

© Т. В. Боронихина, А. Н. Яцковский, 2006
УДК 611.43.018:612.67

Т. В. Боронихина и А. Н. Яцковский

ДИНАМИКА ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА В БУЛЬБОУРЕТРАЛЬНЫХ ЖЕЛЕЗАХ ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ СТАРЕНИЯ

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — чл.-кор. РАМН проф. С.Л.Кузнецов) Московской медицинской академии им. И.М.Сеченова

С помощью моноклональных антител к PCNA и p53 изучена динамика процессов пролиферации и апоптоза в эпителии бульбоуретральных желез мужчин в возрасте от 17 до 90 лет. Установлена более высокая интенсивность размножения и гибели клеток в эпителии выводных протоков, чем концевых отделов. Показано повышение уровня апоптоза с возрастом и коррелирующее с ним усиление пролиферации glanduloцитов. У стариков апоптоз в железах сопровождается тенденцией к снижению пролиферативной активности клеток. Обсуждается взаимосвязь процессов репродукции и гибели клеток в эпителии бульбоуретральных желез и их зависимость от уровня андрогенизации организма.

Ключевые слова: бульбоуретральные железы, пролиферация, апоптоз, старение.

В комплексе добавочных желез мужского полового тракта бульбоуретральные железы (БУЖ) наименее изучены, особенно в сравнении с простатой. Общность происхождения, сходство строения, функциональных задач и механизмов гормональной регуляции позволяют экстраполировать многие данные, известные для простаты, на БУЖ. Вместе с тем, опухольный рост в БУЖ, по сравнению с частотой малигнизации тканей простаты, явление редкое [7]. Полагают, что в основе развития новообразований в андрогензависимых органах лежат нарушения баланса между клеточной пролиферацией и апоптозом, возникающие на фоне нарастающего с возрастом дефицита мужских половых гормонов [6]. Цель данной работы — исследование процессов репродукции и гибели эпителиоцитов БУЖ у мужчин разного возраста, сведений о которых в доступной литературе не обнаружено.

Материал и методы. Исследовали БУЖ мужчин, умерших в возрасте от 17 до 90 лет вследствие заболеваний, не связанных с патологией органов полости таза, или погибших от случайных причин (всего 20 случаев). Причину смерти устанавливали по заключению судебно-медицинской экспертизы. Материал группировали в соответствии с общепринятой возрастной периодизацией жизни человека. В каждой возрастной группе исследовали не менее 3 случаев. Учитывая, что снижение уровня половых гормонов и коррелирующие с ним изменения репродуктивной функции у мужчин приобретают отчетливо выраженный характер после 45 лет [4], во II периоде зрелого возраста случаи, относящиеся к возрасту 36–45 лет и 46–60 лет, анализировали раздельно. Железы фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин. Использовали иммуногистохимические реакции с моноклональными антителами (DAKO, Cytomation, Дания) к ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA), для определения индекса пролиферации эпителия, и к белку p53, для определения интенсивности апоптоза. Деларифинированные срезы предварительно выдерживали 10 мин в цитратном буфере pH 6,0 в СВЧ-печи при мощности 750 Вт, а затем инкубировали с антителами к PCNA (разведение 1:50) и к p53 (разведение 1:40) в течение 30 мин при комнатной температуре. Для выявления реакции использовали детекционную систему LSAB (DAKO, Cytomation, Дания) на основе биотин-стреп-

тавидинового комплекса и пероксидазы. В качестве красителя применяли диаминобензидин. Ставили позитивные и негативные контроли. Срезы докрашивали гематоксилином и заключали в бальзам. Продукты иммунологических реакций проявлялись в виде гранул коричневого цвета в ядрах клеток. Индекс экспрессии PCNA и p53 вычисляли как среднее от числа меченых на 100 учтенных ядер. В каждом случае отдельно просчитывали по 1000 ядер клеток в концевых секреторных отделах, в многослойном эпителии междольковых протоков, в однослойном эпителии внутридольковых протоков при об. 40, ок. 16. Расчет средних значений параметров, ошибок средних и коэффициентов корреляции, а также регрессионный анализ данных проводили с использованием таблиц MS Excel 7,0. Доверительный интервал для средних величин вычисляли с уровнем достоверности 0,95.

Результаты исследования. У мужчин всех исследованных возрастных групп PCNA-положительные клеточные ядра наиболее часто встречались в эпителии протоковой системы БУЖ. В многослойном эпителии междольковых протоков индекс экспрессии PCNA был выше, чем в однослойном эпителии внутридольковых протоков. Окрашенные ядра преобладали в базальном и парабазальном слоях многослойного эпителиального пласта. Значительно меньшим, чем в протоках, был индекс экспрессии PCNA в клетках секреторных отделов (рис. 1, а, б). Гландулоциты с положительно окрашенными ядрами преимущественно обнаруживались в концевых отделах, расположенных рядом с протоками.

Возрастная динамика экспрессии PCNA в различных отделах БУЖ представлена на рис. 2, а. У юношей (17–21 год) и мужчин I периода зрелого возраста (22–35 лет) доля PCNA-позитивных ядер в эпителии междольковых и внутридольковых протоков не имела значимых различий и была минимальной по сравнению с таковой в других возрастных группах. В glanduloцитах концевых отделов экспрессия PCNA практически отсутствовала. Во II периоде зрелого возраста индексы PCNA в эпителии желез прогрессивно нарастали у мужчин в возрасте 36–45 лет и в подгруппе мужчин 46–60 лет. Наиболее существенный (на порядок) прирост доли PCNA-позитивных ядер отмечен в glanduloцитах концевых от-

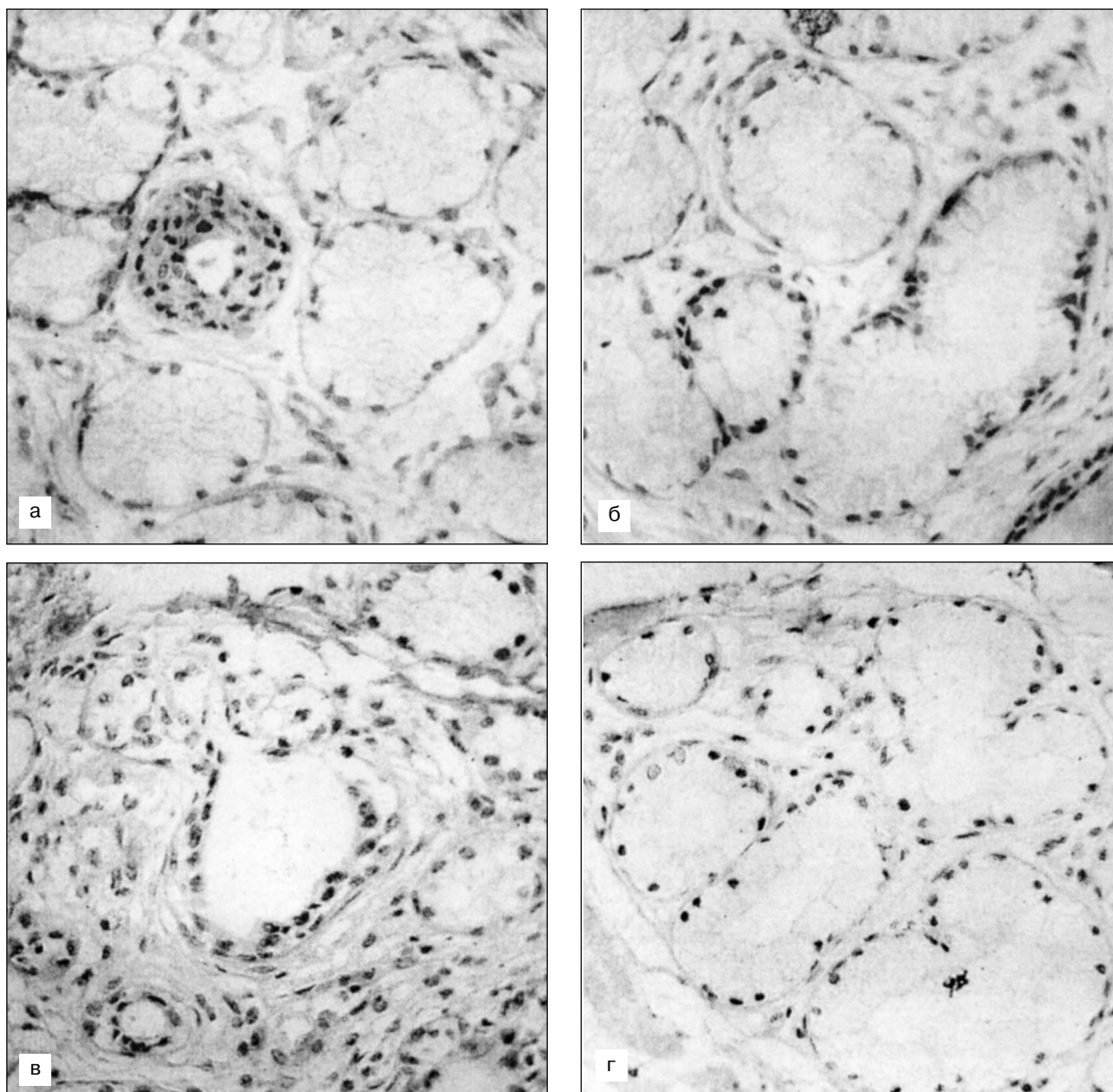


Рис. 1. Экспрессия ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) (а, б) и p53 (в, г) в клетках протоков (а, в) и концевых отделов (б, г) бульбоуретральной железы 35-летнего мужчины.

Окраска: антитела к PCNA и белку p53, меченные пероксидазой хрена, диаминобензидин; докраска ядер гематоксилином. PCNA- и p53-позитивные ядра — черные. Ув. 63.

делов и значительный (на 200% и 88% соответственно) — в эпителиоцитах внутридольковых протоков. В междольковых протоках желез индекс PCNA сохранял тенденцию к росту у мужчин пожилого возраста (61–74 года) и стабилизировался в старческом периоде (75–90 лет). В эпителии внутридольковых протоков доля PCNA-позитивных ядер нарастала вплоть до старческого возраста. В концевых отделах желез величина индекса PCNA у пожилых мужчин не изменялась по сравнению с таковой в предыдущей возрастной группе, а в старческом периоде значительно (более чем в 2 раза) снижалась.

Экспрессия белка p53 обнаружена в ядрах эпителиальных клеток БУЖ мужчин всех исследованных возрастных групп. Окрашенные ядра в большем ко-

личестве определялись в эпителии, выстилающем протоки желез, чем в glanduloцитах концевых секреторных отделов (см. рис. 1, в, г). В междольковых протоках меченые ядра выявлялись преимущественно в клетках промежуточного и поверхностного слоев эпителиального пласта. Экспрессия p53 в glanduloцитах концевых отделов характеризовалась гетерогенностью и обнаруживалась в основном в участках, расположенных рядом с протоками.

Возрастная динамика экспрессии p53 в различных отделах БУЖ представлена на рис. 2, б. В юношеском возрасте (17–21 год), в сравнении с последующими возрастными группами, уровень экспрессии белка в железах минимальный. У мужчин I периода зрелого возраста (22–35 лет) доля меченых ядер во

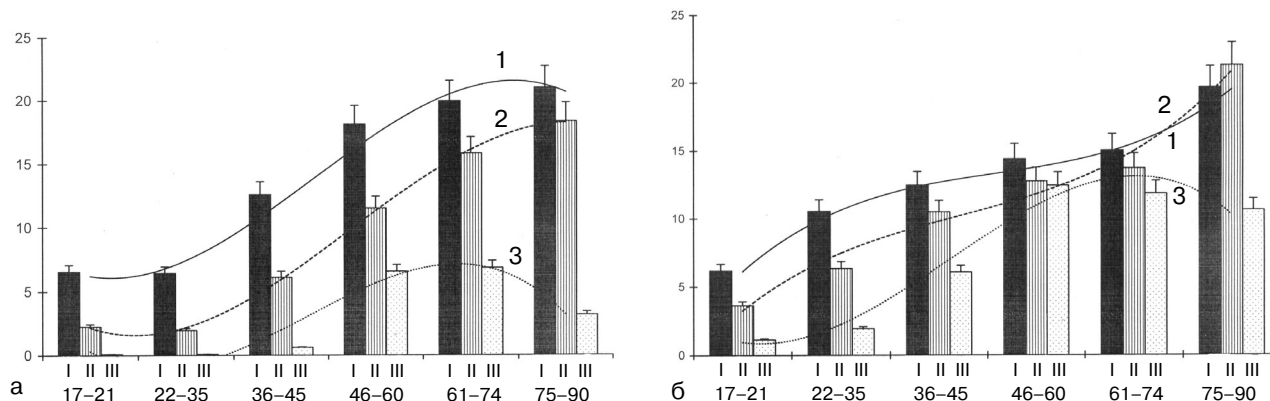


Рис. 2. Индекс экспрессии ядерного антигена пролиферирующих клеток (а) и белка р53 (б) в различных отделах бульбоуретральных желез мужчин разного возраста.

По оси абсцисс: I — междольковые протоки (МДП); II — внутридольковые протоки (ВДП); III — концевые секреторные отделы (КСО); возраст (лет); по оси ординат — индексы экспрессии (%); линии — аппроксимирующие полиномиальные кривые: 1 — МДП, 2 — ВДП, 3 — КСО. Вертикальные отрезки — 95% доверительные интервалы.

всех отделах БУЖ существенно (более чем на 70%) увеличивалась. Тенденция к росту экспрессии р53 сохранялась во II периоде зрелого возраста как у мужчин в возрасте 36–45 лет, так и в подгруппе мужчин 46–60 лет. В этой возрастной группе прирост доли окрашенных ядер был наиболее выражен в клетках концевых отделов желез и внутридольковых протоков. У пожилых мужчин (61–74 года) показатели экспрессии р53 в эпителии БУЖ не обнаруживали значимых различий с таковыми в предыдущей возрастной группе. В железах мужчин старческого возраста (75–90 лет) уровень экспрессии р53 в клетках концевых отделов менялся незначительно, но существенно нарастал в эпителиоцитах междольковых и внутридольковых протоков (на 30% и 55% соответственно).

На рис. 2, а, б представлены также результаты регрессионного анализа, отраженные в виде кривых, характеризующих общую направленность возрастных изменений показателей экспрессии р53 и PCNA в различных отделах БУЖ. Во всех случаях величина значимости аппроксимации $R^2=0,95$ и более. Между возрастными изменениями уровня экспрессии р53 и индекса PCNA в эпителии БУЖ имеется отчетливо выраженная коррелятивная связь. Коэффициент корреляции этих показателей в междольковых протоках составил 0,91, во внутридольковых протоках — 0,89 и в концевых отделах желез — 0,73.

Возрастная динамика суммарных значений экспрессии PCNA и р53 во всех эпителиальных структурах БУЖ представлена на рис. 3. Сравнительный анализ показывает, что в юношеском возрасте доли PCNA-позитивных и р53-положительных ядер не имели статистически значимых различий. Начиная с I периода зрелого возраста, уровень экспрессии р53 прогрессивно нарастал, вплоть до пожилого возраста, когда значение этого показателя стабилизировалось. Повышение индекса PCNA происходило в начале II периода зрелого возраста. При этом, в железах мужчин 22–25 и 36–45 лет доля PCNA-позитивных ядер оставалась ниже доли р53-позитивных ядер, а у людей в возрасте 46–60 лет и у пожилых мужчин эти показатели выравнивались. В старческом возрасте суммарный уровень экспрессии р53 вновь

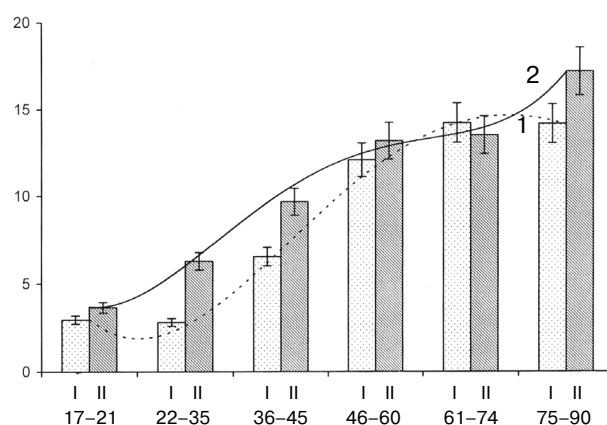


Рис. 3. Суммарные показатели экспрессии ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) и белка р53 в паренхиме бульбоуретральных желез мужчин разного возраста.

По оси абсцисс: I — PCNA; II — р53; возраст (лет); по оси ординат — индекс экспрессии (%); линии — аппроксимирующие полиномиальные кривые: 1 — PCNA; 2 — р53. Вертикальные отрезки — 95% доверительные интервалы.

увеличивался, при этом суммарный индекс PCNA, напротив, обнаруживал тенденцию к снижению.

Обсуждение полученных данных. Для определения индекса пролиферации эпителия БУЖ использовали уровень экспрессии белка PCNA, участвующего в редупликации ДНК в качестве кофермента ДНК-полимеразы [9]. Для оценки интенсивности апоптоза эпителиоцитов был выбран проапоптотический белок р53, инициирующий гибель генетически поврежденных клеток [5]. Известно, что PCNA и р53 участвуют также в процессах репарации ДНК [5, 9], что делает полученные результаты несколько завышенными, относительно абсолютных значений уровней пролиферации и апоптоза, но не искажает их динамику и позволяет сравнивать показатели экспрессии использованных белков.

Анализ локализации PCNA-положительных ядер в паренхиме БУЖ показал, что во все исследованные возрастные периоды эпителиоциты протоков обладают более высокими пролиферативными потенциями,

чем клетки секреторных отделов. Эти данные согласуются с имеющимися в литературе сведениями об отсутствии в концевых отделах БУЖ стволовых элементов [8] и позволяют предполагать их локализацию в эпителии протоков. Возможно, что перемещение малодифференцированных клеток из камбиальных зон в новообразованные концевые отделы служит причиной обнаружения PCNA-позитивных ядер в glanduloцитах, локализованных рядом с протоками.

Характер возрастной динамики индекса PCNA в эпителии БУЖ, обратно коррелирующей со снижающимся уровнем циркулирующих мужских половых гормонов, позволяет допустить, что камбиальные эпителиоциты БУЖ, по аналогии с таковыми простаты, андрогеннезависимы и находятся под контролем эстрогенов [10]. Повышение эстрогенизации мужского организма в процессе старения [4] может быть одной из причин усиления пролиферативной активности эпителия БУЖ с возрастом.

Экспрессия p53 обнаружена в БУЖ впервые. Этот белок является важнейшим онкосупрессором, запускающим процесс гибели в клетках с опухолевой трансформацией [5]. Известно, что в простате p53 не экспрессируется нормальными эпителиоцитами [3], но выявляется в неопластических клетках, где считается мутантным и способствующим развитию опухолевого процесса [3, 5]. Экспрессия p53 в эпителии БУЖ может рассматриваться как один из защитных механизмов, обеспечивающих развитие апоптоза, элиминацию потенциально опухолевых клеток, и тем самым объяснять относительно редкую малигнизацию желез [7].

Анализ локализации p53-позитивных ядер в паренхиме БУЖ выявил более высокий уровень апоптоза в эпителии протоков, чем в концевых отделах, что обусловлено, по-видимому, различной интенсивностью размножения их клеток. Митотические деления сопровождаются повреждениями генома и повышают вероятность апоптоза, что находит свое отражение в повышении содержания и активности p53 [5].

Возрастная динамика экспрессии p53 в эпителии БУЖ свидетельствует об активации клеточной гибели в концевых отделах и в протоковой системе желез по мере старения организма. Можно полагать, что прогрессирующее снижение содержания андрогенов, оказывающее мощное апоптозингибирующее действие на клетки-мишени [6], растормаживает гибель андрогензависимых эпителиоцитов БУЖ. В свою очередь, усиление апоптоза в эпителии БУЖ может быть одной из причин повышения его пролиферативной активности, по аналогии с glanduloцитами предстательной железы, интенсивность репродукции которых напрямую зависит от локальных клеточных потерь [10]. Это допущение подтверждается данными корреляционного анализа, демонстрирующими положительную связь между экспрессией p53 и PCNA.

Наименьшие и близкие по величине значения экспрессии p53 и PCNA в эпителии БУЖ зарегистрированы в юношеском возрасте, когда максимальные концентрации андрогенов в крови [4] способны сдерживать процессы гибели и размножения клеток-мишеней, обеспечивая клеточный гомеостаз в желе-

зах [10]. Активация апоптоза, приводящая к нарушению равновесия между репродукцией эпителиоцитов БУЖ и их гибелью, обнаружена в II период зрелого возраста (22–35 лет) и совпадает с началом снижения содержания андрогенов [4]. Увеличение индекса PCNA в паренхиме желез наблюдается позже — в возрасте 36–45 лет. Вторичность стимуляции клеточного размножения по отношению к активации апоптоза можно рассматривать как пролиферативный ответ эпителия БУЖ на усиление клеточных потерь.

Сравнение значений экспрессии p53 и PCNA, а также возрастная динамика этих показателей свидетельствуют о том, что темпы нарастания апоптоза и пролиферации в эпителии БУЖ, характерные для зрелого возраста, снижаются и стабилизируются у мужчин в возрасте 61–74 лет. Эти данные контрастируют с имеющимися в литературе сведениями о значительном падении уровня андрогенизации мужского организма после 45 лет [4]. Ведь низкие концентрации тестостерона не способны сдерживать апоптоз клеток-мишеней и сохранять баланс между их гибелью и репродукцией. Возможно, что к выполнению этих функциональных задач подключаются локальные факторы регуляции тканевого гомеостаза, в частности эндокриноциты БУЖ, число которых увеличивается у мужчин 46–60 лет и становится максимальным в пожилом возрасте [1]. У стариков количество эндокриноцитов в железах не намного ниже, чем у пожилых мужчин [1], однако показатели экспрессии p53 и PCNA свидетельствуют об интенсификации клеточной гибели и нарушении баланса между пролиферацией и апоптозом. Эти изменения могут быть следствием глубокой андрогенной недостаточности, развивающейся в старческом возрасте [4], противостоять которой не способны локальные факторы.

Усиление пролиферации эпителиоцитов БУЖ с возрастом может рассматриваться в качестве компенсаторной реакции, направленной на поддержание тканевого гомеостаза. Однако подобные компенсаторные возможности оказываются недостаточными для предотвращения прогрессивного снижения объема паренхимы БУЖ по мере старения [2]. Можно полагать, что недостаток андрогенов блокирует процесс дифференцировки новообразованных клеток, побуждая их к гибели. Такое развитие событий возможно, по крайней мере, в БУЖ мужчин старше 60 лет, у которых повышение индекса PCNA в клетках внутримозговых протоков сопровождается отсутствием роста (у пожилых) или снижением (у стариков) этого показателя в glanduloцитах концевых отделов. Выявленная диспропорция свидетельствует, что размножение клеток в камбиальных зонах не приводит к адекватному увеличению их числа в зонах дифференцировки, возможно, вследствие потерь среди молодых эпителиоцитов, специализация которых не может реализоваться при дефиците эндокринных регуляторов.

Таким образом, возрастная динамика экспрессии белков p53 и PCNA свидетельствует об активации процессов пролиферации и апоптоза в эпителии БУЖ на фоне снижения уровня андрогенизации мужского организма при старении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боронихина Т.В. Возрастная динамика количества эндокринных клеток в бульбоуретральных железах человека. Вестник новых медицинских технологий, 2005, т. 12, № 3–4, с. 75–77.
2. Боронихина Т.В. и Яцковский А.Н. Морфометрический анализ возрастных изменений паренхимы бульбоуретральных желез человека. Омск. науч. вестн., 2004, приложение к вып. 26, с. 43–45.
3. Гундорова Л.В. Дифференциальная диагностика гиперпластических и опухолевых процессов предстательной железы (иммуногистохимическое и плоидометрическое исследование): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2005.
4. Теппермен Дж. и Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. М., Мир, 1989.
5. Чумаков П.М. Функция гена p53: выбор между жизнью и смертью. Биохимия, 2000, т. 65, № 1, с. 34–47.
6. Fitzpatrick J. Clinical perspective on apoptosis in the management of the BPH patient. The Prostate, 2000, Suppl. 9, p. 47–50.
7. Moormann J.G. Diseases of the bulbourethral gland (Cowper) in men. Urologe A, 1998, v. 37, № 4, p. 401–409.
8. Riva A., Usai E., Cossu M. et al. Ultrastructure of human bulbourethral glands and of their main excretory ducts. Arch. Androl., 1990, v. 24, № 2, p. 177–184.
9. Shivji M.K.K., Kenny M.K. and Wood R.D. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. Cell, 1992, v. 69, № 3, p. 367–374.

10. Sinowatz F., Amselgruber W., Plendl J. et al. Effects of hormones on the prostate in adult and aging men and animals. Microsc. Res. Tech., 1995, v. 30, № 4, p. 282–292.

Поступила в редакцию 10.12.2005 г.

DYNAMICS OF PROLIFERATION AND APOPTOSIS IN THE HUMAN BULBOURETHRAL GLANDS IN THE PROCESS OF AGING

T.V. Boronikhina and A.N. Yatskovskiy

The dynamics of the processes of proliferation and apoptosis in the epithelium of the bulbourethral glands in men aged 17–90 years was studied using monoclonal antibodies against PCNA and p53. Higher levels of cell reproduction and cell death were noted in the glandular duct epithelium as compared to those in secretory portions. Age-related increase in apoptosis which correlated with the activation of the glandular cell proliferation was shown. In old men, apoptosis in the bulbourethral glands was accompanied by the tendency to reduced cell proliferation. The correlation between the processes of cell reproduction and cell death in the epithelium of the bulbourethral glands, as well as their dependence on blood androgen levels, are discussed.

Key words: *bulbourethral glands, proliferation, apoptosis, aging.*

Department of Histology, Cytology and Embryology, I.M. Sechenov Moscow Medical Academy.

© Коллектив авторов, 2006
УДК 611.652:618:14.-006.36

Г.С. Данелия, М.В. Пайлодзе, М.А. Дгебуадзе и С.Г. Матиташвили*

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ЖЕЛТОГО ТЕЛА У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА В НОРМЕ И ПРИ МИОМЕ МАТКИ

Морфологическое отделение (руков. — академик Медико-биологической академии Грузии проф. Г.С.Данелия) Института перинатальной медицины, акушерства и гинекологии Грузии им. акад. К.В.Чачава и кафедра нормальной анатомии (зав. — академик Медицинской академии Грузии проф. Р.Г.Хецуриани) Тбилисского государственного медицинского университета

С помощью ультрасонографического (интравагинального цветового доплеровского картирования), лабораторного (содержание прогестерона и эстрогенов в периферической крови) и морфологического (гистологического, гистохимического и морфометрического) методов исследования изучено менструальное желтое тело в стадии расцвета у женщин репродуктивного возраста в норме и при пролиферативной миоме матки. Выявлено наличие неполноценного желтого тела при миоме матки, на что указывало преобладание мелких зернистых лютеоцитов, незначительное количество и неравномерное распределение липидных включений в их цитоплазме, резкое снижение содержания прогестерона в крови, анэхогенность, низкая степень васкуляризации, повышение значения индекса резистентности стромальных артерий яичников.

Ключевые слова: *яичник, желтое тело, миома матки.*

Изменчивость внешнего и внутреннего строения яичника в зависимости от возраста, циклической гормональной и репродуктивной активности женского организма во многом определяет неуклонный интерес исследователей к изучению структуры и эндокринных функций этого органа.

Желтое тело, временная добавочная эндокринная железа в составе яичника — один из его главных эндо-

кринных компонентов [2]. Строение желтого тела на различных стадиях его развития и сложные механизмы функциональной регуляции жизненного цикла этой структуры уточняются и по сегодняшний день.

У человека желтое тело синтезирует прогестерон, эстрогены, андрогены, а также другие вещества [2, 5]. Прогестерон синтезируется в лютеоцитах, которые имеют в основном происхождение из фоллику-

*E-mail — illusion_ia2001@yahoo.com