается интенсификация процессов пролиферации за счет клеток, сохранивших способность к росту и делению. Во всех возрастных группах животных баланс пролиферативной активности и апоптоза после облучения достоверно смещается в сторону антипролиферативной активности и клеточной гибели.

ВЫВОДЫ

1. При старении происходит снижение пролиферативной активности тиреоцитов в щитовидной железе человека.
2. Индуцированное старение (воздействие ионизирующей радиации) приводит к уменьшению суммарной площади экспрессии белка Ki-67 в щитовидной железе старых крыс, однако усиливает пролиферативную активность тиреоцитов в молодом возрасте, что является потенциально неблагоприятным для формирования опухолевых очагов в щитовидной железе.
3. Зарегистрировано возрастное усиление процессов апоптоза клеток щитовидной железы у человека
4. Воздействие ионизирующей радиации приводит к активации процессов апоптоза в щитовидной железе крыс различного возраста. Сравнение показателей экспрессии проапоптозного фактора P53 у необлученных животных свидетельствует об усилении под действием радиации естественных инволютивных процессов, способствующих программированной клеточной гибели.

5. На основании оценки баланса процессов пролиферации и апоптоза в щитовидной железе человека и крыс показано преобладание антипролиферативных процессов при старении.

6. Воздействие ионизирующей радиации приводит к смещению баланса между процессами пролиферации и апоптоза в щитовидной железе крыс в сторону усиления клеточной гибели.

7. Однотипность динамики баланса пролиферативной активности и апоптоза клеток щитовидной железы у человека и крыс позволяет экстраполировать результаты экспериментальных исследований на человека.

8. Возрастное снижение пролиферативной активности тиреоцитов у человека и смещение баланса процессов пролиферации и апоптоза при действии радиации в сторону клеточной гибели, прогрессирующее с возрастом у крыс, позволяет рассматривать старение как фактор, снижающий риск возникновения радиационно индуцируемого рака щитовидной железы

Практические рекомендации

1. При исследовании биопсий щитовидных желез пациентов пожилого и старческого возраста рекомендуется оценивать экспрессии белков Ki-67 и P53 для оценки риска возникновения и прогноза неопластического роста.

2. При облучении щитовидных желез в пожилом и старческом возрасте выбор диапазона дозовой нагрузки может быть расширен за счет снижения риска развития неопластической трансформации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статья в журнале, включенном в Перечень ВАК Минобрнауки РФ

1. Динамика процессов пролиферации и апоптоза фолликулярных клеток щитовидной железы человека и крыс при естественном и радиационно-индуцированном старении/О.Н. Зугаирова, В.О. Полякова, С.С. Коновалов//Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. – Санкт-Петербург. – 2009. – № 4. – С. 54-58.

Тезисы докладов

2. Верификация экспрессии протеина Р53 в щитовидной железе человека при старении/О.Н. Зугаирова, С.С. Коновалов, В.О. Полякова//Матер. Весенней геронтологической конференции. – Белгород. – 2009. – С. 27- 28.
3. Возрастная динамика пролиферативной активности фолликулярных клеток щитовидной железы человека/О.Н. Зугаирова, С.С. Коновалов, В.О. Полякова//Матер. Весенней геронтологической конференции. – Белгород. – 2009. – С. 28-29.
4. Возрастные изменения экспрессии факторов пролиферации и апоптоза в щитовидной железе крыс при моделировании ускоренного старения/О.Н. Зугаирова, В.О. Полякова, С.С. Коновалов//Геронтологические чтения. – Белгород – Новополоцк. – 2009. – С. 13-14.
5. Показатели клеточного обновления в щитовидной железе при возрастной инволюции/О.Н. Зугаирова, В.О. Полякова, С.С. Коновалов//Геронтологические чтения. – Белгород – Новополоцк. – 2009. – С. 14-15.
6. Показатели клеточного обновления в щитовидной железе человека как маркеры возрастной адаптации организма/О.Н. Зугаирова, В.О. Полякова, С.С. Коновалов//IV Международный конгресс «Человек, спорт, здоровье». – Санкт-Петербург. – 2009. – С. 129.
7. Изменение уровня синтеза белка Ki-67 в щитовидной железе как показатель возрастного снижения адаптации к физическим нагрузкам/О.Н. Зугаирова, В.О. Полякова, С.С. Коновалов//IV Международный конгресс «Человек, спорт, здоровье». – Санкт-Петербург. – 2009. – С.128-129.
8. Возрастная динамика экспрессии белка Р53 в фолликулярных клетках щитовидной железы человека как основа планирования физических нагрузок/О.Н. Зугаирова, В.О. Полякова, С.С. Коновалов//IV Международный конгресс «Человек, спорт, здоровье». – Санкт-Петербург. – 2009. – С. 127-128.
9. Возрастная динамика пролиферации и апоптоза в щитовидной железе человека/О.Н. Зугаирова, В.О. Полякова//Фундаментальная наука и клиническая медицина. – Санкт-Петербург. – 2009. – С. 140- 141.

- 10.Пострадиационные нарушения динамики клеточного обновления в щитовидной железе крыс разного возраста/О.Н. Зугаирова, В.О. Полякова//Фундаментальная наука и клиническая медицина. – Санкт-Петербург. – 2009. – С. 139-140.
- 11.Экспрессия белка пролиферации Ki-67 в нейроиммunoэндокринных клетках щитовидной железы людей разных возрастных групп/ О.Н. Зугаирова, С.С. Коновалов, В.О. Полякова//XVII Всероссийская конференция «Нейроиммунология». – Санкт-Петербург. – 2009. – С. 42.
- 12.Возрастная динамика экспрессии белка Р53 в нейроиммunoэндокринных клетках щитовидной железы/О.Н. Зугаирова, С.С. Коновалов, В.О. Полякова//XVII Всероссийская конференция «Нейроиммунология». – Санкт-Петербург. – 2009. – С. 42-43.

Зугаирова Ольга Николаевна ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ КЛЕТОК ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ// Автореф. дис. канд. биол. наук: 14.01.30 – СПб., 2010. – 26 с.

Подписано в печать 20.01.2010. Формат 60*84 1/16.

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

Тираж 100 экз. Заказ 49.

Отпечатано с готового оригинал-макета.

ЗАО "Принт - Экспресс"

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