



005531263

На правах рукописи

АБДУЛРАГИМОВ
Руслан Исраилович

**ЭКСПРЕССИЯ ГОРМОНОВ В ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ
КЛЕТКАХ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ ПРИ ВОЗРАСТНОЙ
ИНВОЛЮЦИИ**

14.01.30 – геронтология и гериатрия

– 4 июля 2013

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2013

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

Научные руководители:

заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор

Кветной Игорь Моисеевич

доктор биологических наук

Полякова Виктория Олеговна

Официальные оппоненты:

Аничков Николай Мильевич, заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАМН, доктор медицинских наук, профессор, государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова» Министерства по здравоохранению и социальному развитию» РФ, заведующий кафедрой патологической анатомии.

Прощаев Кирилл Иванович, доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства образования и науки РФ профессор кафедры внутренних болезней № 2 медицинского факультета.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Институт повышения квалификации» Федерального медико-биологического агентства России (ФГБОУ ДПО ИПК ФМБА России).

Защита диссертации состоится «08» июля 2013 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета Д 601.001.01 при Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии 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 **«07» июня 2013 г.**

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

Л.С. Козина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Старение является гетерогенным процессом, проявляющимся на тканевом, клеточном и молекулярном уровнях организации живого. Одной из важнейших причин возрастного нарушения гомеостаза организма является снижение функциональной активности клеток регуляторных систем организма - нервной, иммунной и эндокринной [Пальцев М.А., Кветной И.М., 2006; Пальцев М.А. и соавт., 2011; Khavinson V. Kh. et al., 2011c].

В последние годы внимание исследователей различного профиля концентрируется на одном из необычных феноменов: многие неэндокринные клетки в живом организме способны продуцировать гормоны [Kvetnoy I.M., et al., 2000]. Для нейронов и некоторых иммунокомпетентных клеток такая способность была продемонстрирована ранее [Hartung H.P. et al., 1986; Inagaki S., Kito S., 1986], сегодня этот список пополняют тучные клетки, лимфоциты, эозинофильные лейкоциты, эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки тимуса и многие другие иммунокомпетентные клетки, резидентно расположенные в различных органах. Спектр гормональных веществ, продуцируемых ими, чрезвычайно широк: серотонин, мелатонин, гистамин, эндорфины, эндотелины, матрилизин, натрийуретический пептид, вазоактивный интестинальный пептид, тимозины, соматостатин, пролактин, адренокортикотропный гормон и другие [Reiter R.J. et al., 2010; 2011].

Наряду с общебиологическим значением, не менее важными являются также онкологические аспекты феномена выявления гормонов в неэндокринных иммунокомпетентных клетках и изучение этих процессов при радиационном старении.

Большинство физиологически активных веществ, выявленных в клетках иммунной системы, обладают биологическими эффектами, свидетельствующими об их непосредственном участии в регуляции процессов деления, размножения и дифференцировки (серотонин, мелатонин, гистамин, катехоламины, соматостатин, эндорфины и др.). Некоторые гормоны (серотонин, мелатонин, гистамин и др.) обладают геропротекторными свойствами. Кроме того, практически все пептидные гормоны и биогенные амины являются химическими звеньями патогенеза нарушений, возникающих при ускоренном старении и развитии в организме злокачественных новообразований.

Согласно проведенным исследованиям, неопластический процесс, ассоциированный с возрастом, влияет на морфофункциональное состояние гормонпродуцирующих клеток, а физиологически активные вещества, продуцируемые этими клетками, принимают участие в эндогенных механизмах опухолевого роста. Предполагается, что сочетанное применение иммуностимуляторов с дополнительной гормональной стимуляцией иммунных механизмов даст весомое преимущество при комбинированных схемах иммунотерапии рака [Berczi I. et al., 1998].

В Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН был разработан ряд коротких пептидов (КП), важнейшими из которых являются иммуномодулятор вилон и пептид, регулирующий функции пинсальной железы (эпифиза) - эпиталон [Anisimov V.N., Khavinson V. Kh., 2010; Khavinson V.Kh., et al., 2011a; 2011c].

Исследование их влияния на гормонпродуцирующую функцию иммунных клеток представляется перспективным с точки зрения оценки механизма их биологической активности и перспектив клинического применения.

Однако необходимо подчеркнуть, что установленные факты во многом носят предварительный характер, они получены в процессе выполнения исследований, не имевших таких задач в качестве первоочередных, поэтому не являются систематизированными и ставят ряд важных вопросов, решение которых необходимо для всесторонней оценки геронтологического и общебиологического значения выявленного феномена.

Цель и задачи исследования

Целью диссертационного исследования явилось изучение экспрессии гормонов в резидентных иммунокомпетентных клетках, расположенных в различных органах, и оценка этого феномена в механизмах радиационного старения.

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

- 1) верифицировать экспрессию гормонов (серотонина, соматостатина и β-эндорфина) эпителиальными и лимфоидными клетками тимуса и лимфоцитами периферической крови;
- 2) изучить экспрессию гормонов неэндокринными клетками тимуса, селезенки и кишечника при радиационном старении и действии геропротекторных пептидов - вилон и эпиталон;
- 3) сравнить выраженность радиационного старения тимуса в условиях нарушения функций надпочечников (ингибирование стероидогенеза мелатонином) и без воздействия мелатонина;
- 4) оценить гормонпродуцирующую способность тучных клеток кишечника и тимуса в условиях индуцированного старения;
- 5) оценить гормонпродуцирующие функции неэндокринных клеток в экспериментальной опухоли (асцитной карциноме Эрлиха) у животных;
- 6) оценить значение экспрессии гормона в иммунокомпетентных клетках в патогенезе радиационного старения.

Научная новизна работы

В работе впервые изучена гормонпродуцирующая способность клеток органов иммунной системы в норме и при ускоренном старении, а также показана возможность синтеза гормонов иммунными клетками микроокружения опухоли и непосредственно опухолевыми клетками.

В тимусе человека впервые зарегистрирована положительная иммуногистохимическая реакция на серотонин и соматостатин в эпителиальных клетках, формирующих тельца Гассалья.

Установлено, что в предшественниках Т-лимфоцитов секретируются серотонин и мелатонин, в незрелых кортикальных тимоцитах – серотонин, а в зрелых медуллярных клетках – серотонин и β -эндорфин. Локализация гормонов в лимфоцитах и эпителиальных клетках тимуса подтверждает существование двусторонней связи между эндокринной и иммунной системами.

Впервые получены данные о снижении функциональной активности тучных клеток слизистой оболочки кишечника и тимуса в модели радиационного старения. Установлено, что вилон активирует синтез биогенных аминов в энтерохромафинных и тучных клетках, усиливает пролиферативную активность тимоцитов и повышает пролиферативный потенциал стволовых клеток в кишечнике, тем самым способствуя восстановлению гормонпродуцирующей функции жизненно важных органов при ускоренном старении.

В работе впервые показано, что ультраструктурные изменения в клетках тимуса, вызванные ускоренным старением, нивелируются при ингибировании стероидогенеза мелатонином, а увеличение количества ретикулоэпителиальных клеток указывает на активизацию гормонпродуцирующей функции тимуса.

Полученные результаты свидетельствуют, что развитие функциональной патологии и дисгормональной супрессии неэндокринных клеток при радиационном старении определяется не только их прямым повреждением, но и опосредованным влиянием гормонов коры надпочечников и других биологически активных веществ.

Впервые установлено, что в асцитной карциноме Эрлиха в эозинофильных лейкоцитах экспрессируются серотонин и мелатонин. При изучении неэндокринных клеток в этой опухоли среди микроокружения раковых клеток впервые идентифицирован особый тип тучных клеток с выраженной экспрессией серотонина. Эти клетки дифференцируются в зонах спонтанной гипоксии и могут влиять на скорость канцерогенеза, ассоциированного со старением.

На основании полученных данных впервые сформулировано положение, указывающее на важную роль гормонпродуцирующей способности клеток иммунной системы в механизмах старения.

Практическая значимость работы

Верификация экспрессии ряда гормонов в клетках иммунной системы позволяет выяснить вклад их гормонпродуцирующей функции в механизмы ускоренного старения и возрастной инволюции органов и тканей. Тот факт, что, гормональная функция не является специфической и присуща практически всем типам клеток в организме, является важным для эффективного поиска таргетных мишеней лекарственных препаратов, в том числе КП, так как позволяет учитывать новые аспекты их биологической активности и участие в межклеточных сигнальных взаимодействиях при старении организма.

Например, иммунокомпетентные гормонпродуцирующие клетки могут служить мишенью для таргетной терапии при применении геропротекторного пептида вилона, что позволяет расширить показания для его применения в геронтологии и иммунологии.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

- 1) В ряде неэндокринных клеток иммунной системы и желудочно-кишечного тракта впервые выявлен синтез различных гормонов и других биологически активных веществ, участвующих в регуляции гомеостаза;
- 2) Выявлена линейная положительная корреляция между экспрессией гормонов в иммунных клетках тимуса человека и способностью этих клеток к пролиферации. В иммунных клетках тимуса, находящихся на различных этапах дифференцировки, экспрессируются серотонин, мелатонин, β -эндорфин и соматостатин;
- 3) В модели ускоренного старения, индуцированного радиацией, синтез гормонов в тучных и enteroхромаффинных клетках снижается, что может играть важную роль в нарушении гомеостаза при старении организма;
- 4) Вилон стимулирует гормональную активность неэндокринных клеток тимуса и кишечника в модели радиационного старения;
- 5) Возрастная дисфункция неэндокринных клеток может быть связана с нарушением стероидогенеза, так как установлено, что при ингибировании функции надпочечников признаки индуцированного радиацией старения тимуса нивелируются;
- 6) В иммунных клетках, составляющих микроокружение опухоли, а также непосредственно в раковых клетках верифицирована экспрессия серотонина, что может быть связано с возможностью регуляции роста новообразований при воздействии на неэндокринные гормонпродуцирующие клетки.
- 7) Возможность синтеза гормонов и биогенных аминов неэндокринными клетками играет важную роль в механизме поддержания гомеостаза при естественном и ускоренном старении. Кроме того, такие клетки могут являться мишенью для действия геропротекторных веществ, например, вилона.

Апробация работы

Основные результаты и положения диссертационной работы доложены и обсуждены на V научно-практической геронтологической конференции с международным участием «Пушковские чтения» (Санкт-Петербург, 2009); XVII Российского национального конгресса «Человек и лекарство» (Москва, 2010); VII международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность» (Москва, 2010); «Геронтологические чтения – 2010» (Белгород, 2010); XV Международной научно-практической конференции «Пожилой больной. Качество жизни» (Москва, 2010); Международной научно-практической конференции «Ускоренное старение: механизмы, диагностика, профилактика» (Киев, 2012).

Реализация результатов исследования

Материал диссертации отражен в главах в книге «Введение в молекулярную диагностику» (М., Медицина, 2010), рекомендованной экспертным советом ММА им. И.М. Сеченова в качестве учебного пособия для системы вузовского и последиplomного медицинского образования. Результаты работы используются в научной, педагогической и практической деятельности Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН, Белгородского государственного национального исследовательского университета.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 17 работ, из них 5 - статей в журналах, включенных в Перечень ВАК Минобрнауки РФ, 2 статьи в других изданиях, 2 главы в руководстве и 8 тезисов докладов.

Связь с научно-исследовательской работой института

Диссертационная работа является научной темой, выполняемой по основному плану НИР Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 5 глав, обсуждения, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Текст диссертации изложен на 111 страницах, содержит 9 таблиц, иллюстрирован 7 рисунками. Список литературы содержит 142 источника, из них отечественных – 33, зарубежных – 109.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика исследуемого материала

Исследования иммунокомпетентных клеток человека выполнены на образцах тимуса детей, полученных при операциях по поводу врожденных пороков сердца в Институте кардиохирургии РАМН, на субпопуляциях тимоцитов и эпителиальных клетках тимуса линии VTEC2.H/S (Институт иммунологии МЗ РФ), на лимфоцитах периферической крови человека, а также на тимусе, селезенке и проксимальном отделе двенадцатиперстной кишки крыс в модели радиационного старения и на асцитной карциноме Эрлиха у старых мышей.

Тимоциты выделяли из фрагментов тимуса эмбрионов человека 20-недельного срока развития и разделяли на субпопуляции с использованием иммунных наборов для позитивной селекции CD4 и CD8 с добавлением магнитных «микрошариков» ("DynaI"). Лимфоциты выделяли из венозной крови доноров центрифугированием над слоем фиколла-верографина.

Моделирование ускоренного старения

Моделирование ускоренного старения проводили на 6 группах самцов белых крыс Вистар массой 90-100 г. 30 животных подвергали однократно общему γ -облучению в дозе 6 Гр на кобальтовом аппарате ГУБ 20000 при мощности дозы 200 рад/мин. После облучения 12 крысам РП не вводили, 12 и 6 крысам вводили вилон (Lys-Glu) и эпیتالон (Ala-Glu-Asp-Gly) в разовой дозе 5 мкг/кг. Контрольную группу составили 6 необлученных крыс, еще 6 необлученным крысам вводили вилон или эпیتالон в том же режиме, что и облученным животным. Органы (тимус, селезенку и проксимальный отдел двенадцатиперстной кишки) выделяли под нембуталовым наркозом через 3 сут после окончания введения препаратов и на 8 сут после γ -облучения.

В эксперименте по ингибированию синтеза глюкокортикоидных гормонов использовали 30 самцов линии Вистар массой 180 - 200 г. Животные были разделены на четыре группы: 1 - интактные; 2 - облученные; 3 - облученные крысы, которым вводили метопирон (Ciba); 4) облученные крысы после введения метопирона, которым вводили мелатонин (Sigma). Гамма-облучение выполнено на аппарате ЛУЧ-1. Животные получали ежедневную дозу 1,25 Гр в течение 5 дней. Метопирон вводили в дозе 100 мг/кг однократно через 48 часов после облучения. Мелатонин вводили подкожно в течение двух недель от начала облучения в дозе 10 мг на 100 г массы тела животного.

Методика культивирования асцитной карциномы Эрлиха

Культивирование асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) выполнено на мышах-самцах гибридах (CBA $\times$ C₅₇Bl₆)F₁ в возрасте 18 месяцев, массой тела 45-55 г.

Штамм АКЭ был получен в группе опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Для поддержания опухоли суспензию клеток АКЭ в стерильных условиях вводили внутривентрально мышам по 3×10^7 живых клеток, а затем образовавшуюся опухоль перевивали экспериментальным животным. Суспензию опухолевых клеток для культивирования готовили путем разведения полученной асцитической жидкости в 10 мл среды 199. Культивирование клеток АКЭ осуществляли *in vivo* в диффузионных камерах, помещаемых в брюшную полость сингенных мышей – реципиентов. Мышей-реципиентов предварительно облучали гамма-лучами на аппарате "Gammacell" в дозе 5 Гр за 24 ч до имплантации им диффузионных камер. Животных – реципиентов умерщвляли через 5-7 сут культивирования, камеры с опухолью извлекали из брюшной полости и подсчитывали число выросших колоний.

Гистологические и цитологические методы

Кусочки органов (тимус, селезенка, двенадцатиперстная кишка) объемом 1 см³ фиксировали в течение 24 часов кислой жидкостью Буэна. Тканевые блоки обезжизняли с помощью автоматической станции проводки материала Leica TP1020 и заключали в Paraplast Plus (Kendall). Парафиновые срезы толщиной 3-5 мкм помещали на предметные стекла, покрытые пленкой из поли-L-лизина (Sigma). Полутонкие срезы толщиной 1 мкм и

ультратонкие срезы ~ 70 нм готовились на ультрамикротоме LKB-7A (LKB, Швеция).

Общую гистологию органов изучали на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Функциональную активность клеток тимуса изучали методом избирательной импрегнации ядрышковых организаторов:

Определение числа апоптотических клеток АКЭ проводили на препаратах, импрегнированных по методу Мозера. Тучные клетки селективно окрашивали 1% раствором толуидинового синего (Fluka) в 0,5 М HCl при pH 0,5.

Для цитологических исследований асцитическую жидкость центрифугировали при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, а из осадка делали мазок на тонкие предметные стекла для светооптических исследований. Для светооптического исследования препараты окрашивали гематоксилином и эозином, азу-эозином по Гимза и по методу Севки для выявления биогенных аминов, а также аргирофильным методом Гримелиуса для выявления структур ядер. Цитологические мазки также подвергали иммуноцитохимическому исследованию с целью идентификации в клетках биогенных аминов и пептидных гормонов.

Иммуноцито- и иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое выявление антигенов на гистологических срезах и в цитологических мазках выполнено согласно основным требованиям для иммунопероксидазных методов при изучении гормональной функции клеток.

Для иммуноцитохимического исследования взвеси иммунных клеток их предварительно фиксировали в смеси 4% формальдегида и 0,1% глутарового альдегида на фосфатно-солевом буфере (pH=7,4) в течение 3-5 минут и затем путем последовательного центрифугирования – ресуспензирования отмывали в этом же растворе. После удаления фиксирующей смеси к суспензии добавляли 0,03% Тритон X-100 на 20 мин при 4°C для пермеабилзации клеточных мембран. Затем клетки отмывали буферным раствором 2 раза по 3 мин и готовили стандартные мазки на предметных стеклах.

Для иммуноцитохимического исследования мазков асцитной карциномы Эрлиха клетки фиксировали ацетоном в течение 3-5 минут и затем высушивали на воздухе. После фиксации и высушивания мазки промывали в трех сменах фосфатно-солевого буфера (pH=7,3) по 5 минут. Процедура иммуноокрашивания с применением моноклональных антител к серотонину, мелатонину, гистамину, соматостатину и β -эндорфину (все Novocastra, 1:100) осуществлялась по схеме согласно коммерческим протоколам.

Для иммуноокрашивания пролиферирующих клеток на гистологических срезах использовали мышинные моноклональные антитела к PCNA при разведении 1:50 (клон PC10, Calbiochem) и авидин-биотин-пероксидазный набор для выявления мышинных иммуноглобулинов (Vectastain). Гормонпродуцирующие клетки выявляли с помощью антител к гистамину, серотонину, β -эндорфину, соматостатину, гастрину, глюкагону, инсулину, кальцитонину и соответствующих иммуноокрашивающих наборов.

Иммуноглобулин (Ig)-содержащие клетки идентифицировали набором для выявления крысиных иммуноглобулинов (BioGenex).

Электронная микроскопия и морфометрический метод

Ультратонкие срезы, контрастированные уранилацетатом и цитратом свинца, изучали в электронном микроскопе JEM-100S (JEOL, Япония). Для ультраструктурного анализа были отсняты целые клетки и их фрагменты при первичных увеличениях на экране микроскопа от $\times 2100$ до $\times 14000$.

Для верификации эндокринных гранул на ультраструктурном уровне использовали метод уранафинной реакции. Для этого осадок клеток фиксировали 3% глутаровым альдегидом на 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,2) в течение 90 минут. После фиксации кусочки измельчали на блоки размером около 1 мм и промывали 3 раза в 0,9% растворе хлорида натрия, каждая промывка по 15 мин. Промытые блоки ткани помещали в 4% водный раствор уранилацетата (pH=3,9) на 18 ч при 4°C. После промывки в 3 сменах 0,9% раствора хлорида натрия, исследуемые объекты обезвоживали в спиртах и заключали в эпон. В электронном микроскопе изучали ультратонкие срезы без дополнительного контрастирования клеток.

Морфометрическую оценку данных, полученных методом иммуногистохимии, выполняли на световом микроскопе Olympus CX41 с микрофотосъемкой на цифровую камеру Nikon Coolpix 4500.

Индекс апоптоза ($I_{\text{ап}}$) и митотический индекс ($I_{\text{мит}}$) определяли по стандартной методике при иммерсионном увеличении микроскопа при подсчете не менее 3000 ядер клеток. Пролиферативный показатель по PCNA (I_{PCNA}) определяли как отношение количественной плотности PCNA-позитивных ядер (N_{PCNA}) к количественной плотности ядер клеток ($N_{\text{як}}$), окрашенных гематоксилином. Количественную плотность определяли по числу сечений ядер на 1 мм^2 площади среза.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов исследования проводили по стандартным программам для персональных компьютеров. Использовали специализированные пакеты прикладных программ для медико-биологических исследований ("Statistica-5.0" и "Microsoft Excell"), обеспечивающих выполнение общепринятых математико-статистических методов (расчет параметров вариации признаков, t-критерий Стьюдента для зависимых равновеликих и независимых разновеликих выборок).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гормональная функция неэндокринных клеток тимуса

Исследование гормональной функции неэндокринных клеток тимуса человека

На препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином, насыщенность корковой зоны тимуса по ядрам составляет 41014 ± 462 клетки на мм^2 площади среза - для детей в возрасте 6 мес.; 41948 ± 1147 - для возрастной

группы 1,2 года и 43137 ± 762 – для группы 2,4 года. Основная популяция пролиферирующих клеток в тимусе детей располагается в слое коркового вещества с тенденцией концентрироваться в периферической зоне долек.

В мозговой зоне определяется достаточно высокая количественная плотность клеток: 32262 ± 1423 для детей в возрасте 6 мес; 34835 ± 911 – для возрастной группы 1,2 года и 33667 ± 490 – для группы 2,4 года, однако реакцию на PCNA и циклин А дают единичные ядра (табл. 1).

Таблица 1

Показатели пролиферативной активности в корковом и мозговом веществе тимуса детей по иммуноокрашиванию PCNA и циклина А

Возрастная группа	Корковая зона		Мозговое вещество	
	Индекс PCNA	Индекс циклина А	Индекс PCNA	Индекс циклина А
М ± m группа 6 мес	$20,8 \pm 0,9$	$12,7 \pm 0,6$	$8,1 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,1$
М ± m группа 1,2 лет	$30,3 \pm 1,3^*$	$16,3 \pm 0,6^*$	$5,3 \pm 0,8^*$	$1,1 \pm 0,06^*$
М ± m группа 2,4 лет	$39,1 \pm 1,2^{*#}$	$16,8 \pm 0,6^*$	$4,3 \pm 0,6^*$	$0,87 \pm 0,03^{*#}$

* -p <0,05 по сравнению с группой 6 мес.,

-p <0,05 по сравнению с группой 1,2 лет.

Установлена положительная связь ($r = +0,8$; $p < 0,05$) между экспрессией PCNA и циклина А в ядрах тимоцитов коркового вещества (рис. 1А) и отрицательной корреляции ($r = -0,9$; $p < 0,01$) между индексами пролиферации в корковом и мозговом веществе вилочковой железы (рис. 1Б). Кроме того, получены сведения о корреляционных связях между экспрессией серотонина и соматостатина в эпителиальных клетках телец Гассалья и пролиферативной активностью тимоцитов человека по PCNA (рис. 1В,Г). Наиболее ярко экспрессия серотонина и соматостатина верифицируется в эпителиальных клетках тимуса, формирующих тельца Гассалья (табл. 2).

Таким образом, прослеживается отчетливая тенденция к усилению с возрастом экспрессии серотонина в эпителиальных клетках, рост пролиферативной активности тимоцитов в корковом веществе, снижение индексов пролиферации в мозговом веществе, а также последовательное снижение в постнатальном онтогенезе выработки эпителиальными клетками соматостатина.

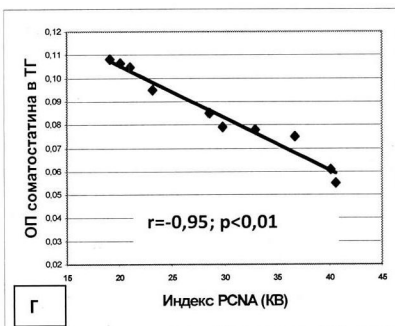
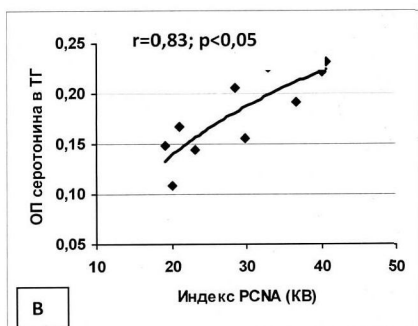
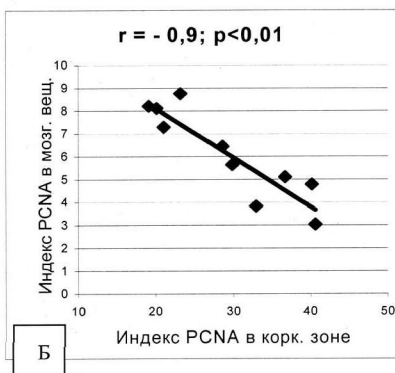
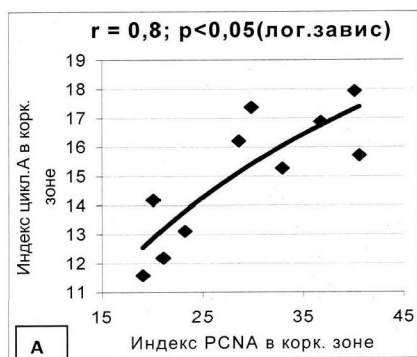


Рис. 1. Корреляционные связи между пролиферативной активностью тимоцитов (PCNA) и экспрессией циклина А, а также содержанием серотонина и соматостатина в эпителиальных клетках телец Гассалья. КВ – корковое вещество; ОП – оптическая плотность иммуногистохимической реакции; ТГ – тельца Гассалья.

Таблица 2

Содержание серотонина и соматостатина в эпителиальных клетках телец Гассалья в тимусе детей

Возрастная группа	серотонин		соматостатин	
	Объемная плотность	Оптическая плотность	Объемная плотность	Оптическая плотность
М ± m группа 6 мес	0,204 ± 0,015	0,142 ± 0,0,12	0,106 ± 0,027	0,104 ± 0,003
М ± m группа 1,2 лет	0,254 ± 0,049	0,196 ± 0,021*	0,080 ± 0,028	0,081 ± 0,002*
М ± m группа 2,4 лет	0,288 ± 0,016	0,214 ± 0,012*	0,079 ± 0,029	0,064 ± 0,006*#

* -p < 0,05 по сравнению с группой 6 мес.,

-p < 0,05 по сравнению с группой 1,2 лет.

Исследование гормональной функции незэндокринных клеток тимуса в культуре

При электронно-микроскопическом исследовании культуры эпителиальных клеток эмбрионального тимуса человека определяется 3 субпопуляции клеток: располагающиеся по одиночке, образующие кластеры из 3-5 клеток и формирующие органотипический пласт.

Клетки, располагающиеся изолированно друг от друга, имеют округлую форму и сглаженную поверхность. Ядра крупные, занимают большую часть клетки, как правило, имеют правильную форму с неглубокими инвагинациями. Хроматин мелкодисперсный, распределен более или менее равномерно. В ядрах выявляются одно - два хорошо выраженных ядрышка. Основными цитоплазматическими органеллами являются митохондрии и полирибосомы. Среди этой субпопуляции клеток часто выявляются клетки в разных стадиях митоза. По ультраструктурным характеристикам этот тип клеток можно отнести к низкодифференцированным.

На поверхности клеток, формирующих скопления в виде небольших кластеров, появляются цитоплазматические отростки. Относительное содержание цитоплазмы в клетках увеличивается. Перинуклеарно практически во всех клетках определяются элементы пластинчатого комплекса и мелкие гранулы невысокой электронной плотности. В ядрах по периметру внутреннего листка кариолеммы отмечается слабая конденсация хроматина. Размеры и форма ядер варьируют.

Клетки, образующие органотипические пласты, имеют полигональную форму и тесно сцеплены между собой цитоплазматическими отростками. В ядрах клеток, входящих в состав симпластов, увеличивается содержание гетерохроматина. В хорошо выраженных ядрышках появляются признаки фибриллярного строения. В цитоплазме увеличивается содержание цистерн зернистого эндоплазматического ретикулума и элементов пластинчатого комплекса, что свидетельствует об усилении секреторной функции этих клеток.

Полученные данные по типированию клеток эмбрионального тимуса человека на ультраструктурном уровне свидетельствуют о формировании гормональной функции ретикулоэпителиоцитов на определенной стадии их дифференцировки в условиях экспрессии адгезионных связей и наличия межклеточных коммуникаций.

В отдельных клетках культуры тимоцитов человека, находящихся на различной стадии дифференцировки, идентифицированы следующие гормоны: в предшественниках Т-лимфоцитов (CD4-CD8-) содержатся серотонин и мелатонин; в незрелых кортикальных клетках (CD4+CD8+) обнаружен только серотонин, в зрелых медуллярных клетках выявлен серотонин, мелатонин, бета-эндорфин и гистамин; в лимфоцитах периферической крови – серотонин и бета-эндорфин.

Гормональная функция иммунных клеток в модели радиационного старения

Гормональная функция иммунных клеток в норме

На препаратах тимуса, окрашенных гематоксилином, насыщенность корковой зоны по ядрам составляет более 29000 тимоцитов на мм^2 площади среза (табл. 3). Основная популяция клеток с PCNA-позитивными ядрами располагается в корковом веществе. I_{PCNA} в корковом веществе составляет 26%. В мозговом веществе реакцию на PCNA дают единичные ядра. При окрашивании толуидиновым синим в прослойках соединительной ткани, разделяющих дольки, визуализируются немногочисленные тучные клетки. Лишь тучные клетки дают отчетливую реакцию на гистамин и серотонин. В корковой зоне тимуса отдельные клетки показывают иммунную реакцию на β -эндорфин, а в мозговом веществе – на соматостатин.

Таблица 3

Количественные характеристики исследованных параметров в тимусе и
селезенке крыс

Группа животных и условия эксперимента	Тимус				Селезенка		
	$N_{Я-ГЕМ}/\text{мм}^2$	$N_{PCNA}/\text{мм}^2$	$I_{PCNA}(\%)$	$N_{ТК}/\text{мм}^2$	$N_{PCNA(ЛФ)}/\text{мм}^2$	$N_{PCNA(ЗЭК)}/\text{мм}^2$	$N_{Ig}/\text{мм}^2$
1-я (контроль) $n=6$	29227±857	7518±314	26±1	18±2	8082±79	2217±159	728±44
2-я (введение вилона) $n=3$	26800±173	9933±1197 *	37±4	22±7	7880±253	2387±711	715±78
3-я (введение эпителиона) $n=3$	28450±967	7173±535	26±3	24±5	3230±853 *	1168±259 *	567±54
4-я (гамма-облучение) $n^+=3/12$	16982±1079 *	5420±845 *	33±7	44±11 *	3630±276 *	482±30 *	328±34 *
5-я (введение вилона после гамма-облучения) $n^+=5/12$	12846±635 *,**	7135±577	55±3 *,**	71±18 *	5908±1011 *	1962±691 **	558±38 *,**
6-я (введение эпителиона после гамма-облучения) $n^+=1/6$	16400	6110	37	29	3400	513	412

Примечание. Я-ГЕМ – ядра клеток, окрашенные гематоксилином; ТК – тучные клетки; ЛФ – герминативные центры лимфоидных фолликулов; ЗЭК – зоны экстрамедуллярного кроветворения; Ig – иммуноглобулинпозитивные клетки; n^+ – количество крыс, выживших на 8 сутки после гамма облучения, от числа животных, введенных в эксперимент; * - $p(U)<0.05$ по сравнению с контролем; ** - $p(U)<0.05$ по сравнению с 4 группой.

Количественная плотность PCNA-позитивных ядер в клетках селезенки составляет более 8000 на мм^2 . В субкапсулярной зоне и вдоль трабекул располагаются небольшие по размерам очаги миелоидного

крововетворения с высокой интенсивностью иммуноокрашивания PCNA-позитивных ядер (табл. 3). Ig-позитивные клетки выявляются практически по всей паренхиме селезенки с концентрацией по периферии маргинальных зон и в виде характерных цепочек вдоль трабекул. Количественная плотность Ig-продуцирующих клеток составляет более 700 на мм² площади среза селезенки. Клеток с иммунной реакцией на гормоны практически не визуализируется. Лишь единичные клетки в зоне периаартериальных муфт показали слабую позитивную реакцию на гистамин, серотонин и β-эндорфин.

Высокий индекс PCNA (44,8%) и митотический индекс (2,9%) в клетках слизистой оболочки кишечника отражают уровень физиологической регенерации эпителия двенадцатиперстной кишки животных 1-й группы (табл. 4). В двенадцатиперстной кишке позитивную реакцию на серотонин дают энтерохромаффинные (ЕС) клетки, локализующиеся в эпителиальном слое крипт и ворсинок, а также часть тучных клеток в собственной пластинке слизистой оболочки. Суммарная объемная плотность клеток с позитивной реакцией на серотонин в криптах составляет 0,64% при количественной плотности ЕС клеток – 162 на мм² площади слизистой оболочки.

Таблица 4

Количественные характеристики исследованных параметров в двенадцатиперстной кишке крыс

Группа животных и условия эксперимента	I _{PCNA} (%)	I _{мит} (%)	Р _{СЕР} (%)	N _{ЕС} /мм ²	ОП _{ЕС} (усл.ед)	N _{ТК} /мм ²
1-я (контроль)	44,8±0,2	2,9±0,1	0,64±0,02	162±4	0,205±0,002	169±23
2-я (введение вилона)	48,2±1,4*	4,4±0,3*	0,67±0,06	146±17	0,193±0,008	163±33
3-я (введение эпителиона)	33,3±4,2*	2,9±0,2	0,57±0,07	136±17	0,182±0,014*	146±19
4-я (гамма-облучение)	46,5±0,7*	4,2±0,4*	0,43±0,08*	130±12*	0,209±0,005	18±2*
5-я (введение вилона после гамма-облучения)	49,8±0,7*,**	4,7±0,1*	0,71±0,09	147±18	0,202±0,012	24±3*
6-я (введение эпителиона после гамма-облучения)	19,2	2,5	0,30	65	0,195	14

Примечание. СЕР – серотонин-иммунопозитивные клетки; ЕС – энтерохромаффинные клетки; ТК – тучные клетки; n⁺ - количество крыс, выживших на 8 сутки после гамма облучения, от числа животных, введенных в эксперимент; * - p(U)<0.05 по сравнению с контролем; ** - p(U)<0.05 по сравнению с 4 группой.

Около 30% тучных клеток, содержащих серотонин, показывают достаточно отчетливую реакцию на гистамин. Тучные клетки в двенадцатиперстной кишке топографически располагаются субэпителиально, а также концентрируются вблизи кровеносных и лимфатических сосудов. В собственной пластинке слизистой двенадцатиперстной кишки единичные клетки дали слабо выраженную реакцию на гастрин.

Гормональная функция неэндокринных иммунных клеток при радиационном старении

В группе облученных животных, не получавшие КП, из 12 животных, введенных в эксперимент, на 8 сутки после гамма-облучения выжило

3 крысы. При этом 6 крыс пали в кишечной фазе лучевой болезни – на 3-5 сутки.

В тимусе выражены атрофические изменения, сходные с признаками естественного старения. Однако, достаточно высокий индекс PCNA (33 %) и увеличение содержания тучных клеток свидетельствуют о начавшемся периоде пострадиационного восстановления вилочковой железы. В селезенке облученных животных определяется очень низкий уровень пролиферативной активности клеток, как в экстрамедуллярных зонах, так и в редуцированных фолликулах.

Количественная плотность Ig-позитивных клеток также снижена более чем в два раза по сравнению с контролем. Пролиферативный показатель по PCNA в крипах кишечника возрастает до 46,5%, а митотический индекс – до 4,2%. Эти данные свидетельствуют, что восстановление эпителиального слоя слизистой оболочки у выживших животных протекает очень быстро, а пул стволовых клеток кишечного эпителия в этот период находится на стадии гиперрегенерации. Содержание тучных клеток в собственной пластинке слизистой оболочки снижено почти в 10 раз. Это соответствует выводам о высокой чувствительности тучных клеток слизистых оболочек к радиационному старению и очень медленному восстановлению их количества даже при воздействии сублетальных доз.

Таким образом, гамма-облучение вызывает подавление иммуногенеза в тимусе и селезенке, что является характерной особенностью снижения функциональной активности иммунной системы у лиц старше 60 лет.

Гормональная функция незидокринных иммунных клеток при радиационном старении и введении вилонa и эпиталона

В группе животных после инъекций вилонa наиболее существенные изменения регистрируются по изменению пролиферативной активности клеток в тимусе и двенадцатиперстной кишке.

Дольки вилочковой железы увеличиваются в размере, в основном, за счет коркового слоя. В периферических зонах возрастает интенсивность иммуноокрашивания на PCNA ядер тимоцитов с формированием характерных микрофолликулярных образований. На фоне снижения суммарной клеточной плотности в корковом веществе, обусловленном увеличением содержания более крупных по размеру лимфобластов и снижением количества зрелых тимоцитов, I_{PCNA} возрастает до 37%. Не исключено, что эти данные отражают влияние вилонa на дифференцировку и скорость миграции Т-лимфоцитов из коркового слоя тимуса в мозговое вещество. В двенадцатиперстной кишке увеличение индекса PCNA в генерационной зоне крипт всего на 3,4% сопровождается увеличением в 1,5 раза числа клеток, вступающих в митоз.

В селезенке крыс, леченых вилонem, пролиферативная активность в лимфоидных фолликулах увеличивается в 1,6 раза, а в экстрамедуллярных зонах кроветворения – в 4 раза. Кроме того, в 1,7 раза возрастает количественная плотность Ig-содержащих клеток. После введения вилонa

нормализуется гистологический рисунок крипт кишечника облученных животных. При этом индекс PCNA достигает почти 50%, а митотический индекс увеличивается до 4,7%. Количественная плотность ЕС клеток практически достигает уровня контрольных значений.

В группе облученных животных, которым вводили эпиталон, существенных изменений в гистоархитектонике органов на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, не выявлено. При окрашивании препаратов на PCNA визуализируется снижение интенсивности иммунной реакции пролиферирующих клеток в селезенке и кишке.

Таким образом, пептид вилон нивелирует признаки ускоренного старения органов желудочно-кишечного тракта и иммунной системы, повышая пролиферативную активность их клеток, что указывает на его геропротекторное действие.

Гормональная функция клеток тимуса в условиях радиационного старения и ингибирования стероидогенеза

В тимусе животных, подвергнутых ускоренному старению, на 14 сутки после начала облучения отмечалось нарушение тесных межклеточных контактов между тимоцитами, отслоение участков наружной ядерной мембраны, набухание матрикса митохондрий с лизисом крист в этих клетках. Среди тучных клеток встречаются мастоциты с крупными цитоплазматическими вакуолями, в которых содержатся многочисленные секреторные гранулы разной степени электронной плотности, что, по-видимому, является морфологическим выражением различной степени секреции биологически активных продуктов. Иногда секреторные гранулы тучных клеток выявляются в периваскулярном пространстве.

У животных, получавших мелатонин, через 14 суток от начала облучения в корковом веществе долек тимуса наблюдается тесный контакт между тимоцитами. Их ядра имеют правильную форму, хроматин конденсирован по периметру ядра. В ядрах выявляется одно - три плотных крупных ядрышка. Митохондрии умеренной плотности, с хорошо видимыми кристами. Среди скоплений малых лимфоцитов часто встречаются более крупные "активированные" тимоциты, имеющие широкий ободок цитоплазмы, в которой содержится большое количество полисом и митохондрий. Часто встречаются делящиеся тимоциты на разных стадиях митоза.

Ультраструктура ретикулоэпителиальных клеток практически не отличается от структуры клеток контрольных животных. В цитоплазме макрофагов, помимо фагоцитированного материала, обнаруживаются липидные капли. В кровеносных капиллярах эндотелиальные клетки имеют ядра с извилистыми контурами и 1-2 ядрышками. В цитоплазме этих клеток развиты мембраны эндоплазматического ретикулума, содержится большое количество свободных рибосом, пиноцитозных везикул, что свидетельствует о повышении их функциональной активности.

При радиационном старении состояние сосудистого эндотелия не отличается от такового у контрольных животных: базальная мембрана и периваскулярные пространства без признаков разрыхления и отека. Тучные клетки характеризуются содержанием большого числа секреторных гранул, среди которых преобладают крупные гранулы с высокой электронной плотностью.

Ультраструктурные исследования показывают, что ускоренное старение тимуса, вызванные фракционированным гамма-облучением в сублетальных дозах, нивелируются при ингибировании стероидогенеза мелатонином, а увеличение количества ретикулоэпителиальных клеток может указывать на активизацию гормонпродуцирующей функции тимуса. Отмечено также, что на фоне введения мелатонина хорошо сохраняется ультраструктура тучных клеток. Таким образом, мелатонин обладает выраженным геропротекторным действием в отношении вилочковой железы в условиях ее индуцированного старения и нарушения стероидогенеза.

Гормональная функция иммунокомпетентных неэндокринных клеток в асцитной карциноме Эрлиха у старых животных

Данные по иммуноокрашиванию клеток микроокружения опухоли, свидетельствуют о том, что клетки асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) не являются эндокринными.

Таблица 5

Результаты иммуноокрашивания клеток асцитной карциномы Эрлиха и эозинофильных лейкоцитов

Антитела к биогенным аминам и пептидным гормонам	Клетки асцитной карциномы Эрлиха	Эозинофильные лейкоциты в асците
β-эндорфин	—	+– (в единичных клетках)
Гистамин	—	+– (в единичных клетках)
Мелатонин	—	+ (от 1 до 3% клеток)
Серотонин	+– (в единичных клетках)	+ (от 3 до 5% клеток)
Соматостатин	—	+ (в единичных клетках)

Примечание: — реакция не зафиксирована; +– интенсивность положительной реакции незначительно превышает фон; + интенсивность положительной реакции существенно превышает фон.

В то же время положительная реакция отдельных эозинофильных лейкоцитов на серотонин и мелатонин свидетельствует о возможной гормональной функции этих неэндокринных клеток (табл. 5). Обращает внимание, что наиболее отчетливая реакция эозинофилов на присутствие индолалкиламинов и соматостатина регистрируется в клетках, тесно контактирующих с опухолевыми клетками.

В подкожной клетчатке над опухолью концентрируется значительное количество тучных клеток соединительнотканного типа, которые дают интенсивную положительную реакцию на гистамин. Отдельные тучные клетки также иммуноокрашиваются на серотонин. Диапазон варьирования их количественной плотности составляет от 50 до 130 клеток на 1 мм² площади среза клетчатки.

Эти клетки интенсивно окрашиваются толуидиновым синим, имеют крупные размеры ($S_{\text{тк}} \approx 90-100 \text{ мкм}^2$), многие функционально активизированы и находятся в состоянии дегрануляции с «рассыпанием» зерен. В периферических участках опухоли периваскулярно выявляются единичные клетки с отчетливой, но менее интенсивной (по сравнению с тучными клетками кожи) гистохимической реакцией на толуидиновый синий. Эти клетки относительно небольшие (площадь среза не превышает 30 - 40 мкм²), дают выраженную позитивную иммуногистохимическую реакцию на серотонин, слабую на гистамин и не окрашиваются на иммуноглобулины.

При окрашивании мазков по методу Севки среди популяции опухолевых клеток выявляются клетки с фиолетовым цветом цитоплазмы. Размеры их меньше, чем размеры основных клеток АКЭ. Фиолетовый цвет окраски их по методу Севки свидетельствует о наличии в цитоплазме норадреналина. В мазках АКЭ контрольной группы количество Севки-положительных клеток составляет $11,4 \pm 0,36\%$. Следовательно, АКЭ представляет собой неоднородную популяцию опухолевых клеток, представленную основными опухолевыми клетками и норадреналинсодержащими клетками.

Полученные данные позволяют предположить, что процессы онкогенеза у лиц старших возрастных групп могут сопровождаться синтезом гормонов в опухолевых клетках, что приводит к нарушению локальных межклеточных взаимодействий.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов собственных исследований и многочисленных данных литературы свидетельствует, что гормональная функция не является специфической функцией только нейроэндокринных клеток. Так, в тимусе детей всех изученных возрастных групп зарегистрирована положительная иммуногистохимическая реакция на серотонин и соматостатин в эпителиальных клетках, формирующих тельца Гассалья. Электронно-микроскопическое типирование эпителиальных клеток эмбрионального тимуса человека и выявление в их цитоплазме эндокринных гранул свидетельствует, что гормональная функция эпителия тимуса начинает формироваться на определенной стадии их дифференцировки при соответствующем микроокружении.

Кроме того, в предшественниках Т-лимфоцитов выявлены серотонин и мелатонин, в незрелых кортикальных тимоцитах – серотонин, а в зрелых медуллярных клетках – серотонин и β -эндорфин. Локализация гормонов в

лимфоцитах и эпителиальных клетках тимуса подтверждает существование двусторонней связи между эндокринной и иммунной системами. Изучение параметров пролиферативной активности лимфоидных клеток тимуса показало наличие достоверной положительной связи между экспрессией PCNA и циклина А в ядрах тимоцитов коркового вещества и отрицательной корреляции между индексами пролиферации в корковом и мозговом веществе вилочковой железы.

Получены данные о снижении функциональной активности тучных клеток слизистой оболочки кишечника и тимуса в модели радиационного старения. Изучено влияние двух пептидных геропротекторов – вилонина и эпителина на эндокринную функцию неэндокринных клеток тимуса, селезенки и двенадцатиперстной кишки крыс в норме и при индуцированном радиацией старении. Установлено, что вилонин активизирует синтез биогенных аминов в энтерохромаффинных и тучных клетках, усиливает пролиферативную активность тимоцитов и повышает пролиферативный потенциал стволовых клеток в кишечнике, тем самым способствуя восстановлению гормонпродуцирующей функции жизненно важных органов при ускоренном старении.

Результаты исследования предполагают, что восстановление активности тучных клеток и тимоцитов в модели ускоренного старения может быть обусловлено их взаимно индуктивным влиянием. Показано, что эпителин замедляет обменные процессы в слизистой двенадцатиперстной кишки, снижает функциональную активность неэндокринных клеток и выраженность гемопоэза и лимфопоэза в селезенке.

Установлено, что ультраструктурные изменения в клетках тимуса, вызванные ускоренным старением, нивелируются при ингибировании стероидогенеза мелатонином, а увеличение количества ретикулоэпителиальных клеток указывает на активизацию гормонпродуцирующей функции тимуса. Полученные результаты свидетельствуют, что развитие функциональной патологии и дисгормональной супрессии неэндокринных клеток при радиационном старении определяется не только их прямым повреждением, но и опосредованным влиянием гормонов коры надпочечников и других биологически активных веществ.

В АКЭ (эозинофильные лейкоциты) иммуногистохимически зарегистрирована экспрессия серотонина и мелатонина. При изучении неэндокринных клеток в этой опухоли среди микроокружения раковых клеток иммуногистохимически и электронно-микроскопически идентифицирован особый тип тучных клеток с выраженной экспрессией серотонина.

Таким образом, полученные результаты и многочисленные данные литературы позволяют вполне обоснованно пересмотреть один из фундаментальных постулатов классической эндокринологии – «гормональная функция есть специализированная функция эндокринных клеток, имеющих общее происхождение и сходное строение».

В связи с этим различные гормонпродуцирующие неэндокринные клетки можно рассматривать как неотъемлемое звено и часть универсальной системы контроля и защиты организма, а секретируемые ими гормональные вещества в этом случае – как паракринные сигнальные молекулы для локальной координации межклеточных, межтканевых и межорганых взаимосвязей.

Таким образом, гормональная функция не является специфической функцией некоторых клеток. Ее следует рассматривать как общебиологическую функцию, присущую многим живым клеткам независимо от их развития и основных ролей. Этот факт открывает новые перспективы в выяснении важных механизмов клеточной сигнализации и ее роли для регуляции гомеостаза при старении организма.

В моделях радиационного старения и индуцированного опухолеобразования установлено, что важную роль в механизмах старения играет гормонпродуцирующая способность неэндокринных, в особенности иммунных, клеток, которая может быть восстановлена под действием геропротекторного пептида вилонина.

ВЫВОДЫ

1. Проведенные исследования позволили верифицировать экспрессию ряда пептидных гормонов и биогенных аминов в неэндокринных клетках, связанных с иммунной функцией - эпителиальных клетках тимуса, предшественниках Т-лимфоцитов, тучных клетках, эозинофильных лейкоцитах, энтерохромаффинных клетках кишечника.
2. В эпителиальных клетках тимуса верифицирована экспрессия серотонина и соматостатина. В предшественниках Т-лимфоцитов выявлены серотонин и мелатонин, в незрелых кортикальных тимоцитах – серотонин, в зрелых медуллярных клетках – серотонин и β -эндорфин. Установлена линейная зависимость между экспрессией гормонов в эпителиальных клетках тимуса, пролиферативной активностью тимоцитов.
3. При радиационном старении гормонпродуцирующая способность тучных клеток кишечника и тимуса и энтерохромаффинных клеток кишечника снижается.
4. Вилонин активизирует синтез биогенных аминов в энтерохромаффинных и тучных клетках тимуса и кишечника, усиливает пролиферативную активность тимоцитов и повышает пролиферативный потенциал стволовых клеток в кишечнике.
5. Признаки радиационного старения тимуса нивелируются при ингибировании стероидогенеза мелатонином. Вероятно, возрастная дисфункция неэндокринных клеток тимуса определяется не только их инволюцией, но и опосредованным влиянием гормонов коры надпочечников.

6. В асцитной карциноме Эрлиха у старых мышей среди микроокружения опухолевых клеток идентифицированы тучные и эозинофильные клетки с выраженной экспрессией серотонина. Эти клетки дифференцируются в зонах спонтанной и индуцированной гипоксии и могут влиять на рост новообразований.
7. Экспрессия гормонов в резидентных иммунокомпетентных клетках различных органов играет важную роль в механизмах старения и является молекулярной мишенью геропротекторного действия пептида вилонина.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Установлено, что геропротекторный пептид вилонин и мелатонин нивелируют признаки ускоренного старения иммунной системы и желудочно-кишечного тракта, индуцированного гамма-облучением, что позволяет рекомендовать эти биологически активные вещества для дальнейшего изучения в качестве геро- и радиопротекторных средств.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в Перечень ВАК Минобрнауки РФ

1. Возрастная динамика процессов пролиферации и апоптоза кишечного эпителия/В.О. Полякова, Н.Н. Севостьянова, Р.И. Абдулрагимов, И.М. Кветной//Вестник МАНЭБ. – 2010. – Т. 15, №3. – С. 86-92.
2. Иммуномодулирующее действие вилонина и его аналога в культурах клеток тимуса человека и животных/Н.Н. Севостьянова, Н.С. Линькова, В.О. Полякова, Н.А. Червякова, А.В. Костылев, А.О. Дурнова, И.М. Кветной, Р.И. Абдулрагимов, В.Х. Хавинсон//Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. - №4. – С. 220-223.
3. Пептидная регуляция репаративных процессов в органах иммунной системы при ускоренном старении/В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, И.М. Кветной, В.О. Полякова, А.В. Трофимов, Н.Н. Севостьянова, Р.И. Абдулрагимов//Научные ведомости Белгородского государственного университета. Медицина. Фармация. Геронтология и гериатрия. – 2010.– № 22 (93), Вып. 12/1. – С. 57-61.
4. Роль сигнальных молекул в старении эпифиза и тимуса человека/Н.С. Линькова, В.О. Полякова, Т.В. Кветная, А.С. Катанугина, А.В. Костылев, Р.И. Абдулрагимов, Н.Н. Севостьянова//Молекулярная медицина. – 2012. - №5. – С. 41-44.
5. Севостьянова, Н.Н. Функциональная морфология клеточного обновления в щитовидной железе при старении/Н.Н. Севостьянова, В.О. Полякова, Р.И. Абдулрагимов//Вестник МАНЭБ. – 2010. – Т. 15, №3. – С. 92-98.

Главы в руководстве

6. Иммуногистохимические маркеры в оценке функционального состояния плаценты/В.О. Полякова, Н.С. Линькова, А.В. Костылев, И.М. Кветной, С.С. Коновалов, А.О. Дурнова, Р.И. Абдулрагимов//В кн.: «Введение в молекулярную диагностику». Том 1. Белки-маркеры в современной клинической диагностике. – Москва «Медицина». – 2010. – С. 318-343.

7. Полякова, В.О. Иммуногистохимические маркеры в диагностике патологии тимуса/В.О. Полякова, Н.С. Линькова, Р.И. Абдулрагимов//В кн.: «Введение в молекулярную диагностику». Том 1. Белки-маркеры в современной клинической диагностике. – Москва «Медицина». – 2010. – С. 216-224.

Статьи в других журналах

8. Инволютивные изменения резидентных клеток тимуса человека при старении/В.О. Полякова, И.М. Кветной, Н.С. Линькова, С.С. Коновалов, Н.Н. Севостьянова, Р.И. Абдулрагимов//Геронтологический журнал им. В.Ф. Купревича. – 2010. – № 1. – С. 48-51.

9. Современные представления о нейроиммуноэндокринных механизмах старения/И.М. Кветной, В.О. Полякова, Р.И. Абдулрагимов, Н.Н. Севостьянова//В сб. трудов I Международной научно-практической конф. «Инновационные технологии управления здоровьем и долголетием человека». – Санкт-Петербург. – 2010. – С. 140-148.

Тезисы докладов

10. Абдулрагимов, Р.И. Экспрессия гормонов в иммунокомпетентных клетках при старении тимуса/Р.И. Абдулрагимов, В.О. Полякова, Н.С. Линькова//Матер. III международной конференции «Геронтологические чтения – 2010». в журнале «Геронтологический журнал им. Купревича. - 2010. – № 2. – С. 20-21.

11. Везуген как геропротектор активирующий пролиферацию и дифференцировку тимоцитов/А.В. Трофимов, В.О. Полякова, Н.С. Линькова, Н.Н. Севостьянова, Р.И. Абдулрагимов//Матер. XV Международной научно-практической конференции «Пожилой больной. Качество жизни» – М., 2010. – С. 84.

12. Молекулярные аспекты ускоренного старения pineальной железы/ Н.Н. Севостьянова, Н.С. Линькова, В.О. Полякова, А.В. Костылев, И.М. Кветной, Р.И. Абдулрагимов// Сб. тез. Международной научно-практической конф. «Ускоренное старение: механизмы, диагностика, профилактика». Ж. «Проблемы старения и долголетия», Киев, приложение, – 2012. - Т. 21. – С. 38-39.

13. Молекулярно-клеточные механизмы эмбрионального цитогенеза нейроэндокринных клеток тимуса человека/В.О. Полякова, Р.И. Абдулрагимов, Н.С. Линькова, С.А. Пичугин//Матер. VII международной конф. «Молекулярная медицина и биобезопасность». – Москва. – 2010. – С. 153-154.

14. Нейроиммуноэндокринные взаимодействия в норме и патологии: роль сигнальных молекул в диагностике возраст-ассоциированных заболеваний/ И.М. Кветной, В.О. Полякова, С.С. Коновалов, Т.В. Кветная, О.В. Хейфец, Н.В. Левдик, Р.И. Абдулрагимов, Н.Н. Севостьянова//Матер. V научно-практической геронтологической конференции с международным участием «Пушковские чтения». – Санкт-Петербург. – 2009. – С. 222-224.
15. Нейроиммуноэндокринные механизмы старения/Р.И. Абдулрагимов, Н.Н. Севостьянова, О.В. Хейфец, А.О. Дурнова, Н.С. Линькова, В.О. Полякова// Матер. III международной конф. «Геронтологические чтения – 2010». – в журнале «Геронтологический журнал им. Купревича. - 2010. – № 2. – С. 22-23.
16. Паракринная регуляция локального гомеостаза тимуса при его старении/ Н.С. Линькова, А.В. Трофимов, В.О. Полякова, Н.Н. Севостьянова, Р.И. Абдулрагимов, С.С. Коновалов//Матер. XV Международной научно-практической конференции «Пожилой больной. Качество жизни» – М., 2010. – С. 47-48.
17. Экспрессия мелатонина в пинеальной железе и тимусе: мишень для таргетной терапии возраст-ассоциированной патологии/В.О. Полякова, И.М. Кветной, Т.В. Кветная, Н.Н. Севостьянова, Р.И. Абдулрагимов, Н.С. Линькова, С.С. Коновалов//Матер. XVII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – Москва. – 2010. – С. 704-705.

АБДУЛРАГИМОВ Руслан Израилович ЭКСПРЕССИЯ ГОРМОНОВ В ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТКАХ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ ПРИ ВОЗРАСТНОЙ ИНВОЛЮЦИИ // Автореф. дис. канд. мед. наук: 14.01.30 – СПб., 2013. – 24 с.

Подписано в печать «07»июня 2013. Формат 60*84 1/16.

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

Тираж 100 экз. Заказ 85.

Отпечатано с готового оригинал-макета.

ЗАО «Принт-Экспресс»

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

СПИСОК ЦИТИРУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

- Пальцев М.А. и соавт.** Факторы транскрипции как маркеры диагностики прогноза опухолевых заболеваний // Молекулярная медицина. – 2011. – № 4. – С. 19-23; **Пальцев М.А., Кветной И.М.** Руководство по нейроиммуноэндокринологии. - М.: Медицина, 2006. – 384 с.; **Anisimov V.N., Khavinson V.Kh.** Peptide bioregulation of aging: results and prospects // Biogerontology. – 2010. – Vol. 11. – P. 139-149\$
- Berczi I., Chow D.A., Baral E., Nagy E.** Neuroimmunoregulation and cancer (review) // Int J Oncol. – 1998. – Vol. 13, N 5. – P. 1049-1060; **Hartung H.P., Wolters K., Toyka K.V.** Substance P: binding properties and studies on cellular responses in guinea pig macrophages // J. Immunol.- 1986.- Vol. 136, N 10.- P. 3856-3863; **Inagaki S., Kito S.** Peptides in the peripheral nervous system // Prog. Brain Res.- 1986.- Vol. 66.- P. 269-316; **Khavinson V.Kh., Fedoreeva L.I., Vanyushin B.F.** Short Peptides Modulate the Effect of Endonucleases of Wheat Seedling. // Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2011a. - Vol. 437. - P. 64-67; **Khavinson et al.** Morphofunctional Fundamentals for Peptide Regulation of Aging. // Biology Bulletin Reviews. – 2011b. - Vol. 1, N 4. - P. 389-393; **Khavinson V. Kh. et al.** Peptides Regulate Cortical Thymocytes Differentiation, Proliferation, and Apoptosis// Journal of Amino Acids. – 2011c. - Vol. 2011. P. 1-5; **Kvetnoy I.M. et al.** Claude Bernard was right: hormones may be produced by "non-endocrine" cells // Neuro Endocrinol Lett. - 2000. - Vol. 21, N 3. – P. 173-174; **Reiter R.J. et al.** Melatonin: new applications in clinical and veterinary medicine, plant physiology and industry // NeuroEndocrinol Lett. – 2011. - Vol. 32, N 5. – P. 575-587; **Reiter R.J., Tan D.X., Fuentes-Broto L.** Melatonin: a multitasking molecule // Prog. Brain Res. – 2010. – Vol. 181. – P. 127-151.