

На правах рукописи

Витрук Татьяна Юрьевна

**ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ КЛЕТОЧНО-МАТРИКСНЫХ
ВЗАИМООТНОШЕНИЙ В КОЖЕ ПРИ ЕЕ ХРОНОЛОГИЧЕСКОМ
И ФОТОИНДУЦИРОВАННОМ СТАРЕНИИ**

14.00.16 – патологическая физиология
14.00.11 – кожные и венерические болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2008

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научные руководители:

доктор медицинских наук,
профессор

Рязанцева
Наталья Владимировна

доктор медицинских наук,
профессор

Пестерев
Петр Николаевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор Хлусов Игорь Альбертович

доктор медицинских наук, профессор Прохоренков Виктор Иванович

Ведущая организация: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Защита состоится «___» _____ 2008 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, ул. Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета

Автореферат разослан «___» _____ 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Суханова Г.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время прослеживается явная тенденция к увеличению в составе населения лиц пожилого и старческого возраста. Их доля в популяции во многих странах превысила 20%. Профилактика старения является одним из наиболее активно и динамично формирующихся в последнее время новых направлений медицины. Это обусловлено сложностью и социально-экономической значимостью проблемы старения населения в современном мире (Анисимов В.Н., 1999; Крутько В.А., 2000; Гончарова Н.Д. и соавт., 2002; Wulf H.C., 2004).

Представленные в научной литературе данные в отношении различных гипотез старения организма можно объединить в несколько групп. Первая группа теорий основывается на генетических факторах (теории генетического контроля, «предела делений», митохондриальная теория старения, теломеразная теория и др.). Вторая группа теорий объясняет старение воздействием внешних факторов (теория износа систем, теория свободных радикалов, теория износа иммунной системы). Третья группа теорий в качестве определяющих рассматривает изменения в нейроэндокринной системе, энергетический дисбаланс и др. (Fisher G.J., 2002; Турова Е.А., 2007). Но все указанные гипотезы рассматривают старение как процесс структурно-функциональных изменений организма, протекающий длительно и неравномерно, затрагивающий как внутренние органы и системы, так и ткани, определяющие внешний облик человека (Мареева Е.Б., 1995).

Важную роль в механизмах общего биологического процесса старения организма играет старение кожи. С одной стороны, механизмы старения кожных покровов определяются общими для всего организма обменными, структурными и функциональными изменениями, и состояние кожи в целом может свидетельствовать о степени старения организма. С другой стороны, кожа является органом, постоянно контактирующим с внешней средой, в результате чего признаки её старения могут появляться значительно раньше, чем в других органах (Ткаченко С.Б., Поткаев Н.Н., 2003; Смирнова И.О., 2004). Таким образом, старение кожи связано с общим процессом старения организма, детерминированным генетически (естественное старение), и агрессивным воздействием факторов внешней среды, среди которых наиболее разрушительным является УФ-излучение (фотостарение) (Хертель Б., 2000; Vulteau A. et al., 2005).

Процесс старения кожи затрагивает сложный комплекс межклеточных взаимодействий в коже, опосредованный анатомическими контактами и широким спектром сигнальных молекул (Kosmadaki M.G., Gilcrest V.A., 2004; Смирнова И.О. и соавт., 2005).

Хорошо известно, что основной клеткой дермы является фибробласт, ему принадлежит ключевая роль в нормальном функционировании и состоянии соединительнотканной основы кожи. Согласованная работа фибробластов с другими компонентами эпидермиса, дермы и сосудистого русла, регуляция микроокружения и клеточно-матриксных отношений в значительной степени

определяют их способность поддерживать гомеостаз кожи и реагировать на воздействие внешней и внутренней среды (Серов В.В., 1981; Мартынов А.И. и соавт., 1998; Быков В.Л., 2004). Однако особенности взаимоотношений дермальных фибробластов и эпидермальных кератиноцитов, а также динамика возрастных морфологических изменений компонентов эпидермиса и дермы остаются недостаточно изученными (Oikarinen A., 1994; Tzaphlidou M., 2004), что обосновывает целесообразность детального рассмотрения изменений клеточно-матриксных взаимоотношений в коже при хронологическом и фотоиндуцированном старении кожи.

Цель исследования: установить роль нарушений клеточно-матриксных взаимоотношений в коже у женщин при её хронологическом и фотоиндуцированном старении.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи исследования:

1. Определить роль изменений пролиферативного потенциала фибробластов дермы в механизмах старения кожи.

2. Установить закономерности изменений структуры дермы и эпидермиса при хронологическом и фотоиндуцированном старении кожи у женщин.

3. Оценить особенности экспрессии белков-маркеров апоптоза (p53, bcl-2, bax) кератиноцитами при старении кожи.

4. Выявить общие закономерности и особенности клеточно-матриксных взаимоотношений в коже у женщин при её хронологическом и фотоиндуцированном старении.

Научная новизна. Впервые с привлечением комплекса современных культуральных, гистологических и иммуногистохимических методов исследования выявлены общие закономерности и особенности нарушений клеточно-матриксных взаимоотношений в коже при хронологическом и фотоиндуцированном старении. Показано, что признаки хронологического, гормонального и фотоиндуцированного старения кожи выражены во всех структурных компонентах эпидермиса и дермы, степень выраженности которых наиболее значима при хронической инсоляции. Установлено, что нарушение клеточно-матриксных взаимоотношений в коже при ее старении связано со снижением пролиферативного потенциала дермальных фибробластов. Выявлено, что степень дегенерации коллагеновых волокон дермы в большей мере зависит от влияния хронической инсоляции, чем от возраста и состояния репродуктивной системы, а эластиновых волокон дермы - от влияния хронической инсоляции и состояния репродуктивной системы пациенток, чем от возраста. Показано, что для возрастных изменений кожи характерно возрастание содержания белков-маркёров апоптоза (p53 и bax) в кератиноцитах эпидермиса.

Теоретическая и практическая значимость работы. Получены новые данные фундаментального характера о комплексных изменениях эпидермиса и дермы, раскрывающие новые аспекты клеточных механизмов старения кожи. Показано, что хроническая инсоляция является фактором риска преждевременного старения кожи, реализуемого на уровне эпидермиса и

дермы. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о целесообразности разработки патогенетически обоснованных мер профилактики хронологического и фотоиндуцированного старения кожных покровов, направленных на все структурные компоненты эпидермиса и дермы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Механизмы нарушения клеточно-матриксных взаимодействий в коже при ее хронологическом и фотоиндуцированном старении сопряжены со снижением пролиферативного потенциала дермальных фибробластов.
2. Возрастные изменения кожи характеризуются структурно-функциональными изменениями внеклеточного матрикса – дегенерацией коллагеновых и эластиновых волокон, очаговым распределением гликозаминогликанов в дерме, степень выраженности которых наиболее значима при фотоиндуцированном старении.
3. При старении кожи происходит дизрегуляция запрограммированной гибели клеток эпидермиса, проявляющаяся увеличением уровня экспрессии белков-маркеров апоптоза (p53, bax).

Апробация и реализация работы. Результаты исследований используются в курсе лекций по патологической физиологии (разделы «Общая патология клетки», «Механизмы старения», «Роль апоптоза в норме и при патологии»), дерматовенерологии (разделы «Фотодерматиты», «Экраны от солнца и профилактика рака кожи», «Фотостарение кожи»). Основные положения диссертации представлены на V Сибирском физиологическом съезде (г. Томск, 2005) и на Всероссийской конференции «Первые результаты реформы здравоохранения и задачи кожно-венерологических учреждений на переходный период» (г. Екатеринбург, 2005).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 работ, из которых 1 – в центральном рецензируемом журнале, рекомендованном ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 23 рисунками и 10 таблицами. Библиографический указатель включает 248 источников (105 - отечественных и 143 - иностранных).

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили биоптаты кожи, полученные у 42 женщин в возрасте от 17 до 64 лет. Операционный материал был получен у здоровых пациенток клиник пластической хирургии г. Томска при вмешательствах, связанных с хирургической коррекцией косметических недостатков области лица, шеи и груди («Центр женского здоровья», отделение пластической хирургии, заведующий – М.Ю. Афанасьев; клиника пластической хирургии «Шанс», заведующая – О.Г. Гейко). Наряду с этим материалом исследования являлись кожно-мышечные лоскуты 3 человеческих эмбрионов

(срок 8 недель) (гинекологическая клиника «Ева и Адам», главный врач - В.В. Носов).

При отборе пациенток для данного исследования учитывались следующие критерии: возраст, состояние репродуктивной системы, соматические заболевания, тип светочувствительности кожи по Фитцпатрику, частота инсоляции.

Учитывая возрастную классификацию ВОЗ, все пациентки были разделены на 3 клинические группы: I группа – «молодые» от 16 до 44 лет (19 человек (45,2%)); II группа – «среднего возраста» от 45 до 59 лет (21 человек (50%)); III группа – «пожилые» от 60 до 74 лет (2 человека (4,7%)). В дальнейшем пациентки II и III группы были объединены в одну – «среднего и пожилого возраста».

С учётом того, что возрастные колебания гормонального статуса женщин могли отразиться на полученных результатах, мы распределили пациенток по состоянию репродуктивной системы: I группа - с нормальным менструальным циклом - 20 человек (47,6%) в возрасте от 17 до 49 лет; II группа с изменённым менструальным циклом (пери- и постменопауза) - 22 человека (52,4%) в возрасте от 44 до 64 лет.

Пациентки на момент взятия материала не предъявляли каких-либо жалоб, но имели в анамнезе ряд хронических соматических заболеваний (19 человек - заболевания желудочно-кишечного тракта, 2 человека – заболевания дыхательной системы, 2 человека – заболевания сердечно-сосудистой системы, 3 человека – заболевания опорно-двигательного аппарата, 12 человек – различные заболевания женской половой системы, 4 человека – считали себя здоровыми).

Кроме того, пациентки были разделены на группы в зависимости от места взятия кожного биоптата: I группа – пациентки, у которых биоптаты кожи были взяты с открытых участков тела (22 человека (52,4%)); II группа – пациентки, у которых кожные биоптаты были взяты с закрытых участков тела – (20 человек (47,6%)). К открытым участкам тела относили височную область, шею и веки, к закрытым – подчелюстную и заушную области, область молочных желёз.

Отбор пациентов проводили с учётом типа светочувствительности кожи на основании самооценки реакции кожи на УФО. В исследование были включены пациентки с первым, вторым и третьим типами светочувствительности по Фитцпатрику.

Клинические признаки фотостарения кожи, подверженной хронической инсоляции (истончение и морщинистость кожи, солнечное лентиго, телеангиоэктазии, множественные пигментные новообразования на открытых участках кожи), отмечены у 14 человек (33,3%) различных возрастов. При сборе анамнеза данные пациентки сообщили, что часто загорали и при этом не использовали солнцезащитные средства.

Исследование проводили с использованием методов, направленных на изучение межклеточных и клеточно-матриксных взаимоотношений компонентов дермы и эпидермиса кожи. В частности, для оценки пролиферативного потенциала дермальных фибробластов осуществляли их

культивирование. С целью выявления возрастных морфологических изменений компонентов дермы проводили гистологическое исследование кожных биоптатов. С целью выявления возрастных изменений клеток эпидермиса выполняли иммуногистохимическое исследование экспрессии маркёров апоптоза кератиноцитами (табл. 1).

Культивирование дермальных фибробластов осуществляли для оценки их пролиферативного потенциала. Выделение клеток из биоптатов кожи пациенток проводили по методу Р. Адамса (1983), Г.П. Пинаева (1988). Клетки культивировали в пластиковых культуральных флаконах в питательной среде, состоящей из среды Игла, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2% L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 ЕД/мл стрептомицина при температуре $36\pm 1^\circ\text{C}$ в условиях 5% CO_2 . За динамикой прикрепления клеток к субстрату и образованием монослоя наблюдали в течение 12-ти дней с момента посева. Микроскопическое исследование и фотографирование клеточных культур проводили с помощью светового микроскопа «МБИ-6» при увеличении – об.10 \times , ок. 10 \times , 20 \times . Препараты фотографировали с использованием цифровой фотокамеры «OLYMPUS C-310 ZOOM».

Гистологическое исследование кожи проводили с целью выявления морфологических признаков ее старения в зависимости от возраста, состояния репродуктивной системы пациенток, а также воздействия инсоляции. Биопсийный материал после взятия фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина (Меркулов Г.А., 1969), подвергали обезвоживанию в спиртах восходящей концентрации и парафинизации. Из полученных парафиновых блоков готовили срезы толщиной 5-6 мкм. С целью выявления изменения толщины эпидермиса, состояния границы между эпидермисом и сосочковым слоем дермы, степени кератинизации рогового слоя эпидермиса, количества меланоцитов в базальном слое эпидермиса срезы окрашивали гематоксилином и эозином (Меркулов Г.А., 1969). Для выявления и определения степени дегенерации коллагеновых волокон дермы использовали окрашивание срезов гематоксилином и пикрофуксином (Вайль С.С., 1947), для выявления и определения степени дегенерации эластических волокон - орсеином (Ромейс Б., 1954), с целью выявления гликозаминогликанов в дерме использовали окрашивание срезов альциановым синим по Steedman (Лили Р.Д., 1969).

Микроскопическое исследование и фотографирование гистологических препаратов кожи проводили с помощью светового микроскопа «МБИ-6» при увеличении – об. 10 \times , 20 \times ; ок. 5 \times , 10 \times , дополнительное увеличение микроскопа - 2,5 \times . Фотографировали срезы кожи цифровой фотокамерой «OLYMPUS C-310 ZOOM».

При морфологическом описании в коже отмечали следующие признаки:

- 1) изменение толщины эпидермиса;
- 2) сглаженность границы между эпидермисом и сосочковым слоем дермы;
- 3) кератинизация рогового слоя;
- 4) дегенерация коллагеновых волокон;
- 5) увеличение толщины и/или количества эластических волокон дермы (эластоз);

- 6) распределение меланоцитов в базальном слое эпидермиса;
7) распределение гликозаминогликанов в дерме.

Таблица 1

Распределение обследованных групп пациенток в соответствии с использованными методами исследования

Группы обследованных пациенток	Методы исследования		
	Культивирование фибробластов дермы	Гистологическое исследование кожи (морфологические признаки старения)	Иммуногистохимическое исследование кожи (выявление маркеров апоптоза p53, bcl-2, bax)
Общее количество пациенток	12	30	16
В зависимости от возраста:			
Пациентки возраста 16-44 лет	6	13	8
Пациентки возраста 45-74 лет	6	17	8
В зависимости от состояния менструального цикла:			
Пациентки с нормальным менструальным циклом	7	13	9
Пациентки с изменённым менструальным циклом	5	17	7
В зависимости от степени инсоляции кожи:			
Пациентки, у которых кожный биоптат взят с открытых участков тела	8	14	10
Пациентки, у которых кожный биоптат взят с закрытых участков тела	4	16	6

Морфологическую оценку полученных результатов проводили полуколичественным способом. Результаты выражали в баллах по следующей шкале: 1 – отсутствие признака; 2 – слабая выраженность признака; 3 – средняя степень выраженности; 4 – сильная выраженность признака.

Для выявления и оценки степени экспрессии маркеров апоптоза клетками эпидермиса при старении кожи проводили иммуногистохимическое

исследование. Исследование осуществляли на парафиновых срезах кожи с помощью двухэтапного авидин-биотинового метода, включавшего демаскировку антигенов высокотемпературной обработкой ткани с использованием антител к p53, bcl-2, bax и визуализирующей системы фирмы «DakoCytomation», США (Эллиниди В.Н. и соавт., 2002).

Статистическую обработку данных, полученных в результате гистологического исследования кожи, проводили при помощи компьютерной программы «SSPS, V 11.5». Для сравнения долей качественных данных использовали точный критерий Фишера. Сначала показатели проверяли на однородность по исследуемому признаку. Если выявлялись статистически значимые ($p < 0,05$) различия по показателю между исследуемыми группами, то тогда проводился попарный анализ с учётом поправки на множественное сравнение Бонферрони с целью определения различающихся групп

Статистическую обработку данных, полученных в результате иммуногистохимического исследования, также проводили при помощи компьютерной программы «SSPS, V 11.5». Так как объёмы выборки не удовлетворяли требованиям параметрических критериев, для сравнения количественных показателей у исследуемых групп применяли критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney). Анализ качественных данных проводили с помощью точного критерия Фишера. При уровне значимости $p < 0,05$ различия считали статистически достоверными. Если количество градаций качественных показателей превышало два, то отдельно анализировали каждую градацию с помощью точного критерия Фишера. Коррекцию эффекта множественного сравнения осуществляли с поправкой Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день существует множество гипотез, объясняющих механизмы старения организма. Старение кожи связывают с общим старением организма, детерминированным генетически (естественное старение), и агрессивным воздействием факторов внешней среды, среди которых наиболее разрушительным оказывается УФ-излучение (фотостарение) (Хертель Б., 2000).

Хорошо известно, что основной клеткой соединительной ткани является фибробласт, он продуцирует протеогликаны и гликопротеины внеклеточного матрикса, образует коллаген, ретикулярные, эластические волокна, а также регулирует стабильность этих элементов (Мартынов А.И. и соавт., 1998). Фибробластам принадлежит ключевая роль в нормальном функционировании и состоянии соединительнотканной основы кожи. Согласованная работа фибробластов с другими компонентами эпидермиса, дермы, сосудистого русла, регуляция микроокружения и эпителиально-мезенхимальных отношений в значительной степени определяет их способность поддерживать гомеостаз кожи и реагировать на воздействие внешней и внутренней среды (Серов В.В., 1981).

Известно, что сложное структурное и функциональное единство различных элементов и структур кожи обеспечивается тесными межклеточными взаимодействиями, опосредованными анатомическими контактами и продукцией широкого спектра сигнальных молекул (Смирнова И.О., 2005). В основе возрастных нарушений лежат, по-видимому, механизмы, приводящие к разбалансировке системы связей между клетками (Турова Е.А., 2007).

Всё вышеизложенное в целом свидетельствует о важной роли межклеточных и клеточно-матриксных взаимодействий структурных компонентов эпидермиса и дермы в поддержании гомеостаза кожи. Однако в литературе приведены фрагментарные данные о подобных взаимодействиях с точки зрения механизмов старения кожи. В связи с этими фактами, целью нашего исследования явилось получение новых знаний о возрастных изменениях кожи и об участии в этом процессе дермальных фибробластов, эпидермальных кератиноцитов и других компонентов эпидермиса и дермы.

В настоящее время известно, что пролиферативный потенциал фибробластов имеет прямую связь с возрастом донора, поэтому культура нормальных диплоидных фибробластов широко используется для исследования механизмов старения организма (Гуткевич Е.А., Языков К.Г., 1985). Ещё в 1961г. L. Hayflick и P.S. Moorhead установили, что культуры фибробластов имеют ограниченную продолжительность жизни и выдвинули предположение о связи этого факта со старением на клеточном уровне. Было установлено, что продолжительность жизни культур клеток уменьшается с увеличением возраста доноров.

При исследовании кожно-мышечных лоскутов эмбрионов нами было установлено, что на 3-5-е сут в культуре определялись веретенообразные фибробластоподобные клетки, которые к 6-7-му дню исследования формировали сплошной монослой. При исследовании кожных биоптатов, взятых с закрытых участков кожи женщин в возрасте 30-35 лет, появление единичных фибробластоподобных клеток происходило на 7-8-е сут. Далее на 11-12-й день продолжался их рост, вытягивание с формированием веретенообразной формы, а также переплетение и наслоение клеточных элементов. При культивировании дермальных фибробластов женщин возраста 30-40 лет, полученных с открытых участков кожи, и фибробластов женщин 40-52 лет, выделенных из кожных биоптатов, взятых как с открытых, так и закрытых участков кожи, были выявлены следующие закономерности. Прикрепление клеток к субстрату происходило на 2-й день исследования. Далее на 7-8-е сут появлялись единичные фибробластоподобные веретенообразные клеточные элементы, в последующие дни клеточный рост был мало выражен либо вообще не определялся. В некоторых случаях исследования клетки оставались округлой и полигональной формы, клеточный рост отсутствовал, происходила гибель клеточных элементов. Таким образом, в проведенном нами исследовании, была выявлена зависимость пролиферативной способности дермальных фибробластов от возраста донора.

Приведённые нами результаты исследования ростовых свойств дермальных фибробластов вполне согласуются с данными, полученными в других лабораториях. Так, другими исследователями при культивировании фибробластов в целях лечения ран различной этиологии было выявлено, что фибробласты, полученные из дермы взрослых людей, во всех случаях не отличались высокой пролиферативной активностью и требовали обогащения питательной среды, и, кроме того, имели достаточно ограниченный срок жизни. В то время как фибробласты эмбрионов обладали лучшими ростовыми свойствами, формируя на 2-е сутки равномерный монослой (Колокольцова Т.Д и соавт., 1998).

Проведённый нами анализ результатов исследования показал также зависимость скорости клеточного роста фибробластов от места взятия кожного биоптата. Этот факт согласуется с данными литературы, из которых следует, что пролиферативный потенциал штамма *in vitro* может зависеть от места взятия биоптата и условий культивирования клеток (Kirkwood T.V. et al., 1982). Так, О.Г. Макеевым и соавт. (2005) при культивировании аутогенных дермальных фибробластов, было показано наличие выраженной зависимости активности фибробластов от зоны взятия биоптата. Фибробласты, выделенные из кожных биоптатов с кисти пациентов, отличались достоверно меньшей пролиферативной и синтетической активностью, чем клетки, полученные из биоптатов кожи передней брюшной стенки и ягодичной области. При исследовании нами биоптатов, взятых с закрытых участков кожи, также отмечался более активный рост клеток в культуре по сравнению со слабым или отсутствующим клеточным ростом фибробластов, полученных из кусочков кожи с открытых участков тела.

По данным некоторых авторов, при гистологическом исследовании кожи, подверженной истинному (хронологическому) старению, толщина рогового слоя эпидермиса практически не меняется. Эпидермис становится тоньше, в основном за счёт уменьшения его клеточных рядов, клетки его становятся переменными по форме и размерам, происходит расширение межклеточных промежутков (Сёмкин В.И., 2001). При проведении нами аналогичного исследования кожи у женщин в возрасте 16-44 лет толщина эпидермиса была нормальной в 100% случаев, а у женщин в возрасте 45-74 лет в 23,5% случаев определялось истончение эпидермиса (табл. 2). У женщин с нормальным менструальным циклом истончение эпидермиса выявлялось в 7,7% случаев, а у пациенток с возрастными изменениями менструального цикла - в 17,6% (табл. 3). Значительных отличий в степени кератинизации рогового слоя эпидермиса при хроностарении в обеих группах обследованных не отмечалось, что полностью соответствует данным литературы.

Хорошо известно, что при хронической инсоляции в роговом слое эпидермиса обнаруживаются признаки гиперкератоза, отмечается появление атипичных кератиноцитов и уплощение базальной мембраны (Хертель Б., 1999; Акилов О., 2002). В ходе проведённого нами исследования у пациенток в возрасте 16-44 лет, биоптаты кожи которых были взяты с открытых участков тела, сглаженная граница между эпидермисом и дермой выявлялась в 33,3%

случаев исследования, в отличие от биоптатов, взятых с закрытых участков тела, где в 100% случаев граница была нормальной (табл. 4).

Таблица 2

Анализ показателей морфологических изменений дермы и эпидермиса пациенток в зависимости от возраста

Регистрируемый показатель		Группы по возрасту		Р _{М/Г}
		16-44 года	45-74 года	
		n=13	n=17	
Изменения толщины эпидермиса	1 – нет	13 100,0%	12 70,6%	ТКФ=4,202 p=0,113
	2 – истончен	0 0,0%	4 23,5%	
	3 – утолщен	0 0,0%	1 5,9%	
Граница эпидермисом и сосочковым слоем дермы	1 – нормальная	11 84,6%	15 88,2%	ТКФ=0,084 p=0,999
	2 – сглажена	2 15,4%	2 11,8%	
Кератинизация рогового эпидермиса	1 – слабая	1 7,7%	2 11,8%	ТКФ=0,552 p=0,999
	2 – умеренная	11 84,6%	14 82,4%	
	3 – выраженная	1 7,7%	1 5,8%	
Дегенерация коллагеновых волокон дермы	1 – нет	9 69,2%	12 70,6%	ТКФ=1,379 p=0,663
	2 – слабая	3 23,1%	5 29,4%	
	3 – умеренная	1 7,7%	0 0,0%	
Увеличение толщины и/или количества эластических волокон (эластоз)	1 – нет	7 53,8%	9 52,9%	ТКФ=4,401 p=0,122
	2 – слабая	5 38,5%	2 11,8%	
	3 – умеренная	1 7,7%	6 35,3%	
Распределение меланоцитов в базальном слое эпидермиса	1 – до 5 в поле зрения	6 46,2%	6 35,3%	ТКФ=0,362 p=0,711
	2 – от 5 до 10 в поле зрения	7 53,8%	11 64,7%	
Распределение гликозаминогликанов в дерме	1 – равномерное	3 23,1%	0 0,0%	ТКФ=4,359 p=0,037
	2 – очаговое	10 76,9%	17 100,0%	

У пациенток в возрасте 45-74 лет при аналогичном сравнении данная закономерность не прослеживалась.

По данным литературы, при хроностарении одни клетки эпидермиса могут содержать значительное количество меланосомных комплексов, другие - практически лишаются меланинового пигмента (Сёмкин В.И., 2001). При хронической инсоляции базальная мембрана эпидермиса утолщается, при этом отмечается неравномерное распределение вдоль неё различных по размерам, накоплению пигмента и количеству отростков меланоцитов (Gilchrest V.A. et al., 1979), наблюдается значительное увеличение количества этих клеток.

В результате исследования, выполненного в нашей лаборатории, были получены данные, подтверждающие увеличение количества меланоцитов в базальном слое эпидермиса участков кожи, подверженной хронической инсоляции. У молодых пациенток увеличение количества меланоцитов в биоптатах кожи, взятых с открытых участков тела, выявлялось почти в 1,5 раза чаще, чем с закрытых (66,7 и 42,9%, соответственно), у пациенток среднего и пожилого возраста – почти в 2 раза (87,5 и 44,4%, соответственно) (табл. 4). При этом значительного влияния состояния репродуктивной системы пациенток на данный показатель выявлено не было.

Известно также, что при хроностарении в дерме снижается содержание коллагена, происходит его дезорганизация, истончение коллагеновых пучков, фибриллы в них располагаются более рыхло (Uitto J. et al., 1998; Oikarinen A., 1994; Реброва Г.А., 2003). Образование коллагеновых димеров, опосредуемое различными механизмами, также вносит существенную роль в развитие возрастных изменений в дерме (Марголина А.А. и соавт., 1999). По данным некоторых авторов при морфометрическом исследовании кожи пациентов разных возрастных групп (от 10 до 75 лет) выявлено прогрессивное уменьшение доли соединительной ткани, содержащей коллагеновые волокна (Gogly B. et al., 1997). Эти изменения становятся более выраженными в средней части дермы и достигают существенных величин уже к 50 годам. По другим данным, существенное уменьшение коллагеновых волокон на закрытых участках кожного покрова отмечается только к восьмидесяти годам жизни (De Backer C.M. et al., 1998).

На основании проведённых гистохимических и морфологических исследований некоторыми авторами утверждается, что коллагеновые волокна уже с начала пожилого возраста (60-74 года) теряют продольную исчерченность вследствие склеивания отдельных фибрилл и гомогенизации. По мере нарастания возраста, вплоть до возраста долголетия (90 лет и выше), отмеченные изменения прогрессируют. Прогрессирование названных изменений приводит к тому, что крупнокалиберные коллагеновые волокна в процессе старения сменяются склеенными между собой волокнами, создающими впечатление широких пластинок, а в случаях исследования кожи пациентов старческого возраста обнаруживаются разволокнённость и рассеянность волокон коллагена (Качахидзе Т.Н., 1970).

По данным литературы, фотостарение кожи проявляется уменьшением количества нормального дермального коллагена вследствие разрушения его матричными металлопротеазами, активность которых повышается при транскрипции активатора протеина-1, активирующегося УФ-излучением (Voorhees J.J., 1984). Снижение продукции коллагеновых волокон сопровождается дегенерацией окружающей коллагеновой сети (Bernstein E.R. et al., 1996). При фотостарении кожи коллагеновые волокна укорачиваются, истончаются и дезорганизуются (Varani J. et al., 2001).

Приведённые нами результаты морфологического исследования коллагеновых волокон дермы в целом согласуются с данными, полученными в других лабораториях, за исключением некоторых особенностей. Так, нами не было обнаружено зависимости степени дегенерации волокон коллагена от возраста и состояния репродуктивной системы пациенток (табл. 2, 3). В случае исследования биоптатов кожи, взятых с различных участков тела нами были обнаружены статистически значимые различия между группами по степени дегенерации коллагеновых волокон ($p < 0,001$) (табл. 4). В коже открытых участков тела пациенток обеих возрастных групп коллагеновые волокна, подверженные различной степени дегенерации, были выявлены почти у 65% обследованных (рис. 1 б), тогда как в коже, защищённой от УФ-облучения, у 100% пациенток коллагеновые волокна не были изменены (рис. 1 а).

В настоящее время накоплено определённое количество знаний об изменении структуры эластиновых волокон при хронологическом и ультрафиолетовом старении кожи. С возрастом в сосочковой дерме наблюдается прогрессивное исчезновение эластической ткани (Сёмкин В.И., 2001), в сетчатом слое увеличивается число и ширина эластических волокон, они становятся грубыми, часто отмечается их фрагментация и эластолиз (Lavker R.M. et al., 1989). Прогрессирующая дегенерация эластических волокон является особенностью хронологического старения кожи. При фотостарении кожи наблюдается скопление изменённых эластических волокон, занимающих различные части дермы – актинический эластоз (Kligman A.M., 1969; Тедеско Ф., 1998). Последний обычно начинается в области соединения сосочковой и сетчатой частей дермы, при возрастном старении кожи он не обнаруживается.

Приведённые нами результаты по состоянию эластиновых волокон дермы вполне согласуются с результатами аналогичных исследований других авторов. Так, при сравнении биоптатов кожи у пациенток с нормальным менструальным циклом и пациенток с возрастными изменениями менструального цикла нами были выявлены статистически значимые различия по выявлению степени эластоза дермы между группами ($p = 0,027$) (табл. 3). Обращало на себя внимание, что явное увеличение толщины и/или количества эластиновых волокон у представителей старшей возрастной группы выявлялось почти в 4,5 раза чаще, чем у пациенток группы 16-44 лет (35,3 и 7,7% соответственно). Подтверждение данного факта мы находим в литературе, где указывается, что снижение уровня эстрогенов является одной из важных причин старения кожи. Ее гормонозависимое старение идёт независимо от фотостарения и выражается

в истончении кожи и деградации эластиновых и коллагеновых волокон (Марголина А., 2001).

Таблица 3

Анализ показателей морфологических изменений дермы и эпидермиса у пациенток в зависимости от состояния репродуктивной системы

Регистрируемый показатель		Группы по состоянию репродуктивной системы		P _{M/T}
		норма	возрастные изменения	
		n=13	n=17	
Изменения толщины эпидермиса	1 – нет	12 92,3%	13 76,5%	ТКФ=1,43 p=0,777
	2 – истончен	1 7,7%	3 17,6%	
	3 – утолщен	0 0,0%	1 5,9%	
Граница между эпидермисом и сосочковым слоем дермы	1 – нормальная	11 84,6%	15 88,2%	ТКФ=0,084 p=0,999
	2 – сглажена	2 15,4%	2 11,8%	
Кератинизация рогового слоя эпидермиса	1 – слабая	2 15,4%	1 5,9%	ТКФ=1,142 p=0,777
	2 – умеренная	10 76,9%	15 88,2%	
	3 – выраженная	1 7,7%	1 5,9%	
Дегенерация коллагеновых волокон дермы	1 – нет	8 61,5%	13 76,5%	ТКФ=1,668 p=0,526
	2 – слабая	4 30,8%	4 23,5%	
	3 – умеренная	1 7,7%	0 0,0%	
Увеличение толщины и/или количества эластических волокон (эластоз)	1 – нет	6 46,2%	10 58,8%	ТКФ=7,311 p=0,027
	2 – слабая	6 46,2%	1 5,9%	
	3 – умеренная	1 7,6%	6 35,3%	
Распределение меланоцитов в базальном слое эпидермиса	1 – до 5 в поле зрения	5 38,5%	7 41,2%	ТКФ=0,023 p=0,999
	2 – от 5 до 10 в поле зрения	8 61,5%	10 58,8%	
Распределение гликозаминогликанов в дерме	1 – равномерное	3 23,1%	0 0,0%	ТКФ=4,359 p=0,037
	2 – очаговое	10 76,9%	17 100,0%	

Таблица 4

Анализ показателей морфологических изменений дермы и эпидермиса у пациенток в зависимости от локализации биоптата кожи

Регистрируемый показатель		Группы по локализации биоптата				P _{МГ}	P _{пар.}
		16-44 года		45-74 года			
		закрытые участки кожи	открытые участки кожи	закрытые участки кожи	открытые участки кожи		
		n= 7	n=6	n= 9	n=8		
		I	II	III	IV		
Изменения толщины эпидермиса	1 - нет	7	6	6	6	0,40	p ₁₋₂ =1,00 p ₃₋₄ =1,00 p ₂₋₄ =0,47 p ₁₋₃ =0,47
		100,0%	100,0%	66,7%	75,0%		
	2 - истончен	0	0	2	2		
		0,0%	0,0%	22,2%	25,0%		
3 - утолщен	0	0	1	0			
	0,0%	0,0%	11,1%	0,0%			
Граница между эпидермисом и сосочковым слоем дермы	1 - нормальная	7	4	8	7	0,40	p ₁₋₂ =0,19 p ₃₋₄ =1,00 p ₂₋₄ =0,54 p ₁₋₃ =1,00
		100,0%	66,7%	88,9%	87,5%		
	2 - сглажена	0	2	1	1		
		0,0%	33,3%	11,1%	12,5%		
Кератинизация рогового слоя эпидермиса	1 - слабая	0	1	0	2	0,36	p ₁₋₂ =0,19 p ₃₋₄ =0,33 p ₂₋₄ =0,75 p ₁₋₃ =1,00
		0,0%	16,7%	0,0%	25,0%		
	2 - умеренная	7	4	8	6		
		100,0%	66,6%	88,9%	75,0%		
3 - выраженная	0	1	1	0			
	0,0%	16,7%	11,1%	0,0%			
Дегенерация коллагеновых волокон	1 - нет	7	2	9	3	<0,001	p ₁₋₂ =0,021 p ₃₋₄ =0,009 p ₂₋₄ =0,77 p ₁₋₃ =1,00
		100,0%	33,3%	100,0%	37,5%		
	2 - слабая	0	3	0	5		
		0,0%	50,0%	0,0%	62,5%		
3 - умеренная	0	1	0	0			
	0,0%	16,7%	0,0%	0,0%			
Увеличение толщины и/или количества эластических волокон (эластоз)	1 - нет	6	1	9	0	<0,001	p ₁₋₂ =0,009 p ₃₋₄ <0,001 p ₂₋₄ =0,012 p ₁₋₃ =0,44
		85,7%	16,7%	100,0%	0,0%		
	2 - слабая	0	5	0	2		
		0,0%	83,3%	0,0%	25,0%		
3 - умеренная	1	0	0	6			
	14,3%	0,0%	0,0%	75,0%			
Распределение меланоцитов в базальном слое эпидермиса	1 - до 5 в поле зрения	4	2	5	1	0,23	p ₁₋₂ =0,59 p ₃₋₄ =0,13 p ₂₋₄ =0,54 p ₁₋₃ =1,00
		57,1%	33,3%	55,6%	12,5%		
	2 - от 5 до 10 в поле зрения	3	4	4	7		
		42,9%	66,7%	44,4%	87,5%		
Распределение гликозаминогликанов в дерме	1 - равномерное	2	1	0	0	0,13	p ₁₋₂ =1,00 p ₃₋₄ =1,00 p ₂₋₄ =0,43 p ₁₋₃ =0,17
		28,6%	16,7%	0,0%	0,0%		
	2 - очаговое	5	5	9	8		
		71,4%	83,3%	100,0%	100,0%		

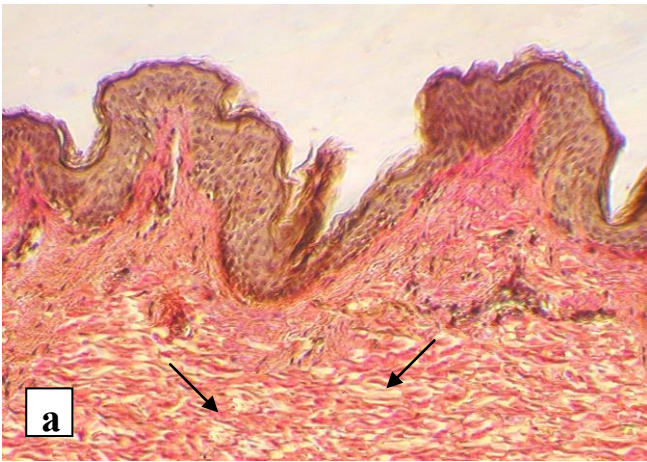


Рис. 1. Препараты кожи области шеи: **а** – пациентки Д., 24 года: нормальные коллагеновые волокна в дерме; **б** – пациентки Б., 57 лет: очаговая дегенерация коллагеновых волокон (указано стрелками). Окраска гематоксилином и пикрофуксином по Ван-Гизону. Ув. 250.

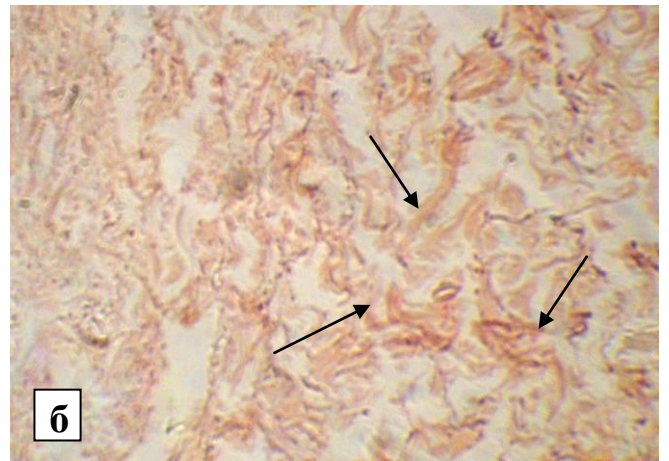
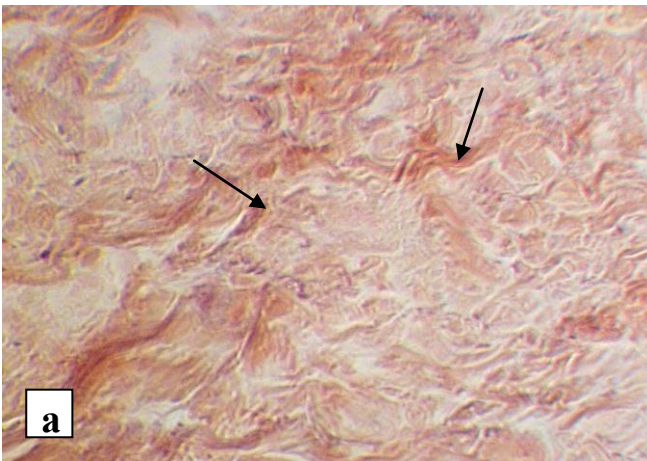


Рис. 2. Препараты кожи области: **а** – молочной железы пациентки Ю., 25 лет: нормальные эластические волокна в дерме; **б** – шеи пациентки О., 44 года: увеличение количества эластических волокон на границе сосочкового и сетчатого слоев дермы (указано стрелками). Окраска орсеином. Ув. 450.

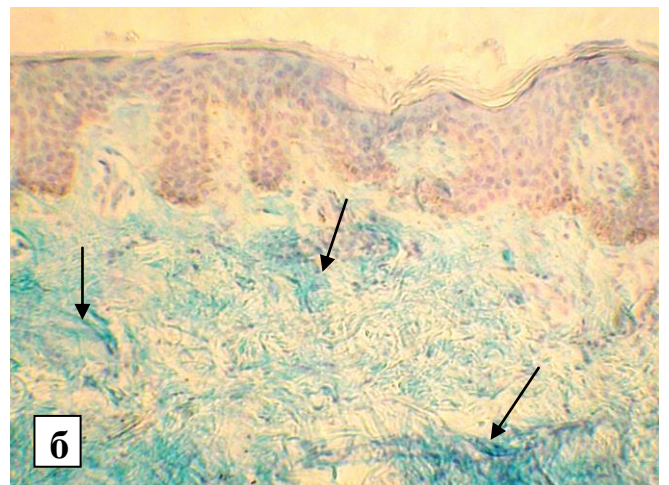
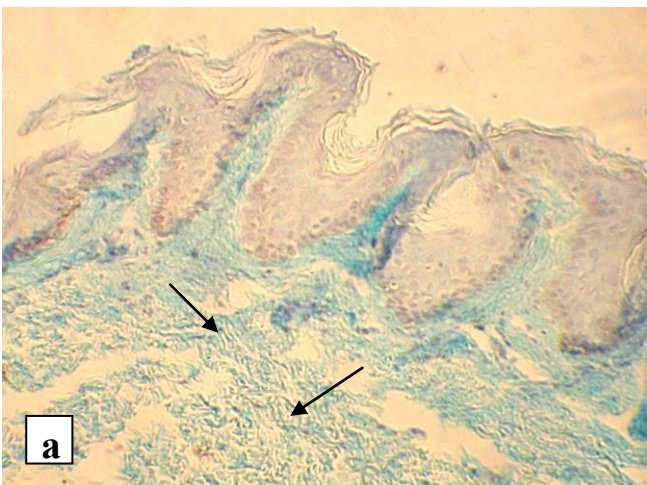


Рис. 3. Препараты кожи области: **а** – молочной железы пациентки Б., 17 лет: равномерное распределение гликозаминогликанов в дерме; **б** – шеи пациентки О., 44 года: очаговое распределение гликозаминогликанов в дерме (указано стрелками). Окраска альциановым синим и гематоксилином. Ув. 250.

Но особенно выраженные различия в изменении структуры эластиновых волокон выявлялись при исследовании нами кожных биоптатов, взятых с различных участков кожи (табл. 4). По данному показателю были также обнаружены статистически значимые различия между группами ($p < 0,001$). Так, нормальные эластиновые волокна дермы в коже у молодых пациенток, полученной с закрытых участков тела, выявлялись в 85,7% случаев исследования (рис. 2 а), а в 83,3% случаев в биоптатах, взятых с открытых для УФО участков тела, волокна были изменены (рис. 2 б). У всех пациенток среднего и пожилого возраста в коже закрытых участков тела эластиновые волокна были неизменными, тогда как в биоптатах, взятых с открытых участков тела, в 100% случаев исследования волокна были подвержены различной степени дегенерации.

Доказано, что возрастные изменения содержания гликозаминогликанов в дерме включают как снижение их количества, так и изменение качественного состава основных дисахаров (Fisher G.J. et al., 1997; Miyachi Y., Ishikawa O., 1998). Результатом является дегидратация кожи, снижение её тургора и эластичности. Кроме того, уменьшение количества гликозаминогликанов и особенно гиалуроновой кислоты ведёт к нарушению межклеточных взаимодействий. Так, предполагается, что гиалуроновая кислота связывает многие факторы роста и участвует в передаче фибробластам импульсов, стимулирующих миграцию и синтез коллагена (Gillardon F. et al., 1995). Некоторыми отечественными авторами проводились исследования по изучению зависимости между возрастом и содержанием в коже женщин ГАГ, в результате которых было выявлено четырёхкратное снижение уровня этих протеогликанов с 40 до 80 лет жизни (Зимницкий А.Н., 2005).

В результате исследования характера распределения ГАГ (равномерное, очаговое) в кожных биоптатах пациенток нами были выявлены статистически значимые различия по этому показателю между возрастными группами ($p = 0,037$). Так, равномерное распределение ГАГ было выявлено почти у четверти пациенток группы в возрасте 16-44 лет (рис. 3 а), тогда как у пациенток группы в возрасте 45-74 лет в 100% случаев выявлялось очаговое распределение гликозаминогликанов (табл. 2). Такие же результаты были получены при сравнении кожных биоптатов пациенток с нормальным менструальным циклом и пациенток с возрастными изменениями репродуктивной системы (табл. 3). В случае исследования кожных биоптатов, взятых с различных участков тела, по показателю распределения гликозаминогликанов в дерме статистически значимых различий между группами не обнаружено ($p = 0,13$) (табл. 4). Однако обращал на себя внимание тот факт, что в препаратах кожи, взятых с открытых для инсоляции участков тела, протеогликаны имели очаговое распределение с аккумуляцией специфического красителя в этих участках (рис. 3 б). В отличие от этого в препаратах кожи, взятых с закрытых участков тела, протеогликаны имели либо равномерное, либо очаговое распределение, но с разрежением специфического красителя в очагах. Этот факт вполне согласуется с некоторыми данными литературы, указывающими на то, что воздействие УФО вызывает

аккумуляцию гликозаминогликанов в папиллярной дерме (Biecker E., Schahtschabel D.O., 1999).

Для исследования состояния эпидермиса при старении кожи нами были изучены особенности экспрессии маркёров апоптоза кератиноцитами у женщин двух возрастных групп: от 16 до 44 лет и от 45 до 74 лет.

В последнее время накоплено определённое количество о значительной роли апоптоза в старении клеток и организма в целом, а также в развитии возрастной патологии (Nunez G. et al., 1998). Апоптоз – запрограммированная гибель клетки, выполняющая ключевую роль в поддержании клеточного гомеостаза (Lane D.P., 1992; Владимирская Е.Б., 2002). На клеточном уровне важным эффектом является прогрессирующая утрата способности адекватно отвечать на сигнал апоптоза, что приводит к накоплению повреждённых клеток в организме. Таким образом, поломка механизма регуляции апоптоза является одной из составляющих естественного старения организма (Хансон К.П., 1999; Белушкина Н.Н., 2001; Жижина Г.П., 2002).

Апоптоз имеет прямое отношение к состоянию кожных покровов человека. Жизнеспособность клеток эпидермиса зависит от баланса факторов выживания и источников апоптотических сигналов. Наиболее важным фактором выживания кератиноцитов является инсулиноподобный фактор роста IGF-1, который поддерживает жизнеспособность клеток эпидермиса, вызывая внутриклеточный синтез белка c98, родственного факторам семейства bcl-2 (Ярилин А.А., 2004).

Апоптоз является ведущим механизмом, определяющим пролиферацию кератиноцитов с целью поддержания постоянного уровня толщины эпидермиса. Запрограммированная гибель кератиноцитов развивается по рецепторному Fas-зависимому механизму: Fas-рецептор (специализированный рецептор, передающий сигнал к развитию апоптоза) появляется на них по мере перемещения в наружные слои эпидермиса, а источником Fas-лиганда служат активированные эпидермальные Т-клетки (Ярилин А.А., 2004; Прохоренков В.И. и соавт., 2005). От преждевременной гибели по этому механизму кератиноциты защищаются благодаря высокой экспрессии противопоптотических факторов bcl-2 и bcl-XL.

Среди естественных индукторов апоптоза клеток кожи главным является УФ-излучение. Оно повреждает, в первую очередь, клетки Лангерганса, однако кератиноциты и фибробласты также становятся объектом его действия. Основным механизмом включения апоптоза при этом служат активные формы оксида азота, выработка которого усиливается благодаря активации индуцибельной NO-синтазы (Weller R., 2003).

Хорошо известно, что в живых клетках организма, включая клетки кожи человека, содержится протеин p53, кодируемый геном p53. Получая сигналы о клеточном повреждении, белок p53 либо останавливает клеточный цикл для репарации генома, либо индуцирует апоптотическую гибель клетки. Активированный белок p53 одновременно осуществляет индукцию белков-промоторов апоптоза bax, bak и bad, а также репрессию белков-ингибиторов апоптоза bcl-2 и bcl-XL (Adams J.M. et al., 1998; Chao D.T. et al., 1998; Reed J.S.,

1998). Таким образом, дисбаланс между экспрессией генов белков, отвечающих за выживаемость клеток, и семейства белков, ответственных за гибель клеток (Nakagawa K. et al., 1994; Jost M. et al., 1999), является механизмом, контролирующим апоптоз клеток кожи. Поломка механизма регуляции апоптоза является одной из составляющих естественного старения организма.

Как показали проведённые нами исследования, средние значения содержания белка p53 в клетках эпидермиса у пациенток обеих возрастных групп были достоверно различны ($2,24 \pm 2,24$ и $30,41 \pm 15,12\%$ соответственно, $p=0,029$) (табл. 5), при этом степень выраженности иммунопозитивной реакции между группами достоверно не различалась.

Многочисленные исследования выявили, что в эпидермисе фотоповреждённой кожи отмечается высокая экспрессия протеина p53 (Ponten F. et al., 1995; Qin J.Z. et al., 2002). В то же время иммуноокрашивание этого белка в эпидермисе закрытых участков кожи либо отсутствует, либо определяется на невысоком уровне (Blatt T. et al., 1999). Хронологическое и фотостарение кожи сопровождается увеличением доли клеток эпидермиса и дермы, экспрессирующих p53, а также аккумуляцией протеина в ядрах клеток открытых участков кожи (Смирнова И.О. и соавт., 2005).

Таблица 5

Экспрессия маркёров апоптоза p53, bcl-2 и bax клетками эпидермиса у пациенток разных возрастных групп

Показатель, %	Возраст пациенток		p
	16-44 года	45-74 года	
	n=8	n=8	
p53	$2,24 \pm 2,24$	$30,41 \pm 15,12$	0,029
bcl-2	$2,66 \pm 2,66$	$16,64 \pm 11,76$	0,204
bax	$25,90 \pm 14,38$	$78,75 \pm 11,25$	0,046

Однако изучение другими исследователями возрастных изменений кожи показало, что характерной особенностью эпидермиса пожилых и старых людей является увеличение количества апоптозных кератиноцитов в базальном слое эпидермиса (Семкин В.И., 2001).

По мнению W.Тао (1999) в нормальных клетках белка p53 содержится мало – на уровне чувствительности методов определения. Полупериод жизни этого протеина составляет приблизительно 5-20 мин, p53 постоянно обновляется путём синтеза. Другие авторы подтверждают, что в физиологических условиях «дикий» тип (wt)p53, характеризующийся коротким

периодом полураспада (не более 20 мин), содержится в клетках в таких низких концентрациях, которые обычно ниже чувствительности иммуногистохимических методов (Петров С.В., Райхлина Н.Т., 2000).

В нашем исследовании обращал на себя внимание факт, что доля p53-иммунопозитивных кератиноцитов в препаратах кожи у молодых пациенток была от 3 до 17,9%, тогда как в препаратах кожи пациенток среднего и пожилого возраста этот показатель был от 63% до 90%. Эти результаты не противоречат результатам исследований, полученных в других лабораториях. Так, имеются данные об обнаружении конституциональной экспрессии протеина p53 в эпидермисе человека с увеличением доли иммунопозитивных клеток по мере старения кожи (Смирнова И.О. и соавт., 2005). Одни исследователи отмечают высокий уровень экспрессии этого протеина в эпидермисе в сезон активной инсоляции (El-Domiaty M. et al., 2002), другие утверждают, что появление его реактивности отмечается только при повреждении кожи различными факторами, в том числе и УФО (Wassberg S. et al., 2003).

При оценке средних значений содержания белка-ингибитора апоптоза bcl-2 и выраженности иммунопозитивной реакции в клетках эпидермиса у пациенток обеих групп статистически значимых различий обнаружено не было ($2,66 \pm 2,66$ и $16,64 \pm 11,76\%$ соответственно, $p=0,204$) (табл. 5). При этом доля окрашенных клеток в препаратах кожи у пациенток возраста 16-44 лет была не более 21,3%, а в препаратах кожи пациенток возраста 45-74 лет - от 43 до 90%.

Изучение другими исследователями экспрессии белка bcl-2 в коже установило, что иммунопозитивная реакция кератиноцитов к антителам этого белка определялась чаще в цитоплазме клеток базального слоя эпидермиса. При этом отмечалось возрастание показателей оптической плотности этого маркера в эпидермисе у пациентов различных возрастных групп при хронологическом и фотостарении. Описанные особенности экспрессии bcl-2 свидетельствуют о преимущественном повышении резистентности к проапоптотическим сигналам менее дифференцированных клеток эпидермиса (Смирнова И.О. и соавт., 2005). Этими же авторами было отмечено усиление экспрессии белков – блокаторов апоптоза при фотостарении в эпидермисе и дерме. Вероятнее всего протеин bcl-2, блокируя развитие апоптоза, может играть ключевую роль в выживании кератиноцитов с фотоиндуцированными повреждениями митохондриальной ДНК (Lu Q.L. et al., 1996; Wang Y. et al., 1998).

При оценке средних значений содержания белка-индуктора апоптоза bax в клетках эпидермиса у пациенток 16-44 лет и 45-74 лет были выявлены статистически значимые различия по содержанию данного протеина между группами ($25,9 \pm 14,38$ и $78,75 \pm 11,25\%$ соответственно, $p=0,046$) (табл. 5). По показателю выраженности иммунопозитивной реакции были также выявлены статистически достоверные различия между группами ($p=0,004$). Доля окрашенных клеток в препаратах кожи пациенток 16-44 лет была от 27,2% до 90,0%, а в препаратах кожи пациенток 45-74 лет - более 90%.

По данным литературы, индуцирующее действие протеина bax на механизмы клеточного апоптоза проявляется путём открытия мембранных

каналов митохондрий. В норме протеин *Bax* находится в цитоплазме клеток, под действием апоптозного сигнала его молекулы мигрируют к мембранам митохондрий, где они образуют комплексы с интегральным белком наружной мембраны, открывая мембранные каналы (Chao D.T. et al., 1998; Reed J.C., 1998). Этот факт является критическим событием апоптоза, так как при этом происходит выход из митохондрий цитохрома C, инициирующего каскад апоптотических реакций (Nunez G. et al., 1998), конечная стадия которых приводит к конденсации хроматина и его межнуклеосомной фрагментации, изменению морфологии, а затем и к фрагментации ядра. Далее происходит дислокация органелл, возникновение апоптозных телец и разрушение клетки (Жижина Г.П., 2002).

Проведённое нами исследование продемонстрировало, что ассоциирующиеся с хронологическим старением кожи изменения в системе регуляции апоптоза касаются увеличения уровня экспрессии протеинов *p53* и *Bax* клетками эпидермиса пациенток старшей возрастной группы. Учитывая, что феномен апоптоза является результатом действия множества факторов, таких как окислительный стресс, ионизирующая радиация, гипоксия, действие химических препаратов, вирусная инфекция, УФ-излучение др., становится понятным, что по мере старения пациентов происходит накопление повреждающего действия этих факторов, вызывающих усиление проапоптотического сигнала и дальнейшую ликвидацию повреждённых клеток кожи.

Таким образом, при анализе результатов культурального, гистологического и иммуногистохимического методов исследования при старении кожи у пациенток старшей возрастной группы (от 45 до 74 лет) нами было выявлено снижение пролиферативного потенциала дермальных фибробластов, сочетающееся с выраженными изменениями дермы (дегенерация коллагеновых и эластиновых волокон, очаговое распределение гликозаминогликанов и др.) и повышенным уровнем экспрессии белков-маркеров апоптоза клетками эпидермиса. Подобная зависимость чаще выявлялась у пациенток, кожные биоптаты которых были получены с открытых для инсоляции участков тела. Эти факты свидетельствуют о том, что в процессе старения кожи все структурные компоненты эпидермиса и дермы претерпевают значительные изменения, затрагивая межклеточные и клеточно-матриксные взаимоотношения в коже, вызванные экзо- и эндогенными факторами старения.

ВЫВОДЫ

1. Механизмы нарушений клеточно-матриксных взаимодействий в коже при её естественном и фотоиндуцированном старении сопряжены со снижением пролиферативного потенциала дермальных фибробластов.
2. Морфологическими признаками хронологического старения кожи у женщин является очаговое распределение гликозаминогликанов в дерме,

ультрафиолетового старения кожи – дегенерация коллагеновых волокон и эластоз дермы.

3. Для возрастных изменений кожи у женщин характерны изменения в регуляции апоптоза клеток эпидермиса, характеризующиеся накоплением в базальных и супрабазальных кератиноцитах белков-регуляторов апоптоза p53 и вах с увеличением доли иммунопозитивных клеток.
4. Хронологическое и фотоиндуцированное старение кожи у женщин характеризуется изменениями клеточно-матриксных взаимоотношений в дерме и эпидермисе, наиболее значимыми при хронической инсоляции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Дermalные фибробласты и старение кожи человека / Т.Ю. Витрук, Т.Л. Мирютова, Н.В. Рязанцева и др // Успехи современного естествознания. – 2005. - № 10. – С. 40-41.
2. Изменения пролиферации дермальных фибробластов при старении кожи / Т.Ю. Витрук, П.Н. Пестерев, Н.В. Рязанцева и др // Успехи современного естествознания. – 2005. - № 12. – С. 69-70.
3. Нарушения пролиферативного потенциала фибробластов дермы при старении кожи / Т.Ю. Витрук, П.Н. Пестерев, Н.В. Рязанцева и др // Бюллетень сибирской медицины. – 2005. – Т. 4, Прил. 1. – С. 111.
4. Дисфункция дермальных фибробластов при старении кожи / Т.Ю. Витрук, Н.В. Рязанцева, П.Н. Пестерев и др // Первые результаты реформы здравоохранения и задачи кожно-венерологических учреждений на переходный период : сб. матер. конф. - Екатеринбург, 2005. – С. 45.
5. Витрук, Т.Ю. Морфологические особенности старения кожи в зависимости от состояния репродуктивной системы пациенток и хронической инсоляции / Т.Ю. Витрук, Н.В. Рязанцева, П.Н. Пестерев // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. – 2007. - № 6. – С. 53-58.
6. Роль апоптоза кератиноцитов в механизмах старения кожи / Т.Ю. Витрук, Н.В. Рязанцева, П.Н. Пестерев, Л.Р. Мустафина // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. – 2008. - №2. – С. 4-8.
7. Особенности экспрессии маркеров апоптоза клетками кожи при старении / Т.Ю. Витрук, Н.В. Рязанцева, П.Н. Пестерев, Л.Р. Мустафина // Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – Т. 7, № 2. – С. 23-28.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

УФО – ультрафиолетовое облучение
 ИГХ – иммуногистохимическая реакция
 ГАГ – гликозаминогликаны
 IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста
 FAS L – киллерный лиганд