

УДК 616.62: 616-053.9

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АКТИВАЦИИ ВАНИЛОИДНЫХ И ПУРИНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ УРОТЕЛИЯ У МУЖЧИН РАЗНОГО ВОЗРАСТА.

¹ Пранович А.А., ¹ Кветная Т.В., ² Селиванов А.Н.

¹ АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», Санкт-Петербург

² Санкт-Петербургское государственное учреждение здравоохранения «Городская клиническая больница № 31», Санкт-Петербург

В настоящее время по-прежнему актуальным остается вопрос поиска биологических маркеров патологического старения. Целью исследования явилось изучение биологических особенностей активации ванилоидных и пуринаргических рецепторов уротелия у мужчин разного возраста. Выявлено, в процессе нормального старения уровень активности ванилоидных и пуринаргических рецепторов уротелия остается стабильным и сохраняется вне зависимости от увеличения возраста на уровне 56,7-63,5% для ванилоидных рецепторов и 55,4-63,4% для пуринаргических рецепторов. При патологическом старении уrogenитального тракта происходит достоверное повышение активности ванилоидных и пуринаргических рецепторов уротелия до 146,5% в пожилом возрасте и до 169,9% в старческом возрасте. Таким образом, показатели активности ванилоидных и пуринаргических рецепторов могут служить биологическими маркерами патологического старения уrogenитального тракта на модели сочетания гиперфункции уротелия и системного атеросклероза. Выявление активности ванилоидных и пуринаргических рецепторов уротелия в качестве биологических маркеров для дифференциации процессов физиологического и патологического старения уrogenитального тракта может служить в качестве дополнительных критериев при формировании групп пациентов для проведения мероприятий по профилактике преждевременного старения.

Ключевые слова: преждевременное старение, биологические маркеры, патологическое старение, уротелий.

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS ACTIVATION VANILLOID AND PURINERGIC RECEPTOR UROTHELIA IN MEN OF DIFFERENT AGES

¹ Pranovich A.A., ¹ Kvetnaja T.V., ² Selivanov A.N.

¹ Autonomous nonprofit scientific organization of higher education research centre Saint Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, St. Petersburg

² Public health facilities «The City Clinical Hospital № 31», St. Petersburg

Currently, the issue of finding biological markers of pathological aging remains relevant. The aim of the study was to study the biological features of activation of vanilloid and purinergic urothelium receptors in men of different ages. Identified in the process of normal aging the level of activity vanilloid and purinergic receptor urothelia remains stable and persists regardless of the increasing age level of 56.7-63.5 per cent to vanilloid receptors and 55.4-63.4 per cent for purinergic receptors. With pathological aging of the urogenital tract, there is a significant increase in the activity of

vanilloid purinergic urothelium receptors up to 146.5% in old age and up to 169.9% in old age. Thus, the activity indicates of vanilloid and purinergic receptors can serve as biological markers of pathological aging of the urogenital tract on the model of combination of hyperfunction of urothelium and systemic atherosclerosis. Identifying activity vanilloid and purinergic receptor urothelia as biological markers for the differentiation of physiological and pathological processes of ageing of the urogenital tract may serve as additional criteria for the formation of groups of patients to conduct activities for the prevention of premature aging.

Keywords: premature aging, biological markers, pathological aging, urothelium, elderly age.

Введение. При анализе литературы нами было найдено минимальное количество работ по изучению биологических маркеров старения уrogenитального тракта, которые могут использоваться для выявления процессов патологического и преждевременного старения этой системы [1,2,4]. В литературе практически отсутствуют данные о закономерностях активации ванилоидных и пуринаргических рецепторов уротелия мочевого пузыря у мужчин пожилого и старческого возраста, о возрастных особенностях экспрессии сигнальных молекул уротелия мочевого пузыря у мужчин при его гиперфункции, системном атеросклерозе и их сочетании [7, 8, 9]. Изучение модели патологического старения уrogenитального тракта в виде развития гиперактивного мочевого пузыря (ГАМП), являющегося клиническим аналогом гиперфункции уротелия, и системного атеросклероза представляется крайне актуальным в связи с высокой распространенностью данной сочетанной патологии [3,6].

Таким образом, в связи с вышеизложенным, высокую практическую значимость представляет поиск биологических маркеров патологического старения, а также возможность обобщить и систематизировать биологические маркеры патологического старения уrogenитального тракта в рамках данного исследования [5,8].

Цель исследования. Изучить биологические особенности активации ванилоидных и пуринаргических рецепторов уротелия у мужчин разного возраста.

Материал и методы. Все пациенты, включенные в исследование, были разделены на несколько групп в соответствии с критериями Всемирной организации здравоохранения по классификации возраста [World Health Organization. The world health report 2003: shaping the future. Geneva: World Health Organization, 2003; quity [web site]. Geneva, World Health Organization, 2009, <http://www.who.int/healthsystems/topics/equity/en>, accessed 28 June 2009]. В исследование было включено 278 человек: 93 мужчины среднего возраста, 92 мужчины пожилого возраста и 93 мужчины старческого возраста. Пациенты были разделены на следующие группы:

а) три группы мужчин в возрасте $53,6 \pm 2,7$ года (средний возраст от 45 до 59 лет, $n=31$), $67,8 \pm 2,3$ года (пожилой возраст от 60 до 74 лет, $n=30$), $84,2 \pm 1,9$ года (старческий возраст от

75 до 89 лет, n=32) – без признаков гиперактивного мочевого пузыря и системного атеросклероза;

б) три группы мужчин в возрасте $54,7 \pm 2,3$ года (средний возраст от 45 до 59 лет, n=30), $66,4 \pm 2,5$ года (пожилой возраст от 60 до 74 лет, n=31), $85,7 \pm 1,1$ года (старческий возраст от 75 до 89 лет, n=30) – с признаками гиперактивного мочевого пузыря без системного атеросклероза;

в) три группы мужчин в возрасте $55,9 \pm 2,6$ года (средний возраст от 45 до 59 лет, n=32), $68,2 \pm 2,2$ года (пожилой возраст от 60 до 74 лет, n=31), $86,3 \pm 1,6$ года (старческий возраст от 75 до 89 лет, n=31) – с сочетанием гиперактивного мочевого пузыря и системного атеросклероза.

Диагноз ГАМП был выставлен в соответствии с рекомендациями Комитета по стандартизации терминологии Международного общества по удержанию мочи (ICS). Ведущей патологией у данных пациентов со стороны сердечно-сосудистой системы был системный атеросклероз (диагноз выставлен в соответствии с рекомендациями 42 сессии Всемирной организации здравоохранения - Всемирная ассамблея здравоохранения, 42 сессия «Профилактика сердечно-сосудистых и других хронических неинфекционных болезней и борьба с ними» и Международной статистической классификацией болезней и проблем, связанных со здоровьем; 10-й пересмотр).

После взятия биопсии фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина в течение 24 часов. Далее образцы обезжировали в спиртах возрастающей концентрации (70-95%), помещали в ксилол и заливали в жидкий парафин. Проводка осуществлялась с помощью станции Leica TP 1020, с последующим изготовлением парафиновых блоков на автоматической станции заливки Leica EG 1160. При помощи микротомы Rotary 3002 Pfm получали парафиновые срезы толщиной 3-5 мкм.

Для гистологического исследования биоптатов уротелия нами были использованы следующие методы окраски клеток.

1. Водный раствор азур-эозина по Романовскому-Гимза в разведении 1:5 наносили на препарат биоптатов уротелия и выдерживали 20 мин при комнатной температуре. Затем препарат промывали и заключали под покровное стекло.
2. 1% раствор орсеина наносили на препарат биоптатов уротелия и выдерживали 20 мин при комнатной температуре (работа с орсеиновым синим проводилась в вытяжном шкафу, т.к. в состав этого красителя входит уксусная кислота). Затем препарат промывали и заключали под покровное стекло.

3. 1% водный раствор метиленового синего наносили на препарат биоптата уротелия и выдерживали 50 мин при комнатной температуре, промывали и заключали под покровное стекло.
4. 1% раствор орсеина наносили на стекло на 5 мин, затем промывали дистиллированной водой и наносили 0,1% спиртовой раствор водного зеленого, далее вновь промывали водой и заключали под покровное стекло.

Иммуногистохимическое исследование проводили по стандартной методике. Депарафинированные образцы биоптатов уротелия помещали на покрытые поли-L-лизинном предметные стекла (Sigma). Для иммуноцитохимического исследования использовались первичные и вторичные антитела - моноклональные мышинные анти-человеческие антитела к различным сигнальным молекулам. Применяли антитела фирмы «Dako» к рецепторам ванилоидных и пуриновых рецепторов.

Визуализацию иммуногистохимической реакции проводили с применением комплекса авидина с биотинилированной пероксидазой (ABC-kit), с последующим проявлением пероксидазы хрена диаминобензидином (Novocastra).

Для оценки результатов иммуногистохимического окрашивания проводили морфометрическое исследование с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящей из микроскопа Nikon Eclipse E400, цифровой камеры Nikon DXM1200, персонального компьютера на базе Intel Pentium 4 и программного обеспечения Vidiotest Morphology 5.0». В каждом случае анализировали 5 полей зрения при увеличении 200.

Оптическую плотность экспрессии выявленных продуктов измеряли в условных единицах. Указанные параметры отражают интенсивность синтеза или накопления исследуемых сигнальных молекул.

Статистическая обработка материалов исследования осуществлялась на персональном компьютере IBM PC (Intel Pentium-III), Windows Millennium с помощью программных средств и пакета Statistica for Windows Version 6.0 (StatSoft Inc., США). Массив исходных данных был подготовлен так, что можно было сравнивать весь имеющийся набор сведений в анализируемых группах и подгруппах разного уровня. При соответствии нормальному закону распределения признака проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента с оценкой достоверности различий ($p < 0,05$) по значениям $M \pm m$. Для оценки достоверности различий независимых выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, применяли

непараметрический критерий Манна-Уитни, для зависимых выборок данных использовали критерий Вилкоксона. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. При оценке связей качественных показателей применяли критерий достоверности связи Пирсона с поправкой Йетса, критерий Фишера.

Результаты и их обсуждение. При изучении биологических особенностей активации ванилоидных рецепторов уротелия у мужчин разного возраста получены следующие результаты (таблица 1). Так, у мужчин без ГАМП и системного атеросклероза был выявлен уровень активации ванилоидных рецепторов уротелия в $56,7 \pm 4,9\%$ у людей среднего возраста, в $61,9 \pm 4,8\%$ у людей пожилого возраста и в $63,5 \pm 5,3\%$ у людей старческого возраста (различия между возрастными группами недостоверны, $p > 0,05$). У мужчин при ГАМП без системного атеросклероза был выявлен уровень активации ванилоидных рецепторов уротелия в $76,5 \pm 4,2\%$ у пациентов среднего возраста, в $91,4 \pm 7,5\%$ у пациентов пожилого возраста и в $117,8 \pm 6,8\%$ у пациентов старческого возраста (разность показателей достоверна внутри каждой пары возрастных групп, $p < 0,05$). Аналогичная по темпам возрастная динамика активации ванилоидных рецепторов была выявлена при сочетании ГАМП и системного атеросклероза. Кроме того, во всех возрастных группах наблюдалось повышение активности ванилоидных рецепторов с нарастанием тяжести патологии ($p < 0,05$), достигая максимума у людей старческого возраста с сочетанием ГАМП и атеросклероза.

Таблица 1

Биологические особенности активации ванилоидных рецепторов уротелия у мужчин разного возраста

Нозологическая характеристика	Уровень активации ванилоидных рецепторов уротелия у пациентов разного возраста (%)		
	Средний возраст (n=93)	Пожилой возраст (n=92)	Старческий возраст (n=93)
Без ГАМП и системного атеросклероза	$56,7 \pm 4,9$	$61,9 \pm 4,8$	$63,5 \pm 5,3$
При ГАМП без системного атеросклероза	$76,5 \pm 4,2^{\circ}$	$91,4 \pm 7,5^{* \circ}$	$117,8 \pm 6,8^{* * \# \circ}$
Сочетание ГАМП и системного атеросклероза	$120,4 \pm 9,7^{0,00}$	$147,3 \pm 12,7^{* 0,00}$	$164,3 \pm 10,4^{* * \# 0,00}$

* $p < 0,05$, разность показателей между группами пациентов пожилого и среднего возраста;

** $p < 0,05$, разность показателей между группами пациентов старческого и пожилого возраста;

$p < 0,05$, разность показателей между группами пациентов старческого и среднего возраста;

° $p < 0,05$, разность показателей между группами пациентов с ГАМП и без патологии;

°° $p < 0,05$, разность показателей между группами пациентов с ГАМП+атеросклероз и с ГАМП.

Также нами были изучены биологические особенности активации пуринергических рецепторов уротелия у мужчин разного возраста (таблица 2). У мужчин без ГАМП и системного атеросклероза был выявлен уровень активации пуринергических рецепторов уротелия в $55,4 \pm 4,7\%$ у людей среднего возраста, в $62,6 \pm 4,5\%$ у людей пожилого возраста и в $63,4 \pm 5,2\%$ у людей старческого возраста (различия между возрастными группами недостоверны, $p > 0,05$). У мужчин при ГАМП без системного атеросклероза был выявлен уровень активации пуринергических рецепторов уротелия в $77,3 \pm 4,1\%$ у пациентов среднего возраста, в $92,0 \pm 7,2\%$ у пациентов пожилого возраста и в $116,5 \pm 6,4\%$ у пациентов старческого возраста (разность показателей достоверна внутри каждой пары возрастных групп, $p < 0,05$). Аналогичная по темпам возрастная динамика активации пуринергических рецепторов была выявлена при сочетании ГАМП и системного атеросклероза. Кроме того, во всех возрастных группах наблюдалось повышение активности пуринергических рецепторов с нарастанием тяжести патологии ($p < 0,05$), достигая максимума у людей старческого возраста с сочетанием ГАМП и атеросклероза.

Таблица 2

Биологические особенности активации пуринергических рецепторов уротелия у мужчин разного возраста

Нозологическая характеристика	Уровень активации пуринергических рецепторов уротелия у пациентов разного возраста (%)		
	Средний возраст (n=93)	Пожилой возраст (n=92)	Старческий возраст (n=93)
Без ГАМП и системного атеросклероза	$55,4 \pm 4,7$	$62,6 \pm 4,5$	$63,4 \pm 5,2$
При ГАМП без системного атеросклероза	$77,3 \pm 4,1^{\circ}$	$92,0 \pm 7,2^{*\circ}$	$116,5 \pm 6,4^{**\#\circ}$
Сочетание ГАМП и системного атеросклероза	$121,3 \pm 9,5^{\circ\circ}$	$146,5 \pm 11,9^{*\circ\circ}$	$169,9 \pm 11,0^{**\#\circ\circ}$

атеросклероза			
---------------	--	--	--

* $p < 0,05$, разность показателей между группами пациентов пожилого и среднего возраста;

** $p < 0,05$, разность показателей между группами пациентов старческого и пожилого возраста;

$p < 0,05$, разность показателей между группами пациентов старческого и среднего возраста;

^o $p < 0,05$, разность показателей между группами пациентов с ГАМП и без патологии;

^{oo} $p < 0,05$, разность показателей между группами пациентов с ГАМП+атеросклероз и с ГАМП.

Выводы.

1. Уровень активности ванилоидных и пуринергических рецепторов уротелия в процессе нормального старения остается стабильным и сохраняется вне зависимости от увеличения возраста на уровне 56,7-63,5% для ванилоидных рецепторов и 55,4-63,4% для пуринергических рецепторов.

2. При патологическом старении уrogenитального тракта, характеризующегося гиперфункцией уротелия на фоне системного атеросклероза, происходит достоверное повышение активности ванилоидных пуринергических рецепторов уротелия до 146,5% в пожилом возрасте и до 169,9% в старческом возрасте.

3. Показатели активности ванилоидных и пуринергических рецепторов могут служить биологическими маркерами патологического старения уrogenитального тракта на модели сочетания гиперфункции уротелия и системного атеросклероза (снижение их активности свидетельствует о патологическом старении).

4. Выявление активности ванилоидных и пуринергических рецепторов уротелия в качестве биологических маркеров для дифференциации процессов физиологического и патологического старения уrogenитального тракта может служить в качестве дополнительных критериев при формировании групп пациентов для проведения мероприятий по профилактике преждевременного старения.

Список литературы

1. Антивозрастная медицина – новое направление в современной российской медицине / С. Трофимова, А. Трофимов, ... К. Процаев [и др.] // Врач. – 2016. – № 6. – С. 3.
2. Арьев А.Л., Овсянникова Н.А., Арьева Г.Т., Дзахова С.Д., Хавинсон В.Х. Полиморбидность в гериатрии// Практическая онкология. - 2015. - Т. 16. - № 3. - С. 83-90.

3. Попович И.Г., Анисимов В.Н. Есть ли у нас лекарство от старости?// Вестник эстетической медицины. 2013. - Т. 12. - № 2. - С. 44-50.
4. Превентивная гериатрия, или антивозрастная медицина / А.Н. Ильницкий, К.И. Прощаев, С.В. Трофимова [и др.] // Успехи геронтологии. – 2015. – Т. 28, № 3. – С. 589-593.
5. Хавинсон В.Х., Бенберин В.В., Михайлова О.Н., Сидоренко А.В. Старение в странах с развивающейся экономикой: вызовы и возможности// Управленческое консультирование. 2015. - № 11 (83). - С. 50-58.
6. Шабалин В.Н. Основные закономерности старения организма человека// Здравоохранение Российской Федерации. - 2009. - № 2. - С. 13-17.
7. Шабалин В.Н., Кубатиев А.А., Лысов Н.А., Яковлев О.Г., Воевода М.И., Архипов И.В. Научная концепция физиологического старения и активного долголетия населения российской федерации//Посвящается Ветеранам Великой Отечественной Войны – Героической элите народа/ Российская ассоциация геронтологов и гериатров, Медицинский институт "РЕАВИЗ". Самара, 2015.
8. Anisimov V.N., Mikhailova O.N. Gerontology in Russia: milestones and perspectives of development// Успехи геронтологии. - 2015. - Т. 28. - № S1. - С. 52-62.
9. Meng E, Lin WY, Lee WC, Chuang YC. Pathophysiology of Overactive Bladder // Low Urin Tract Symptoms. - 2012 - № 1.- p. 48-55.

The list of references

1. Antivozrastnaja medicina – novoe napravlenie v sovremennoj rossijskoj medicine / S. Trofimova, A. Trofimov, ... K. Proshhaev [i dr.] // Vrach. – 2016. – № 6. – S. 3.
2. Ar'ev A.L., Ovsjannikova N.A., Ar'eva G.T., Dzahova S.D., Havinson V.H. Polimorbidnost' v geriatrii// Prakticheskaja onkologija. - 2015. - Т. 16. - № 3. - S. 83-90.
3. Popovich I.G., Anisimov V.N. Est' li u nas lekarstvo ot starosti?// Vestnik jesteticheskoy mediciny. 2013. - Т. 12. - № 2. - S. 44-50.
4. Preventivnaja geriatrija, ili antivozrastnaja medicina / A.N. Il'nickij, K.I. Proshhaev, S.V. Trofimova [i dr.] // Uspehi gerontologii. – 2015. – Т. 28, № 3. – S. 589-593.
5. Havinson V.H., Benberin V.V., Mihajlova O.N., Sidorenko A.V. Starenie v stranah s razvivajushhejsja jekonomikoj: vyzovy i vozmozhnosti// Upravlencheskoe konsul'tirovanie. 2015. - № 11 (83). - S. 50-58.
6. Shabalin V.N. Osnovnye zakonomernosti starenija organizma cheloveka// Zdravoohranenie Rossijskoj Federacii. - 2009. - № 2. - S. 13-17.

7. Shabalin V.N., Kubatiev A.A., Lysov N.A., Jakovlev O.G., Voevoda M.I., Arhipov I.V. Nauchnaja koncepcija fiziologicheskogo starenija i aktivnogo dolgoletija naselenija rossijskoj federacii//Posvjashhaetsja Veteranam Velikoj Otechestvennoj Vojny - Geroicheskoj jelite naroda / Rossijskaja asociacija gerontologov i geriatrov, Medicinskij institut "REAVIZ". Samara, 2015.
8. Anisimov V.N., Mikhailova O.N. Gerontology in Russia: milestones and perspectives of development// Успехи геронтологии. - 2015. - Т. 28. - № S1. - С. 52-62.
9. Meng E, Lin WY, Lee WC, Chuang YC. Pathophysiology of Overactive Bladder // Low Urin Tract Symptoms. - 2012 - № 1.- p. 48-55.

Информация об авторах

ПРАНОВИЧ Александр Анатольевич, Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, научный сотрудник отдела биogerонтологии

Кветная Татьяна Викторовна, д.б.н., проф., Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, ученый секретарь

Селиванов Андрей Николаевича, к.м.н., врачу-уролог Городской клинической больницы № 31 г. Санкт-Петербурга