

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 612-79.015,112.67,577,112.853

© Коллектив авторов

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ В КОЖЕ У ЖЕНЩИН

А.Н. Зимницкий¹, С.А. Башкатов², Е.Г. Петренко², С.Б. Хуснутдинова²

¹ОАО НПП "Жеспар-Биос", г. Москва,
125040, Москва, Ленинградский пр., 14, стр.1;
тел./факс: (095)212-63-02, (095)214-59-34; эл.почта: plazan@ufacom.ru

²Институт нефтехимии и катализа АН РБ и УНЦ РАН, г. Уфа
450075, Уфа, пр. Октября, 141

Исследовали 50 (посмертных) образцов кожи женщин в возрасте от 15 до 90 лет. Проведенные исследования позволили заключить, что показатели содержания в коже белка и ДНК достаточно стабильны и не изменяются со временем. В то же время, с возрастом в коже женщин уменьшается уровень гликозаминогликанов (ГАГ) в соответствии с уравнением линейной регрессии: $\text{возраст} = -0,3578 \cdot \text{ГАГ} + 100,1562$.

Выявленные закономерности, на наш взгляд, представляют интерес для медицинской геронтологии в части анализа соответствия паспортного возраста биологическому, а также для косметологии в качестве объективного критерия применения технологий, улучшающих тургор, эластичность и внешний вид кожных покровов.

Ключевые слова: Возрастные изменения, кожа, протеогликаны, гликозаминогликаны, ДНК, белок, геронтология

ВВЕДЕНИЕ. Протеогликаны (ПГ) являются одним из основных компонентов межклеточного матрикса. Это - высокомолекулярные агрегаты, состоящие из гликозаминогликановых субъединиц и белкового кора, объединенных трисахаридным звеном. Они обеспечивают механические и барьерные свойства тканей, их тургор, участвуют в обмене воды и солей, выполняют ряд других важных функций [1]. При этом главная функциональная нагрузка ложится на высокозаряженные гликозаминогликаны (ГАГ), функционирующие по ионообменному механизму и представляющие собой линейные полимеры, содержащие многократно повторяющийся дисахаридный фрагмент, представленный гексуроновой кислотой и гексозамином, соединенными О-гликозидными связями. В настоящее время выделяют три основных класса ГАГ, содержащих гексуроновые кислоты - несulfатированную гиалуроновую кислоту и sulfатированные хондроитин- и гепарансulfаты.

В коже человека с возрастом отмечаются морфологические и физиологические изменения, позволяющие предположить наличие изменений в содержании ГАГ. Так, уменьшается степень гидратации, наблюдаются дряблость, пастозность, снижаются эластичность и механическая прочность кожи [2, 3].

Рядом авторов [4] в свое время было показано, что средние значения содержания в коже некоторых классов ГАГ у лиц молодого возраста меньше, чем

ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНЫ КОЖИ ЖЕНЩИН

у пожилых людей. В доступной современной литературе мы не нашли аргументированных сведений о причинной зависимости между возрастом и концентрацией ГАГ в коже. На наш взгляд, для понимания механизмов старения не меньшего внимания заслуживает оценка возрастных изменений содержания в коже белка и нуклеиновых кислот.

В современной косметологии накопился достаточно большой объем сведений эмпирического характера, позволяющих предлагать определенные технологии улучшения состояния кожи, однако не вызывает сомнений необходимость проведения фундаментальных исследований для их естественно-научного обоснования.

В связи с изложенным, целью настоящего исследования явилось изучение функциональной зависимости между возрастом и содержанием в коже женщин, белка и ДНК.

МЕТОДИКА. Исследовали 50 посмертных образцов кожи женщин в возрасте от 15 до 90 лет. Образцы весом 0,5-1,0 г консервировали в системе этиловый спирт : глицерин в соотношении 1:1, хранили при 4°C. Перед проведением исследований образцы подвергали щелочному гидролизу 2М NaOH в течение 1 часа при 60°C, нейтрализовали и определяли общий белок по Лоури. В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали человеческий сывороточный альбумин после щелочного гидролиза, проведенного в тех же условиях, что и у экспериментальных образцов. Далее проводили гелефильтрацию на сефадексе G-25 для отделения биополимеров, которые затем подвергали анионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе. Фракционирование производили дистиллированной водой и растворами хлорида натрия возрастающей молярности (0,15, 0,5 и 2,0 М). В водной и 0,15 М фракции спектрофотометрически определяли ДНК, в 0,5 М и 2,0 М фракциях - ГАГ по методу Дише. Статистическую обработку полученных данных производили с помощью пакета программ STATISTICA 6.0 для Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Сводные результаты по основным обследованным группам представлены в таблице 1. В соответствии с классификациями, принятыми в геронтологии и возрастной психологии, мы достаточно условно распределили данные по возрастным градациям: 40-50 (зрелость), 50-60 лет (кризис зрелости), 60-70 лет (пожилой возраст), 70-80 лет (ранняя старость) и 80-90 лет (поздняя старость). Помимо содержания белка, ГАГ, ДНК приведены коэффициенты ДНК/белок, ГАГ/белок и ГАГ/ДНК.

Таблица 1. Биохимические показатели кожи женщин старше сорока лет

Показатель	40-50 лет	50-60 лет	60-70 лет	70-80 лет	80-90 лет
Белок, мг/г ткани	107,40±36,96 n=7	93,05±33,15 n=9	94,90±41,22 n=6	83,33±14,05 n=7	97,89±48,91 n=7
ДНК, мкг/г ткани	464,42±162,77 n=5	500,02±404,27 n=7	603,10±224,34 n=5	508,53±182,62 n=4	615,67±195,27 n=5
ДНК/белок	4,32±1,50 n=5	5,37±3,13 n=7	6,36±2,56 n=5	6,10±1,10 n=4	6,29±2,57 n=5
ГАГ, мкг/г ткани	178,91±39,54 n=7	145,96±61,18 n=9	100,13±40,62 n=6	91,91±28,87 n=7	44,72±27,19 n=5
ГАГ/белок	1,67±0,47 n=7	1,57±0,61 n=9	1,06±0,45 n=6	1,10±0,27 n=7	0,47±0,26 n=5
ГАГ/ДНК	0,39±0,11 n=5	0,29±0,18 n=7	0,17±0,07 n=5	0,18±0,06 n=4	0,07±0,03 n=5

Из данных, представленных в таблице 1, следует, что с возрастом содержание ГАГ в коже достоверно уменьшается со 178,91±39,54 до 44,72±27,19, то есть в 4,0 раза. Уровень белка и ДНК в коже с возрастом статистически достоверно не изменялся.

Сравнение средних значений содержания ГАГ (на г ткани) по t-тесту Стьюдента выявило шесть значимых различий между всеми возрастными группами (табл. 2). При использовании в качестве показателя коэффициента ГАГ/белок количество статистически достоверных различий средних значений

Таблица 2. Матрица значений вероятностей (p) статистических различий средних значений содержания ГАГ (на грамм ткани) в возрастных группах по t-тесту Стьюдента

	40-50 лет	50-60 лет	60-70 лет	70-80 лет	80-90 лет
40-50 лет	*	*	*	*	*
50-60 лет	0,172841	*	*	*	*
60-70 лет	0,00317	0,067237	*	*	*
70-80 лет	0,000564	0,008622	0,664586	*	*
80-90 лет	0,000988	0,002707	0,045947	0,067703	*

Примечание: здесь и в таблицах 3,4 жирным шрифтом выделены статистически достоверные различия между средними значениями.

существенно уменьшалось (до двух) и они были менее сильными (табл. 3), что, очевидно, обусловлено варьированием уровня белка в образцах. Аналогичные результаты получены при статистической обработке коэффициентов ГАГ/ДНК (табл. 4): только два статистически значимых различия средних на уровне $p < 0,05$. По-видимому, как и в случае коэффициента ГАГ/белок, причиной снижения различий между группами явилось варьирование уровня ДНК в тканях.

Таблица 3. Матрица значений вероятностей (p) статистических различий средних значений содержания ГАГ (на мг белка) в возрастных группах по t-тесту Стьюдента

	40-50 лет	50-60 лет	60-70 лет	70-80 лет	80-90 лет
40-50 лет	*	*	*	*	*
50-60 лет	0,83713	*	*	*	*
60-70 лет	0,266699	0,138324	*	*	*
70-80 лет	0,139444	0,0221	0,394251	*	*
80-90 лет	0,081479	0,031992	0,201094	0,509087	*

Таблица 4. Матрица значений вероятностей (p) статистических различий средних значений содержания ГАГ (на мкг ДНК) в возрастных группах по t-тесту Стьюдента

	40-50 лет	50-60 лет	60-70 лет	70-80 лет	80-90 лет
40-50 лет	*	*	*	*	*
50-60 лет	0,874248	*	*	*	*
60-70 лет	0,102331	0,025559	*	*	*
70-80 лет	0,102435	0,037978	0,923371	*	*
80-90 лет	0,103859	0,077211	0,895145	0,85395	*

Корреляционный анализ между исследованными переменными показал наличие сильной отрицательной корреляционной связи между возрастом и уровнем ГАГ. Корреляции отсутствовали между возрастом, белком и ДНК. Введение в корреляционный анализ коэффициентов ГАГ/ДНК и ГАГ/белок уменьшало силу корреляционных связей до средней и умеренной соответственно (табл. 5). Также в таблице 5 приведены "технические" корреляции между ГАГ и содержащими ГАГ коэффициентами, обусловленные корреляцией ГАГ - ГАГ, равной 1,0. Той же причиной обусловлены достоверные "технические" корреляции между белком и содержащим его коэффициентом, а также между ДНК и ее коэффициентом.

Для доказательства влияния возраста на уровень ГАГ в коже женщин нами был проведен дисперсионный анализ (однофакторный), подтвердивший на высоком уровне значимости ($p < 0,001$) эту зависимость (табл. 6).

Для доказательства значимого влияния именно возраста на содержание ГАГ мы провели факторный анализ (табл. 7). Фактор-1 значимо коррелировал с возрастом, ГАГ и показателями, включающими ГАГ, и не коррелировал с белком и ДНК. Фактор-2 был связан с белком, а Фактор-3 - с ДНК. Таким образом, можно констатировать наличие не просто статистической, но и функциональной связи между возрастом и содержанием ГАГ в коже женщин. Полученные результаты также свидетельствуют об отсутствии статистических связей между самими

ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНЫ КОЖИ ЖЕНЩИН

Таблица 5. Матрица интеркорреляций между показателями возраста, содержания гликозаминогликанов, белка, ДНК, коэффициентами ГАГ/белок и ГАГ/ДНК в коже у женщин

	возраст	белок	ГАГ	ДНК	ГАГ/белок	ГАГ/ДНК
возраст	1,0000	*	*	*	*	*
белок	-0,1672	1,0000	*	*	*	*
ГАГ	-0,72067	0,321814	1,0000	*	*	*
ДНК	0,078209	0,007034	0,250508	1,0000	*	*
ГАГ/белок	-0,43035	-0,57854	0,525311	0,207664	1,0000	*
ГАГ/ДНК	-0,63149	0,165801	0,632474	-0,5446	0,366796	1,0000

Примечание: жирным шрифтом выделены статистически достоверные корреляционные связи (n=24); Для n=24 г критическое равно 0,4 (для p=0,05) и 0,52 (для p=0,01).

Таблица 6. Результаты дисперсионного анализа (однофакторного) влияния возраста на содержание ГАГ в коже у женщин

Эффект	SS	Degr. of	MS	F	p
Отрезок	275671,8	1	275671,8	303,0490	0,000413
Возраст	22812,6	20	1140,6	1,2539	0,490292
Ошибка	2729,0	3	909,7		

Таблица 7. Факторный анализ биохимических и возрастных показателей кожи женщин

Переменная	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3
Возраст	0,873062	-0,070990	-0,070571
Белок	-0,123527	0,797996	0,571742
ГАГ	-0,892185	-0,027061	0,399616
ДНК	0,101993	-0,557284	0,818736
ГАГ/белок	-0,628307	-0,737944	-0,163974
ГАГ/ДНК	-0,842360	0,321011	-0,358799
Expl.Var	2,688233	1,600744	1,317514
Prp.Totl	0,448039	0,266791	0,219586

Примечание: здесь и в табл. 8 жирным шрифтом выделены корреляции между фактором и переменной больше 0,6.

факторами, что позволило нам применить методический подход ортогонального вращения (ротации) факторов по программе "Варимакс", повышающий эффективность анализа (табл. 8). Вращение факторов выявило усиление статистических связей между ними и переменными, констатированными традиционным факторным анализом. Так, корреляция между Фактором-1 и ГАГ увеличилась по абсолютной величине с 0,892 до 0,952, Фактором-2 и белком - с 0,798 до 0,953, Фактора-3 и ДНК - с 0,819 до 0,994. Полученные данные с высокой степенью достоверности позволяют констатировать взаимозависимость между возрастом и содержанием ГАГ в коже женщин.

Таблица 8. Результаты ротации факторов (варимакс) биохимических и возрастных показателей кожи женщин

Переменная	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3
Возраст	-0,871644	-0,019912	0,109989
Белок	0,262169	-0,953095	0,042694
ГАГ	0,952229	-0,061164	0,214330
ДНК	0,043101	0,045041	0,993685
ГАГ/белок	0,557233	0,794969	0,154060
ГАГ/ДНК	0,765106	0,021038	-0,596260
Expl.Var	2,632988	1,546974	1,426529
Prp.Totl	0,438831	0,257829	0,237755

Для описания зависимости содержания ГАГ от возраста нами был проведен регрессионный анализ, результаты которого (см. рисунок), позволившего с высокой степенью достоверности ($p < 0,00001$) охарактеризовать уравнение регрессии зависимости уровня ГАГ от возраста в коже женщин.

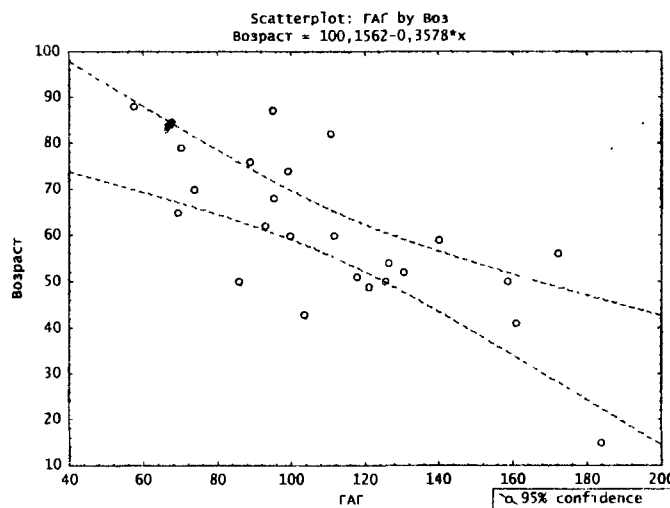


Рисунок.

Линия регрессии зависимой переменной (ГАГ) по предиктору (возраст).

Проведенные исследования позволили заключить, что показатели содержания в коже белка и ДНК достаточно стабильны и не изменяются с возрастом. В то же время, можно с высоким уровнем достоверности констатировать, что с возрастом в коже женщин уменьшается уровень ГАГ в соответствии с приведенным уравнением линейной регрессии.

Выявленные закономерности, на наш взгляд, представляют интерес для медицинской геронтологии в части анализа соответствия паспортного возраста биологическому, а также для косметологии в качестве объективного критерия применения технологий, улучшающих тургор, эластичность и внешний вид кожных покровов.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Башкатов С.А. (1996) Гликозаминогликаны в механизмах адаптации организма, БашГУ, Уфа.
2. Зимницкий А.Н. (2003) в кн.: Актуальные вопросы пластической хирургии и дерматокосметологии, Майер Джей, М, с.94.
3. Башкатов С.А. (2003) там же с.93.
4. Слуцкий Л.И. (1969) Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани, Медицина, Л.

Поступила 12.09.2003

AGE-RELATED CHANGES IN CONTENT OF GLYCOSAMINOGLYCANS IN WOMEN SKIN

A.N. Zimnitskii¹, S.A. Bashkatov², E.G. Petrenko², S.B. Khusnutdinova²

¹Jespar-Bios Ltd., Moscow; 125040, Moscow, Lenigrade av., 14;

²Institute of Petrochemistry and Catalysis, Ufa; 450075, Ufa, pr. Oktabria, 141

Postmortem skin samples of 50 women aged from 15 to 90 years were analysed. Protein and DNA levels were stable and rather age-independent. Glycosaminoglycane (GAG) level decreased during ageing according to linear regression equation: Age = 100.1562 - 0.3578xGAG.

Key words: Age-related changes, proteoglycans, glycosaminoglycans, DNA, protein, gerontology.