

УДК 616.858-07:616.831.541-091.8

МЕЛАТОНИН В БУККАЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ – МАРКЕР СТАРЕНИЯ И СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИИ

У.Ф. Гашимова¹, И.М. Кветной², В.О. Полякова², Ю.С. Крылова², Х.М. Сафиханова¹,
С.И. Гусейнова¹, Н.Р. Багирова¹, И.З. Галандарли¹, А.М. Гаджиев¹

(Представлено академиком НАНА И.М. Гусейновой)

В работе изучались возрастные особенности экспрессии мелатонина (МТ) у лиц без сердечно-сосудистой патологии (ССП) и больных артериальной гипертензией (АГ) неинвазивным методом с использованием буккального эпителия (БЭ). Мазки БЭ анализировались с помощью методов иммуноцитохимии, иммунофлуоресцентной микроскопии, а также морфометрии. Исследование проводилось в 3 возрастных группах: 1-я возрастная группа состояла из лиц молодого и среднего возраста (25-59 лет), 2-я – пожилых и старых людей (60-89 лет), а 3-я группа из долгожителей (90 лет и старше). Установлено, что экспрессия МТ в БЭ с возрастом снижается в 2-4,5 раза. Выявлено, что этот процесс более выражен у больных АГ по сравнению с лицами без ССП. Анализ уровня МТ в БЭ является перспективным неинвазивным методом оценки скорости старения и эффективности лечения АГ у лиц разного возраста.

Ключевые слова: мелатонин, буккальный эпителий, артериальная гипертензия, старение

Введение

Старение организмов – это биологический процесс постепенной деградации частей и систем организма, а также последствия этого процесса. Процесс старения – это процесс сложный, постепенный, зависящий от многих биологических факторов. Старение контролируется генетическими факторами и биологическими процессами. Понимание причин старения: как оно действует на живые организмы, и какие факторы влияют на продолжительность жизни – является первым шагом для разработки способов замедления этого естественного процесса и увеличения продолжительности жизни. Многочисленные исследования в этом направлении предполагают, что старение и возрастные заболевания могут быть связаны со снижением синтеза пинеального и экстрапинеального мелатонина (МТ) [1,2]. Снижение пиков секреции МТ у человека можно выявить по мере старения, что влечет многочисленные последствия для нейроэндокринной системы, главным образом в связи с репродуктивными функциями и реакци-

ями на стресс, а также для иммунной системы, канцерогенеза и регуляции циркадианных ритмов. В организме человека мелатонин синтезируется из аминокислоты триптофана, которая участвует в синтезе нейромедиатора (нейропередатчика) серотонина, а он, в свою очередь, под воздействием фермента N-ацетилтрансферазы превращается в мелатонин. Мелатонин является индольным производным серотонина и синтезируется ночью ферментами N-ацетилтрансферазой и гидроксиндол-О-метилтрансферазой. МТ участвует практически во всех физиологических процессах в человеческом организме, контролируя основные его функции: сон, деятельность эндокринной системы, системы кровообращения и иммунитета. Постоянно появляются новые научные данные, свидетельствующие о многогранности его влияния на живой организм животных и человека. Известно, что МТ регулирует циркадные ритмы клеток, органов и тканей, а также функции иммунной, сердечно-сосудистой, антиоксидантной и других систем [3,4]. Сердечно-сосудистая патология в

целом и артериальная гипертензия (АГ) в частности рассматриваются как возрастные заболевания, и было показано, что МТ эффективен в комплексном лечении больных АГ [5,6].

Наличие циркадианной ритмики артериального и центрального венозного давления у людей свидетельствует об участии мелатонина и в регуляции функций сердечно-сосудистой системы. В пользу этого говорит также присутствие рецепторов к мелатонину в мышечном слое и эндотелии сосудов. В экспериментах на животных выявлено, что пинеалэктомия приводит к стойкому повышению артериального давления, уровень которого снижается до нормальных значений при экзогенном введении мелатонина [7].

В литературе имеются данные, наглядно показывающие, что АГ приводит к нарушению клеточного метаболизма, в частности к митохондриальной дисфункции. МТ обладает антиоксидантным действием и может нормализовать функцию митохондрий. Одним из звеньев в цепи патогенеза АГ является дисбаланс в ренин-ангиотензиновой системе, функции которой также поддерживаются МТ [8].

Известно, что некоторые регионы Азербайджана характеризуются повышенной концентрацией долгожителей [9]. Этот факт представляет научно-практический интерес и требует более тщательного и детального изучения. Понимание особенностей нейроиммuno-эндокринологической организации долгожителей является важным и необходимым инструментом в столь актуальном вопросе продления жизни людей.

В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования является изучение особенностей проявления (секреции) МТ в буккальном эпителии у жителей Ленкоранского района, который является одним из регионов с повышенным индексом долгожителей в Азербайджане (см.[https:// www.trend.az/ azerbaijan/ society/3287527.html](https://www.trend.az/azerbaijan/society/3287527.html)) - у лиц без сердечно-сосудистой патологии и у больных АГ.

Материалы и методы

Изменения функциональной активности буккальных эпителиоцитов в значительной степени отражают состояние локального и системного гомеостаза или его нарушение при патологических состояниях и старении [10,11]. Поэтому для проведения данного исследования был выбран БЭ. Для исследования были выбраны жители района Ленкорань (Азербайджан). Выборки БЭ были разделены на следующие возрастные группы: 1 – лица молодого и среднего возраста (25-59 лет, средний возраст $45,3 \pm 4,3$ года), 2-лица пожилого и старческого возраста (60-89 лет, средний возраст $68,6 \pm 3,9$ года), 3 – долгожители (90 лет и старше, средний возраст $92,1 \pm 1,7$ года). Каждая группа была разделена на две подгруппы: лица без сердечно - сосудистой патологии и других соматических заболеваний в стадии обострения ("норма") и пациенты с АГ первой и второй степени. Средний возраст больных АГ и таковой в "нормальной " подгруппе в пределах одной возрастной группы достоверно не различались.

Все пациенты или их родственники дали информированное согласие на участие в исследовании. Во время исследования все участники получали стандартное питание и оставались в свободном режиме с обычным уровнем физической активности. Исследование проводилось в конце осени и начале зимы. Образцы БЭ отбирали из полости рта (слизистой оболочки щек) не ранее чем через 4 часа после еды, после полоскания рта физиологическим раствором. Образцы БЭ отбирали с помощью стерильных полиэфирных тампонов-палочек, затем их тестовые части отрезали и помещали в одноразовые пробирки Эппендорфа с транспортной средой (изотоническим водным физиологическим раствором с консервантом).

Клеточные мазки готовились методом жидкостной цитологии с использованием автоматизированной системы Novoprep NRS (Франция). Иммуностатирование препаратов БЭ проводили по стандартному протоколу с использованием первичных антител к МТ

(1:75, abcam, США). В качестве вторичных антител мы использовали антитела, конъюгированные с флуорофорами (Abcam, США). Ядра клеток были окрашены с помощью Hoechst 33258 (Sigma, США). Полученные препараты исследовали с помощью инвертированного микроскопа Olympus Fluoview CM FV300-IX70. Для оценки результатов иммуноцитохимического окрашивания проводили морфометрическое исследование с использованием системы анализа изображений микроскопа, состоящей из микроскопа Olympus Fluoview CM FV300-IX70, цифровой камеры Olympus, персонального компьютера IntelPentium 5 и программного обеспечения Videotest Morphology 5.2. В каждом случае было проанализировано пять полей зрения. Площадь экспрессии рассчитывали в процентах от площади иммунопозитивных клеток и общей площади клеток в поле зрения.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения SPSS Statistics 17.0. Характер распределения определялся с помощью критерия Шапиро-Уилка. Различия между выборками оценивались с помощью параметрического t-критерия Стьюдента (при нормальном распределении данных) и непараметрического U-критерия Манна-Уитни (при отсутствии нормального распределения данных). Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (при отсутствии значимых различий) принимался равным 0,01.

Результаты и обсуждение

Изучение экспрессии (площадей иммуноцитохимически окрашенных областей) МТ в БЭ у лиц разного возраста без сердечно-сосудистой патологии и с АГ показало что, площадь экспрессии МТ в БЭ у лиц пожилого и старческого возраста без сердечно-сосудистой патологии была в 2,08 раза ниже по сравнению с таковой у лиц молодого и среднего возраста. Площадь экспрессии МТ в БЭ у долгожителей в "нормальной" группе была в

4,33 раза ниже по сравнению с пожилыми и старыми людьми (см. рис.).

У больных АГ молодого, среднего, пожилого и старческого возраста площадь экспрессии МТ в БЭ была в 2,4 и 2,74 раза ниже по сравнению с таковой у лиц аналогичного возраста в "нормальной" группе. Площадь экспрессии МТ в БЭ статистически не различалась у долгоживущих лиц без сердечно-сосудистой патологии и с АГ. Площадь экспрессии МТ в БЭ у пожилых, старых и долгоживущих пациентов с АГ была в 2,27 и 4,5 раза ниже по сравнению с таковой у пациентов молодого и среднего возраста с АГ.

Проведенные исследования показали, что у лиц пожилого и старческого возраста без сердечно-сосудистой патологии экспрессия МТ в БЭ снижается в 2 раза по сравнению с лицами молодого и среднего возраста. Эти данные согласуются с сообщением о возрастном снижении МТ в крови [12] и выведение его метаболита 6-сульфатоксимелатонина с мочой [13]. Отсутствие снижения экспрессии МТ в БЭ у долгожителей без сердечно-сосудистой патологии свидетельствует о сохранении нормального уровня синтеза МТ в эпифизе и экстраэпифизарных тканях. Высокая продолжительность жизни лиц этой группы может быть связана с локальными и системными геропротекторными эффектами МТ. У больных АГ 25-94 лет экспрессия МТ в БЭ была в 2,1–2,4 раза ниже по сравнению с лицами без сердечно-сосудистой патологии. У пожилых, старых и долгоживущих лиц с АГ экспрессия МТ в БЭ была в 2,3–4,5 раза ниже по сравнению с пациентами молодого и среднего возраста с этой патологией. Можно предположить, что снижение синтеза МТ коррелирует с развитием АГ, и эта корреляция с возрастом становится еще сильнее. Это предположение подтверждается тем фактом, что МТ регулирует функции ренин-ангиотензиновой системы, участвующей в поддержании физиологических значений артериального давления [9].

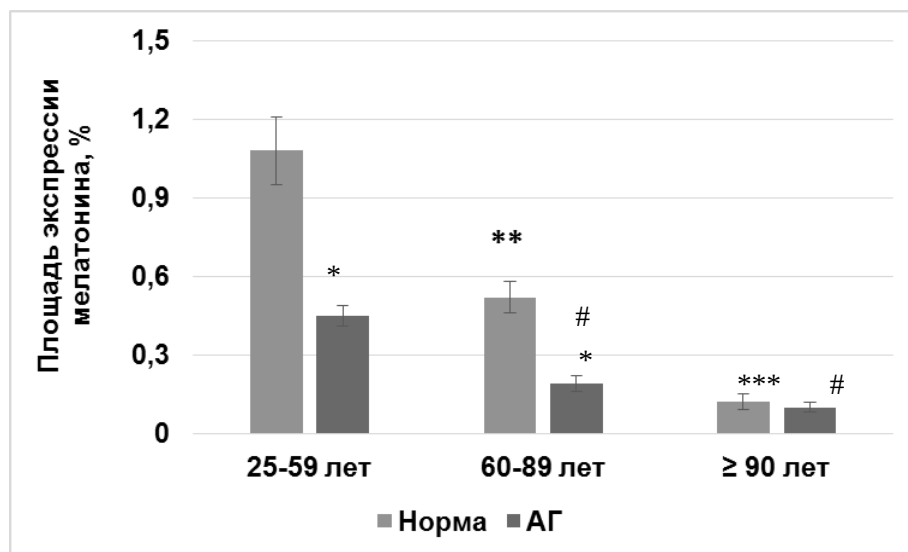


Рис. Экспрессия мелатонина в буккальном эпителии у здоровых лиц (норма) и у больных артериальной гипертензией (АГ) разного возраста

* - $p < 0,01$ по сравнению с соответствующей контрольной возрастной группой

** - $p < 0,01$ по сравнению с контрольной "нормальной" группой для лиц 25-59 лет

*** - $p < 0,01$ по сравнению с контрольной "нормальной" группой для лиц 60-89 лет.

- $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой у больных артериальной гипертензией 25-59 лет

Из литературных данных следует, что МТ является перспективным геро- и онкопротектором [14,15]. Если рассматривать эти сигнальные молекулы как потенциальные мишени для медикаментозного лечения, то следует предположить, что их экспрессия должна отражать эффективность лечения соматической патологии. В связи с этим наши данные могут отражать такую возможность: мы наблюдали снижение экспрессии МТ в БЭ у больных АГ и снижение экспрессии МТ с возрастом. В заключение следует отметить, что неинвазивная оценка экспрессии мелатонина в БЭ у людей пожилого возраста является исследованием, которое позволяет нам оценить особенности синтеза экстраэпифизарного мелатонина. Следует отметить, что это исследование позволяет провести оценку темпа старения и функционального состояния организма. Наряду с этим, наши данные позволяют использовать анализ экспрессии мелатонина в БЭ для интегральной оценки биоритмов организма у людей пожилого возраста, что подтверждает ранее высказанные гипотезы о применении БЭ при многих диагностиче-

ских исследованиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда развития науки при Президенте Азербайджанской Республики (грант №EIF-BGM-4-RFTF-1/2017-21/19/3) и РФФИ (грант Аз_а 18-54-060-12).

ЛИТЕРАТУРА

1. Kvetnoy I.M. Extrapineal melatonin in pathology: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of illness // *Neuro Endocrinol Lett.*, 2002, 23 Suppl 1:92-96.
2. Reiter R.J., Ma Q., Sharma R. Melatonin in Mitochondria: Mitigating Clear and Present Dangers // *Physiology (Bethesda)*. 2020, 35(2):86-95.doi: 10.1152/physiol.00034.2019.
3. Polyakova V.O., Kvetnoy I.M., Anderson G. et al. Reciprocal Interactions of Mitochondria and the Neuroimmunoenocrine System in Neurodegenerative Disorders: An Important Role for Melatonin Regulation // *Frontiers in Physiology*. 2018, vol. 9(199), pp.1-13. doi: 10.3389/fphys.2018.00199.
4. Paltsev M.A., Polyakova V.O., Kvetnoy I.M. et al. Morphofunctional and signaling molecules overlap of pineal gland and thymus: role and significance in aging // *Oncotarget*, 2016, vol. 7, N11, p. 11972-11983
5. Hardeland R. Aging, Melatonin, and the Pro- and Anti-Inflammatory Networks // *Int J Mol Sci*. 2019; 20(5). pii: E1223. doi: 10.3390/ijms20051223.

6. Nedogoda S.V., Smirnova V.O., Barykina I.N. et al. Effects of melatonin on blood pressure, endothelial function and vascular stiffness in patients with metabolic syndrome and sleep disorders // "Arterial'naya Gipertenziya" ("Arterial Hypertension"). 2017; 23(2):150-159. (in russian.) <https://doi.org/10.18705/1607-419X-2017-23-2-150-159>
7. Ранонопт С.И., Голиченков В.А. Мелатонин: теория и практика. М.: Medpraktika, 2009, 99 стр.
8. Baltatu O.C., Amaral F.G., Campos L.A., Cipolla-Neto J. Melatonin, mitochondria and hypertension // Cell Mol Life Sci., 2017, 74(21): 3955-3964.
9. Козлов В.И. Долгожительство в Азербайджане. Сборник научных трудов. М.: Наука, 1989 г. - 186 с.
10. Ebersole JL, Orraca L, Novak MJ et al. Comparative Analysis of Gene Expression Patterns for Oral Epithelium-Related Functions with Aging // Adv Exp Med Biol. 2019;1197:143-163. doi: 10.1007/978-3-030-28524-1_11;
11. Wael Youssef E. Age-Dependent Differential Expression of Apoptotic Markers in Rat Oral Mucosa // Asian Pac J Cancer Prev. 2018, 19(11):3245-3250.
12. Nanzadsuren T., Myatav T., Dorjkhoo A., Byamba K. Association between serum melatonin and skin aging in an urban population of Mongolia // J Cosmet Dermatol. 2019. doi: 10.1111/jocd.13166
13. Zuev VA, Trifonov NI, Linkova NS, Kvetnaia TV. Melatonin as a molecular marker of age-related pathologies // Adv Gerontology, 2017, 30(1):62-69.
14. Anisimov V.N., Popovich IG, Zabezhinski et al. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen // Biochim Biophys Acta, 2006, 1757(5-6):573-589.
15. Gu H, Shen Q, Mei D et al. Melatonin Inhibits TE-1 Esophageal Cancer Cells Metastasis by Suppressing the NF-κB Signaling Pathway and Decreasing MMP-9 // Ann Clin Lab Sci., 2020, 50(1):65-72.

¹Институт физиологии им. акад. Абдуллы Караева НАНА
²ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», РФ, Санкт-Петербург
 ahmed.hajiyev@yandex.com

BUKKAL EPİTELİDƏ MELATONİN QOCALMANIN VƏ ÜRƏK-DAMAR PATOLOGİYASININ MARKERİDİR

U.F. Həşimova, İ.M. Kvetnoy, V.O. Polyakova, Yu.S. Krılova, X.M. Səfixanova, S.İ. Hüseynova,
 N.R. Bağirova, İ.Z. Qələndərli, Ə.M. Hacıyev

İşdə ürək-damar patologiyası (ÜDP) olmayan və arterial hipertenziyası (AH) olan insanlarda melatoninin (MT) ekspressiyasının yaş xüsusiyyətləri bukkal epiteli (BE) nümunələrindən istifadə edən qeyri-invaziv üsulla öyrənilmişdir. BE yaxmalarının analizi immunositokimya, immunofluorescent mikroskopiya və morfometriya metodları ilə həyata keçirilmişdir. 3 yaş qrupunda tədqiqat aparılmışdır: 1-ci yaş qrupu gənc və orta yaşlı şəxslər (25-59 yaş), 2-ci yaş qrupu – ahıl və qoca yaşlılar (60-89 yaş), 3-cü qrup isə uzunömürlülərdən (90 yaş və yuxarı) ibarət olmuşdur. Müəyyən edilmişdir ki, BE-də melatoninin ekspressiya sahəsi müxtəlif yaş qruplarında 2-4,5 dəfəyə qədər azalır. Belə dəyişmənin AH xəstələrində ÜDP olmayan şəxslərlə müqayisədə daha ifadəli olduğu aşkar edilmişdir. BE-də MT səviyyəsinin təyini və təhlili qocalma tempinin qiymətləndirilməsi və müxtəlif yaşlarda AH müalicəsinin effektivliyini qiymətləndirmək üçün perspektivli qeyri-invaziv üsul kimi baxıla bilər.

Açar sözlər: melatonin, bukkal epiteli, arterial hipertenziya, qocalma

MELATONIN IN THE BUCCAL EPITHELIUM – A MARKER OF AGING AND CARDIOVASCULAR PATHOLOGY

U.F. Hashimova, I.M. Kvetnoy, V.O. Polyakova, Yu.S. Krylova, Kh.M. Safikhanova, S.I. Huseynova,
 N.R. Bagirova, I.Z. Galandarli, A.M. Gadzhiev

The presented paper explores the age-related peculiarities of melatonin (MT) expression in individuals without cardiovascular pathology (CVP) and patients with arterial hypertension (AH) by non-invasive method using buccal epithelium (BE). Immunocytochemical methods and immunofluorescence microscopy, as well as morphometry were used for the analysis of buccal epithelial smear. The study was performed in 3 age groups: young and middle-aged (25-59 years), elderly and senile-aged (60-89 years), and long-livers (90 years and over). It was found that the expression of MT in BE decreases 2-4,5 times with age and this process is more pronounced in patients with AH compared to those without CVP. Analysis of the level of MT in BE is a promising non-invasive method for assessing the rate of aging and the effectiveness of treatment of AH in individuals of different ages.

Keywords: melatonin, buccal epithelium, arterial hypertension, aging