



РЕПАРАТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДА ВЕЗУГЕНА НА СТРУКТУРУ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ В МОДЕЛИ УСКОРЕННОГО СТАРЕНИЯ

**Г.А. Рыжак, Н.Н. Севостьянова
Т.В. Кветная, А.В. Трофимов
Н.С. Линькова, Е.А. Гусельников
Л.А. Грабежев, С.С. Коновалов**

*Санкт-Петербургский институт
биорегуляции и геронтологии
СЗО РАМН*

e-mail: m1ayy@yandex.ru

Патология желудочно-кишечного тракта нередко является одним из проявлений старения организма. Было показано, что синтетический пептид везуген восстанавливает структуру и повышает пролиферативную способность ткани двенадцатиперстной кишки крыс в модели ускоренного старения. Геропротекторное действие везугена связано с его способностью усиливать репаративный ангиогенез.

Ключевые слова: двенадцатиперстная кишка, ускоренное старение, пролиферация, пептиды.

Старение – сложный многоуровневый процесс, проявляющийся инволюцией различных органов и систем [1, 4, 5]. Важное место среди возрастных заболеваний занимает патология желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). При старении наблюдается уменьшение толщины слизистой оболочки ЖКТ, высоты и количества ворсинок, снижение числа эпителиальных клеток, их пролиферативной активности [2, 3].

По данным многочисленных исследований, пептидные биорегуляторы успешно используются для коррекции патологии органов нервной, иммунной и эндокринной систем, развивающейся у лиц старше 60 лет [6-8]. Однако влияние коротких пептидов на органы ЖКТ до сих пор изучено недостаточно.

В связи с этим целью настоящего исследования явилась оценка эффективности пептида везугена на морфофункциональное состояние двенадцатиперстной кишки крыс в модели ускоренного старения.

Материалы и методы исследования. Исследования проведены на 20 самцах крыс линии Вистар в возрасте 2,5 месяцев массой тела 140-150 г. Животные были разделены на 4 группы: 1 группа – контроль, 2 группа – γ -облучение, 3 группа – γ -облучение с последующим введением контрольного пептида хонлутена (H-Glu-Asp-Gly-OH) и 4 группа – γ -облучение с последующим введением опытного пептида везугена (H-Lys-Glu-Asp-OH).

Общее однократное облучение животных 2, 3 и 4 групп в дозе 7 Гр. выполнено на кобальтовом аппарате ЛУЧ при мощности 32 сГр/мин.

Исследуемые пептиды вводили животным внутрибрюшинно в дозе 20 нг/мл через 2 часа после облучения по 0,5 мкг в течение 5 дней. Крысам 1 группы по той же схеме вводили физраствор. Выделение двенадцатиперстной кишки проведено под нембуталовым наркозом на 7 сутки после облучения.

Кусочки двенадцатиперстной кишки объемом 1 см³ фиксировали и обезвоживали, а затем заключали в парафин. Срезы толщиной 3-5 мкм помещали на предметные стекла и окрашивали гематоксилином и эозином.

Изучение пролиферативной активности клеток двенадцатиперстной кишки методом иммуногистохимии проводили с применением мышиных моноклональных антител к маркеру пролиферации клеток PCNA (1:50, Dako) согласно стандартному протоколу.

Морфометрическую оценку данных выполняли на микроскопе Olimpus CX41 с цифровой камерой Nikon Coolpix 4500 с помощью системы анализа микроскопических изображений Analysis 5.0. Индекс пролиферации PCNA рассчитывали в процентах как отношение количественной плотности иммуноокрашенных ядер к количественной плотности ядер клеток, окрашенных гематоксилином. Статистическая обработка результатов выполнялась в программе Statistica 6,0.

Результаты исследования. В контрольной группе внешний вид и рельеф слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки и структурно-функциональные

комплексы «крипта-ворсинка» соответствовали норме (рис. 1). У контрольных животных ворсинки имели различную конфигурацию, но чаще встречалась пальцевидная и листовидная формы.

Основу ворсинок образовывала собственная пластинка слизистой оболочки, состоящая из рыхлой волокнистой соединительной ткани, здесь же располагались кровеносные и лимфатические капилляры, образующие микроциркуляторное русло, нервные волокна и их окончания. Подслизистая основа кишки состояла из волокнистой соединительной ткани, в которой располагались кровеносные сосуды и элементы подслизистого нервного сплетения.

Иммуноокрашивание на PCNA показало, что основная масса пролиферирующих клеток располагалась в криптах. По данным морфометрии, индекс пролиферативной активности составил $17 \pm 3\%$.



Рис. 1. Крипты двенадцатиперстной кишки крысы контрольной группы. Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 480$

Во 2 группе на 7 сутки после облучения рельеф слизистой оболочки практически полностью восстанавливался и мало отличался от контроля. Ворсинки сохраняли преимущественно пальцевидную и листовидную форму, однако их высота и плотность расположения были несколько снижены. В некоторых зонах глубина крипт была меньше, чем у интактных животных, а среди энтероцитов встречалось большое количество митозов. В криптальном эпителии были видны дегенеративно измененные ядра клеток.

Отчетливо был выражен отек подслизистой основы и собственной пластинки слизистой (рис. 2). Пластинка слизистой выглядела тоньше, чем у контрольных животных, при явном снижении ее клеточности, при этом число лимфоцитов резко снижалось. Местами на апикальной поверхности ворсинок была видна экструзия эпителиального пласта. Пролиферативная активность эпителиоцитов достоверно возросла по сравнению с контрольной группой и составила $22 \pm 1\%$ ($p < 0,05$).

В 3 группе гистоархитектоника слизистой оболочки животных характеризовалась выраженными дистрофическими изменениями. Высота и плотность расположения ворсинок была несколько снижена относительно 2 группы. Обращало на себя внимание паретическое расширение крупных сосудов и капилляров в подслизистой основе и собственной пластинке слизистой с формированием периваскулярного, и по сравнению со 2 группой в эпителии крипт чаще встречались дистрофически измененные пухляковидные ядра энтероцитов.

У двух крыс 3 группы снижалась интенсивность иммуноокрашивания ядер клеток на PCNA, однако в целом существенных изменений в значении индексе PCNA по сравнению со 2 группой зарегистрировано не было.



Рис. 2. Отек подслизистой основы двенадцатиперстной кишки после γ -облучения (2 группа).
Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 480$

В 4 группе по структурно-функциональному комплексу «крипта – ворсинка» слизистая оболочка двенадцатиперстной кишки не отличалась от контроля (рис. 3). Крипты имели правильное строение, в них верифицировались многочисленные делящиеся клетки. Восстанавливался клеточный состав собственной пластинки. Под действием везугена происходила нормализация структуры микроциркуляторного русла, подслизистой основы и нервных ганглиев и нивелировались признаки вазогенного отека.

Индекс пролиферативной активности по PCNA был достоверно выше по сравнению со всеми остальными группами и составил $25 \pm 1\%$ ($p < 0,05$).



Рис. 3. Восстановление структуры крипт двенадцатиперстной кишки после γ -облучения и введения везугена (4 группа). Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 480$

Заключение. Полученные данные показали, что облучение вызывает ряд патологических процессов в двенадцатиперстной кишке, которые выражаются в деструкции сосудистого русла, отеке, снижении клеточности и изменении структуры ядер эпителиоцитов. Все перечисленные изменения на тканевом и клеточном уровнях сходны с проявлениями естественной инволюции кишечника при старении.

В исследуемой модели ускоренного старения эффекты пептидов определяются их тканеспецифичностью. Так, контрольный пептид хонлутен, имеющий сродство к тканям дыхательной системы, не вызывал репарации тканей двенадцатиперстной

кишки после облучения, а в некоторых случаях даже способствовал замедлению их восстановления. Однако под действием везугена, основой для создания которого послужила сосудистая ткань, наблюдалось выраженное усиление пролиферации кишечного эпителия, при этом патология сосудистого русла, индуцированная облучением, полностью отсутствовала. Вероятно, синтетический пептид везуген, оказывая тканеспецифическое действие на сосудистое русло и, тем самым, улучшая трофику двенадцатиперстной кишки, способствовал активации в ней пролиферативных процессов.

Полученные результаты открывают перспективы для применения везугена в качестве геропротекторного средства, стимулирующего кровоснабжение органов ЖКТ при его возрастной инволюции.

Литература

1. Анисимов, В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения / В.Н. Анисимов – СПб., 2008. – 434 с.
2. Валенкевич, Л.Н. Болезни органов пищеварения: руководство по гестроэнтерологии для врачей / Л.Н. Валенкевич, О.И. Яхонтова. – СПб.: Деан, 2006. – 656 с.
3. Трофимов, А.В. Нейроэндокринные клетки желудочно-кишечного тракта в моделях преждевременного старения / А.В. Трофимов, И.В. Князькин, И.М. Кветной. – СПб.: Деан, 2005. – 208 с.
4. Трофимов, А.В. Функциональная морфология старения / А.В. Трофимов // Успехи геронтол. – 2009. – Т.22. – № 3. – С. 401-408.
5. Хавинсон, В.Х. Возрастная инволюция органов и тканей / В.Х. Хавинсон (и др.) // Успехи физиол. наук. – 2003. – Т. 34. – № 1. – С. 79-92.
6. Хавинсон, В.Х. Пептидная регуляция старения / В.Х. Хавинсон. – СПб.: Наука, 2009. – 50 с.
7. Хавинсон, В.Х. Пептидная регуляция старения: 35-летний опыт исследований / В.Х. Хавинсон, В.Н. Анисимов // Бюлл. экп. биол. и мед. – 2009. – Т. 148. – № 7. – С. 108-113.
8. Anisimov, V.N. Peptide bioregulation of aging: results and prospects / V.N. Anisimov, V.Kh. Khavinson // Biogerontology. – 2010. – Vol. 11. – P. 139-149.

REPARATIVE EFFECT OF PEPTIDE – VESUGEN ON DUODENAL STRUCTURE IN ACCELERATED AGEING

**G.A. Ryzhak, N.N. Sevostianova,
T.V. Kvetnaya, A.V. Trofimov,
N.S. Linkova, E.A. Guselnikova,
L.A. Grabezhev, S.S. Konovalov**

*Institute of bioregulation
and gerontology,
Russian Academy
of Medical Sciences
Saint-Petersburg*

e-mail: miayy@yandex.ru

One of manifestation of ageing is pathology of gastrointestinal tract. Synthetic peptide vesugen has geroprotective effect at rat's duodenum in model of accelerated ageing. This effect was connected with reparation of bloodstream and increase proliferative epithelial cells of duodenum.

Key words: duodenum, accelerated ageing, proliferation, peptides.