

MANIFESTĂRILE BIOCHIMICE ALE MODIFICĂRILOR CRONOLOGICE CUTANATE ÎN FUNCȚIE DE VÂRSTĂ

¹Anatol Vișnevschi – dr. hab. în med., prof. univ.,

¹Irina Tcaci – doctorand,

²Leonid Chișlaru – dr. în med., conf. cerc.

¹Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”,

²Academia de Științe a Moldovei

sectiamed@asm.md, tel.: 069995060

Rezumat

Estimarea parametrilor de peroxidare lipidică, activității enzimelor sistemului antioxidant și enzimelor lizozomale la pacienții cu modificări cronologice cutanate a constatat o creștere semnificativ statistică cu vârsta a hidroperoxidizilor lipidici timpurii (hexan), hidroperoxidizilor lipidici intermediari (hexan), ceruloplasminei, glutation-s-transferazei, activității antioxidante totale (izopropil) și hidroxiprolinei, o reducere autentică a dialdehidei malonice, β -glucuronidazei, β -galactozidazei și activității colagenolitice.

Cuvinte-cheie: îmbătrânirea pielii, modificări cutanate cronologice, peroxidarea lipidelor, sistem antioxidant, enzime lizozomale

Summary. Biochemical manifestations of cutaneous chronological changes by age.

Estimation parameter of lipid peroxidation, activity of the antioxidant system enzymes and lysosomal enzymes in patients with cutaneous chronological changes found statistically significant increases by age in early lipid hydroperoxides (hexane), intermediate lipid hydroperoxides (hexane), ceruloplasmin, glutathione-S-transferase, total antioxidant activity (isopropyl) and hydroxyproline, statistically significant reduction in malonic dialdehyde, β -glucuronidase, β -galactosidase and collagenolytic activity.

Key words: ageing skin, chronological skin changes, lipid peroxidation, antioxidant system, lysosomal enzymes

Резюме. Биохимические проявления хронологических изменений кожи в зависимости от возраста.

Изучение параметров перекисного окисления липидов, активности ферментов антиоксидантной системы и лизосомальных ферментов у пациентов с хронологическими изменениями кожи показало статистически значимое увеличение ранних и промежуточных гидроперекисей липидов (гексан), церулоплазмينا, глутатион-S-трансферазы, общей антиоксидантной активности (изопропил) и гидроксипролина, статистиче-

ски значимое уменьшение малонового диальдегида, β -глюкуронидазы, β -галактозидазы и коллагенолитической активности.

Ключевые слова: старение кожи, хронологические изменения кожи, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система, лизосомальные ферменты

Actualitatea temei. Peroxidarea lipidică (POL) este cea mai studiată și biologic relevantă reacție în lanț a radicalilor liberi, care sunt un rezultat natural al metabolismului aerob. POL, concomitent cu stresul oxidativ și leziunile oxidative moleculare, este o cauză importantă de disfuncție tisulară și celulară, cu un rol semnificativ în procesul de îmbătrânire, dezvoltarea majorității stărilor patologice și afecțiunilor determinate de vârstă și de stresul oxidativ (inflamația, ateroscleroza, bolile neurodegenerative și cancerul) [1, 2]. Mitocondriile sunt sursa principală a radicalilor liberi de oxigen și produselor POL, legate de vârstă [1, 3].

Rezultatele primelor studii privind nivelul metaboliților POL în timpul îmbătrânirii erau contradictorii. Acest fapt este determinat de lipsa unei metode simple, exacte și reproductibile pentru măsurarea metaboliților POL în serul sanguin sau în țesuturi, chiar în pofida studierii acestui proces de biochimisti o perioadă de peste 60 de ani. În literatura de specialitate există o multitudine de studii care au investigat concentrația diferitor produși de POL și activitatea antioxidantă enzimatică în diferite țesuturi la om și organisme model [1, 4].

Scopul studiului prezent constă în estimarea proceselor de peroxidare a lipidelor, activității sistemului antioxidant și enzimelor lizozomale la pacientele cu pielea îmbătrânită intrinsec.

Material și metode de cercetare. În scopul evaluării și analizei particularităților manifestărilor biochimice am examinat 90 de femei cu vârsta cuprinsă între 25 și 60 de ani (vârsta medie $43,29 \pm 1,2$ ani), cu modificări cutanate cronologice bilaterale (aspect ridat și deformant al feței, gâtului și decolteului – riduri profunde și/sau brazde, de exemplu, riduri glabelare de încruntare, riduri frontale, riduri fine periorbitale, falduri naso-labiale și riduri periorale). Pacientele nu au fost supuse anterior unor proceduri cosmetice sau estetice (tratamentului facial estetic, de augmentare tisulară, chirurgical, cu laser ablativ, non-ablativ sau cu radiofrecvență).

Femeile au fost divizate în 3 grupuri de vârstă: 30 de femei în vârstă de 25-34 de ani, 30 de femei în vârstă de 35-50 de ani și 30 de femei în vârstă de 51-60 de ani.

În scopul determinării tipului, stării și cauzelor problemelor cutanate faciale și pentru determinarea modificărilor biochimice am folosit următoarele metode de investigații:

1. Analiza acuzelor (subiective, obiective), istori-

cului vieții, istoricului medical, condițiilor de muncă și de viață a pacientei.

2. Examenul clinic, inclusiv examenul dermatologic vizual și, examenul cutanat prin utilizarea echipamentelor de diagnostic: lampa-lentilă, lampa Wood, videomicroscopia digitală.

3. Examenul biochimic complex în serul sanguin prin micrometode spectrofotometrice, efectuat conform metodelor perfecționate de colaboratorii Secției Biochimie a Laboratorului Central de Cercetări Științifice a USMF „Nicolae Testemițanu” [5]:

a. parametrii POL – hidroperoxidii lipidici (HPL) timpurii, intermediari și tardivi (ng/ml), dialdehida malonică (DAM, nmol/l);

b. activitatea enzimelor sistemului antioxidant (SAO) – superoxid-dismutaza (SOD, pg/ml), ceruloplasmina (pg/ml), glutation-s-transferaza (GST, nmol/l), glutation-reductaza (GR, ng/ml), activitatea antioxidantă totală (AAT, pg/ml);

c. fosfataza alcalină (pg/ml);

d. β -glucuronidaza (ng/ml);

e. β -galactozidaza (nmol/l);

f. arilsulfatazele AB (pg/ml);

g. elastaza (ng/ml);

h. catepsina G și D (nmol/l);

i. activitatea colagenolitică (ACL, ng/ml);

j. hidroxiprolina (nmol/l).

Rezultate obținute și discuții. HPL sunt principalele produse ale POL. Au fost depistate circa 120-150 tipuri de HPL [6]. Deși, rezultatele sunt contradictorii [1, 8], în general s-a constatat o creștere a produselor de POL concomitent cu vârsta și în multe afecțiuni legate de vârstă (de exemplu, boala Alzheimer), în sindromul metabolic și obezitate [1, 9, 10]. Modificările markerilor de stres oxidativ în sângele uman includ creșterea valorilor plasmaticice ale DAM și metaboliților POL, reducerea activității enzimelor SAO sanguin (SOD, glutation peroxidaza, GST și catalaza) [1, 6, 9].

Estimarea modificărilor parametrilor POL în studiul nostru a constatat o creștere semnificativă statistic a HPL timpurii (hexan): de la $20,59 \pm 0,4$ ng/ml la vârsta de 35-50 de ani până la $21,70 \pm 0,2$ ng/ml la vârsta de 51-60 de ani ($p < 0,05$) și HPL intermediari (hexan): de la $4,55 \pm 0,1$ ng/ml la vârsta de 25-34 de ani până la $5,31 \pm 0,1$ ng/ml la vârsta de 51-60 de ani ($p < 0,001$) (tabelul 1).

Celelalte produse ale POL – HPL tardivi (hexan),

Tabelul 1

Valorile medii ale parametrilor POL, enzimelor SAO și enzimelor lizozomale în funcție de vârstă

Parametrul	Grupul de vârstă			p	
	Total	25-34 de ani 1	35-50 de ani 2		51-60 de ani 3
Parametrii POL					
HPL timpurii (hexan), ng/ml	21,04±0,2	20,85±0,2	20,59±0,4	21,70±0,2	2-3*
HPL intermediari (hexan), ng/ml	4,93±0,07	4,55±0,1	4,94±0,1	5,31±0,1	1-3***
HPL tardivi (hexan), ng/ml	0,63±0,03	0,56±0,03	0,60±0,03	0,73±0,07	
HPL timpurii (izopropil), ng/ml	12,12±0,1	12,32±0,2	11,92±0,2	12,12±0,2	
HPL intermediari (izopropil), ng/ml	2,94±0,09	2,91±0,1	2,94±0,2	2,98±0,1	
HPL tardivi (izopropil), ng/ml	1,11±0,09	1,03±0,1	1,19±0,2	1,10±0,1	
DAM (nmol/l)	11,77±0,6	15,92±0,8	12,98±1,1	6,41±0,6	1-2* 1-3*** 2-3***
Enzimele SAO					
SOD (pg/ml)	1235,02±18,3	1268,38±45,0	1241,90±26,7	1194,77±15,6	
Ceruloplasmina (pg/ml)	442,22±5,6	415,56±8,8	464,91±7,9	446,20±10,2	1-2**
Glutacionreductaza (ng/ml)	96,89±9,4	92,42±8,6	74,12±4,5	124,14±25,9	
Glutacion-s-transferaza (nmol/l)	114,19±3,7	82,17±3,4	117,95±5,3	142,45±5,0	1-2*** 1-3*** 2-3**
AAT (hexan), pg/ml	2,70±0,04	2,80±0,08	2,69±0,08	2,59±0,07	
AAT (izopropil), pg/ml	6,56±0,2	5,92±0,4	6,40±0,5	7,38±0,3	1-3*
Enzimele lizozomale					
Fosfataza acidă (pg/ml)	44,92±1,7	45,29±4,1	44,19±2,7	45,27±1,6	
β-glucuronidaza (ng/ml)	4,81±0,2	5,54±0,3	4,51±0,3	4,38±0,2	1-2* 1-3**
β-galactozidaza (nmol/l)	6,34±0,3	7,81±0,4	5,88±0,5	5,35±0,4	1-2** 1-3***
Arilsulfatazele AB (pg/ml)	1,77±0,1	1,95±0,2	1,47±0,08	1,89±0,2	
Elastaza (ng/ml)	68,66±1,9	66,07±2,8	71,83±4,2	68,07±2,8	
Catepsina G (nmol/l)	34,18±1,1	34,36±2,1	36,34±2,2	31,83±1,2	
Catepsina D (nmol/l)	6,24±0,3	6,60±0,3	6,09±0,4	6,04±0,8	
ACL (ng/ml)	14,11±0,2	14,79±0,3	13,69±0,3	13,84±0,3	1-2*
Hidroxirolina (nmol/l)	72,06±1,3	64,03±0,9	73,73±2,2	78,42±2,3	1-2** 1-3***

HPL timpurii (izopropil), HPL intermediari (izopropil) și HPL tardivi (izopropil) – prezintă doar o tendință nesemnificativă de creștere concomitent cu vârsta.

Activitatea DAM se reduce autentic de la 15,92±0,8 nmol/l la vârsta de 25-34 de ani până la 12,98±1,1 nmol/l la vârsta de 35-50 de ani ($p<0,05$), de la 15,92±0,8 nmol/l la vârsta de 25-34 de ani până la 6,41±0,6 nmol/l la vârsta de 51-60 de ani ($p<0,001$) și de la 12,98±1,1 nmol/l la vârsta de 35-50 de ani până la 6,41±0,6 nmol/l la vârsta de 51-60 de ani ($p<0,001$).

Cresc statistic semnificativ unele enzime ale SAO. Ceruloplasmina se majorează de la 415,56±8,8 pg/ml la vârsta de 25-34 de ani până la 464,91±7,9 pg/ml la vârsta de 35-50 de ani ($p<0,01$). GST creș-

te de la 82,17±3,4 nmol/l la vârsta de 25-34 de ani până la 117,95±5,3 nmol/l la vârsta de 35-50 de ani ($p<0,001$), de la 82,17±3,4 nmol/l la vârsta de 25-34 de ani până la 142,45±5,0 nmol/l la vârsta de 51-60 de ani ($p<0,001$) și de la 117,95±5,3 nmol/l la vârsta de 35-50 de ani până la 142,45±5,0 nmol/l la vârsta de 51-60 de ani ($p<0,01$). AAT (izopropil) se majorează de la 5,92±0,4 pg/ml la vârsta de 25-34 de ani până la 7,38±0,3 pg/ml la vârsta de 51-60 de ani ($p<0,05$).

Conform datelor din literatura de specialitate, nivelurile serice de ceruloplasmină cresc semnificativ cu vârsta [16] – o manifestare a reacției compensatorii și de adaptare a organismului la activarea radicalilor liberi și proceselor de peroxidare [17]. Creșterea ceruloplasminei este un mecanism important antioxidant și de apărare de radicalii liberi [17].

Modificările legate de vârstă în activitatea unor enzime ale SAO sunt controversate. A fost constatată o activitate eritocitară mai mare, ca răspuns adaptiv la stres oxidativ legat de vârstă, o activitate mai mică sau lipsa modificărilor SOD [7, 10, 11]. Activitatea GR în unele studii scade cu vârsta [11], iar în altele crește la persoanele cu cele mai bune capacități funcționale [12]. AAT a plasmei sanguine umane crește cu vârsta în unele studii și scade în alte studii [9].

În studiul nostru, SOD și AAT (hexan) au o tendință de reducere, iar GR – o tendință de creștere. Reducerea activității SOD cu vârsta este determinată, probabil, de cererea redusă pentru enzimă la rata metabolică scăzută și consumul de oxigen mai mic [12]. Majorarea activității GR cu vârsta este definită, probabil, de supraviețuirea selectivă mai bună a acestor persoane [12].

Activitatea enzimelor lizozomale scade cu vârsta, fapt care corespunde cu reducerea intensității degradării proteinelor cu îmbătrânirea [13, 14]. Expunerea cronică a celulelor la stresul oxidativ provoacă acumularea materialului non-biodegradabil în lizozomi cu diminuarea activității lizozomale [15].

În studiul nostru, printre enzimele lizozomale examinate se reduce statistic semnificativ activitatea β -glucuronidazei: de la $5,54 \pm 0,3$ ng/ml la vârsta de 25-34 de ani până la $4,51 \pm 0,3$ ng/ml la vârsta de 35-50 de ani ($p < 0,05$) și de la $5,54 \pm 0,3$ ng/ml la vârsta de 25-34 de ani până la $4,38 \pm 0,2$ ng/ml la vârsta de 51-60 de ani ($p < 0,01$); β -galactozidazei: de la $7,81 \pm 0,4$ nmol/l la vârsta de 25-34 de ani până la $5,88 \pm 0,5$ nmol/l la vârsta de 25-34 de ani ($p < 0,01$) și de la $7,81 \pm 0,4$ nmol/l la vârsta de 25-34 de ani până la $5,35 \pm 0,4$ nmol/l la vârsta de 51-60 de ani ($p < 0,001$); ACL de la $14,79 \pm 0,3$ ng/ml la vârsta de 25-34 de ani până la $13,69 \pm 0,3$ ng/ml la vârsta de 35-50 de ani ($p < 0,05$).

Valorile hidroxiprolinei serice la adulții normali, conform examenelor de laborator și fizic, depind de vârstă și sex: cresc cu vârsta și sunt mai mari printre bărbați [18]. În studiul nostru, de asemenea, crește statistic semnificativ cu vârsta activitatea hidroxiprolinei: de la $64,03 \pm 0,9$ nmol/l la vârsta de 25-34 de ani până la $73,73 \pm 2,2$ nmol/l la vârsta de 35-50 de ani ($p < 0,01$) și de la $64,03 \pm 0,9$ nmol/l la vârsta de 25-34 de ani până la $78,42 \pm 2,3$ nmol/l la vârsta de 51-60 de ani ($p < 0,001$).

Ceilalți fermenți lizozomali examinați variază nesemnificativ în funcție de vârstă: în unele cazuri cu o tendință de creștere și în alte cazuri cu o tendință de reducere.

Așadar, discrepanțele observate în studiul nostru și datele din literatura de specialitate privind activitatea enzimelor SAO se pot datora mai multor factori:

a) diferențele de gen pot fi legate cu diferite obiceiuri dietetice între bărbați și femei, b) dimensiunea relativ mică a eșantionului poate fi un aspect critic în determinarea semnificației statistice a diferențelor observate, c) nici un studiu nu a utilizat eșantioane aleatorii ale populației, nu a studiat rolul fundalului genetic, obiceiurilor alimentare și consumului de micronutrienți [7].

Concluzii:

1. Estimarea parametrilor de peroxidare lipidică la pacientele cu modificări cutanate a constatat o creștere semnificativ statistică cu vârsta a hidroperoxidizilor lipidici timpurii (hexan), hidroperoxidizilor lipidici intermediari (hexan) și o reducere semnificativ statistică a dialdehidei malonice.

2. Cresc statistic semnificativ cu vârsta unele enzime ale sistemului antioxidant: ceruloplasmina, glutathion-s-transferaza și activitatea antioxidantă totală (izopropil).

3. Printre enzimele lizozomale examinate se reduce statistic semnificativ cu vârsta activitatea β -glucuronidazei, β -galactozidazei și activitatea colagenolitică și crește autentic cu vârsta activitatea hidroxiprolinei.

Bibliografie

1. Negre-Salvayre A., Auge N., Ayala V. et al. *Pathological aspects of lipid peroxidation*. Free Radic. Res. 2010, vol. 44, no. 10, p. 1125-1171.
2. Baraibar M., Liu L., Ahmed E. et al. *Protein oxidative damage at the crossroads of cellular senescence, aging, and age-related diseases*. Oxid. Med. Cell. Longev. 2012, vol. 2012, no. 919832.
3. Anderson E.J., Katunga L.A., Willis M.S. *Mitochondria as a source and target of lipid peroxidation products in healthy and diseased heart*. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2012, vol. 39, no. 2, p. 179-193.
4. Rho K.A., Kim M.K. *Effects of different grape formulations on antioxidative capacity, lipid peroxidation and oxidative DNA damage in aged rats*. J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo). 2006, vol. 52, no. 1, p. 33-46.
5. Gudumac V., Tagadiuc O., Rîvneac V. et al. *Investigații biochimice: Elaborare metodică*. Chișinău: Tipografia „Elena-VI”. Volumul II. Micrometode. 2010, 97 p.
6. Gueraud F., Atalay M., Bresgen N. et al. *Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products*. Free Radic. Res. 2010, vol. 44, no. 10, p. 1098-1124.
7. Mariani E., Cornacchiola V., Polidori M. et al. *Antioxidant enzyme activities in healthy old subjects: influence of age, gender and zinc status: results from the Zincage Project*. Biogerontology. 2006, vol. 7, no. 5-6, p. 391-398.
8. Suzuki M., Willcox D., Rosenbaum M. et al. *Oxidative stress and longevity in okinawa: an investigation of blood lipid peroxidation and tocopherol in okinawan centenarians*. Curr. Gerontol. Geriatr. Res. 2010, vol. 2010, no. 380460.

9. Gil L., Siems W., Mazurek B. et al. *Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes*. Free Radic. Res. 2006, vol. 40, no. 5, p. 495-505.
10. Mendoza-Nunez V., Ruiz-Ramos M., Sanchez-Rodriguez M. et al. *Aging-related oxidative stress in healthy humans*. Tohoku. J. Exp. Med. 2007, vol. 213, no. 3, p. 261-268.
11. Andersen H., Nielsen J., Nielsen F. et al. *Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes*. Clin. Chem. 1997, vol. 43, no. 4, p. 562-568.
12. Andersen H., Jeune B., Nybo H. et al. *Low activity of superoxide dismutase and high activity of glutathione reductase in erythrocytes from centenarians*. Age Ageing. 1998, vol. 27, no. 5, p. 643-648.
13. Gromakova I.A., Konovalenko O.A. *Lysosomal proteolysis: effects of aging and insulin*. Biochemistry (Mosc). 2003, vol. 68, no. 7, p. 772-775.
14. Nixon R.A., Yang D.S., Lee J.H. *Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age*. Autophagy. 2008, vol. 4, no. 5, p. 590-599. (de omis)
15. Liton P., Lin Y., Luna C. et al. *Cultured porcine trabecular meshwork cells display altered lysosomal function when subjected to chronic oxidative stress*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2008, vol. 49, no. 9, p. 3961-3969.
16. Wiggins J., Goyal M., Wharram B. et al. *Antioxidant ceruloplasmin is expressed by glomerular parietal epithelial cells and secreted into urine in association with glomerular aging and high-calorie diet*. J. Am. Soc. Nephrol. 2006, vol. 17, no. 5, p. 1382-1387.
17. Kim L.B. *Age-related changes in ceruloplasmin content in W/SSM rats*. Bull. Exp. Biol. Med. 2008, vol. 146, no. 6, p. 680-681.
18. Gilbertson T.J., Brunden M.N., Gruszczyk S.B. et al. *Serum total hydroxyproline assay: effects of age, sex and Paget's bone disease*. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1983, vol. 21, no. 3, p. 129-132.