



УДК 613.495

КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ ОКСИДАТИВНОГО МЕТАБОЛИЗМА В КОЖЕ МЫШЕЙ РАЗЛИЧНОГО ВОЗРАСТА С ПОМОЩЬЮ ПЕПТИДНО-БИОАНТИОКСИДАНТНОГО КОМПЛЕКСА

**И.В. БОРЗОВА
В.А. АРУТЮНОВ
Л.С. КОЗИНА
Г.А. РЫЖАК**

*Санкт-Петербургский институт
биорегуляции и геронтологии
СЗОРАМН*

e-mail: milakozina@mail.ru

Работа посвящена исследованию роли оксидативного стресса в повреждении кожи у мышей разного возраста (3 мес. и 18 мес.) при механическом и термическом воздействии (модель эксцизионных ран и термического ожога). Установлено, что повреждению кожи сопутствует интенсификация процесса перекисного окисления липидов, снижение уровня содержания восстановленного глутатиона, активности глутатионтрансферазы и повышение активности антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и каталазы. Выявленные изменения были более выражены в коже старых животных, носили длительный характер и поддавались коррекции при использовании пептидно-биоантиоксидантного комплекса (ПБК), выделенного из биомассы женьшеня. Крем содержит 6% ПБК, в состав которого входят гинзенозиды, относящиеся к гликозидам женьшеня, обладающим антиоксидантными свойствами, и относится к препаратам, способным препятствовать развитию окислительного стресса при воздействии на кожу повреждающих факторов.

Ключевые слова: пептидно биоантиоксидантный комплекс, оксидативный стресс, перекисное окисление липидов, система антиоксидантной защиты, механическое повреждение кожи, термический ожог кожи.

Введение. Кожа представляет собой естественный барьер, защищающий поверхность тела от повреждающих факторов окружающей среды. При действии на кожу повреждающих факторов происходит нарушение кровоснабжения ее различных слоев, начиная с эпидермиса. Это является одной из наиболее существенных причин развития окислительного стресса в тканях кожи, для устранения которого в настоящее время широко используются различные мази и кремы, содержащие биоантиоксидантные препараты [3].

В данной работе были изучено влияние механического повреждения и ожога на некоторые показатели про- и антиоксидантной системы кожи мышей различных возрастных групп, а также возможность их коррекции с помощью пептидно-биоантиоксидантного комплекса, состоящего из трипептида Т-38 и биоантиоксидантного комплекса из биомассы женьшеня.

Материалы и методы исследования. В модели эксцизионных ран использовали 40 беспородных самок белых мышей с массой тела 18-20 г в возрасте 3 месяцев (молодые животные) и 40 самок с массой тела 24-28 в возрасте 18 месяцев (старые животные). Каждая группа животных была подразделена на 2 подгруппы, одна из которых подвергалась механическому или термическому повреждению кожи без последующего воздействия ПБК, а вторая после повреждающего воздействия указанных факторов была пролечена ПБК. В экспериментах с использованием модели эксцизионных ран у животных выстригали симметричные участки кожи спины площадью 1 см². Состояние наркоза вызывали введением кетамина в дозировке 0,5 мг/кг массы. На выстриженные участки наносили повреждение поверхности с помощью скарификатора. На участки, расположенные с правой стороны тела животного, после повреждения наносили крем, содержащий 6% ПБК, ежедневно по одному разу в течение 10 дней. Участки с левой стороны были контрольными и заживали естественным путем. Через 2 недели после нанесения механического повреждения животных декапитировали, препарировали кусочки поврежденной кожи массой 200-300 мг и хранили их при -80°C до использования в эксперименте.

Для оценки антиоксидантного действия ПБК были проведены также эксперименты с использованием модели термического ожога, вызванного у лабораторных мышей. Время воздействия на животных зависело от тяжести повреждения. В опытах использовали 20 самок белых беспородных мышей (питомник «Рапполово» РАМН). Участок спины площадью 7,5% от общей поверхности тела выстригали и на него наносили термический ожог первой степени (2 опыта) с помощью установки с кварцево-галогеновыми лампами (экспозиция 0,5 секунды). Крем, содержащий 6% ПБК, наносили на поверхность кожи сразу после ожога на протяжении 1 и 15 дней после нанесения. Об



эффективности лечения судили как по местным признакам: скорости и качеству заживления и эпителизации ожоговой поверхности, так и по общему состоянию животных.

При проведении биохимических экспериментов использовали 20% гомогенат ткани кожи, приготовленный на 50 мМ калий-фосфатном буфере pH 7,4. В исследуемых пробах определяли ТБК-активные продукты (ТБКАП), восстановленный глутатион (GSH), активность ферментов антиоксидантной защиты: супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГТП), глутатион-S-трансферазы (GST) и каталазы (КАТ). При определении ТБКАП смесь 0,375% тиобарбитуровой кислоты (ТБК) и 15% трихлоруксусной кислоты добавляли к пробам в соотношении 9:1, смесь нагревали при 95°С и после охлаждения центрифугировали 10 мин. при 13000 об./мин. Содержание ТБКАП определяли спектрофотометрически при 335 нм [4]. Для определения содержания глутатиона к 0,02 мл супернатанта, полученного после центрифугирования гомогената в течение при 10000 об./мин., добавляли 2 мл раствора, содержащего реагент Элмана (5,5'-дитиобис-2 нитробензойная кислота) и 0,8 М трис-буфер, pH 8,9. Пробы спектрофотометрировали спустя 4 мин. при 412 нм [11]. Активность СОД измеряли, используя непрямой спектрофотометрический метод, основанный на генерации супероксидного радикала в смеси, состоящей из восстановленного никотинамидадениннуклеотида (НАДН), феназинметасульфата (ФМС) и нитросинего тетразолия (НСТ). Для этого к 0,05 мл гомогената добавляли 0,45 мл H₂O, 0,125 мл хлороформа и 30 мг сухого K₂HPO₄ и после тщательного перемешивания пробы центрифугировали 30 мин. при 4000 об./мин., после чего к 0,01 мл полученного гомогената. Добавляли 2 мл раствора, содержащего 50 мМ K⁻фосфатного буфера и 0,1 мМ ЭДТА, 60 мкМ НСТ и 100 мкМ НАДН. Реакцию запускали ФМС (30 мкМ) и через 5 мин. измеряли абсорбцию при 560 нМ, активность фермента выражали в Ед./г. белка [6]. Глутатионпероксидазную активность определяли модифицированным методом Tappel [13]. Реакционная смесь состояла из 0,39 мМ глутатиона, 0,19 мМ НАДН, 1,55 Ед./мл глутатионредуктазы и буфера, содержащего 50 мМ трис pH 7,6, 0,1 мМ ЭДТА. К пробе добавляли 0,01 мл супернатанта, используемого для определения активности СОД, и реакцию запускали добавлением 0,1% H₂O₂. Активность фермента определяли спектрофотометрически при 340 нм и выражали в милиЕд./г белка. Белок определяли по Lowry et al. [10].

Экспериментальные исследования были проведены в строгом соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 1964 г. с изменениями от 1975, 1983 и 1989 гг.

Результаты исследования. Как видно из представленных в табл. 1, 2 данных, после механического повреждения кожи как у молодых, так и у старых мышей уже в первые сутки наблюдается усиление процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), о чем можно судить на основании определения ТБКАП. Следует отметить, что интенсивность ПОЛ в коже старых мышей выше, чем у молодых, что соответствует представлениям о том, что с возрастом в различных органах и тканях животных и человека она возрастает. Наряду с повышением уровня содержания ТБКАП происходит некоторое снижение количества восстановленного глутатиона в коже мышей с эксцизионными ранами, что также указывает на интенсификацию перекисных процессов в этих условиях. Это сопровождается изменением активности антиоксидантных ферментов. Активность СОД возрастает на 35,2% ($p < 0,05$) у молодых мышей и 24,8% – у старых, активность ГП повышается на 21,9% ($p < 0,05$) у молодых мышей и 10,9% – у старых. Примерно в одинаковой степени при этом повышается также активность КАТ. Активность же Г-S-T при этом, напротив, несколько снижается. На 10-е сутки после механического повреждения заживление эксцизионных ран сопровождается у молодых мышей некоторым снижением интенсивности перекисных процессов, на что указывает уменьшение уровня содержания ТБКАП и менее выраженные изменения активности ферментов антиоксидантной защиты, по сравнению с первыми сутками, прошедшими после нанесения травмы. У старых же животных процесс заживления поврежденного участка кожи происходит медленнее и хуже, однако ситуация значительно улучшается при обработке ран ПБК. Использование ПБК у молодых мышей приводит к незначительному снижению интенсивности свободнорадикальных процессов уже на первые сутки после повреждения, в отличие от старых животных, у которых его благоприятное влияние проявляется лишь на 10-е сутки наблюдения, что выражается в нормализации уровня содержания ТБКАП и показателей системы АОЗ.

Аналогичные изменения отмечались нами при исследовании эффективности влияния ПБК на свободнорадикальные процессы в модели термического ожога у молодых и старых мышей. Данные, представленные в табл. 3, 4, свидетельствуют о том, что уже на первые сутки термического воздействия наблюдается увеличение уровня содержания ТБКАП, снижение количества восстановленного глутатиона и повышение активности всех исследуемых ферментов АОЗ. На 15-е сутки наблюдения эти изменения несколько ослабевают, но остаются достаточно выраженными, особенно у старых животных. В отличие от данных, полученных на модели эксцизионных ран, при ожоге, начиная с первых суток вплоть до 15-го дня, наблюдается значимое подавление активности глутатион-S-трансферазы, особенно у старых мышей. При обработке участка кожи, подвергнутого термическому



воздействию, исходная активность фермента восстанавливалась. Характерно, что благоприятное влияние ПБК при ожогах наблюдалось при исследовании параметров, характеризующих интенсивность свободнорадикальных процессов и активность антиоксидантной системы, уже на первые сутки использования ПБК, но отчетливо проявлялось спустя 15 суток, когда все изучаемые показатели достигали нормы как у молодых, так и старых животных.

Сравнивая динамику изменения исследуемых показателей ПОЛ и АОЗ в коже молодых и старых мышей, можно прийти к заключению, что если у молодых особей выявленные через сутки нарушения в отдаленные сроки наблюдения (10-е сутки при механическом повреждении и 15-е сутки при ожоге) отсутствуют или менее выражены, по сравнению с первыми сутками, то у старых животных они, в основном, сохраняются.

Обсуждение результатов. Приведенные результаты указывают на то, что воздействие на кожу исследуемых в проведенных нами экспериментах повреждающих факторов (механическое повреждение, термический ожог) вызывает окислительный стресс, обусловленный усилением перекисных процессов. При этом происходит мобилизация ресурсов антиоксидантной защиты, что выражается в повышении активности основных антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы. Увеличение активности ГТП сопровождается снижением уровня содержания восстановленного глутатиона, который расходуется в глутатиопероксидазной реакции, а также повышением активности каталазы, утилизирующей избыточное количество перекиси водорода, образующейся при активации СОД. Полученные нами данные сопоставимы с исследованиями других авторов, описавших развитие окислительного стресса при облучении мышей ультрафиолетовым светом (310-400 нм), глубоко проникающим в дермо-эпидермальный слой кожи, причем он носил системный характер, так как изменения показателей СРО и АОЗ были обнаружены не только в коже, но и в печени и эритроцитах облученных животных [5, 12]. Снижение активности Г-S-T, отмеченное в работе [12], а также наблюдаемое в проведенных нами экспериментах, свидетельствует о том, что при воздействии на кожу повреждающих факторов, стимулирующих развитие окислительного стресса, происходит нарушение процесса детоксикации продуктов СРО в коже и их выведения из организма. Накопление токсических продуктов ПОЛ может способствовать окислительной модификации белков и образованию карбонилпроизводных аминокислот в них [12], а также приводить к усилению фрагментации геномной ДНК и индуцированию апоптоза в кератиноцитах [8]. Устойчивость к этим процессам при механическом повреждении и термическом ожоге кожи при старении организма ослабевает в силу истощения ресурсов антиоксидантной системы, что связано, как показали проведенные нами исследования, со снижением, в первую очередь, активности антиоксидантных ферментов. ПБК при местном применении препятствует этому, восстанавливая в коже активность антиоксидантных ферментов (СОД и ГТП) и уровень содержания восстановленного глутатиона, при этом снижается интенсивность ПОЛ и возрастает активность глутатион-S-трансферазы, что свидетельствует о нормализации процесса устранения токсических продуктов свободнорадикального окисления. Следует подчеркнуть, что в отличие от старых животных, у молодых особей на 10-15-е сутки после воздействия повреждающего фактора отмечается существенное улучшение показателей ПОЛ и АОЗ и в случае, если ПБК не использовался, что свидетельствует о проявлении более выраженных адаптационных возможностей молодого организма.

Таблица 1

**Показатели про- и антиоксидантной системы
при механическом повреждении кожи у молодых животных**

	Без ПБК			С ПБК		
	контроль	повреждение		контроль	повреждение	
		1-й день	10-й день		1-й день	10-й день
ТБКАП, ммоль/г	0,28 ± 0,04	0,54 ± 0,06*	0,42* ± 0,03	0,25 ± 0,03	0,48 ± 0,05*	0,33 ± 0,04
GSH, ммоль/г	12,52 ± 0,65	10,43 ± 1,25**	10,85 ± 1,66*	13,05 ± 0,95	11,24 ± 1,04*	12,65 ± 1,44
СОД, Ед./г	62,23 ± 7,15	84,12 ± 9,15*	72,15 ± 8,22*	60,14 ± 6,52	81,36 ± 8,85*	63,33 ± 7,15
ГП, милиЕд./г	160,4 ± 20,8	195,5 ± 23,6**	178,6 ± 18,9	168,2 ± 22,2	198,7 ± 19,6*	171,6 ± 16,7
Г-S-T, Ед./г	0,15 ± 0,02	0,09 ± 0,01*	0,13 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,11 ± 0,02*	0,17 ± 0,02
КАТ, милиЕд./г	5,65 ± 1,15	7,55 ± 1,63*	6,82 ± 1,56*	5,82 ± 0,88	6,05 ± 0,76	5,66 ± 1,02

Примечание: *p<0,01; **p<0,05.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ПБК, в состав которого входят гинзенозиды, относящиеся к гликозидам женьшеня, обладающим антиоксидантными свойствами, относится к препаратам, способным препятствовать развитию окислительного стресса при воздействии на кожу повреждающих факторов благодаря увеличению адаптационных ресурсов при старении. Это подтверждается рядом исследований, в которых было показано, что гинзенозиды обладают способностью индуцировать выработку эндогенной супероксиддисмутазы [3, 7].



Можно полагать, что антиоксидантное действие ПБК является одним из существенных механизмов, обуславливающих его противовоспалительное действие и репаративные свойства [1,2].

Таблица 2

Показатели про- и антиоксидантной системы при механическом повреждении кожи у старых животных

	Без ПБК			С ПБК		
	контроль	повреждение		контроль	повреждение	
		1-й день	10-й день		1-й день	10-й день
ТБКАП, ммоль/г	0,66±0,08	1,05±0,12*	0,98±0,14*	0,72±0,04	0,94±0,14*	0,75±0,07
GSH, ммоль/г	9,58±0,75	6,05±0,66*	6,85±1,04*	9,45±0,88	7,55±1,12*	9,12±1,21
СОД, Ед./г	54,55±6,28	68,12±7,05*	67,15±6,05*	52,32±7,02	66,23±6,82*	55,45±5,95
ГП, миллиЕд./г	136,4±16,5	151,2±12,8**	148,8±13,6	138,5±15,4	149,9±14,2*	135,6±12,8
Г-СТ, Ед./г	0,32±0,05	0,36±0,08	0,41±0,11**	0,34±0,04	0,21±0,05*	0,38±0,08
КАТ, миллиЕд./г	4,65±0,75	6,25±1,05*	5,92±0,88**	4,73±0,92	5,98±0,76**	4,81±0,79

Примечание: *p<0,01; **p<0,05.

Таблица 3

Показатели про- и антиоксидантной системы при термическом ожоге кожи у молодых животных

	Без ПБК			С ПБК		
	контроль	ожог		контроль	ожог	
		1-й день	15-й день		1-й день	15-й день
ТБК АП, моль/г	0,35 ± 0,05	0,62 ± 0,08*	0,48 ± 0,06	0,33 ± 0,05	0,55 ± 0,11*	0,36 ± 0,07
GSH, ммоль/г	11,38 ± 0,65	9,25 ± 1,75**	8,73 ± 1,08*	12,25 ± 1,95	11,24 ± 1,07	12,85 ± 1,26
СОД, Ед./г	58,86 ± 6,92	77,4 ± 8,2*	75,3 ± 7,1**	61,19 ± 6,89	72,15 ± 7,44	64,03 ± 6,98
ГП, миллиЕд./г	171,7 ± 30,3	203,7 ± 18,2	182,3 ± 20,4	174,8 ± 26,7	203,7 ± 23,2	179,3 ± 19,1
Г-СТ, Ед./г	0,14 ± 0,05	0,09 ± 0,03*	0,13 ± 0,04	0,19 ± 0,07	0,12 ± 0,05*	0,17 ± 0,04
КАТ, миллиЕд./г	4,38 ± 1,75	6,25 ± 1,43**	6,03 ± 0,66	4,85 ± 0,83	6,05 ± 0,92**	5,03 ± 0,99

Примечание: *p<0,01; **p<0,05.

Таблица 4

Показатели про- и антиоксидантной системы при термическом ожоге кожи у старых животных

	Без ПБК			С ПБК		
	контроль	ожог		контроль	ожог	
		1-й день	15-й день		1-й день	15-й день
ТБКАП, ммоль/г	0,74 ± 0,27	1,42 ± 0,31*	1,05 ± 0,23*	0,72 ± 0,26	0,87 ± 0,21*	0,79 ± 0,19
GSH, ммоль/г	10,03±0,82	7,85 ± 0,77*	7,93 ± 0,93	9,83 ± 1,28	8,55 ± 0,72*	9,46 ± 1,03
СОД, Ед./г	60,05±6,13	72,26±7,45*	66,28±7,67	61,13±7,02	69,14±5,49*	58,77±6,02
ГП, миллиЕд./г	148,3±21,1	163,2±17,9*	168,8±18,9*	155,8±21,6	159,6±19,7	148,1±16,3
Г-СТ, Ед./г	0,37±0,08	0,16±0,03**	0,19±0,04**	0,34±0,06	0,31±0,08	0,38±0,12

Примечание: *p<0,01; **p<0,05.

Литература

1. Борц, М.С. Механизмы геропротекторного действия биоантиоксидантного комплекса из биомассы женьшеня / М.С. Борц, Е.Г. Николаева, Н.В. Кожемякина, И.В. Борзова // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2012, № 18/1. – С. 24-29.
2. Рыжак, Г.А. Противовоспалительное и регенерирующее действие геропротектора на основе экстракта из биомассы женьшеня / Г.А. Рыжак, М.С. Борц, Е.Г. Николаева, Н.В. Кожемякина, И.В. Борзова // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2012, № 17/1. – С. 31-36.
3. Allemann, I.B. Antioxidants used in skin care formulations / I.B. Allemann // SkinTherapyLett. – 2008. – V. 13(7). – P. 5-9.
4. Buege, J.A. Methods Enzymol / J.A. Buege, S.D. Aust // – 1978. – V.52. – P. 302-310.
5. Chi, C. Quantitative measurements of oxidative stress in mouse skin induced by X-ray irradiation / C. Chi, R. Tanaka, Y. Okuda et al. // Chem. Pharm. Bull. – 2005. – V. 53 (11). – P. 1411-1415.
6. Ewing, J.F. Anal. Biochem / J.F. Ewing, D.R. Janero // – 1995. – V. 232. – P. 243-248.



7. Feng-Jie, L. Allelopathic effects of ginsenosides on in vitro growth and antioxidant enzymes activity of ginseng callus / L. Feng-Jie, Z. Ai-Hua, X. Yong-Hua, Z. Lian-Xue // *Allelopathy Journal*. – 2010. – № 26(2). – P. 13-22.
8. Iwasaki, K. UV-induced apoptosis in rat skin / K. Iwasaki, M. Izawa, M. Mihara // *J. Dermatol. Sci.* – 1996. – V. 12. – P. 31-35.
9. Kitts, D. Efficacy and safety of ginseng / D. Kitts, C. Hu // *Public Health Nutrition*. – 2000. – P. 473-485.
10. Lowry, O.H., Rosbrough N., Farr A., Randall R. // *J. Biol. Chem.* – 1951. – № 193. – P. 265.
11. Sedlak, J., Lindsay R.H. // *Anal. Biochem.* – 1968. – V. 25. – P. 192-205.
12. Svobodova, A.R. Acute exposure to solar stimulated ultraviolet radiation affects oxidative stress-related biomarkers in skin, liver and blood of hairless mice / A.R. Svobodova, A. Galandakova, J. Sianska, D. Dolesal et al. // *Biol. Pharm. Bull.* – 2011. – V. 34 (4). – P. 471-479.
13. Tappel, A.I. // *Methods Enzymol.* – 1978. – V 52. – P. 506-513.

THE DISTURBANCES CORRECTION OF OXIDATIVE METABOLISM IN MICE SKIN BY PEPTIDE-BIOANTIOXIDANT COMPLEX

**L.A. BORZOVA
V.A. ARUTIUNOV
L.S. KOZINA
G.F. RYZHAK**

*Saint Petersburg Institute
of Bioregulation and Gerontology*

e-mail: milakozina@mail.ru

The role of oxidative stress in skin damage initiated by mechanical trauma or term action in mice of different age (3 and 18 months) was investigated. It has been established that skin damage was accompanied by the intensification of lipid peroxidation, decrease of the reduced glutathione form level, and activity of glutathione-S-transferase in blood serum. At the same time the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase were increased. These changes were more revealed in old animals, had a prolonged period and weren't corrected with peptide-bioantioxidant complex from biomass of *Panax ginseng*. The data obtained suggests that this complex may be considered as promising preparation for prevention or deceleration of skin damage and aging.

Keywords: peptide-bioantioxidant complex, oxidative stress, lipids peroxidation, antioxidative system, skin damage.