

На правах рукописи

СЕВОСТЬЯНОВА
Наталья Николаевна

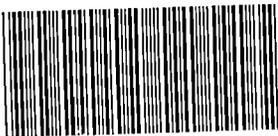
**МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
РАДИАЦИОННОГО СТАРЕНИЯ**

14.01.30 – геронтология и гериатрия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

10 ОКТ 2013

Санкт-Петербург – 2013



005534646

Работа выполнена в отделе клеточной биологии и патологии Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН и на кафедре биохимии Новгородского государственного университета им. Я. Мудрого

Научный консультант:

заслуженный деятель науки РФ,
член-корреспондент РАМН,
доктор медицинских наук, профессор
Хавинсон Владимир Хацкелевич

Официальные оппоненты:

Аничков Николай Мильевич, заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАМН, доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова» Минздрава России, заведующий кафедрой патологической анатомии.

Марков Александр Георгиевич, доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет» (ФГБОУ ВПО СПбГУ), заведующий кафедрой общей физиологии.

Белушкина Наталья Николаевна, доктор биологических наук, профессор, НБИКС-центр Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», главный научный сотрудник.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

Защита диссертации состоится «25» октября 2013 г. в 12.00 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 «12» сентября 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

Козина Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Старение населения признается в настоящее время глобальным явлением. Пожилые люди старше 60 лет являются самой быстро растущей группой населения [Сафарова Г.Л., 2009]. Ожидается, что средняя продолжительность жизни в России к 2015 году достигнет 70 лет.

Однако в настоящее время большинство людей не достигает биологического предела продолжительности жизни, а период старости, как правило, связан со снижением активности и ухудшением здоровья. Следовательно, увеличение продолжительности активного долголетия является одной из наиболее важных и сложных проблем геронтологии и гериатрии [Хавинсон В.Х., 2009; Anisimov V.N., Khavinson V.Kh., 2010], а разработка адекватных моделей для изучения процессов старения представляет собой одно из приоритетных направлений современной биологии и медицины [Хавинсон В.Х. и соавт., 2003].

Нейроиммуноэндокринная регуляция гомеостаза занимает важное место в сложной цепи процессов, приводящих к старению клеток, тканей, органов и организма в целом [Пальцев М.А., Кветной И.М., 2006; Пальцев М.А. и соавт., 2011]. Морфо-физиологическим эквивалентом старения является инволюция жизненно важных органов, в основе механизмов которой лежит нарушение локальных молекулярно-клеточных нейроиммуноэндокринных взаимоотношений [Пальцев М.А., Кветной И.М., 2006].

В последние годы широкое распространение получила модель радиационного старения, в основе которой лежит применение ионизирующего гамма-излучения, однако зачастую ионизирующая радиация вызывает необратимые изменения в клетках органов нейроиммуноэндокринной системы, гораздо более выраженные, чем при естественном старении.

В связи с этим интересным представляется сравнительное изучение радиационных моделей с применением гамма-излучения и когерентного излучения, генерируемого низкоинтенсивными лазерами. В последнее десятилетие в рамках биофизических исследований и в терапевтических целях проводятся исследования взаимодействия различных органов и тканей с фотонами – частицами, генерируемыми низкоинтенсивными лазерами. Широкий спектр и разнонаправленность действия молекулярно-клеточных эффектов, вызываемых низкоинтенсивным лазерным излучением, позволяет предположить, что его применение для создания модели ускоренного старения органов и тканей может быть более перспективно по сравнению с ионизирующими γ -квантами [Bosco N. et al., 2010].

Современные методы исследования (гистохимия, иммуногистохимия, электронная микроскопия и др.) позволяют более глубоко изучать

механизмы радиационного старения клеток и тканей. Они дают возможность разработать новые модели ускоренного (индуцированного) старения, оценить их адекватность и исследовать на их основе разработку геропротекторных средств.

Изучению геропротекторного действия наиболее значимого природного геропротектора мелатонина и синтетических пептидов в моделях радиационного старения, вызванного ионизирующим излучением посвящено значительное количество работ [Kvetnoy I.M. et al., 1995]. В то же время, геропротекторное действие мелатонина и пептидов при лазерном облучении практически не изучено.

В этой связи, помимо мелатонина и его основного предшественника серотонина, наиболее значимый интерес представляет синтетический трипептид *Lys-Glu-Asp*, созданный в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН. Он обладает выраженными геропротекторными свойствами, стимулируя пролиферацию, дифференцировку клеток и подавляя их апоптоз, что было показано на «старых» культурах клеток нейроиммуноэндокринной системы [Хавинсон В.Х. и соавт., 2011].

В связи с этим изучение молекулярно-клеточных механизмов радиационного старения в двух принципиально разных моделях (основанных на применении ионизирующего и неионизирующего излучения) и биологической активности синтетических и природных геропротекторных средств, тропных к клеткам диффузной нейроиммуноэндокринной системы, представляется крайне актуальным для современной геронтологии и гериатрии.

Цель и задачи исследования

Целью диссертационного исследования явилось изучение молекулярно-клеточных механизмов радиационного старения и биологической активности синтетических и природных геропротекторных средств, тропных к клеткам диффузной нейроиммуноэндокринной системы в двух принципиально разных моделях (основанных на применении ионизирующего и неионизирующего излучения).

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

1. Исследовать нейроиммуноэндокринные молекулярно-клеточные взаимоотношения в висцеральных органах, наиболее подверженных возрастной инволюции (гипофиз, пинеальная железа, надпочечники, тимус, селезенка, желудочно-кишечный тракт, поджелудочная железа, щитовидная железа) в норме;
2. Изучить молекулярно-клеточные особенности ускоренного старения в клетках диффузной нейроиммуноэндокринной системы указанных органов, возникающие под влиянием ионизирующего гамма-излучения.

3. Изучить молекулярно-клеточные особенности ускоренного старения в клетках диффузной нейроиммуноэндокринной системы указанных органов, возникающие под влиянием когерентного лазерного излучения.
4. Провести сравнительный анализ молекулярно-клеточных механизмов радиационного старения в двух принципиально разных моделях (при воздействии гамма- и лазерного излучения).
5. Изучить влияние природных и синтезированных герпротекторов – мелатонина, серотонина и трипептида Lys-Glu-Asp на процессы ускоренного старения, индуцированные лазерным и гамма-излучением.
6. Разработать перспективы методологического применения лазерного излучения для моделирования процессов естественного старения.

Научная новизна работы

В работе впервые проведен сравнительный анализ молекулярно-клеточных механизмов радиационного старения в двух принципиально разных моделях - с применением ионизирующего гамма-излучения и неионизирующего низкоинтенсивного лазерного излучения.

Впервые установлено, что лазерное излучение оказывает менее выраженное деструктивное воздействие на органы, наиболее подверженные возрастной инволюции (тимус, пинеальная железа, селезенка, желудочно-кишечный тракт), что позволило детально обосновать перспективы применения данной модели в сравнении с гамма-излучением.

Показано, что при индуцированном старении, вызванном действием ионизирующего гамма-излучения, происходит нарушение структуры пинеалочитов и снижение их функциональной активности (уменьшение синтеза мелатонина и серотонина), тогда как основной мишенью лазерного облучения в пинеальной железе являются глиальные клетки и эндотелий капилляров, причем эти изменения являются обратимыми.

Впервые установлено, что под действием лазерного излучения не наблюдается снижения клеточности и нарушения гистологической архитектоники иммунных органов (тимуса и селезенки) и желудочно-кишечного тракта, а незначительное снижение пролиферации их клеток восстанавливается через 3 недели после окончания действия излучения.

Таким образом, впервые показано более «мягкое» течение инволютивных процессов при лазерном облучении по сравнению с ионизирующим излучением, что позволяет считать «лазерную» модель старения более физиологической и адекватно отражающей процесс возрастной инволюции при естественном старении организма.

Впервые проведено изучение влияния мелатонина, серотонина и герпротекторного трипептида Lys-Glu-Asp в модели лазерного старения на нейроиммуноэндокринные клетки органов, наиболее подверженных

возрастной инволюции. При этом установлена геропротекторная эффективность указанных средств, что является еще одним подтверждением методологической адекватности и перспективности применения данной модели ускоренного старения.

Практическая значимость работы

Сравнительное изучение молекулярно-клеточных механизмов индуцированного старения под воздействием лазерного и гамма-излучения позволило расширить представления об инволютивных процессах, развивающихся в органах и тканях при старении. Показано, что лазерное излучение во многом является более адекватной моделью ускоренного старения, не оказывая выраженного деструктивного действия на органы диффузной нейроиммуноэндокринной системы. Установлено выраженное геропротекторное действие мелатонина и пептида Lys-Glu-Asp в обеих моделях радиационного старения и выявлены клеточные и молекулярные мишени геропротекторного действия изученных веществ – пинеалоциты и сигнальные молекулы, участвующие в запуске апоптоза.

Полученные результаты открывают новые перспективы для разработки эффективных геропротекторов, регулирующих межклеточные нейроиммуноэндокринные взаимодействия.

Проведенные исследования свидетельствуют также о важности дальнейшего углубленного изучения механизмов действия гормональных геропротекторов при старении, что позволит оптимизировать их применение при коррекции различных функциональных нарушений и лечении возраст-ассоциированных заболеваний.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Лазерное излучение вызывает инволютивные изменения в основных органах и системах организма, что позволяет рассматривать его в качестве модели радиационного старения.
2. В сравнении с молекулярно-клеточными признаками старения, индуцированного гамма-излучением, лазерное излучение оказывает менее выраженное деструктивное воздействие на клетки пинеальной железы (эпифиза), тимуса, селезенки, желудка и кишечника. Старение тканей, индуцированное лазерным излучением, носит обратимый характер, последствия которого нивелируются при прекращении лазерного облучения.
3. Модель радиационного старения пинеальной железы индуцированного лазерным излучением, более адекватна естественному процессу, поскольку в эпифизе лазерное излучение вызывает обратимые изменения микроокружения, не затрагивая пинеалоциты. Гамма-излучение индуцирует необратимую деструкцию пинеалоцитов.

4. Применение гамма-излучения для индукции ускоренного старения органов иммунной системы и желудочно-кишечного тракта позволяет оценивать репарационные возможности этих органов, тогда как при гамма-облучении наблюдаются выраженные морфо-функциональные признаки их дисфункции, практически не поддающиеся коррекции.
5. Установлена эффективность использования данной модели для оценки активности геропротекторных средств гормональной и пептидной природы - мелатонина и синтетического трипептида Lys-Glu-Asp.
6. Сочетание двух моделей ускоренного старения, с использованием низкоинтенсивного лазерного излучения и гамма-квантов позволяет всестороннее оценить молекулярно-клеточные механизмы старения различных органов и систем.

Личный вклад автора

Личный вклад автора в диссертационное исследование состоял в разработке новой модели ускоренного старения органов диффузной нейроиммуноэндокринной системы, индуцированного низкоинтенсивным лазерным излучением. Для сравнительной оценки предложенной ранее модели ускоренного старения с использованием гамма-излучения и предложенного нового метода автор использовал современные методы молекулярно-биологических исследований: метод иммуногистохимии, метод, различные гистологические окраски, методы электронной микроскопии и морфометрии, наиболее полно характеризующие процессы старения на различных уровнях организации живой материи. Кроме того, на основании проведенного анализа всех полученных данных автором сделаны важные выводы, имеющие ценность для развития идеи пептидной регуляции нейроиммуноэндокринных взаимодействий при индуцированном старении.

Таким образом, автор предложил новую модель индуцированного старения различных органов и систем, позволяющую оценивать биологическую активность различных классов потенциальных геропротекторов, что в дальнейшем позволит получать важные практические и фундаментальные результаты, существенно расширяющие возможности клинической и теоретической геронтологии.

Апробация работы

Основные результаты и положения диссертационной работы доложены и обсуждены на XIV научно-практической конференции «Современные возможности лазерной терапии» (Великий Новгород, Калуга, 2004), XV Международной научно-практической конференции «Пожилой больной. Качество жизни» (Москва, 2010), Всероссийской

научно-практической конференции «Терапевтические проблемы пожилого человека» (Санкт-Петербург, 2010), Международной конференции «Геронтологические чтения – 2010» (Белгород, 2010), научно-практической конференции преподавателей и студентов Новгородского филиала СПбГУЭФ «Актуальные проблемы современной экономики России» (Великий Новгород, 2010), на XVII научной конференции преподавателей, аспирантов и студентов НовГУ (Великий Новгород, 2010), XVII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2010).

Реализация результатов исследования

Результаты исследований используются в научной, педагогической и практической деятельности Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии и НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН, Новгородского государственного университета и Белгородского государственного национального исследовательского университета.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 28 научных работ, в том числе 17 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации диссертационных исследований.

Связь с научно-исследовательской работой института

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

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 9 глав, выводов и указателя литературы. Текст диссертации изложен на 219 страницах, содержит 7 таблиц, иллюстрирован 42 рисунками. Список литературы содержит 250 источников, из них отечественных – 110, зарубежных – 140.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Для проведения экспериментов по моделированию радиационного старения 160 крыс линии Вистар (масса тела 140-150 г, возраст 3 мес.) в зависимости от метода воздействия были разделены на 6 групп (табл. 1).

Таблица 1

Распределение животных по группам
для моделирования радиационного старения

№ группы	воздействие	взятие материала	количество животных
1	контроль (интактные животные)	14 суток	20
1а	контроль (интактные животные)	21 суток	20
2	гамма-излучение	14 суток	30
2а	гамма-излучение	21 суток	30
3	лазерное излучение	14 суток	30
3а	лазерное излучение	21 суток	30

Таблица 2

Распределение животных по группам
в эксперименте по изучению геропротекторных свойств мелатонина
и серотонина в модели радиационного (лазерного) старения

№ группы	вводимое вещество	время после окончания введения, сут	
1	контроль (интактные животные)		20
2	физиологический раствор	3	15
3	физиологический раствор	12	15
4	мелатонин	3	20
5	мелатонин	12	20
6	серотонин	3	20
7	серотонин	12	20

Опыты по изучению геропротекторных свойств мелатонина и серотонина после лазерного облучения проводили на 130 крысах линии Вистар (масса тела 140-150 г, возраст 3 мес.) по схеме, отраженной в таблице 2. Мелатонин и серотонин однократно вводили сразу после лазерного облучения внутривентриально по 2 мкг на крысу и изучали полученный эффект на 3 и 12 сутки после введения (табл. 2).

В серии опытов по изучению геропротекторного действия трипептида Lys-Glu-Asp в радиационной модели старения, вызванного лазерным облучением, животные были разделены на 5 равных групп:

- 1 группа – контроль (интактные животные),
- 2 группа – лазерное облучение (14 сут опыта),
- 2а группа – лазерное облучение (21 сут опыта),
- 3 группа – лазерное облучение и трипептид (14 сут опыта),
- 3а группа – лазерное облучение и трипептид (21 сут опыта).

Всего в этой серии экспериментов использовали 75 крысах линии Вистар (масса тела 140-150 г, возраст 3 мес.). Исследуемый трипептид Lys-Glu-Asp начинали вводить животным внутривентриально через 2 часа после облучения по 0,5 мкг на крысу в течение 5 дней. Крысам 1, 2 и 2а группы по той же схеме вводили физиологический раствор.

Моделирование радиационного ускоренного старения

Общее однократное ионизирующее гамма-облучение животных выполнено на кобальтовом аппарате ЛУЧ при мощности 32 сГр/мин. Выведение соответствующих групп животных из опыта и выделение органов проводилось под нембуталовым наркозом (50 мг/кг) на 14 и 21 сутки после облучения в утреннее время.

Для изучения радиационной модели при лазерном облучении применяли гелий-неоновый лазер УФЛ-01 (длина волны излучения 0,63 мкм, мощность излучения 20 мВт, на торце световода 15 мВт, регулировка диаметра пучка излучения от 3 до 600 мкм). Проведенное ранее экспериментально-морфологическое изучение действия гелий-неонового лазера на слизистую оболочку желудка и кишечника позволило определить оптимальную дозу воздействия - 20 Дж/см² при частоте подачи импульсов - 1 кГц и продолжительности сеанса - 10 мин [Kvetnoy I.M. et al., 1995].

Методы исследования

Объектом для исследования послужили органы, наиболее подверженные возрастной инволюции и в составе которых широко представлены клетки диффузной нейроиммуноэндокринной системы (гипофиз, пинеальная железа - эпифиз, надпочечники, тимус, селезенка, желудок, кишечник, щитовидная железа, поджелудочная железа).

Кусочки органов крыс объемом 1 см³ фиксировали в течение 24 часов в 10% нейтральном забуференном формалине (рН 7.2) и в жидкости Буэна. Материал обезжизивали с помощью автоматической станции 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). Общую гистологию органов крыс изучали на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Кроме того, в работе использовали следующие гистологические окраски: ШИК-реакция (для гипофиза), импрегнация ядрышковых организаторов - AgNOR и метод верификации катехоламинов по Севки (для надпочечников), выявление слизи альциановым синим (для кишечника).

Изучение пролиферативной активности и апоптоза проводили с применением мышиных моноклональных антител к протеинам Ki-67 (фактор пролиферации) и проапоптотному фактору p53 (оба Novocastra, 1:50). Кроме того, использовали первичные антитела к мелатонину (CIDtech Res. 1:100), хромогранину А, серотонину, NO-синтазе и кальцитонину (все Novocastra, 1:50), гастрину, бета-эндорфину, мотилину

и субстанции Р, эндотелину-1 (все Dako, 1:100), соматостатину, инсулину, глюкагону, панкреатическому пептиду, кальретгину, нейротензину (все Novocastra, 1:150). Для выявления мышинных иммуноглобулинов использовали универсальный биотин-стрептавидин-пероксидазный набор (MP Biomedicals). Визуализацию реакции проводили с помощью пероксидазы хрена с проявлением диаминобензидином (Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, Dako) и щелочной фосфатазы с проявлением аминотилкарбазолом (AEC+ Substrate Chromogen, Dako). Последующую докраску ядер осуществляли гематоксилином. Заключение препаратов проводили в водорастворимую среду (Faramount, Dako).

Все иммуногистохимические реакции проводились согласно стандартному коммерческому протоколу указанных фирм.

Электронно-микроскопическое исследование проводили на материале, фиксированном в 2,5 % глутаральдегиде с последующей дофиксацией 4 % осмием. Материал заливали в смесь эпонов. Срезы толщиной 250-300 А, полученные на ультратоме LKB-7A (LKB, Malmo) контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца, после чего изучали и фотографировали в электронном микроскопе JEM-100S (JEOL).

Морфометрическую оценку микроскопических изображений осуществляли с помощью системы компьютерного анализа микроскопических изображений Nikon Eclipse 400 (Nikon) с применением лицензионной программы Videotest Morphology 5.0 (Видеотест). Подсчет соответствующих структур проводили не менее чем в 20 тестовых полях по 10 срезам исследуемого органа. Тестовая площадь 1 поля составляла 0,05 мм².

Определяли среднюю площадь экспрессии (%) и оптическую плотность (у.е.) сигнальных молекул. Сочетание указанных параметров позволяет оценить как тотальную экспрессию изучаемых молекул, так и функциональную активность отдельных иммунопозитивных клеток.

Индекс пролиферации по Ki-67 (I_{ki-67}) рассчитывали в процентах как отношение количественной плотности иммуноокрашенных ядер к количественной плотности ядер клеток, окрашенных гематоксилином. Относительную фракцию пролиферирующих клеток определяли как произведение объемной доли зоны пролиферации и I_{ki-67} .

Статистическую обработку полученных результатов проводили методами параметрической и непараметрической статистики с использованием программы Statistica 6.0 (Statsoft). Методы описательной (дескриптивной) статистики включали в себя оценку среднего арифметического значения (M), стандартного отклонения от среднего значения (m) – для признаков, имеющих непрерывное распределение; а также частоты встречаемости признаков с дискретными значениями.

Характер статистического распределения признаков анализировали с помощью χ^2 -критерия. Для оценки межгрупповых различий значений признаков, имеющих непрерывное распределение, применяли t-критерий

Стьюдента. Для оценки корреляции между исследуемыми величинами использовали линейный критерий Пирсона.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нейроиммуноэндокринные клеточные взаимоотношения в условиях физиологической нормы

Гипофиз. Передняя доля гипофиза (аденогипофиз) была представлена клетками в виде широких ветвящихся тяжей. В передней доле дифференцировались клетки всех типов с некоторым преобладанием клеток базофильного ряда, особенно в зоне контакта с сосудами. Центральную часть трабекул занимали клетки преимущественно хромофобного ряда, они были меньших размеров и располагались плотнее. Между клетками проходили микрососуды, которые нечетко контурировались.

Оптическая плотность ШИК-позитивных клеток в норме составила $0,113 \pm 0,015$ условных единиц (у.е.). Низкую пролиферативную активность гипофиза иллюстрировали единичные Ki-67 позитивные клетки в аденогипофизе контрольных животных.

Пинеальная железа (эпифиз). В цитоплазме пинеалоцитов обнаруживалось большое количество свободных рибосом и полисом, развитый пластинчатый комплекс, гладкий эндоплазматический ретикулум, многочисленные митохондрии разной величины с выраженными кристами.

В пинеалоцитах верифицировалась выраженная экспрессия мелатонина и более слабая экспрессия серотонина. Площадь экспрессии мелатонин-иммунопозитивных клеток значительно превышала такой же показатель для серотонин-продуцирующих клеток ($0,94 \pm 0,07\%$ и $0,32 \pm 0,05\%$, соответственно). По показателям оптической плотности обе популяции нейроэндокринных клеток отличались друг от друга в сторону преобладания показателя у мелатонин-продуцирующих клеток ($0,46 \pm 0,08$ у.е. и $0,16 \pm 0,05$ у.е., соответственно).

Надпочечники. Объемная доля норадреналин-содержащих клеток составила $0,138 \pm 0,024$ и $0,144 \pm 0,013$ соответственно. Площадь ядер в различных отделах надпочечников контрольных животных колебалась от 19 мкм^2 в сетчатой зоне до 32 мкм^2 в мозговом веществе. При этом минимальная площадь ядер составила 23 мкм^2 в сетчатой зоне, а максимальная - 37 мкм^2 в мозговом веществе.

Объемная плотность (ρ_{AgNO_3}) в ядрах надпочечников колебалась в различных отделах, минимальная отмечается в пучковой зоне - $0,138 \pm 0,012$ у.е., максимальная - в сетчатой - $0,199 \pm 0,014$ у.е. Зональные особенности ρ_{AgNO_3} сохранялись у животных 1а группы. Объемная плотность в пучковой зоне составила $0,134 \pm 0,012$ у.е., в сетчатой - $0,170 \pm 0,039$ у.е.

Пролиферирующие (Ki-67-иммунопозитивные клетки) локализовались преимущественно в клубочковой и наружных отделах пучковой зоны. Пролиферативный индекс у животных контрольной группы составил 6,8%.

Тимус. Неделющиеся малые тимусные лимфоциты были сосредоточены внутри коркового слоя между корковыми эпителиальными клетками. Корковые эпителиальные клетки имели звездчатую форму за счет длинных тонких цитоплазматических отростков, которые, переплетаясь между собой, образовывали "сеть", в ячейках которой располагались тимоциты коркового вещества.

Клеточный состав мозгового вещества был представлен преимущественно эпителиальными клетками и немногочисленными по сравнению с корковым веществом лимфоцитами. Группы эпителиальных клеток с крупным светлым ядром и пылевидным хроматином формировали плотные концентрические образования - тимические тельца.

Тучные клетки встречались в междольковой соединительной ткани, вблизи кровеносных сосудов. Они имели эксцентрично расположенное ядро и цитоплазму, заполненную секреторными гранулами с высокой электронной плотностью.

Ретикуло-эпителиальные клетки, которые чаще хорошо видны в мозговом веществе долек, имели отсчатую форму, рыхлое ядро неправильной формы и цитоплазму богатую канальцами эндоплазматического ретикулума. В цитоплазме таких клеток встречались немногочисленные мелкие секреторные гранулы с высокой электронной плотностью.

Селезенка. В субкапсулярной зоне и вдоль трабекул располагались многочисленные небольшие по размерам очаги миелондного кроветворения с высокой интенсивностью иммуноокрашивания Ki-67-позитивных ядер, составляющих около 1500 ядер на 1мм^2 площади среза красной пульпы.

Ig-содержащие клетки выявлялись практически по всей паренхиме органа с тенденцией концентрации по периферии маргинальных зон и в виде характерных цепочек вдоль трабекул. Их количественная плотность составила около 800 клеток на 1мм^2 , а объемная доля - почти 5%.

Количественный анализ препаратов селезенки контрольных животных показал, что значение объемной плотности Ki-67 положительных клеток в экстрамедуллярной зоне селезенки ($\rho_{\text{Ki-67}}$) на 14 сутки от начала эксперимента составил $0,138 \pm 0,009$ у.е. На 21 сутки в тех же отделах этот показатель равен $0,076 \pm 0,004$ у.е.

Объемная плотность пролиферирующих клеток в фолликулах ($\rho_{\text{Ki-67}}$) контрольных животных составила $0,119 \pm 0,003$ у.е. в 1 группе и $0,122 \pm 0,023$ у.е. в 1а группе. Иммуноглобулин позитивные клетки (IgG) в селезенке контрольных животных были сосредоточены преимущественно в маргинальной зоне между белой и красной пульпой, а также в

субкапсулярной области. Объемная доля их (ρ_{IGG}) составила $0,026 \pm 0,001$ у.е. в 1 группе и $0,082 \pm 0,013$ у.е. в 1а группе.

Желудочно-кишечный тракт. Среднее количество нейроэндокринных клеток (апудоцитов) составило $91,6 \pm 2,2$ на $0,1 \text{ мм}^2$ слизистой оболочки желудка.

ЕС₁-клетки, дали положительную реакцию с антителами к серотонину и мелатонину. Среднее количество ЕС₁-клеток составило $17,2 \pm 0,9$ на $0,1 \text{ мм}^2$.

ЕС₂-клетки, имевшие положительную реакцию с антителами к мотилину и субстанции Р были немногочисленны $-7,3 \pm 0,5$ на $0,1 \text{ мм}^2$. Как правило, одни и те же ЕС₂-клетки содержали мотилин и субстанцию Р и поэтому положительно реагировали с антителами к обоим гормонам.

Среднее количество G-клеток было равно $16,3 \pm 2,3$ на $0,1 \text{ мм}^2$ слизистой оболочки. Иммуногистохимически в них обнаруживался гастрин, в некоторых клетках и бета-эндорфин.

DL-клетки, дававшие положительную реакцию с антителами к соматостатину были немногочисленны $-8,9 \pm 0,6$ на $0,1 \text{ мм}^2$. N-клетки, дают положительную реакцию с антителами к нейротензину. Их среднее количество составляет $7,8 \pm 0,9$ на $0,1 \text{ мм}^2$.

Клетки, дававшие положительную реакцию с антителами к кальцитрину были обнаружены в большом количестве на всем протяжении эпителия слизистой оболочки желудка. Среднее количество таких клеток составивших положительную реакцию с антителами к эндотелину-1 было обнаружено в большом количестве на всем протяжении слизистой оболочки желудка. Среднее количество End₁-клеток составило $22,1 \pm 2,2$ на $0,1 \text{ мм}^2$.

Общее число апудоцитов на 1 мм^2 в фундальном отделе более чем вдвое превышало их содержание в пилорическом отделе (20 ± 1 и 48 ± 5 , соответственно).

В контроле в сигмовидной и прямой кишке содержалось примерно в 8 раз больше мелатонин-содержащих клеток, чем серотонин-иммунопозитивных. При оценке свободнорадикальных процессов в слизистой оболочке кишечника было установлено, что показатели экспрессии основного фермента образования свободных радикалов – NO-синтазы отражали невысокий уровень ее синтеза $-0,16 \pm 0,04\%$ по площади экспрессии и $0,13 \pm 0,06$ у.е. по оптической плотности.

Показатели клеточного обновления эпителиоцитов демонстрировали преобладание процессов пролиферации клеток над процессами их программированной гибели – апоптоза ($0,94 \pm 0,06\%$ и $0,67 \pm 0,05\%$ соответственно), что отражало высокий уровень клеточного обновления в слизистой оболочке кишечника в норме.

Поджелудочная железа. Клетки, формирующие ацинусы, в основном имели пирамидальную форму. Округлые ядра в них с крупными

ядрышками были смещены к базальной части. В цитоплазме ацинарных клеток различались ацидофильные гранулы.

На срезах, окрашенных гематоксилин-эозином выявлялись островки Лангерганса, сформированные А-клетками (продуцирующими глюкагон), В-клетками (продуцирующими инсулин), D-клетками (продуцирующими соматостатин) и PP-клетками (продуцирующими панкреатический полипептид). Основную массу клеток (80%) составляли В-клетки, занимающие центральную часть островков.

При иммуногистохимическом исследовании А-клетки, содержащие глюкагон, располагались по периферии островка. Объемная плотность глюкагон-содержащих клеток составляла 12,8%, а оптическая плотность интенсивности иммуногистохимической реакции – 0,126 у.е. Объемная доля D-клеток составляла 4,5%, а оптическая плотность – 0,160 у.е. D-клетки располагаются по периферии островков.

Микроциркуляторное русло было представлено многочисленными капиллярами, артериолами и венами, имеющими типичное ультраструктурное строение.

Щитовидная железа. При окраске гематоксилином-эозином имла структуру, представленную фолликулами различной формы, в той или иной мере заполненных коллоидом. Каждый фолликул был ограничен базальной мембраной, на которой располагается слой эпителиальных клеток кубической формы. Кроме фолликулярного эпителия были верифицированы крупные клетки со светлой цитоплазмой, в которых иммуногистохимически обнаруживался кальцитонин (парафолликулярные или С-клетки). Оптическая плотность экспрессии кальцитонина в С-клетках составила $0,241 \pm 0,005$ у.е., площадь экспрессии $14,5 \pm 1,9\%$.

Нейроиммуноэндокринные клеточные взаимоотношения при радиационном старении, вызванном ионизирующим облучением

Гипофиз. У облученных животных визуальный анализ препаратов гипофиза, окрашенных гематоксилином и эозином, не позволил выявить отличий на разных сроках эксперимента. Оптическая плотность ШИК-положительных клеток через 14 суток от начала облучения составляла $0,111 \pm 0,010$ у.е., а на 21-е сутки она несколько снижалась по отношению к контролю, составляя $0,091 \pm 0,010$ у.е. Пролиферативная активность клеток гипофиза после облучения не отличалась от контрольных значений.

Пинеальная железа (эпифиз). В нейроглиальных клетках отмечалась стертость границ между ядром и цитоплазмой. Цитоплазма пинеалоцитов выглядела вакуолизированной за счет расширения канальцев эндоплазматической сети, набухания и просветления матрикса митохондрий и лизиса крист в центральных участках.

Цитоплазма эндотелия сосудов была уплотнена. В просвете сосудов были видны единичные эритроциты. На 14 сут отмечался отек периваскулярных пространств и разрыхление базальной мембраны. На 21

сутки от начала эксперимента у облученных животных ультрамикроскопическая организация пинеалоцитов была близка к норме. Изменения в нейроглиальных клетках сохранялись. В стенках кровеносных сосудов встречались участки набухшего отечного эндотелия.

Площадь экспрессии мелатонин-иммунопозитивных клеток была снижена относительно контроля и не отличалась от аналогичного показателя для серотонина ($0,27 \pm 0,03\%$ и $0,29 \pm 0,04\%$, соответственно). По оптической плотности обеих популяций нейроэндокринных клеток экспрессия мелатонина и серотонина была снижена по сравнению с контролем до $0,18 \pm 0,02$ у.е. и $0,06 \pm 0,01$ у.е., соответственно, что свидетельствует о снижении синтеза мелатонина в пинеалоцитах при радиационном старении.

Надпочечники. На 14-е сутки после начала облучения отмечалась мозаичность рисунка, некоторая гиперплазия клеток, преимущественно пучковой зоны, дистрофические изменения в цитоплазме. На 21-е сутки визуальная картина не отличается от контрольной.

Через 14 суток от начала облучения индекс пролиферации снижался по сравнению с контрольной группой и составил 4,6%. На 21-е сутки после облучения пролиферативный индекс составил 6,1%, что статистически значимо не отличалось от контроля.

Через 14 суток от начала лучевого воздействия отмечалось статистически значимое по отношению к контролю снижение объемной доли норадреналин-содержащих клеток в 2 раза до $0,077 \pm 0,011$ у.е., а на 21-е сутки этот показатель приближался к контрольному значению, составляя $0,121 \pm 0,019$ у.е.

У облученных животных на 14 сутки после воздействия площадь ядер по сравнению с контрольной группой менялась неоднозначно. В клубочковой зоне она статистически значимо снижалась, в пучковой не отличалась от контроля, а в остальных отделах надпочечников - увеличивалась.

Минимальное значение для ядер в клубочковой зоне составляло - 22 мкм^2 , а максимальное - 35 мкм^2 в мозговом веществе. На 21-е сутки от начала радиационного облучения площадь ядер несколько сокращалась по сравнению с контрольными показателями. После облучения во 2-й группе объемная плотность ядер надпочечников по гистохимической реакции AgNOR снижалась в 1,5 раза относительно контроля, однако к 21 суткам это различие нивелировалось.

Тимус. В ткани вилочковой железы облученных животных, обнаружено отслоение участков наружной ядерной мембраны, набухание матрикса митохондрий, лизис крист, разрушение плотных контактов между тимоцитами. Облучение вызвало заметные морфологические изменения в стенках кровеносных сосудов, сходные с инволютивными изменениями при естественном старении, а именно - разрыхление базальной мембраны и периваскулярных пространств, увеличение плотности цитоплазмы одних эндотелиоцитов и отек цитоплазмы других.

В просвет сосудов цитоплазма эндотелиоцитов посылает множество тонких выростов. В цитоплазме этих клеток заметны вакуоли и уменьшенное число митохондрий. Уплотнены цитоплазма перицитов и их отростки. Исследование ретикуло-эпителиальных клеток выявляло отслоение наружной мембраны, расширение мембран эндоплазматической сети, появление множества мелких вакуолей, кристы митохондрий набухают и проявляют признаки лизиса.

В перинуклеарном пространстве было заметно некоторое число мелких секреторных гранул. Через 21 сутки после начала облучения в корковом веществе долек вилочковой железы облученных животных выраженных морфологических изменений не отмечено.

Селезенка. Через 14 суток от начала облучения в селезенке животных вокруг центральной артерии отмечалось опустошение фолликулов и их фрагментирование.

Под действием облучения на 14 сут наблюдалось переполнение кровью периферических синусов в селезенке и оголение стромы в ее субкапсулярной зоне. В последующем на 21 сутки происходило неполное восстановление гистоструктуры органа.

В селезенке облученных крыс на 14 сутки объемная плотность Ki-67 позитивных клеток снижалась по сравнению с контрольной группой и составляет $0,082 \pm 0,004$, при этом отличие было статистически достоверно. На 21 сутки пролиферативная активность клеток возрастала, но достоверно не достигала контрольного уровня и составила $0,056 \pm 0,001$.

После облучения на 14 сутки количество иммуноглобулин-позитивных клеток несколько увеличивалось по сравнению с контролем и составило $0,030 \pm 0,002$ у.е., а на 21 сутки объемная доля IgG-позитивных клеток существенно сокращалась до $0,015 \pm 0,001$ у.е. по сравнению с контролем.

Желудочно-кишечный тракт. При радиационном старении на большем протяжении слизистой оболочки желудка отмечалась ее гипертрофия, однако, среди участков гипертрофии встречались участки атрофии. Общая популяция нейроэндокринных клеток (апудоцитов) в желудке при радиационном старении сохраняла свою многочисленность, хотя количественные показатели их общего количества несколько снижались, составляя в среднем $82,3 \pm 2,2$ на $0,1 \text{ мм}^2$ слизистой оболочки.

В ряде ЕС₁-клеток и тучных клеток наблюдались дистрофические изменения в виде набухания митохондрий и появления вакуолей. Среднее количество ЕС₁-клеток при радиационном старении составило $24,1 \pm 1,3$ на $0,1 \text{ мм}^2$. При радиационном старении среднее количество ЕС₂-клеток практически не отличалось от контроля и составило $6,9 \pm 0,2$ на $0,1 \text{ мм}^2$. Среднее количество DL-клеток при радиационном старении увеличивалось до $43,5 \pm 2,8$ на $0,1 \text{ мм}^2$. Количество N-клеток при радиационном старении недостоверно отличалось от контроля и составляло $6,6 \pm 0,8$ на $0,1 \text{ мм}^2$.

Количество Calg-клеток при радиационном старении возрастало и было равно $36,7 \pm 2,6$ на $0,1 \text{ мм}^2$.

Количество эндотелин-1 позитивных клеток было близко к контрольным значениям и составило $26,3 \pm 2,5$ на $0,1 \text{ мм}^2$. Проллиферативная активность эпителиоцитов при радиационном старении практически не изменялась - $I_{\text{КЛ-67}}$ составил $15,8 \pm 0,8$ у.е. в контроле и $17,3 \pm 1,2$ у.е. на 21 сутки после облучения. В то же время апоптозный индекс при радиационном старении возрастал - $0,48 \pm 0,06$ у.е. в контроле и $0,88 \pm 0,09$ у.е. на 21 сутки после облучения.

При радиационном старении кишечника наблюдались воспалительные неспецифические изменения различной степени выраженности без образования язвенных дефектов. Со стороны эндокринных и тучных клеток отмечалось как увеличение аргентаффинных ЕС_1 -клеток, окрашенных по Массону, так и ЕС_1 - и ЕС_2 -клеток, выявленных при иммуноцитохимических реакциях соответственно на серотонин и мелатонин. Среднее их количество составило для ЕС_1 -клеток $8,2 \pm 0,6$ и для ЕС_2 -клеток $10,1 \pm 1,2$ на 1 мм^2 слизистой оболочки. Количество тучных клеток также снижалось и составляло в среднем $4,4 \pm 0,4$ на 1 мм^2 слизистой оболочки.

Общее количество эндокринных клеток при окраске аргирофильным методом Гримелиуса составило $68,3 \pm 3,7$ на $0,1 \text{ мм}^2$ слизистой оболочки. Поведение отдельных типов апудоцитов, хотя и отличалось от контрольных показателей, тем ни менее не обнаруживало тенденции к существенным количественным отличиям. Так, содержание их на $0,1 \text{ мм}^2$ слизистой оболочки было следующим: G-клетки - $20,4 \pm 1,6$; ЕС-клетки (серотонинсодержащие) - $25,6 \pm 1,5$; ЕС (мелатонинсодержащие) - $19,6 \pm 1,4$; ECL-клетки - $4,9 \pm 0,4$; N-клетки - $5,3 \pm 0,4$; D-клетки - $3,9 \pm 0,2$.

При радиационном старении площадь экспрессии серотонин-иммунопозитивных клеток значительно превышала такой же показатель для мелатонин-продуцирующих клеток ($0,74 \pm 0,04\%$ и $0,20 \pm 0,03\%$ соответственно), так же как и по показателям оптической плотности серотонин-позитивные клетки преобладали над мелатонин-иммуноположительными клеточными структурам ($0,74 \pm 0,07$ у.е. и $0,13 \pm 0,02$ у.е. соответственно).

Показатели экспрессии NO-синтазы значительно возросли по сравнению с контрольной группой, отражая высокий уровень накопления свободных радикалов в слизистой оболочке кишечника при внекишечной патологии: $0,74 \pm 0,05\%$ по площади экспрессии и $0,92 \pm 0,04$ у.е. по оптической плотности.

Показатели клеточного обновления эпителиоцитов слизистой оболочки кишечника при радиационном старении демонстрировали примерно равновесный баланс между процессами пролиферации клеток и их апоптозом по площади экспрессии ($0,21 \pm 0,03\%$ и $0,18 \pm 0,02\%$ соответственно), однако, по показателю оптической плотности экспрессия

проапоптозного фактора p53 значительно превышала оптическую плотность клеток по фактору пролиферации Ki-67.

Площадь экспрессии мелатонин-иммунопозитивных клеток была достоверно ниже в сравнении с аналогичным показателем в контроле. При этом оптическая плотность экспрессии мелатонина в обеих группах достоверно не различалась. Экспрессия серотонина по площади экспрессии и оптической плотности при облучении достоверно не отличалась от контроля.

Площадь экспрессии NO-синтазы составила $1,38 \pm 0,18$ % при оптической плотности $1,54 \pm 0,21$ у.е. Показатели клеточного обновления эпителиоцитов при радиационном старении демонстрировали преобладание процессов апоптоза над пролиферацией клеток.

Поджелудочная железа. Через 14 суток после гамма-облучения в поджелудочной железе крыс определялось выраженное полнокровие сосудистого русла. Встречались эпителиальные клетки в состоянии отсроченного пострадиационного апоптоза. Выявлено некоторое снижение продукции глюкагона в А-клетках и соматостатина в D-клетках.

После облучения численная плотность PCNA-положительных ядер клеток уменьшалась на 21,1 % по сравнению с показателем на срезах ткани интактных животных (контроль) и составила 6524 ± 328 ед. на 1 мм^2 среза.

Щитовидная железа. При окраске гематоксилином-эозином структуру, представленную фолликулами различной формы. Однако при иммуногистохимическом исследовании на 14 и 21 сутки было выявлено достоверное увеличение 3 исследуемых показателей, характеризующих функциональную активность клеток (табл. 4), что указывало на стимулирующее действие радиационного излучения на щитовидную железу.

Таблица 4

Влияние облучения на экспрессию кальцитонина
в клетках щитовидной железы

Группы животных	ПЭ, %	КПК/ 1 мм^2	ОП, у.е.
контроль	$14,5 \pm 1,9$	2424 ± 169	$0,241 \pm 0,005$
облучение (14 день)	$17,8 \pm 1,6^*$	$3012 \pm 172^*$	$0,263 \pm 0,003^*$
облучение (21 день)	$22,0 \pm 2,3^*$	$3668 \pm 158^*$	$0,258 \pm 0,012$

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

Примечание: КПК – количественная плотность кальцитонин-содержащих клеток на 1 мм^2 ткани щитовидной железы. ОП – оптическая плотность кальцитонин-содержащих клеток щитовидной железы (у.е.). ПЭ – относительная площадь экспрессии кальцитонина в клетках щитовидной железы (%).

Нейроиммуноэндокринные клеточные взаимоотношения при старении, индуцированном лазерным излучением

Гипофиз. При визуальной оценке препаратов гипофиза облученных животных характер и интенсивность реакции не отличались от контрольной группы. Однако компьютерный анализ микроскопических изображений показал, что оптическая плотность ШИК реакции в гипофизе животных, подвергшихся лазерному воздействию, снижалась, составляя $0,082 \pm 0,009$ у.е. На 21 сутки данный показатель превышал контрольный уровень и составил $0,129 \pm 0,008$ у.е. У крыс, подвергшихся лазерному излучению, при визуальной оценке не удалось выявить особенность распределения ШИК положительного материала по сравнению с контрольными и облученными группами. На 21 сутки от начала облучения отмечалось некоторое увеличение количества Ki-67 положительных клеток.

Пинеальная железа (эпифиз). На 14 сутки наиболее выраженные изменения наблюдались со стороны глиальных клеток - цитоплазма оставалась очень плотной, в ней с трудом удавалось дифференцировать ядро.

Канальцы эндоплазматического ретикулума были расширены, встречались немногочисленные митохондрии с просветленным матриксом и лизированными кристами. В некоторых нейроглиальных клетках отмечалось отслоение кариолеммы.

На 21 сутки в пинеалоцитах под воздействием лазерного излучения увеличивался объем ядер, которые приобретали равномерную мелко гранулярную структуру и содержали плотные крупные ядрышки.

Оптическая плотность экспрессии мелатонин- и серотонин позитивных клеток составила соответственно $0,36 \pm 0,03$ у.е. и $0,16 \pm 0,02$ у.е.

В нейроглиальных клетках плотность цитоплазмы возрастала, в ней находилось большое число рибосом, липидные капли, иногда встречались миелиновые фигуры.

Надпочечники. На 14 сутки после начала облучения отмечалась мозаичность рисунка, некоторая гиперплазия клеток, преимущественно пучковой зоны, дистрофические изменения в цитоплазме. На 21 сутки визуальная картина не отличалась от контрольной. После воздействия лазерного излучения у животных не отмечалось выраженных структурных особенностей по сравнению с контролем.

В группе облученных животных через 14 суток от начала облучения пролиферация по маркеру Ki-67 несколько снижалась по сравнению с контрольной группой и составила 5,6%.

В последующем на 21 сутки характер реакции изменяется и пролиферативный индекс возрастал до 7,1%, что достоверно несколько превышало данный показатель в контрольной группе соответствующего срока.

Объемная доля норадреналин-содержащих клеток у животных, получавших лазерное излучение, была ниже, чем в контроле, и составила $0,091 \pm 0,011$ у.е. и $0,068 \pm 0,008$ у.е.

Тимус. При визуальном исследовании препаратов вилочковой железы животных, подвергшихся действию лазерного излучения, выявлялась сохранность гистоархитектоники органа. При этом отмечалось некоторое полнокровие сосудов. В мозговом веществе было незначительно повышено содержание лимфоцитов.

На 14 сутки отмечалось некоторое усиление интенсивности реакции Ki-67 вдоль септальных перегородок. Других отличий между экспериментальными и контрольными группами при микроскопическом исследовании выявить не удалось. Количественный анализ поведения тучных клеток показал, что их объемная плотность у облученных животных достоверно возрастала по отношению к контролю.

У облученных животных среди наиболее выраженных изменений в тимусе были отмечены следующие: отслоение участков наружной ядерной мембраны, набухание матрикса митохондрий с лизисом крист, нарушение тесных контактов между отдельными тимоцитами.

На 21 день после начала эксперимента у облученных животных в корковом веществе долек тимуса не наблюдалось выраженных морфологических изменений. Тимоциты имели очень узкий ободок цитоплазмы, в которой находилось ограниченное число рибосом и митохондрий. Среди делящихся тимоцитов не было отмечено появления клеток с патологически протекающими митозами.

Селезенка. У животных, получавших лазерное излучение, выраженных особенностей по сравнению с контролем не отмечалось.

Кроме того, гистологическая структура клеток селезенки полностью сохранялась, тогда как при действии гамма-квантов происходило их разрушение. Ki-67 позитивные ядра пролиферирующих клеток выявлялись в очагах экстрамедулярного кроветворения и лимфоидных фолликулах.

У животных, получавших лазерное излучение, динамика показателей объемной плотности Ki-67 положительных клеток в экстрамедулярных отделах достоверно возрастала по отношению к контролю. Применение лазерного излучения приводило к увеличению пролиферативной активности по объемной плотности экспрессии Ki-67 до $0,154 \pm 0,006$ у.е.

Желудочно-кишечный тракт. При лазерном старении в желудке выявлялись мелкие эрозии и зоны фибриноидного некроза.

Общее количество апудоцитов, окрашивающихся по методу Гримелиуса было выше, чем в контроле и составляло $117,5 \pm 4,1$ на $0,1 \text{ мм}^2$ слизистой оболочки. Со стороны всех типов апудоцитов, кроме D-клеток отмечалась гиперплазия, особенно возрастало количество G- и EC - серотонин-содержащих клеток.

Численность апудоцитов составляла $84,7 \pm 2,7$ на $0,1 \text{ мм}^2$. EC_1 -клетки сохраняли иммунореактивность к серотонину и мелатонину. Их среднее количество возрастало и составило $35,3 \pm 4,1$ на $0,1 \text{ мм}^2$.

Среднее количество EC_2 -клеток, дающих положительную реакцию с антителами к мотилину и субстанции P при облучении лазером было уменьшено и составило $4,2 \pm 0,2$ на $0,1 \text{ мм}^2$.

Количество DL-клеток, дающих положительную реакцию с антителами к соматостатину при облучении снижалось и составило $3,2 \pm 0,2$ на $0,1 \text{ мм}^2$.

Среднее количество N-клеток, вступающих в положительную иммуногистохимическую реакцию с антителами к нейротензину почти наполовину снижалось и составило $3,7 \pm 0,3$ на $0,1 \text{ мм}^2$.

Среднее количество Calg-клеток при облучении наполовину уменьшилось и составило $18,7 \pm 3,1$ на $0,1 \text{ мм}^2$. Численность клеток, дающих положительную реакцию с антителами к эндотелину-1 почти в 2 раза превысила количество Calg-клеток. Среднее количество End_1 -клеток при облучении составило $40,1 \pm 4,3$ на $0,1 \text{ мм}^2$.

При лазерном старении в большинстве случаев в кишечнике развивался неспецифический воспалительный рецидивирующий процесс.

Общее количество апудоцитов при иммуноцитохимической реакции на хромогранин A составило $33,5 \pm 3,6$ на 1 мм^2 слизистой оболочки. При анализе поведения отдельных типов эндокринных клеток было установлено, что количество их менялось неодинаково. Так, число аргентафинных EC -клеток, окрашенных по методу Массона ($7,4 \pm 0,6$ на 1 мм^2 слизистой оболочки), увеличивалось по сравнению с контролем.

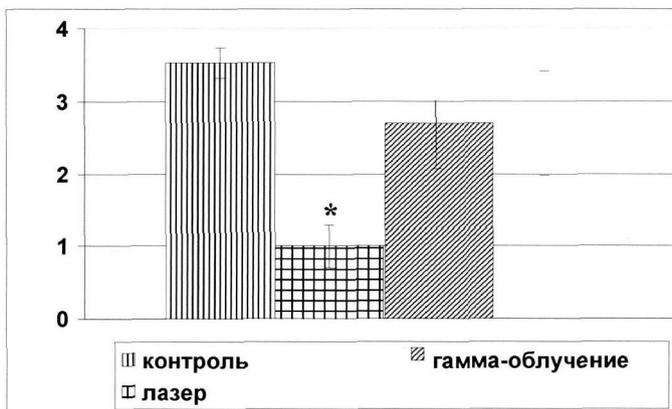


Рис. 1. Площадь экспрессии мелатонина в слизистой оболочке кишечника при радиационном и лазерном воздействии.

* - $p < 0,05$ по сравнению с контролем (без облучения).

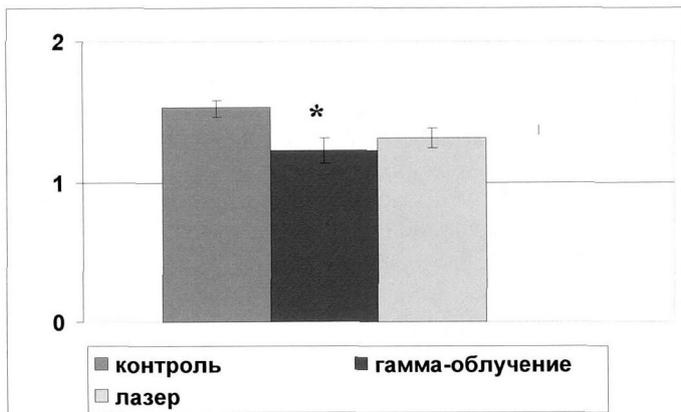


Рис. 2. Оптическая плотность экспрессии мелатонина в слизистой оболочке кишечника при радиационном и лазерном воздействии.
* - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Площадь экспрессии мелатонин-иммунопозитивных клеток была более чем в 2 раза выше при лазерном излучении по сравнению контролем (рис. 1, 2). Оптическая плотность экспрессии мелатонина при лазерном старении так же была несколько выше по сравнению с группой контроля.

При оценке свободнорадикальных процессов в слизистой оболочке кишечника при лазерном старении площадь экспрессии NO-синтазы составила $2,19 \pm 0,07\%$. Оптическая плотность экспрессии NO-синтазы составила $1,55 \pm 0,04$ у.е.

Таблица 5

Экспрессия маркеров Ki-67 и p53 в эпителиоцитах кишечника при лазерном старении

ИГХ маркер	Ki-67		p53	
	Площадь экспрессии	Оптическая плотность	Площадь экспрессии	Оптическая плотность
контроль	$2,45 \pm 0,23$	$1,39 \pm 0,09$	$2,25 \pm 0,14$	$1,26 \pm 0,18$
лазерное старение	$2,27 \pm 0,14$	$1,27 \pm 0,34$	$2,78 \pm 0,29^*$	$1,97 \pm 0,21^*$

Показатели клеточного обновления эпителиоцитов при лазерном воздействии демонстрировали достаточно высокую активность как пролиферации, так и апоптоза. (табл. 5). Полученные данные отражают сохранение способности эпителиоцитов к регенераторным процессам при

лазерном старении, однако свидетельствуют о том, что данный тип старения характеризуется достоверным повышением уровня апоптоза.

Исследование экспрессии различных сигнальных молекул при лазерном старении показало усиление процессов апоптоза их возможное преобладание над пролиферативной активностью клеток. Кроме того, следует отметить, что при лазерном старении снижалась экспрессия гормона мелатонина, что может служить важным показателем в дисфункции нейроэндокринной функции эпителиоцитов кишечника на начальных этапах старения организма.

Геропротекторное действие мелатонина и серотонина при лазерном старении

1 группа – интактные животные

У интактных животных все морфо-функциональные характеристики органов нейроиммуноэндокринной системы сохранились в пределах физиологической нормы.

2 группа - 3 суток после окончания введения физраствора

Животным 2 группы после курса лазерного облучения проводили введение физиологического раствора, после чего на 3 сутки изучали морфо-функциональные особенности органов нейроиммуноэндокринной системы.

Желудок. При светооптическом исследовании желудка крыс 2 группы изменений гистологического рисунка пилорического и фундального отделов желудка на препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином, обнаружено не было.

В то же время, количественный анализ позволил выявить значительные изменения в поведении апудоцитов желудка по сравнению с интактными крысами. Так, количественная плотность энтероэндокринных клеток в 1 мм^2 в пилорическом и фундальном отделах возрастала более чем на 50%, достоверно отличаясь от контроля.

Аналогичные изменения были обнаружены и при морфометрии серотонин-иммунопозитивных клеток пилорического отдела желудка, где после лазерного облучения данный показатель возрастал до 32 ± 3 клеток на 1 мм^2 , что на 28% выше, чем у интактных животных.

Поджелудочная железа. Результаты изучения поджелудочной железы животных 2 группы показали, что ее гистоархитектоника в целом сохранялась. Количественный анализ микроскопических изображений не выявил существенных отличий от 1 группы.

Объемная доля А-клеток составила 12,2%, а их оптическая плотность - 0,111 усл. ед. При анализе соматостатин-содержащих D-клеток установлено некоторое увеличение их объемной доли (на 16% по отношению к контролю), величина которой составила 5,2%, однако

оптическая плотность их при этом практически не отличалась от показателей в 1 группе.

Сосуды. Во 2 группе со стороны капилляров отмечался очаговый стаз крови, просвет некоторых капилляров полностью занят эритроцитами, эндотелиальные клетки в состоянии локального отека, в некоторых эндотелиоцитах отмечались дистрофические изменения, количество пиноцитозных пузырьков в них уменьшалось. Количество перицитарных клеток, лежащих вдоль капилляров было значительно снижено, цитоплазма просветлена, а цитоплазматические отростки либо укорочены, либо вообще не визуализировались.

Щитовидная железа. У животных 2 группы щитовидная железа в основном сохраняла свои структурные особенности. Вместе с тем, количество коллоида в фолликулах уменьшалась, а митотическая активность в фолликулярном эпителии усиливалась. Количество С-клеток по сравнению с 1 группой возрастало на 24% и составило 3012 ± 172 на 1 мм^2 .

Селезенка. Наиболее существенные изменения у крыс 2 группы визуализировались со стороны белой пульпы селезенки. Увеличивались размеры лимфоидных фолликулов и их герминативных зон. В реактивных зонах отмечалось достоверное увеличение количественной плотности митозов и апоптозных тел. Увеличение I_{Ma} до 0,97 у.е. свидетельствовало о сдвиге динамического равновесия в сторону гиперплазии лимфоидных элементов. По данным количественного анализа достоверно снижалась объемная и количественная плотность содержания Ig-позитивных клеток.

3 группа -12 суток после окончания введения физраствора

Животным 3 группы после лазерного облучения проводили введение физиологического раствора, после чего на 12 сутки изучали морфо-функциональные особенности органов нейроиммуноэндокринной системы.

Желудок. В желудке крыс 3 группы количественный анализ показал существенные отличия от 1 группы, которые заключались в снижении количественной плотности энтероэндокринных клеток в обоих исследуемых отделах. Так, в пилорическом отделе данный показатель достоверно отличался от контроля и составил 74%.

При сопоставлении количества апудоцитов на 1 мм^2 во 2 и 3 группах отмечается их значительное сокращение (30 ± 1 и 15 ± 1 на 1 мм^2 , соответственно). Подобные изменения этого параметра выявлены и в фундальном отделе, где количество апудоцитов во 2 группе составило 76 ± 1 на 1 мм^2 , а в 3 группе их количественная плотность снижалась до 41 ± 4 на 1 мм^2 .

Аналогичная динамика была выявлена и при анализе поведения серотонин-продуцирующих клеток, число которых во 2 группе составило 76% от значения в контрольной группе. В 3 группе также обнаруживалось

снижение числа серотонин-положительных клеток по сравнению со 2 группой.

Поджелудочная железа. В поджелудочной железе в 3 группе объемная доля глюкагон-содержащих А-клеток сохранялась на уровне контрольных показателей. Такие же результаты были получены и при анализе оптической плотности А-клеток. Объемная доля соматостатин-содержащих D-клеток в 3 группе увеличивалась по сравнению с контрольными значениями на 20%, в то время как их оптическая плотность практически не отличалась от контроля.

Сосуды. В 3 группе капилляры имели обычное строение, практически не отличающееся от контроля. Просвет их был свободен от стазированных эритроцитов, отек и дистрофические изменения эндотелиальных клеток исчезали, однако количество перicyтов становилось еще меньше чем во 2 группе, а в большинстве участков они вообще не обнаруживались.

Щитовидная железа. Количественная плотность С-клеток через 1,5 месяца после лазерного облучения возрастает более чем на 50% по отношению к контролю, достигая 3668 ± 158 клеток на 1 мм^2 .

Селезенка. В 3 группе отмечалось разрастание лимфоидной ткани. Периартериальные муфты и отдельные фолликулы сливались и образовывали разветвленные тяжи. $S_{\text{фол}}$ и $S_{\text{рц}}$ увеличивались относительно контроля почти в 2 раза. В центрах размножения идентифицировались многочисленные лимфобласты; количественная плотность митозов достигала 200 на 1 мм^2 , а $I_{\text{а/м}} - 1,3$ у.е..

Маргинальные зоны выглядели более рыхлыми, в основном, за счет снижения содержания лимфоцитов. Отмечалась тенденция к снижению количественной плотности Ki-67-позитивных клеток в зонах миелоидного кроветворения. Содержание идентифицируемых Ig-позитивных клеток было снижено относительно контроля, но оставалось на уровне количественных данных для животных 2 группы.

4 группа - 3 суток после окончания введения мелатонина

Животным 4 группы сразу после лазерного облучения проводили введение мелатонина, после чего на 3 сутки изучали морфо-функциональные особенности органов нейроиммуноэндокринной системы.

Желудок. В желудке крыс, которым вводили мелатонин, исследуемые параметры имеют существенные особенности. Количественная плотность апудоцитов в пилорическом отделе желудка составила 21 ± 1 на 1 мм^2 , и в отличие от животных 2 группы, фактически не отличалась от показателей у интактных животных. Аналогичные результаты получены при анализе количественной плотности серотонин-продуцирующих ЕС-клеток. Сопоставляя показатели животных 2 и 4 групп (получавших физиологический раствор и мелатонин, соответственно), обращает внимание стабилизирующее действие мелатонина на последствия лазерного облучения. В фундальном отделе отмечались

подобные, но менее выраженные изменения. Достоверные различия между 2 и 4 группой (76 ± 1 и 64 ± 5 апудоцитов) на 1 мм^2 сохранялись и в этом отделе желудка.

Поджелудочная железа. У животных, получавших мелатонин, в поджелудочной железе существенных особенностей не выявляется. Колебания показателей количества и оптической плотности глюкагон-содержащих А-клеток находятся в пределах контрольных значений. Подобные результаты зарегистрированы и при анализе поведения соматостатин-содержащих D-клеток. Со стороны микроциркуляторного русла поджелудочной железы электронно-микроскопическая картина практически не отличалась от нормы.

Щитовидная железа. Содержание С-клеток в щитовидной железе животных, получавших мелатонин, также имеет особенности, которые сводятся к достоверному сокращению их числа по отношению к контролю на 35%.

Селезенка. При введении мелатонина на препаратах, окрашенных гематоксилином-эозином, наблюдалась нормализация гистоархитектоники белой пульпы. Отмечалась тенденция к нормализации индекса соответствия митотической активности и апоптозной гибели.

5 группа - 12 суток после окончания введения мелатонина

Животным 5 группы сразу после лазерного облучения проводили введение мелатонина, после чего на 12 сутки изучали морфо-функциональные особенности органов нейроиммуноэндокринной системы.

Желудок. В 5 группе при введении мелатонина в желудке выявляются особенности реакции исследуемых показателей при сравнении их с результатами, полученными при анализе животных 3 группы.

Так, в пилорическом отделе количественная плотность апудоцитов, в отличие от 3 группы, колебалась в пределах контрольных значений. Аналогичная картина наблюдалась и при исследовании серотонин-продуцирующих ЕС-клеток.

Таким образом, у животных, получавших мелатонин (4 и 5 группы), количественная плотность апудоцитов не отличалась от контроля. Сходные результаты получены и при изучении фундального отдела желудка.

Поджелудочная железа. В поджелудочной железе в 5 группе отмечалась тенденция к увеличению объемной доли глюкагон-содержащих А-клеток в пределах 20%. Еще большие изменения выявлены при анализе объемной доли соматостатин-содержащих D-клеток, где этот показатель увеличивался более чем на 40% по отношению к контролю. Оптическая плотность интенсивности окраски при обеих иммуногистохимических реакциях колебалась в пределах контрольных значений.

Сосуды. Изменений в структурно-функциональной организации капилляров и других сосудов микроциркуляторного русла в 4 и 5 группах

не отмечается, электронно-микроскопическое строение капилляров практически совпадает с описанием 1 группы.

Щитовидная железа. Содержание С-клеток в щитовидной железе в 5 группе полностью нормализовывалось и практически не отличается от контроля, составляя 2346 ± 162 на 1 мм^2 . Количественная плотность С-клеток на данном этапе значительно отличалась от результатов, полученных в 3 группе, где этот показатель составлял 3668 ± 158 на 1 мм^2 , т.е. более чем на 50% превышает контрольные значения.

Селезенка. В селезенке в 5 группе гистологически выраженные изменения определялись в маргинальных зонах и красной пульпе. Перифолликулярные кольца были сужены, часто выглядели размытыми, в отдельных участках сохранился лишь ретикулярный остов.

6 группа - 3 суток после окончания введения серотонина

Животным 6 группы после курса лазерного облучения проводили введение серотонина, после чего на 3 сутки изучали морфо-функциональные особенности органов нейроиммуноэндокринной системы.

Желудок. В 6 группе в желудке определялось значительное снижение общего числа апудоцитов в пилорическом отделе, достигавшее 73% от контрольных значений. Сходная по направленности, но более выраженная динамика была установлена при изучении содержания серотонин-продуцирующих ЕС-клеток, составляя лишь 60% от контрольных показателей.

В фундальном отделе влияние серотонина у животных 6 группы проявлялось в нормализации количественного уровня серотонин-продуцирующих ЕС-клеток в отличие от 2 группы. Если сравнить полученные результаты с аналогичными показателями 2 группы, то при этом обнаруживаются достоверные отличия, что свидетельствует о модулирующем действии серотонина в этих условиях.

Поджелудочная железа. В 6 группе введение серотонина характеризовалось колебанием исследуемых параметров в пределах контрольных значений. Так объемная доля глюкагон-содержащих А-клеток составила $0,109 \pm 0,015$ у.е., а количество соматостатин-содержащих D-клеток – $0,054 \pm 0,011$ у.е.

Сосуды. Капилляры были расширены, стаза крови в них не отмечается, эндотелиальные клетки активно функционируют, о чем свидетельствует большое количество пинацитозных пузырьков в их цитоплазме, однако, отдельные участки эндотелия были умеренно отечны. Вдоль капилляров отмечалось скопление цепочек перицитов.

Щитовидная железа. В 6 группе отмечено снижение количественной плотности С-клеток относительно контроля. Кроме того сопоставление данного показателя с его динамикой во 2 группе показало разнонаправленный тип реакции. Если во 2 группе количество С-клеток

превышало контрольный уровень на 24%, то в 6 группе, наоборот, этот показатель был на 26 % ниже контрольных значений.

Селезенка. Гистологическая структура селезенки и большинство количественных параметров на эти сроки эксперимента практически соответствуют показателям для животных 4 группы. Нормализовывались гистоархитектоника белой пульпы. Снижались размеры лимфатических фолликулов и их герминативных центров, относительно нормализовывалась митотическая активность лимфоидных клеток.

7 группа - 12 суток после окончания введения серотонина

Животным 7 группы сразу после лазерного облучения проводили введение серотонина, после чего на 12 сутки изучали морфофункциональные особенности органов нейроиммуноэндокринной системы.

Желудок. В 7 группе общее количество апудоцитов в пилорическом и фундальном отделах соответствовало контрольным значениям. В то же время количество серотонин-продуцирующих ЕС-клеток было на 20% ниже, чем в контроле, но не отличалось от 3 группы, то есть по данному показателю серотонин не оказывал выраженного действия.

Поджелудочная железа. В поджелудочной железе у животных 7 группы эффект серотонина проявлялся в снижении объемной доли соматостатин-содержащих D-клеток по отношению к контролю и, особенно, по отношению к 3 группе. Объемная доля глюкагон-содержащих A-клеток сохранялась на контрольном уровне.

Сосуды. Со стороны капилляров отмечались ультраструктурные изменения, свидетельствующие об активном функционировании микроциркуляторного русла. Просвет капилляров был широким, эритроциты находились в свободном состоянии, что, наряду с отчетливым обнаружением органелл в цитоплазме эндотелиоцитов свидетельствовало об активном функционировании микроциркуляторного звена. Крупные перициты также отчетливо выявлялись вдоль стенки капилляров.

Щитовидная железа. Влияние серотонина в 7 группе ярко проявляется в щитовидной железе, где количество C-клеток на данном этапе эксперимента сохраняется на уровне контрольных значений и, следовательно, значительно ниже, чем в 3 группе (2627 ± 203 и 3668 ± 158 на 1 мм^2 соответственно).

Селезенка. Гистологическое строение и практически все изученные параметры в 7 группе находились в пределах варьирования количественных данных для животных 5 группы. Резко возрастала пролиферативная активность лимфоцитов по показателю Ki-67 в центрах размножения фолликулов. Отмечалась аналогичная тенденция к увеличению митотической активности лимфоцитов относительно 6 группы. Практически идентичные изменения регистрировались в маргинальных зонах и в красной пульпе по миелоидному кроветворению и снижению иммуногенеза.

Таким образом, серотонин оказывал стабилизирующее влияние на органный диффузной нейроиммуноэндокринной системы крыс при лазерном старении, во-многом сходное с действием мелатонина, но выраженное в меньшей степени и не на всех изученных сроках.

Влияние трипептида Lys-Glu-Asp на нейроиммуноэндокринные взаимоотношения в модели старения под действием лазерного излучения

Гипофиз. У крыс, получавших пептид Lys-Glu-Asp, при визуальной оценке не удастся выявить особенностей распределения ШИК положительного материала по сравнению с контрольными и облученными группами. Количественный анализ показал, что через 14 суток от начала облучения значение оптической плотности составляет $0,114 \pm 0,010$ у.е, а на 21-е сутки незначительно увеличивается по сравнению с предыдущим сроком и составляет $0,134 \pm 0,011$ у.е.

Пинеальная железа (эпифиз). У облученных животных, получавших пептид Lys-Glu-Asp, наиболее выраженные изменения наблюдаются со стороны глиальных клеток.

Цитоплазма остается очень плотной, в ней с трудом удается отдифференцировать ядро. Канальцы эндоплазматического ретикулума расширены, встречаются немногочисленные митохондрии с просветленным матриксом и лизированными кристами. В некоторых нейроглиальных клетках отмечается отслоение кариолеммы.

Эндотелий кровеносных сосудов уплотнен. В утолщенной, содержащей ядро части эндотелиальной клетки видны митохондрии с просветленным набухшим матриксом и лизированными кристами. Периваскулярные пространства резко отечны, базальная мембрана очень тонкая, разрыхленная. На 21-е сутки в пинеалоцитах под воздействием пептида Lys-Glu-Asp увеличивается объем ядер, которые приобретают равномерную мелкогранулярную структуру и содержат плотные крупные ядрышки. Кариолемма часто образует глубокие инвагинации. В цитоплазме увеличивается количество митохондрий разнообразной формы, с хорошо выраженными кристами, рибосом и полисом. Таким образом, изученный трипептид стимулирует репарационные процессы в эпифизе крыс при старении, индуцированном лазерным излучением.

Тимус. В лазерной модели ускоренного старения тимус животных, получавших пептид Lys-Glu-Asp, в основном сохраняет структурно-функциональную организацию. При этом складывается впечатление, что трипептид усиливает секрецию биологически активных веществ из тучных клеток и гормон-продуцирующих ретикуло-эпителиальных клеток. Так, на 14 сутки от начала эксперимента под действием трипептида после лазерного облучения наблюдалось увеличение объемной плотности тучных клеток, причем этот эффект сохранялся и на 21 сутки эксперимента (табл. 7).

Электронно-микроскопическое исследование вилочковой железы животных после лазерного облучения и введения трипептида показало, что корковое вещество долек представлено скоплениями клеток, которые имеют сходные морфологическую структуру и размеры. Они содержат крупные ядра с хроматином, конденсированным по периферии, с ядрышками крупного размера (одно-два), а также узкий ободок цитоплазмы с небольшим числом полирибосом и митохондрий.

Крупные тимоциты, встречающиеся среди этих клеток, содержат ободок цитоплазмы большей ширины, содержащий значительное число митохондрий (активированные лимфоциты). Обнаруживаются также макрофаги, в цитоплазме которых находятся многочисленные первичные и вторичные лизосомы, фагосомы. Отмечается неодинаковая степень нагруженности фагоцитированным материалом. Контуры ядер эндотелиоцитов ровные, в цитоплазме заметны каналцы эндоплазматической сети, малое число небольших митохондрий и пиноцитозные везикулы. Как правило, в просвете сосудов заметны отдельные эритроциты.

Таблица 7

Объемная плотность мастоцитов (тучных клеток) в тимусе крыс в лазерной модели ускоренного старения при действии пептида Lys-Glu-Asp

Группа животных	Объемная плотность мастоцитов
контроль (14 сут)	0,0058±0,0004
лазер (14 сут)	0,0057±0,0007
лазер+трипептид (14 сут)	0,0080±0,0005*
контроль (21 сут)	0,0045±0,0002
лазер (21 сут)	0,0069±0,0007*
лазер+трипептид (21 сут)	0,0059±0,0003*

* $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем

Таким образом, установлено, что трипептид Lys-Glu-Asp способствует ускоренному восстановлению изменений, индуцированных лазерным излучением, способствуя усилению функциональной активности мастоцитов, нормализации состояния эндотелия капилляров, восстановлению мембранных и внутриклеточных структур тимоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Моделирование инволюционных изменений (сходных с таковыми при естественном старении) при действии гамма-излучения в первую очередь связано с нарушением целостности ДНК делящихся клеток и их

гибелью, что отражает необратимые изменения в различных органах под действием ионизирующего излучения.

Низкоинтенсивное лазерное излучение, в отличие от гамма-излучения, не оказывает воздействие на ДНК, а только на ферментную систему клетки, чем, вероятно, объясняется обратимость вызываемых им эффектов.

Таким образом, сравнительный анализ действия ионизирующего излучения и низкоинтенсивного лазерного излучения на органном, клеточном и молекулярном уровне открывает перспективы применения лазерного облучения для создания модели ускоренного старения различных органов.

Установлено, что в модели радиационного старения под действием гамма-излучения в большинстве органов диффузной нейроиммуноэндокринной системы наблюдаются выраженные морфо-функциональные изменения. Так, в эпифизе происходит деструкция пинеалоцитов, снижение синтеза мелатонина в них, тогда как лазерное облучение пинеальной железы затрагивает лишь глиальные клетки и эндотелий капилляров, причем эти изменения обратимы.

При оценке влияния гамма-излучения на надпочечники было показано, что в них на 14 сутки происходит снижение пролиферативной активности клеток, наблюдается деструкция отдельных клеточных органелл и уменьшение плотности ядер по показателю AgNOR, снижение численности норадреналин-содержащих клеток, однако к 21 суткам происходит восстановление функциональной активности клеток. При воздействии лазерного излучения на 14 сутки структура и функциональная активность клеток надпочечников сохраняется, отмечается незначительное снижение норадреналин-содержащих клеток.

Под действием гамма-квантов наиболее выраженные признаки ускоренного старения наблюдаются в тимусе и селезенке: выраженный отек цитоплазмы эндотелиоцитов капилляров, нарушение межклеточных контактов.

В противоположность гамма-излучению, воздействие когерентного лазерного света не вызывало значительного разрушения клеток иммунокомпетентных органов (за исключением сосудистого звена и контактов между тимоцитами) и способствовало увеличению их пролиферативной активности на 14 сутки, однако к 21 суткам этот показатель возвращался к контрольному значению.

Кроме того, в тимусе под действием лазерного излучения отмечалось увеличение функциональной активности ретикуло-эпителиальных и тучных клеток.

В желудке и кишечнике под действием гамма-излучения отмечался отек собственного слоя слизистой оболочки, инфильтрация лимфоцитами, лейкоцитами и плазматическими клетками. Наблюдалась гиперплазия бокаловидных клеток и снижение продукции мелатонина в эпителиоцитах.

Показатели клеточного обновления эпителиоцитов при радиационном старении демонстрировали преобладание процессов апоптоза над пролиферацией клеток, что отражает усиление гибели клеток. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, гамма-излучение индуцирует выраженные морфо-функциональные изменения слизистой оболочки желудка и кишечника.

Следует отметить, что при лазерном старении экспрессия гормона мелатонина снижалась меньше, чем при воздействии гамма-излучения.

Таким образом, изучение структурно-метаболических особенностей эндокринной и иммунной систем после лазерного облучения показало, что лазерное излучение способно моделировать процессы старения и лазерное излучение наряду с гамма-квантами можно рассматривать как новую модель искусственного старения.

Результаты проведенных исследований функциональной морфологии диффузной нейроиммуноэндокринной системы и иммунной системы крыс при лазерном старении в условиях действия мелатонина и серотонина демонстрируют модулирующее влияние двух гормонов на тканевую и клеточный гомеостаз.

Установлено, что введение мелатонина и серотонина оказывает компенсаторный эффект на структурно-функциональную организацию клеток диффузной нейроиммуноэндокринной системы животных, подвергнутых лазерному облучению.

Сравнение эффектов влияния двух гормонов на тканевую гомеостаз позволяет утверждать, что более ярко выраженным действием обладает мелатонин. Его действие проявляется через 3 суток после окончания введения значительным нивелированием эффекта лазерного облучения и сохраняется через 12 суток.

Влияние серотонина менее выражено, при этом либо создается впечатление отсроченного эффекта, либо оно полностью отсутствует через 3 суток после окончания введения препарата. Полученные данные позволяют считать, что основной точкой приложения действия мелатонина и серотонина являются ЕС-клетки желудка, в которых под влиянием обоих гормонов (особенно мелатонина) усиливается экстрапинеальный синтез серотонина и мелатонина, что полностью компенсирует дефицит этих гормонов при гипоплазии эпифиза при старении.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о важности дальнейшего изучения механизмов действия гормональных геропротекторов на клеточный и тканевую гомеостаз в модели старения, индуцированного лазерным излучением, что позволит оптимизировать их применение при коррекции различных функциональных нарушений и лечении возраст-ассоциированных заболеваний.

Исследование по оценке возможного геропротекторного эффекта трипептида Lys-Glu-Asp в модели лазерного старения показали, что под воздействием пептида Lys-Glu-Asp в пинеалоцитах увеличивается объем ядер, которые приобретают равномерную мелкогранулярную структуру и

содержат плотные крупные ядрышки. В цитоплазме клеток увеличивается количество митохондрий.

Следовательно, трипептид стимулирует репарационные процессы в эпифизе крыс при старении, индуцированном лазерным излучением. Кроме того, показано, что трипептид Lys-Glu-Asp способствует ускоренному восстановлению тимуса, облученного светом лазера, способствуя усилению функциональной активности мастоцитов, нормализации состояния эндотелия капилляров, восстановлению мембранных и внутриклеточных структур тимоцитов.

Таким образом, анализ полученных результатов свидетельствует, что лазерное излучение оказывает менее выраженное деструктивное воздействие на наиболее радиочувствительные органы (тимус, селезенка, желудочно-кишечный тракт, эпифиз), что впервые позволило обосновать преимущества данной модели ускоренного старения в сравнении с гамма-излучением.

Важными являются данные об обратимости влияния лазерного излучения на органы нейроиммуноэндокринной системы, что позволяет оценивать эффект геропротекторных средств в модели лазерного старения органов.

Эффективность лазерной модели ускоренного старения для изучения активности предполагаемых геропротекторов подтверждается данными о пострadiационном восстановлении органов нейроиммуноэндокринной системы под действием мелатонина и трипептида Lys-Glu-Asp.

ВЫВОДЫ

1. Лазерное излучение вызывает инволютивные изменения в основных органах и системах организма, что позволяет рассматривать его в качестве модели радиационного старения.
2. В сравнении с молекулярно-клеточными признаками старения, индуцированного гамма-излучением, лазерное излучение оказывает менее выраженное деструктивное воздействие на клетки эпифиза, тимуса, селезенки, желудка и кишечника. Старение тканей, индуцированное лазерным излучением, носит обратимый характер, последствия которого нивелируются при прекращении лазерного облучения.
3. Модель радиационного старения, индуцированного лазерным излучением, более адекватна естественному процессу, поскольку в эпифизе, тимусе, селезенке и желудочно-кишечном тракте лазерное излучение вызывает обратимые изменения ультраструктуры клеток. При этом гамма-излучение индуцирует необратимую деструкцию клеток в органах нейроиммуноэндокринной системы.

4. Трипептид Lys-Glu-Asp и мелатонин обладают репарационными свойствами в отношении центральных органов нейроиммуэндокринной системы, подвергнутых ускоренному старению, индуцированному лазерным излучением.
5. Модель старения, индуцированного лазерным излучением, является более приближенной к естественному старению.
6. Разработка новой модели ускоренного старения, вызываемого лазерным облучением, открывает новые перспективы в изучении механизмов естественного старения и создания эффективных геропротекторных препаратов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Модель ускоренного старения, индуцированного лазерным излучением, рекомендуется для изучения фундаментальных аспектов молекулярно-клеточных процессов старения различных тканей и органов и апробации геропротекторных свойств биологически активных веществ различного происхождения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в Перечень ВАК Минобрнауки РФ

1. Влияние геропротекторных пептидов на экспрессию внутриядерных белков, регулирующих синтез рибосом в культуре опухолевых клеток /Левдик Н.В., Князькин И.В., Севостьянова Н.Н., Линькова Н.С. // Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация. – 2010. - Вып. 12/1. - № 22 (93). – С. 49-52.
2. Влияние пептидов эпифиза на функции тимуса при его старении /Линькова Н.С., Полякова В.О., Трофимов А.В., Севостьянова Н.Н., Кветной И.М. //Успехи геронтол.-2010.- Т. 23, N 4. - С. 543-546.
3. Возрастные изменения экспрессии факторов клеточного обновления в пейеровых бляшках кишечника / Грабежев Л.А., Севостьянова Н.Н., Колмаков А.Н., Коновалов С.С., Полякова В.О., Кветной И.М.// Бюлл. экспер. биол. мед., 2011, Т.150, №4, с. 465-467.
4. Нейроэндокринный и пролиферативный потенциал клеток кишечника человека при старении /Трофимов А.В., Севостьянова Н.Н., Линькова Н.С., Колмаков А.Н., Полякова В.О. // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2010. – Т. 150. - № 12. – С. 682-685
5. Особенности эпифизарно-тимических взаимоотношений при старении /Линькова Н.С., Полякова В.О., Кветной И.М., Трофимов А.В., Севостьянова Н.Н. // Успехи геронтологии. - 2011. - Т. 24, № 1. - С.38-42.
6. Пептидная регуляция репаративных процессов в органах иммунной системы при ускоренном старении /Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Кветной И.М., Полякова В.О., Трофимов А.В., Севостьянова Н.Н., Абдулрагимов Р.И. // Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация. – 2010. – Вып. 12/1. - № 22 (93). – С. 57-61.
7. Репаративное действие пептида везугена на структуру двенадцатиперстной кишки в модели ускоренного старения /Рыжак Г.А., Севостьянова Н.Н., Кветная Т.В., Трофимов А.В., Линькова Н.С., Гусельникова Е.А., Грабежев Л.А., Коновалов С.С. // Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация. – 2010. - Вып. 12/1. - № 22 (93). – С. 53-56.
8. Индуцированное старение тимуса: радиационная модель и перспективы применения низкоинтенсивного лазерного излучения /Севостьянова Н.Н., Трофимов А.В., Линькова Н.С., Полякова В.О., Кветной И.М. // Успехи геронтол. - 2010. - Т. 23, N 4. С.547-553.
9. Возрастная динамика процессов пролиферации и апоптоза кишечного эпителия. Севостьянова Н.Н. Полякова В.О., Абдулрагимов Р.И., Кветной И.М. // Вестник МАНЭБ, 2010. Т.15, №3. –2010. – С. 86-92.
10. Иммуномодулирующее действие вилона и его аналога в культурах клеток тимуса человека и животных /Севостьянова Н.Н., Линькова Н.С., Полякова В.О., Червякова Н.А., Костылев А.В., Дурнова А.О., Кветной И.М., Абдулрагимов Р.И., Хавинсон В.Х.// Клеточные технологии в

биологии и медицине. – 2012. - №4. – С. 220-223.

11. Клиническая нейроиммуноэндокринология язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки в пожилом возрасте /Ильницкий А.Н., Прошаев К.И., Кветной И.М., Кветная Т.В., Жернакова Н.И., Севостьянова Н.Н., Медведев Д.С., Пожарскис А. // ARS MEDICA. – 2010. - №2 (22). – С. 15-22.
12. Молекулярно-клеточная характеристика буккального эпителия: оптимизация диагностики социально-значимых заболеваний / Пальцев М.А., Кветной И.М., Полякова В.О., Коновалов С.С., Линькова Н.С., Севостьянова Н.Н., Литвякова О.М., Дурнова А.О., Толибова Г.Х. // Молекулярная медицина. 2012. № 4. С. 18-23.
13. Роль сигнальных молекул в старении эпифиза и тимуса человека /Линькова Н.С., Полякова В.О., Кветная Т.В., Катанугина А.С., Костылев А.В., Абдулрагимов Р.И., Севостьянова Н.Н.// Молекулярная медицина. – 2012. - №5. – С. 41-44.
14. Севостьянова Н.Н. Морфо-функциональные особенности эпителиоцитов кишечника в норме и при патологии у людей различного возраста// Успехи геронтологии – 2013 – Т.26 - №3 – С. 456-459.
15. Севостьянова Н.Н. Перспективы применения гамма-излучения для оценки молекулярного старения тимуса и эффективности иммунопротекторных веществ// Молекулярная медицина – 2013 - №4 – С. 18-23..
16. Функциональная морфология клеточного обновления в щитовидной железе при старении. Севостьянова Н.Н., Полякова В.О., Абдулрагимов Р.И. // Вестник МАНЭБ, 2010. Т.15, №3. –, 2010. – С. 92-98.
17. Тетрапептид стимулирует функциональную активность клеток поджелудочной железы при старении / Хавинсон В.Х., Севостьянова Н.Н., Дурнова А.О., Линькова Н.С., Тарновская С.И., Дудков А.В., Кветная Т.В.// Успехи геронтологии. – 2012. – Т.25, №4. – С. 680-684.

Статьи в других изданиях

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

Методические рекомендации

19. Андреева Л.В., Марьяновская Ю.В., Севостьянова Н.Н. Биохимия. Индивидуальный практикум. Части I и II. Для студентов специальностей 060101 – «Лечебное дело», 060105 – «Стоматология», .060108 - «Фармация». - В.Новгород, ИПЦ НовГУ им. Я. Мудрого, 2011. - 125 с.

Тезисы докладов

20. Безручко Ю.А. Возрастные изменения экспрессии протеина Ki-67 в кишечнике человека / Безручко Ю.А., Севостьянова Н.Н. // Тезисы докладов XVII научной конференции преподавателей, аспирантов и студентов НовГУ. Великий Новгород, 2010. – С.49-50.

21. Влияние магнитолазерной терапии на рост живой массы слабых при рождении цыплят-бройлеров / Севостьянова Н.Н., Вязиенен Г.Н., Евстигнеев А.Р. // Современные возможности лазерной терапии. – Материалы XIV научно-практической конференции. – Великий Новгород, Калуга, 2004. – С. 207 – 209. Везуген как геропротектор активирующий пролиферацию и дифференцировку лимфоцитов / Трофимов А.В., Полякова В.О., Линькова Н.С., Севостьянова Н.Н.; Абдулрагимов Р.И. // Матер. XV Международной научно-практической конференции «Пожилой больной. Качество жизни» - М., 2010. – С. 84.
22. Исследование пролиферативной активности клеток кишечника человека при старении / Трофимов А.В., Линькова Н.С., Колмаков А.Н., Севостьянова Н.Н., Полякова В.О. // Матер. Всероссийской научно-практической конференции «Терапевтические проблемы пожилого человека». – С.-Петербург, 2010. – С. 397.
23. Нейроиммуноэндокринные механизмы старения / Абдулрагимов Р.И., Севостьянова Н.Н., Хейфец О.В., Дурнова А.О., Линькова Н.С., Полякова В.О. // Матер. Международной конференции «Геронтологические чтения – 2010». – Белгород, 2010. – С. 24.
24. Молекулярные аспекты ускоренного старения пинеальной железы / Севостьянова Н.Н., Линькова Н.С., Полякова В.О., Костылев А.В., Кветной И.М., Абдулрагимов Р.И. // Международная научно-практическая конференция «Ускоренное старение: механизмы, диагностика, профилактика». – 2012. - в журн. «Проблемы старения и долголетия», Киев, приложение, Т. 21. – С. 38-39.
25. Севостьянова Н.Н. Восстановление структуры клеток тимуса под действием везугена в модели радиационного старения / Севостьянова Н.Н., Трофимов А.В., Линькова Н.С., Коновалов С.С., Грабежев Л.А., Полякова В.О. // Матер. XV Международной научно-практической конференции «Пожилой больной. Качество жизни» - М., 2010. – С. 79.
26. Севостьянова Н.Н. Возрастная динамика экспрессии маркера дендритных клеток CD35 в пейеровых бляшках кишечника крыс при моделировании старения / Севостьянова Н.Н., Полякова В.О., Грабежев Л.А. // Материалы научно-практической конференции преподавателей и студентов Новгородского филиала СПбГУЭФ «Актуальные проблемы современной экономики России». – Великий Новгород. - 2010. – С. 205.
27. Фёдоров Д.В. Возрастная динамика экспрессии апоптоза в пейеровых бляшках кишечника человека / Фёдоров Д.В., Севостьянова Н.Н. // Тезисы докладов аспирантов, соискателей, студентов. Ч.2. XVII научная конференция преподавателей, аспирантов и студентов НовГУ. Великий Новгород, 2010. – С.48-49.
28. Экспрессия мелатонина в пинеальной железе и тимусе: мишень для таргетной терапии возраст-ассоциированной патологии. / Полякова В.О., Кветной И.М., Севостьянова Н.Н., Абдулрагимов Р.И., Коновалов С.С. // Сб. тез. XVII Российского национального конгресса «Человек и лекарство» – М., 2010. - С. 704-705.

Список цитируемой литературы

1. Сафарова Г.Л. Демография старения: современное состояние и приоритетные направления исследований // Успехи геронтологии. – 2009. – Т. 22, № 1. – С. 49-60; Пальцев М.А., Кветной И.М. Руководство по нейроиммуноэндокринологии. - М.: Медицина, 2006. – 384 с.; Пальцев М.А., Кветной И.М., Полякова В.О., Линькова Н.С., Каган О.Ф., Левдик Н.В. Факторы транскрипции как маркеры диагностики прогноза опухолевых заболеваний // Молекулярная медицина. – 2011. – № 4. – С. 19-23.; Хавинсон В.Х. Пептидная регуляция старения. - СПб.: Наука. - 2009. - 50 с.; Хавинсон В.Х., Баринов В.А., Арутюнян А.В., Малинин В.Г. Свободнорадикальное окисление и старение.- СПб.: Наука, 2003.- 327 с.; Хавинсон В.Х., Никольский И.С., Никольская В.В., Зубов Д.А., Галицкая С.Н., Тарануха Л.И., Семенова Я.-М.А., Лисица Н.А., Линькова Н.С., Бутенко Г.М. Влияние трипептидов на лимфоидные и стволовые клетки. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2011. - Т. 151, № 6. - С. 668-671; Хавинсон В.Х., Федореева Л.И., Ванюшин Б.Ф. Короткие пептиды моделируют действие эндонуклеаз из проростков пшеницы. // Доклады Академии наук. – 2011. – Т. 437, № 1. – С. 124-127; Anisimov V.N., Khavinson V.Kh. Peptide bioregulation of aging: results and prospects // Biogerontology. - 2010. - Vol. 11. - P. 139-149; Bosco N., Swee L.K., Benard A. et al. Auto-reconstitution of the T-cell compartment by radioresistant hematopoietic cells following lethal irradiation and bone marrow transplantation // Exp. Hematol. - 2010. - Vol. 38, N 3. - P. 222-232; Kvetnoy I.M., Yuzhakov V.V., Tsyb A. Diffuse neuroendocrine system: effects of non-lethal doses of ionizing radiation? (clinical and experimental aspects) // Pathol. Res. Pract. – 1995. – Vol. 191, N 7-8. – P. 705-706.

Севостьянова Н.Н. МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАДИАЦИОННОГО СТАРЕНИЯ // Автореф. дис. докт. биол. наук: 14.01.30 – СПб., 2013. – 38с.

Подписано в печать «10» июля 2013. Формат 60*84 1/16.

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

Тираж 100 экз. Заказ 111.

Отпечатано с готового оригинал-макета.

ЗАО «Принт - Экспресс»

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