

УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ УРОТЕЛИЯ К СИГНАЛЬНЫМ МОЛЕКУЛАМ У МУЖЧИН РАЗНОГО ВОЗРАСТА С СИНДРОМОМ ГИПЕРАКТИВНОГО МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Пранович А.А.^{1,2}, Кветная Т.В.², Ничик Т.Е.³, Мудраковская Э.В.¹

¹ АНО «Научно-исследовательский медицинский центр «Геронтология», Москва

² АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», Санкт-Петербург

³ Городская больница № 1, Тольятти

Синдром гиперактивного мочевого пузыря является клинической формой патологического старения урогенитального тракта. Патологическое старение урогенитального тракта характеризуется достоверным повышением экспрессии рецепторов к ацетилхолину в клетках уротелия в 1,4 раза, глутамату в 1,6 раза, трансформирующему фактору роста бета-1 в 1,5 раза и снижением уровней экспрессии рецепторов к серотонину и допамину в 1,2 раза. Это позволяет сделать заключение о том, что показатели повышения экспрессии рецепторов к ацетилхолину, глутамату, трансформирующему фактору роста бета-1 и снижение показателей экспрессии рецепторов к серотонину и допамину можно считать биологическими маркерами патологического старения урогенитального тракта.

Ключевые слова: урогенитальный тракт, старение, биомаркеры.

EXPRESSION LEVELS OF UROTHELIUM RECEPTORS FOR SIGNALING MOLECULES IN MEN OF DIFFERENT AGES WITH HYPERACTIVE BLADDER SYNDROME

Pranovich A. A.^{1,2}, Kvetnaya T. V.², Nichik T. E.³, Mudrakovskaya E. V.¹

¹ Research Medical Center "Gerontology", Moscow

² Saint Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, Saint Petersburg

³ 1st Municipal hospital, Togliatti

Hyperactive bladder syndrome is a clinical form of pathological aging of the urogenital tract. Pathological aging of the urogenital tract is characterized by a significant increase in the expression of acetylcholine receptors in urothelial cells by 1.4 times, glutamate by 1.6 times, transforming growth factor beta-1 by 1.5 times, and a decrease in the expression levels of serotonin and dopamine receptors by 1.2 times. This allows us to conclude that the indicators of increased expression of receptors for acetylcholine, glutamate, transforming growth factor beta-1 and a decrease in the expression of receptors for serotonin and dopamine can be considered biological markers of pathological aging of the urogenital tract.

Key words: urogenital tract, aging, biomarkers.

Введение

Среди наиболее значимых геронтологических проблем в заболеваемости лиц мужского пола является такое состояние как гиперактивный мочевой пузырь (ГАМП). Появление ГАМП – большая проблема для лиц мужского пола, которая приводит к снижению социальной и ограничению физической активности с уменьшением продуктивности или полным отказом от работы, вынужденному ограничению сексуальных контактов, потере чувства собственного достоинства. ГАМП входит в группу так называемых «симптомов нижних мочевых путей» (СНМП), которые наблюдаются у 40% мужчин в возрасте старше 50 лет.

Риск возникновения синдрома гиперактивного мочевого пузыря увеличивается с возрастом, причем критическим является возраст старше 60 лет, где распространенность ГАМП максимальная. Увеличение риска появления ГАМП для мужчин объясняется не только возрастной дизъюнкцией мышц, но также гиперплазией предстательной железы, признаки которой в той или иной степени имеются примерно у 50% мужчин в возрасте 60 лет.

Несомненной для развития ГАМП у пожилых пациентов является роль сопутствующих заболеваний с нейрогенным и сосудистым компонентом, таких как сахарный диабет, цереброваскулярная патология, атеросклероз крупных сосудов, и другие, которые могут вызывать или усугублять нарушения сократимости детрузора. Особое место занимает системный атеросклероз, диагностирующийся у 50-70% случаев пожилых людей с ГАМП. Согласно данным многих источников как ГАМП сам по себе, так и ГАМП в сочетании с системным атеросклерозом является патологией, характерной для мужчин старше 60 лет, и не является возрастной нормой и характеристикой нормального старения. Поэтому наличие этих состояний свидетельствует о патологическом старении уrogenитального тракта.

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. В литературе практически отсутствуют данные о закономерностях активации ваниллоидных и пуринергических 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. Изучение модели

патологического старения уrogenитального тракта в виде развития ГАМП, являющегося клиническим аналогом гиперфункции уротелия, и системного атеросклероза представляется крайне актуальным в связи с высокой распространенностью данной сочетанной патологии.

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 [1,2,3].

Цель исследования

Выявить биологические маркеры патологического старения уrogenитального тракта на модели гиперфункции уротелия при системном атеросклерозе.

Материал и методы исследования

Характеристика пациентов, включенных в исследование. 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; equity [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 - Всемирной ассамблеи здравоохранения, 42 сессия «Профилактика сердечно-сосудистых и других хронических неинфекционных болезней и борьба с ними» и Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем; 10-й пересмотр).

Дизайн исследования. Проведено поэтапное исследование. Общая схема исследования:

- гистологическое исследование биоптатов уротелия
- изучение уровня экспрессии рецепторов уротелия к сигнальным молекулам (см. ниже).

Гистологическое исследование биоптатов уротелия.

После взятия биопсии биоптаты фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина в течение 24 часов. Далее образцы обезвоживали 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

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 античеловеческие антитела к различным сигнальным молекулам. Применяли антитела фирмы «Dako» к рецепторам ваниллоидных и пуриновых рецепторов, а также к рецепторам следующих сигнальных молекул: - ацетилхолину; - TGF- β 1 (трансформирующий фактор роста бета – 1); - глутамату; - серотонину; - допамину (фирмы DLD, Германия).

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

Морфометрическое исследование

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 материала

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.

Основные результаты исследования

Данные по изучению биологических особенностей экспрессии рецепторов уротелия к трансформирующему фактору роста бета – 1 в биоптатах уротелия у мужчин разного возраста представлены в таблице 1.

Таблица 1

Биологические особенности экспрессии рецепторов уротелия к трансформирующему фактору роста бета–1 у мужчин разного возраста

Нозологическая характеристика	Уровень экспрессии рецепторов уротелия к трансформирующему фактору роста бета–1 в биоптате у пациентов разного возраста (%)		
	Средний возраст (n=93)	Пожилой возраст (n=92)	Старческий возраст (n=93)
Без ГАМП и системного атеросклероза	43,5±0,07	43,4±0,06	43,5±0,05
При ГАМП без системного атеросклероза	43,5±0,05	44,1±0,07 ^{*,o}	56,3±0,08 ^{*,#}

Сочетание ГАМП и гиперактивности и системного атеросклероза	45,2±0,09 ^{o,oo}	55,8±0,08 ^{*o,oo}	66,7±0,09 ^{**,#o,oo}
---	---------------------------	----------------------------	-------------------------------

* $p < 0,05$, 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.

Возрастные биологические особенности экспрессии рецепторов уротелия к трансформирующему фактору роста бета-1 в биоптатах клеток уротелия заключались в том, что у здоровых людей с увеличением возраста не наблюдались изменения экспрессии рецепторов уротелия к трансформирующему фактору роста бета-1 ($p > 0,05$). При ГАМП без системного атеросклероза и ГАМП с системным атеросклерозом наблюдалось достоверное увеличение экспрессии рецепторов уротелия к трансформирующему фактору роста бета-1 как с увеличением возраста ($p < 0,05$), так и с нарастанием тяжести патологии ($p < 0,05$).

Данные по биологическим особенностям оптической плотности экспрессии рецепторов уротелия к ацетилхолину у мужчин разного возраста представлены в таблице 2.

Полученные данные свидетельствовали о том, что возрастные биологические особенности оптической плотности экспрессии рецепторов уротелия к ацетилхолину подчиняются тем же закономерностям, что и экспрессия рецепторов уротелия к трансформирующему фактору роста бета-1.

Таблица 2

Биологические особенности оптической плотности экспрессии рецепторов уротелия к ацетилхолину у мужчин разного возраста

Нозологическая характеристика	Оптическая плотность экспрессии рецепторов уротелия к ацетилхолину у пациентов разного возраста (у.е.)		
	Средний возраст (n=93)	Пожилой возраст (n=92)	Старческий возраст (n=93)
Без ГАМП и системного атеросклероза	0,31±0,05	0,32±0,06	0,33±0,03
При ГАМП без системного атеросклероза	0,45±0,08 ^o	0,52±0,07 ^{*,o}	0,64±0,06 ^{**,#,o}
Сочетание ГАМП и гиперактивности и системного атеросклероза	0,52±0,07 ^{o,oo}	0,67±0,04 ^{*,o,o} o	0,82±0,08 ^{**,#,o,oo}

*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; ^op<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.

Таким же закономерностям подчинялись биологические особенности экспрессии оптической площади экспрессии рецепторов уротелия к глутамату у мужчин разного возраста (таблица 3).

Таблица 3

Биологические особенности оптической плотности экспрессии рецепторов уротелия к глутамату у мужчин разного возраста

Нозологическая характеристика	Оптическая плотность экспрессии рецепторов уротелия к глутамату у пациентов разного возраста (у.е.)

	Средний возраст (n=93)	Пожилой возраст (n=92)	Старческий возраст (n=93)
Без ГАМП и системного атеросклероза	0,32±0,04	0,33±0,06	0,34±0,08
При ГАМП без системного атеросклероза	0,47±0,09 ^o	0,57±0,08 ^{*.o}	0,69±0,09 ^{**,#.o,oo}
Сочетание ГАМП и гиперактивности и системного атеросклероза	0,53±0,06 ^{o,oo}	0,69±0,05 ^{*,o,oo}	0,83±0,07 ^{**,#.o,oo}

* $p < 0,05$, 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.

Следующим этапом нашего исследования было изучение оптической плотности экспрессии рецепторов уротелия к серотонину в клетках уротелия у мужчин разного возраста (таблица 4). Возрастные биологические особенности экспрессии рецепторов уротелия к серотонину заключались в том, что у здоровых людей с возрастом не наблюдались достоверные изменения оптической плотности экспрессии рецепторов уротелия к серотонину ($p > 0,05$). При ГАМП без системного атеросклероза отмечалось снижение экспрессии рецепторов уротелия к серотонину по сравнению с людьми без патологии ($p < 0,05$), однако возрастных отличий выявлено не было ($p > 0,05$). А вот при сочетании ГАМП и системного атеросклероза аналогичное наблюдалось достоверное снижение экспрессии рецепторов уротелия к серотонину как с увеличением возраста ($p < 0,05$), так и с нарастанием тяжести патологии ($p < 0,05$).

Таблица 4

Биологические особенности оптической плотности экспрессии рецепторов уротелия к серотонину у мужчин разного возраста

Нозологическая характеристика	Оптическая плотность экспрессии серотонина (у.е.)		
	Средний возраст (n=93)	Пожилой возраст (n=92)	Старческий возраст (n=93)
Без ГАМП и системного атеросклероза	0,56±0,07	0,55±0,04	0,54±0,05
При ГАМП без системного атеросклероза	0,50±0,04 ^o	0,46±0,04*, o	0,44±0,07 ^o
Сочетание ГАМП и гиперактивности и системного атеросклероза	0,43±0,05 ^{oo}	0,40±0,04 ^{o,o} o	0,36±0,06 ^{**,#,o,oo}

*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;

^op<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.

Аналогичные закономерности выявлены и в отношении биологических особенностей оптической плотности экспрессии рецепторов уротелия к допамину у мужчин разного возраста (таблица 5).

Таким образом, нами было установлено, что физиологическое старение уrogenитального тракта характеризуется стабильными показателями уровней активности ваниллоидных и пуринергических рецепторов уротелия, а также стабильными уровнями экспрессии рецепторов к таким сигнальным молекулам уротелия, как ацетилхолин, глутамат и трансформирующий фактора роста бета-1.

В то же время, при патологическом старении урогенитального тракта, моделью которого является гиперактивность мочевого пузыря с системным атеросклерозом, происходило достоверное повышение активности ваниллоидных и пуринаргических рецепторов уротелия, увеличивающееся в пожилом возрасте в 1,6 раза и в старческом возрасте в 1,8 раза по сравнению с людьми тех же возрастных групп с физиологическим старением.

Таблица 5

Биологические особенности оптической плотности экспрессии рецепторов уротелия к допамину у мужчин разного возраста

Нозологическая характеристика уротелия	Оптическая плотность экспрессии рецепторов уротелия к допамину (у.е.)		
	Средний возраст (n=93)	Пожилой возраст (n=92)	Старческий возраст (n=93)
Без ГАМП и системного атеросклероза	0,55±0,06	0,54±0,03	0,53±0,04
При ГАМП без системного атеросклероза	0,49±0,05 [°]	0,45±0,06 ^{*,°}	0,43±0,06 [°]
Сочетание ГАМП и гиперактивности и системного атеросклероза	0,42±0,04 ^{°,°°}	0,39±0,03 ^{°,°°}	0,35±0,05 ^{**,#,°,°°}

*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.

Кроме того, патологическое старение уrogenитального тракта характеризовалось достоверным повышением экспрессии рецепторов к ацетилхолину в клетках уротелия в 1,4 раза, глутамату в 1,6 раза, трансформирующему фактору роста бета-1 в 1,5 раза и снижением уровней экспрессии рецепторов к серотонину и допамину в 1,2 раза. Это позволило сделать заключение о том, что показатели повышения экспрессии рецепторов к ацетилхолину, глутамату, трансформирующему фактору роста бета-1 и снижение показателей экспрессии рецепторов к серотонину и допамину можно считать биологическими маркерами патологического старения уrogenитального тракта.

Выводы

1. Физиологическое старение уrogenитального тракта характеризуется стабильными показателями экспрессии рецепторов к трансформирующему фактору роста бета-1 в биоптате клеток уротелия на среднем уровне 43,5%, а также отсутствием статистически значимых колебаний показателей оптической плотности экспрессии рецепторов к ацетилхолину, глутамату, серотонину и допамину в уротелии.

2. Патологическое старение уrogenитального тракта характеризуется достоверным повышением экспрессии рецепторов к ацетилхолину с 0,52 до 0,82 у.е., глутамату с 0,53 у.е. до 0,83 у.е., трансформирующему фактору роста бета-1 с 45,2 до 66,7 % и снижением уровней оптической площади экспрессии рецепторов к серотонину с 0,43 у.е. до 0,36 у.е. и допамину с 0,42 у.е. до 0,35 у.е.

3. Биологическими маркерами патологического старения уrogenитального тракта на модели сочетания гиперфункции уротелия и системного атеросклероза могут служить показатели экспрессии рецепторов к ацетилхолину, глутамату, трансформирующему фактору роста бета – 1 (повышение их экспрессии свидетельствует о патологическом старении), показатели экспрессии рецепторов к серотонину и допамину (снижение их экспрессии свидетельствует о патологическом старении).

Литература

1. Пальцев М.А., Кветной И.М. Руководство по нейроиммуноэндокринологии. - Изд. 3-е, доп. и расш. - Москва : Шико, 2014. - 748 с.
2. Пранович, А.А. Биомаркеры патологического старения уротелия / А.А. Пранович, Э.В. Сатардинова, К.И.Прощаев// Клиническая геронтология. – 2018. - № 3-4 –с.8-12.
3. Prashchayeu K., Zhernakova N., Pranovich A., Pnitskiy A., Grishenko A. Biological Markers of Pathological Aging in Diseases of Men// Helix- 2018- Vol. 8(1)-p. 2588- 2592.