

005054817

На правах рукописи

БОРЗОВА
Ирина Владимировна

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ
ПЕПТИДНО-АНТИОКСИДАНТНОГО КОМПЛЕКСА
В ГЕРОНТОКОСМЕТОЛОГИИ**

14.01.30 – геронтология и гериатрия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

15 НОЯ 2012

Санкт-Петербург – 2012

Работа выполнена в лаборатории возрастной клинической патологии и в лаборатории биохимии Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН

Научные руководители:

заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор
Рыжак Галина Анатольевна
доктор биологических наук, профессор
Козина Людмила Семеновна

Официальные оппоненты:

Кветной Игорь Моисеевич, заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное учреждение "Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта" СЗО РАМН (ФГБУ «НИИ АиГ им. Д.О. Отта» СЗО РАМН), руководитель отдела патоморфологии.

Королькова Татьяна Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО СЗГМУ им. Мечникова МЗ РФ), заведующая кафедрой косметологии.

Ведущая организация:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет» Федерального агентства по образованию РФ (ГБОУ ВПО СПбГУ ФАО РФ).

Защита диссертации состоится «30» ноября 2012 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета Д 601.001.01 при Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН по адресу: 197110, Россия, Санкт-Петербург, пр. Динамо, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН (197110, Россия, Санкт-Петербург, пр. Динамо, д. 3).

Автореферат разослан «26» октября 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета
доктор биологических наук, профессор

Козина Л.С.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Современный темп жизни, ухудшение экологической ситуации, повышенное ультрафиолетовое (УФ) излучение, резкая смена температурных режимов, стрессы, несбалансированное питание - все эти факторы негативно сказываются на состоянии нашего организма и, в первую очередь, на состоянии кожи, и приводят к её преждевременному старению. Решающую роль в геронтогенезе играют свободные радикалы, участвующие в перекисном окислении фосфолипидов клеточных мембран и белков [Harman D., 1956; Rattan S.I., 2006]. Остановить биологическое старение кожи практически невозможно, однако можно замедлить этот процесс. Последнее поколение средств по уходу за кожей не является косметикой в прямом смысле слова, эти продукты содержат в своем составе биоактивные вещества, обладающие лечебными и профилактическими свойствами [Rivers J.K., 2008]. В качестве активных компонентов этих средств часто используют экстракты растений, издавна известные своими целебными свойствами [Singh R.P., Agarwal R., 2009].

Женьшень - одно из наиболее известных лекарственных растений в мире. Корень женьшеня стимулирует центральную нервную систему, снимает слабость, повышенную утомляемость и сонливость, повышает артериальное давление, стимулирует половую функцию, снижает содержание холестерина и глюкозы в крови, активирует деятельность надпочечников, способствует повышению работоспособности при умственных и физических нагрузках [в кн. *Panax ginseng*, 2009]. Его биологическую активность связывают с наличием в его составе целого спектра биологически активных веществ, в том числе три萜пеновых гликозидов (гинзенозидов), которые обладают уникальной способностью индуцировать в нашем организме выработку эндогенной супероксиддисмутазы - фермента, обладающего выраженными антиоксидантными и геропротекторными свойствами [Johnson F., Giulivi C., 2005; Lim S. et al., 2010; Saumya S.M., Mahaboob B., 2011]. При специальной обработке [Слепян Л.И. и соавт., 1995] биологически активные вещества, в том числе и гинзенозиды, в составе экстракта из биомассы женьшеня стабильны при введении в косметические средства и благодаря амфифильным свойствам легко проникают в ткани, где могут оказывать свое биологическое действие. Ранее были описаны геропротекторные свойства биоантиоксидантного комплекса из биомассы женьшеня [Костылева В.В. и соавт., 2009].

Разработки Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии позволили создать трипептид Lys-Glu-Asp, исследование которого показало его тканеспецифическое действие на клетки сосудистой стенки молодых и старых животных, что свидетельствует о перспективности его использования для создания эффективных косметологических средств для улучшения микроциркуляции в коже [Войцеховская М.А. и соавт., 2011].

Вышеизложенное дает основание полагать, что использование комбинированных препаратов, содержащих биологически активные соединения женьшеня и пептиды, может быть особенно эффективным при коррекции возрастных изменений кожи, в связи с чем были сформулированы цель и задачи настоящего исследования.

Целью настоящего исследования было изучение геропротекторных свойств пептидно-антиоксидантного комплекса на основе трипептида Lys-Glu-Asp и экстракта из биомассы женьшеня и обоснование его применения в геронтокосметологии для коррекции возрастных изменений кожи.

В соответствии с поставленной целью были определены **задачи исследования**:

1. Изучить антиоксидантные свойства пептидно-антиоксидантного комплекса в экспериментальных моделях.
2. Выявить наличие регенерирующих свойств и ранозаживляющего действия пептидно-антиоксидантного комплекса.

3. Исследовать геропротекторные свойства пептидно-антиоксидантного комплекса на здоровых добровольцах разного возраста.

4. Исследовать эффективность применения пептидно-антиоксидантного комплекса для коррекции антиоксидантного статуса женщин разного возраста при мезотерапии.

Научная новизна исследования

Впервые изучены геропротекторные свойства пептидно-антиоксидантного комплекса, содержащего трипептид Lys-Glu-Asp и экстракт из биомассы женьшеня. В экспериментальных моделях механического и термического повреждения кожи молодых и старых животных установлено, что в основе геропротекторного действия комплекса лежит его способность нормализовать показатели антиоксидантной защиты. Показано, что применение пептидно-антиоксидантного комплекса способствует ускорению эпителизации поврежденной поверхности кожи у молодых животных в 1,3 раза, а у старых мышей – в 1,6 раза по сравнению с соответствующим контролем, при этом сроки эпителизации поверхности кожи у старых животных при применении комплекса не отличались от молодых животных.

Доказаны регенеративные свойства пептидно-антиоксидантного комплекса, выражающиеся в повышении интенсивности клеточного дыхания и увеличении скорости размножения клеток. Показано противоотечное действие комплекса, о чем свидетельствовало уменьшение легочного коэффициента на фоне развивающегося отека в экспериментальной модели адреналинового отека при введении комплекса через 5 мин после введения адреналина, а также протекторное действие при введении комплекса за 45 мин до введения адреналина.

Впервые в клинических исследованиях установлено выраженное регенерирующее действие пептидно-антиоксидантного комплекса, применение которого в составе геля способствовало достоверному уменьшению количества морщин на коже в области вокруг глаз через 2-4 часа после нанесения геля до 60% от исходного уровня у пациентов разного возраста, в том числе пожилого.

Впервые выявлено, что при мезотерапии происходит нарушение антиоксидантного статуса, выражающееся в ухудшении показателей антиоксидантной системы организма на фоне усиления процессов перекисного окисления липидов. Показано, что у пациенток молодого и среднего возраста резервных возможностей организма достаточно для нормализации показателей про- и антиоксидантной систем организма через месяц после окончания процедур мезотерапии. У пациенток в возрасте старше 55 лет нормализация антиоксидантного статуса организма происходит только при применении пептидно-антиоксидантного комплекса.

Практическая значимость исследования

Впервые в экспериментальных исследованиях показано, что разработанный пептидно-антиоксидантный комплекс на основе трипептида Lys-Glu-Asp и экстракта из биомассы женьшеня обладает антиоксидантными, противовоспалительными, регенерирующими свойствами. Доказано отсутствие токсического действия при исследовании острой и хронической токсичности, что свидетельствует о безопасности применения комплекса в составе косметических средств.

Проведено клиническое изучение косметических средств, содержащих пептидно-антиоксидантный комплекс, с участием добровольцев разного возраста, в результате которого доказана эффективность их применения с целью коррекции возрастных изменений кожи.

Установлена эффективность и целесообразность применения косметического средства, содержащего пептидно-антиоксидантный комплекс, для коррекции повреждений кожи, возникающих после проведения процедур мезотерапии, особенно у лиц пожилого возраста.

Положения, выносимые на защиту

1. Применение пептидно-антиоксидантного комплекса на основе трипептида Lys-Glu-Asp и экстракта из биомассы женьшеня при механическом и термическом повреждении кожи нормализует показатели про- и антиоксидантной защиты в коже у молодых и старых мышей.

2. Пептидно-антиоксидантный комплекс обладает выраженными регенеративными свойствами и способствует ускорению эпителизации поверхности кожи при ожоговой болезни легкой степени у мышей, при этом сроки полной эпителизации поврежденной поверхности не отличаются у молодых и старых животных.

3. Пептидно-антиоксидантный комплекс в составе косметического средства способствует уменьшению количества морщин на коже в области вокруг глаз у пациентов среднего и пожилого возраста, повышению интенсивности микроциркуляции и повышению гидратности кожи.

4. При мезотерапии возникают нарушения антиоксидантного статуса организма, показатели которого у пациентов молодого и среднего возраста через месяц после окончания процедур мезотерапии восстанавливаются до нормальных значений, а у пациентов пожилого возраста нормализуются только при применении пептидно-антиоксидантного комплекса.

5. Пептидно-антиоксидантный комплекс на основе трипептида Lys-Glu-Asp и экстракта из биомассы женьшеня обладает геропротекторным действием, основанным на антиоксидантных, противовоспалительных, регенерирующих свойствах, его целесообразно применять в составе косметических средств в геронтокосметологии с целью коррекции возрастных изменений кожи и повышения резервных возможностей организма пациентов пожилого возраста.

Связь с научно-исследовательской работой Института

Диссертационная работа является научной темой, выполняемой по основному плану НИР Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии.

Апробация и реализация результатов диссертации

Результаты исследований, включенных в диссертацию, доложены и обсуждены на международном форуме «Старшее поколение» (Санкт-Петербург, 2012), геронтологической конференции с международным участием «Пушковские чтения» (Санкт-Петербург, 2012).

Результаты исследования используются в практической деятельности ряда лечебно-профилактических учреждений Санкт-Петербурга, в научной деятельности Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН.

Личный вклад автора

Автором лично определены цель и задачи исследования, проанализирована отечественная и зарубежная литература по изучаемой проблеме, разработаны методические подходы к проведению исследования. Автор непосредственно производила сбор данных, обработку и обобщение полученных материалов, подготовку основных публикаций по выполненной работе, написание и оформление рукописи.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 работ, в том числе 5 статей в научных журналах, включенных в Перечень ВАК Минобрнауки РФ, 4 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из оглавления, введения, общей характеристики работы, основной части, состоящей из пяти глав, выводов, практических рекомендаций, списка использованных литературных источников. Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста, содержит 17 таблиц, 4 рисунка и список использованной литературы, включающий 216 источников, из них 96 отечественных и 120 зарубежных..

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Пептидно-антиоксидантный комплекс

Разработана композиция, состоящая из 2 биологически активных субстанции в оптимально подобранных сочетаниях:

1) трипептид Lys-Glu-Asp, синтезированный на основании анализа аминокислотного состава экстракта из стенки сосудов в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии; в проведенных ранее исследованиях обладал пролиферативными свойствами в отношении ткани сосудистой стенки;

2) биоантиоксидантный комплекс (БАК), полученный из биомассы женьшеня *Panax ginseng* C.A. Meyer биотехнологическим путем - экстракцией в «мягком» режиме. В состав БАК входит комплекс активных компонентов - ферментов (супероксиддисмутазы, пероксидазы, тритерпеновых гликозидов, флавоноидов, микро- и макроэлементов. Проведенные ранее исследования показали, что БАК на основе экстракта из биомассы женьшеня обладает выраженными антиоксидантными свойствами [Костылева В.В. и соавт., 2009].

Полученная комбинированная субстанция получила название пептидно-антиоксидантный комплекс (ПАК) и была включена в состав косметического крема, свойства которого изучали в экспериментальных и клинических исследованиях [Николаева Е.Г. и соавт., 1997].

Экспериментальные исследования

Все экспериментальные исследования на животных проводили в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki) 1964 г. с изменениями от 1975, 1983, 1989, 2000 гг.

Исследование нарушения оксидативного метаболизма в коже мышей разного возраста, вызванные механическим повреждением и ожогом, и их коррекции с помощью пептидно-антиоксидантного комплекса

В модели эксцизионных ран использовали 40 беспородных белых мышей самок (питомник «Рапполово» РАМН) с массой тела 18–20 г в возрасте 3 месяцев (молодые животные) и 40 самок с массой тела 24–28 г в возрасте 18 месяцев (старые животные). У животных выстригали симметричные участки кожи спины площадью 1 см². Состояние наркоза вызывали введением кетамина в дозировке 0,5 мг/кг массы тела. На выстриженные участки наносили повреждение поверхности с помощью скарификатора. На участки, расположенные с правой стороны тела животного, после повреждения наносили крем, содержащий 6 % ПАК, 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 выводили из опыта, препарировали кусочки поврежденной кожи массой 200–300 мг и хранили их при температуре минус 80°С до дальнейшего исследования. В модели термического ожога использовали 20 самок белых беспородных мышей (питомник «Рапполово» РАМН) в возрасте 3 и 18 месяцев. Участок спины площадью 7,5 % от общей поверхности тела выстригали и на него наносили термический ожог первой степени с помощью установки с кварцево-галогеновыми лампами (экспозиция 0,5 с). Животных методом рандомизации разделили на 2 группы: у 10 животных контрольной группы поврежденная поверхность заживала естественным путем; 10 животным подопытной группы сразу после ожога в течение 1 и 15 дней после повреждения на поврежденную поверхность кожи наносили крем, содержащий 6% ПАК. Об эффек-

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

При проведении биохимических исследований 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 (ГП), глутатион-S-трансферазы (GST) и каталазы (КАТ) [Арутюнян и соавт., 2000].

Общую антиоксидантную активность ПАК определяли по стандартной методике спектрофотометрически с дианизидиновым реактивом и рибофлавином при длине волны 460 нм [Fridovich I., McCord J., 1969]. Определение количества суммарных гликозидов (сапонинов) в составе ПАК производили по методу, который основан на реакции гликозидов с ванилином с последующей регистрацией окрашенного продукта при длине волны 544 нм [Атан А.С., 1995]. В качестве стандарта использовали эргокальциферол.

Для оценки интенсивности клеточного дыхания и скорости размножения клеток под действием ПАК использовали фибробласты человека в культуре, которые выращивали по стандартной методике в 24-х луночных планшетах до получения сплошного монослоя. Интенсивность клеточного дыхания оценивали в тесте с нитросиним тетразолием, скорость размножения клеток – по содержанию общего белка в образцах по методу Lowry [Lowry O.H. et al., 1951].

Исследование противовоспалительного и регенерирующего действия герпротектора на основе пептидно-антиоксидантного комплекса

Исследование острой и хронической токсичности

Определение острой токсичности ПАК проводили на половозрелых белых нелинейных мышах и крысах с использованием внутрибрюшинного, внутрижелудочного и внутримышечного способов введения препарата общепринятым методом [Руководство под ред. Хабриева У.Р., 2006]. Наблюдение за животными проводили в течение 14 дней, по истечении этого срока регистрировали гибель животных и на основании этого рассчитывали LD₅₀ по методу Кёрбера [Lim S. et al., 2010]. В экспериментах было использовано 144 самца и самки белых нелинейных мышей с массой тела 20-24 г (питомник «Рапполово» РАМН) и 168 самцов и самок белых нелинейных крыс с массой тела 180-220 г (разводка вивария ЦНИРРИ МЗ РФ). В каждой подопытной группе было по 12 животных (6 самок и 6 самцов).

ПАК вводили мышам в возрастающих дозах по Литчфилду-Уилкоксона [Lim S. et al., 2010]: внутрибрюшинно – в дозах от 2000 мг/кг до 5000 мг/кг; внутрижелудочно и внутримышечно – в дозах от 3000 мг/кг до 6000 мг/кг. Для оценки хронической токсичности ПАК вводили в дозе 1/10 LD₅₀ в течение 30 дней, затем наблюдали за поведением животных в течение следующих 30 дней.

Модель линейных кожных ран

Изучение ранозаживляющего действия ПАК проводили на модели линейных кожных ран у 60 половозрелых крыс, которым под легким эфирным наркозом в области спины наносили линейную рану в продольном направлении длиной 5 см. Участок раневой поверхности кожи высотой 2 см и шириной 3 см (1,5 см по обе стороны рубца) исследовали с помощью специального устройства для определения прочности рубца, подвешивая груз увеличивающейся массы к лоскуту кожи.

Модель ватной гранулемы

Изучение антипролиферативных свойств ПАК проводили на модели ватной гранулёмы у крыс с определением массы грануляционно-фиброзной ткани. Для этого у 30 крыс, находящихся под легким эфирным наркозом, в области спины тщательно выстригали шерсть, в асептических условиях ножницами делали продольный разрез кожи и подкож-

ной клетчатки длиной 1-2 см. В подкожной клетчатке пинцетом формировали полость, куда помещали предварительно простерилизованный ватный шарик массой 15 мг, после чего на рану накладывали 1-2 шва для фиксации шарика. Вес образовавшейся грануляционно-фиброзной ткани определяли по разнице между весом высушенной гранулемы и имплантированного ватного шарика.

Модель адреналинового отека

Для оценки влияния пептидно-антиоксидантного комплекса на экссудацию использовали модель адреналинового отека легких у мышей. Оценку эффективности препарата проводили, вычисляя легочный коэффициент, равный отношению массы легких к 100 г массы тела животного. В качестве препаратов сравнения использовали нестероидные противовоспалительные средства, эффективно приостанавливающие развитие отека: бутадион и ортофен.

Клинические исследования

Исследование эффективности коррекции возрастных изменений кожи косметическими средствами с пептидно-антиоксидантным комплексом

Исследование эффективности косметического средства, содержащего ПАК, проводили с участием волонтеров – клинически здоровых людей, мужчин и женщин в возрасте от 20 до 66 лет, неотягощенных аллергологическим анамнезом. Для оценки раздражающего и аллергизирующего действия крема, содержащего 6% ПАК, у волонтеров (25 женщин-добровольцев в возрасте от 20 до 66 лет) была проведена лоскутная проба. Кожные пробы проводили нанесением 0,5 г крема на предплечье на 24 ч и 48 ч, а затем многократные аппликации раз в неделю в течение 30 дней. Фиксировали температуру тела волонтеров ежедневно в течение 30 дней, а также проводили гематологические исследования до и после испытаний.

Для оценки гидратности (влажности) кожи при применении геля использовали метод реовазографии (РВГ). Проводили двукратное обследование волонтеров (25 женщин в возрасте от 25 до 63 лет): до применения геля в области предплечий обеих рук и после 5-ой процедуры применения средства (в этом исследовании в кожу предплечий втирали по 2 мл средства).

Для оценки лифтинг-эффекта гель с пептидно-антиоксидантным комплексом наносили в количестве 1 мл и равномерно вбивали легкими движениями подушечками пальцев в область кожи вокруг глаз волонтеров (25 человек в возрасте от 35 до 65 лет). Результаты оценивали по степени снижения количества морщинок на 1 см² в области вокруг глаз, а также по степени впитывания геля и по изменению тургора кожи.

Оценку микроциркуляции крови при использовании крема с 6% ПАК проводили в группе из 20 человек (8 мужчин и 12 женщин) в возрасте от 37 до 64 лет с помощью тепловизионного метода

Аутофлору кожи лба у 25 добровольцев (15 женщин, 10 мужчин) в возрасте от 36 до 62 лет исследовали методом агаровых отпечатков. Для этого предметное стекло с застывшей агаровой средой на несколько секунд прикладывали к коже лба до и после использования крема. Отпечаток помещали в чашку Петри, а затем инкубировали в течение 48 ч в термостате при температуре 37 °С. После инкубации подсчитывали число выросших колоний на 1 см² агара.

Исследование эффективности применения пептидно-антиоксидантного комплекса при мезотерапии у лиц среднего и пожилого возраста

В исследовании принимали участие 85 женщин, которые были разделены на 2 возрастные группы: среднего возраста 25–40 лет (35 человек) и пожилого возраста 55–68 лет (50 человек), каждая из которых, в свою очередь, была разделена на 2 подгруппы – контрольную и основную. Отступление от принятых ВОЗ градаций возрастных периодов свя-

зано с резким изменением у женщин в возрасте старше 55 лет гормонального статуса, который оказывает наибольшее влияние на состояние кожи

Активность системы антиоксидантной защиты оценивали, определяя интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ), уровень общей антиокислительной активности (ОАА) и активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГП). Интенсивность ПОЛ оценивали по показателям H_2O_2 -индуцируемой люминолзависимой хемиллюминесценции (ХЛ) и высоты максимальной вспышки (МВ), значения которых характеризуют интенсивность свободнорадикальных процессов и расходования свободных радикалов при их взаимодействии с эндогенными антиоксидантами, измеряемую на хемиллюминиметре Emilite-1105 (Россия).

Статистические методы обработки результатов исследования

Статистическую обработку результатов исследования проводили по стандартным программам для персональных компьютеров. Использовали специализированные пакеты прикладных программ для медико-биологических исследований (“Statistica-5.0” и “Microsoft Excell”), обеспечивающих выполнение общепринятых математико-статистических методов (расчет параметров вариации признаков, t-критерий Стьюдента для зависимых равновеликих и независимых разновеликих выборок) [Гланц С., 1999; Григорьев С.Г., 2002].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Результаты экспериментальных исследований

Исследование нарушения оксидативного метаболизма в коже мышей разного возраста при повреждении и их коррекции с помощью пептидно-антиоксидантного комплекса

Модель эксцизионных ран

Как видно из данных, представленных в таблицах 1 и 2, после механического повреждения кожи как у молодых, так и у старых мышей уже в первые сутки наблюдалось усиление процессов перекисного окисления липидов, о чем можно судить на основании определения ТБКАП. Следует отметить, что интенсивность ПОЛ в коже старых мышей исходно была выше, чем у молодых, что соответствует представлениям о том, что с возрастом в различных органах и тканях животных и человека интенсивность ПОЛ возрастает. Наряду с повышением уровня содержания ТБКАП, происходило некоторое снижение количества восстановленного глутатиона в коже старых мышей с эксцизионными ранами, что также указывает на интенсификацию перекисных процессов в этих условиях. Это сопровождалось изменением активности антиоксидантных ферментов. Так, активность СОД возрастала на 35,2 % ($p < 0,05$) у молодых мышей и 24,8 % - у старых животных; активность ГП повышалась на 21,9 % ($p < 0,05$) у молодых мышей и на 10,9% - у старых. Примерно в одинаковой степени при этом повышалась активность КАТ. Активность GST при этом, напротив, несколько снижалась.

На 10-е сутки после механического повреждения заживление эксцизионных ран сопровождалось 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 животных процесс заживления поврежденного участка кожи происходил медленнее по сравнению с молодыми животными.

Таблица 1

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

Показатель	Без применения ПАК			С применением ПАК		
	Исходный	После повреждения		Исходный	После повреждения	
		1-е сут	10-е сут		1-е сут	10-е сут
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, мили ед./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-ST, 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, мили ед./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: здесь и в таблицах 2-4 *p<0,01; **p<0,05 по сравнению с исходным показателем.

Таблица 2

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

Показатель	Без применения ПАК			С применением ПАК		
	Исходный	После повреждения		Исходный	После повреждения	
		1-е сут	10-е сут		1-е сут	10-е сут
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, мили ед./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-ST, 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, мили ед./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

Использование ПАК у молодых мышей приводило к незначительному снижению интенсивности свободнорадикальных процессов уже в 1-е сутки после повреждения по сравнению с показателями у контрольных животных (без применения ПАК), к 10-м суткам наблюдений показатели возвращались к исходным значениям. У старых животных эффект применения ПАК проявлялся лишь на 10-е сутки наблюдения, но при этом все показатели антиоксидантной защиты практически достигали исходных значений.

Модель термического ожога

При исследовании эффективности влияния ПАК на свободнорадикальные процессы в модели термического ожога у молодых и старых мышей получены результаты, во многом схожие с изменениями, наблюдаемыми в модели эксцизионных ран. Уже на 1-е сутки после термического воздействия наблюдалось увеличение уровня содержания ТБКАП, снижение количества восстановленного глутатиона и повышение активности всех исследуемых ферментов АОЗ. На 15-е сутки наблюдения эти изменения несколько ослабевали, но оставались достаточно выраженными, особенно у старых животных. В от-

личие от данных, полученных на модели эксцизионных ран, при ожоге, начиная с 1-х суток вплоть до 15-го дня наблюдения, отмечалось значимое подавление активности глутатион-S-трансферазы, особенно у старых мышей. При обработке ПАК участка кожи, подвергнутого термическому воздействию, исходная активность фермента восстанавливалась. Характерно, что благоприятное влияние ПАК при ожогах наблюдалось при исследовании параметров, характеризующих интенсивность свободнорадикальных процессов и активность антиоксидантной системы, уже в 1-е сутки применения ПАК, 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) отсутствовали или были менее выражены по сравнению с 1-ми сутками, то у старых животных они, в основном, сохранялись. И только применение пептидно-антиоксидантного комплекса способствовало нормализации исследуемых показателей к 10-м и 15-м суткам, соответственно, даже у старых животных. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ПАК, в состав которого входят гинзенозиды, относящиеся к гликозидам женьшеня, обладающим антиоксидантными свойствами, а также пептид Lys-Glu-Asp, относится к препаратам, способным препятствовать развитию окислительного стресса при воздействии на кожу повреждающих факторов благодаря увеличению адаптационных ресурсов при старении.

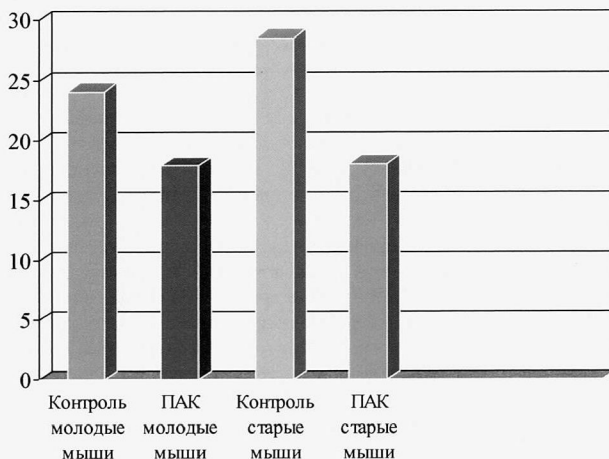
Исследование механизмов гепропротекторного действия пептидно-антиоксидантного комплекса

Определение общей антиоксидантной активности пептидно-антиоксидантного комплекса

В ходе исследования установлено, что пептидно-антиоксидантный комплекс на основе экстракта из биомассы женьшеня и трипептида Lys-Glu-Asp, обладает высокой антиоксидантной активностью, которая составляет 25,5 ед. опт. плотн./мг белка, что в 3,5 раза превышает антиоксидантную активность известного антиоксиданта рибофлавина ($p < 0,01$). Сравнение активности ПАК и широко применяемой в медицине настойки корня женьшеня показало, что настойка по антиоксидантным свойствам значительно уступает ПАК: её активность составила всего 3,5 ед. опт. плотн./мг белка ($p < 0,05$). Антиоксидантные свойства женьшеня, вероятно, связаны с наличием в его составе гликозидов – гинзенозидов [Kitts D., Hu C., 2000.]. Комплекс из биомассы женьшеня давал цветную реакцию на три-терпеновые гликозиды – содержание суммарных гликозидов в препарате достигало 5,1% от сухого веса вещества: для сравнения – в сухом растительном сырье (корне женьшеня) содержание гинзенозидов составляло 0,3-1,0%.

Модель термического ожога

Для изучения влияния ПАК на репаративные процессы использовали экспериментальную модель термического ожога. Легкая степень ожоговой болезни приводила к гибели части подопытных животных (29-30% у молодых и старых животных) и характерным местным изменениям: гибели кожного эпителия, эритеме и отечности кожи с последующим медленным восстановлением эпителиального слоя и волосяного покрова. Через 1 месяц наблюдения установлено, что нанесение крема, содержащего 6% ПАК, на обожженную поверхность способствовало улучшению общего состояния подопытных животных (активность, поедание корма, изменение массы тела) и увеличивало их выживаемость на 27% по сравнению с контролем как у молодых, так и у старых мышей ($p < 0,01$). Крем обладал противовоспалительным действием, способствовал исчезновению эритемы и отечности.



*Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем.*

Рис. 1. Влияние пептидно-антиоксидантного комплекса на сроки эпителизации поврежденной кожи при термическом поражении.

Обращают на себя внимание сроки эпителизации кожи (рис. 1). У старых животных контрольной группы (без применения ПАК) эпителизация поврежденной поверхности кожи наступала в 1,2 раза позже, чем у молодых животных. Применение крема, содержащего 6% ПАК, способствовало ускорению эпителизации у молодых животных в 1,3 раза, а у старых мышей – в 1,6 раза по сравнению с соответствующим контролем ($p < 0,01$). Важно отметить, что сроки эпителизации поверхности кожи у молодых и старых животных при применении ПАК практически не отличались ($17,9 \pm 1,2$ сут и $18,0 \pm 1,5$ сут, соответственно). Таким образом, в результате проведенных испытаний было установлено выраженное противоожоговое действие ПАК при экспериментальных ожогах легкой степени, что свидетельствует о регенеративных свойствах комплекса.

Использование крема при тяжелых термических ожогах (ожог IIIб степени) было неэффективно.

Оценка интенсивности клеточного дыхания

Исследования, проведенные на фибробластах человека, отчасти помогли объяснить положительное влияние ПАК на процессы регенерации. Установлено, что под воздействием ПАК в бессывороточной среде усиливалась интенсивность клеточного дыхания и увеличивалась скорость размножения клеток, а это напрямую определяет скорость регенерации в целом.

Показано, что в среде, содержащей 10% сыворотки крови, ПАК в концентрациях 20%, 10% и 5% значительно повышал интенсивность клеточного дыхания – на 21% и увеличивал скорость размножения клеток на 8% (показатель содержания общего белка), стимулируя таким образом накопление клеточной биомассы (табл. 3). Длительное инкубирование фибробластов в присутствии 50% раствора ПАК приводило к полному снятию монослоя с субстрата, что, вероятно, связано с наличием биологически активных соединений в растворе, а именно, сапонинов, действующих на клеточные рецепторы на уровне межклеточных контактов, что приводило к откреплению клеток от пластика, на котором они растут.

Таблица 3

Влияние пептидно-антиоксидантного комплекса на интенсивность клеточного дыхания и содержание общего белка в присутствии 10% сыворотки

Группа клеток		Интенсивность клеточного дыхания, %	Содержание общего белка, мкг/мл
Контроль (без комплекса)		100,0	156,0±11,5
ПАК, концентрация (%)	50%	79,2±11,5	110,4±11,2
	40%	86,5±4,9	119,8±8,8
	30%	90,3±8,5	124,4±6,7
	20%	115,1±7,1*	160,1±5,9*
	10%	117,5±13,1*	167,0±7,9*
	5%	121,2±12,9*	168,2±8,2*

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с показателем в контроле.

В косметических средствах это действие может приводить к эффекту отшелушивания мертвых клеток, которое стимулирует в эпидермисе рост молодых клеток, что, в свою очередь, приводит к повышению тургора кожи и разглаживанию морщин. Таким образом, показана перспективность использования ПАК в косметических средствах в качестве компонента, обладающего геропротекторным действием и стимулирующего регенерацию клеток.

Исследования противовоспалительного и регенерирующего действия геропротектора на основе экстракта из биомассы женьшеня

Исследование острой и хронической токсичности

Результаты исследования показали, что при внутрижелудочном, внутримышечном и внутрибрюшинном пути введения ПАК мышам и крысам в дозах от 3000 до 6000 мг/кг, превосходящих рекомендованную терапевтическую дозу более чем в 3000-6000 раз препарат практически нетоксичен для организма.

При хроническом ежедневном внутрижелудочном введении ПАК крысам в количестве 1/10 от максимально переносимой дозы в течение 30 дней летальных эффектов не наблюдали, не было обнаружено и значимых различий в показателях поведенческих реакций животных в группах хронического введения и контроля. Основываясь на интегральном показателе кумуляции и показателях общей нелетальной токсичности, пептидно-антиоксидантный комплекс был признан не способным к кумуляции и нетоксичным.

Модель линейных ран кожи

На первом этапе исследований для оценки ранозаживляющего действия ПАК использовали модель линейных кожных ран у крыс. В качестве препарата сравнения вводили трипсин. Установлено, что внутрибрюшинное введение обоих препаратов не оказывало ранозаживляющего действия. Однако при местном применении ПАК показатель тензиометрии был в 1,85 раза больше, чем в контроле, а при местном применении трипсина – в 2,49 раза больше. Таким образом, при применении ПАК местно в 50% растворе глицерина наблюдали выраженное ранозаживляющее действие, сопоставимое с действием трипсина.

МАССА ОБРАЗОВАВШЕЙСЯ ГРАНУЛЯЦИОННО-ФИБРОЗНОЙ
ТКАНИ, мг

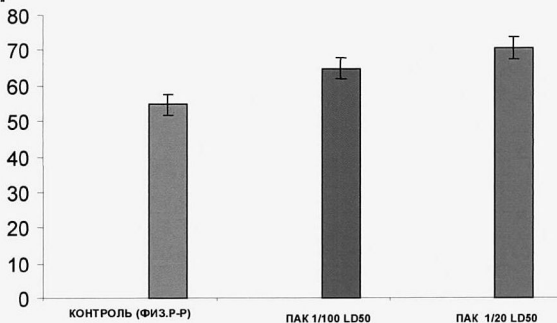


Рис.2. Влияние пептидно-антиоксидантного комплекса на образование грануляционно-фиброзной ткани в модели ватной гранулемы у крыс.

Таблица 4

Результаты изучения антипролиферативных свойств пептидно-антиоксидантного комплекса на модели ватной гранулемы у крыс

Группа животных (n=10 в каждой группе)	Масса извлеченной гранулемы, мг	Масса высушенной гранулемы, мг	Масса образовавшейся грануляционно-фиброзной ткани, мг	p по отношению к контролю
Контроль физ. р-р внутривенно вокруг гранулемы ежедневно	89,5±6,01	69,6±5,95	54,6±5,94	-
ПАК 1/100 LD ₅₀ внутривенно вокруг гранулемы ежедневно *	95,8±7,21	79,8±15,21	64,8±15,34	p>0,05
ПАК 1/20 LD ₅₀ внутривенно вокруг гранулемы ежедневно	95,6±5,67	85,5±9,97	70,5±10,28	p>0,05

Примечание: *ПАК каждый раз перед употреблением разводили дистиллированной водой и определяли концентрацию белка в растворе, для расчета дозы использовали LD₅₀ при внутривенном введении.

Модель ватной гранулемы

Антипролиферативные свойства ПАК оценивали в модели ватной гранулемы. Проллиферативное воспаление характеризуется патологической репарацией и регенерацией (регенерационная гипертрофия, грануломатоз с образованием полипов, склероз и цирроз).

Установлено, что ПАК не действовал на фазу пролиферации. Масса образовавшейся грануляционно-фиброзной ткани под действием ПАК не отличалась от показателя у контрольных животных (рис. 2). Это в целом характерно для применяемых в настоящее время нестероидных противовоспалительных средств, весьма слабо подавляющих процессы пролиферации.

Вычисляя массу образовавшейся вокруг гранулёмы грануляционно-фиброзной ткани, можно было косвенно судить об антиэкссудативных свойствах препарата по разнице между массой только что извлеченной и высушенной гранулёмы (табл. 4). Эта разница имела тенденцию к понижению по сравнению с контролем, особенно при введении ПАК в дозе $1/20 LD_{50}$, поэтому в следующей серии экспериментов изучали влияние комплекса на экссудацию.

Модель адреналинового отека

Для оценки влияния ПАК на экссудацию использовали модель адреналинового отека легких у мышей. ПАК обладал хорошей антиэкссудативной активностью, выраженность которой зависела от схемы введения. Эффект был наиболее выражен при внутривнутрибрюшинном введении ПАК в дозе $1/20 LD_{50}$ через 5 мин после введения адреналина, стимулирующего свободнорадикальное окисление на фоне развивающегося отека – легочный коэффициент при этом уменьшался на 31,8%, что совпадает с эффективностью бутадiona. Превентивное использование препарата вызывало эффект при введении его не позднее, чем за 45 мин до введения адреналина – легочный коэффициент при этом уменьшался на 24,2%. Полученные результаты свидетельствовали о выраженном противовоспалительном действии ПАК, прежде всего, в экссудативной фазе воспаления.

Таким образом, результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что пептидно-антиоксидантный комплекс на основе синтетического трипептида Lys-Glu-Asp и экстракта из биомассы женьшеня нетоксичен и обладает выраженными антиоксидантными свойствами, противовоспалительным, регенерирующим и ранозаживляющим действием при повреждении поверхности кожи разного генеза, особенно у старых животных. Указанные свойства ПАК позволяют расценивать его в качестве эффективного средства для геронтокосметологии.

Результаты клинических исследований

Исследование коррекции возрастных изменений кожи косметическими средствами, содержащими пептидно-антиоксидантный комплекс

Успешно проведенные доклинические испытания ПАК, показавшие эффективность и безопасность применения комплекса, позволили перейти к клиническим исследованиям для оценки эффективности его применения при коррекции возрастных изменений кожи с участием волонтеров мужчин и женщин в возрасте от 20 до 66 лет, неотягощенных аллергологическим анамнезом. При исследовании безопасности крема, содержащего 6% ПАК, показано, что лоскутная проба, проведенная для оценки раздражающего и аллергизирующего действия крема, у всех волонтеров была отрицательна. Гематологические показатели волонтеров после применения крема также достоверно не отличались от таковых до проведения клинических испытаний ($p > 0,05$). Таким образом, на основании анализа клинических данных было сделано заключение об отсутствии у крема, содержащего ПАК, раздражающего и аллергизирующего действия.

С участием волонтеров оценивали регенерирующие свойства ПАК по эффекту разглаживания морщин, неизбежно появляющихся в процессе старения кожи. Показано, что использование волонтерами крема, содержащего 6% ПАК, способствовало разглаживанию морщин на коже вокруг глаз (табл. 5).

Отличия между количеством морщин на правой и левой сторонах лица до использования средства были не достоверны, поэтому дальнейшие результаты оценки лифтинг-эффекта крема через 1-6 ч сравнивали с исходными показателями контрольной (правой) стороны лица. Под действием крема, содержащего ПАК, отмечено достоверное уменьшение количества морщин на коже в области вокруг глаз, максимум действия наступал через 2-4 часа после нанесения крема, и длительность эффекта сохранялась до 6 часов (табл. 5). Через 4 ч после использования крема количество морщин составляло 60% от исходного

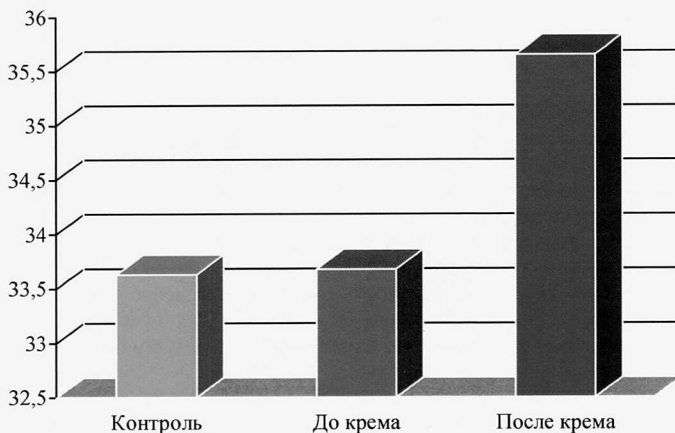
уровня, а через 6 ч оставалось на уровне 68%. В процессе эксперимента все волонтеры отмечали (визуально) увеличение тургора кожи и наличие освежающего действия крема с ПАК. Таким образом, ПАК обладал выраженным регенерирующим действием.

Таблица 5

Оценка лифтинг-эффекта крема с пептидно-антиоксидантным комплексом

Волонтеры, средний возраст (лет)	Количество морщин вокруг глаз							
	контроль до использования средства		После использования средства					
	слева	справа	Время эксперимента, ч					
			1	2	3	4	5	6
n=25; 46,1±2,3	10,92 ±0,87	10,87 ±0,81	7,86 ±0,65*	7,53 ±0,57*	6,77 ±0,32*	6,55 ±0,47*	7,10 ±0,35*	7,42 ±0,28*
%	-	100	72	69	62	60	65	68

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с показателем в контроле.



* $p < 0,05$ по сравнению с показателем до применения крема.

Рис. 3. Оценка теплового излучения кожи волонтеров до и после использования крема с пептидно-антиоксидантным комплексом.

Известно, что эластичность кожи зависит от уровня микроциркуляции в тканях и их влагоемкости. Проведенные исследования микроциркуляции в коже тепловизионным методом обнаружили достоверное различие в показателях теплового излучения между контрольным участком кожи и исследуемым после использования крема с ПАК в течение 7 дней: разница составила 6,0% от показателя в контроле (рис. 3), что свидетельствует об улучшении уровня кровотока под действием крема, содержащего ПАК.

При определении гидратности (влажности) кожи проводили двукратное обследование волонтеров в возрасте от 34 до 67 лет: до применения крема, содержащего ПАК, в области предплечий обеих рук и после 5-й процедуры применения средства (табл. 6).

Таблица 6

Оценка влажности кожи до и после применения крема
с пептидно-антиоксидантным комплексом

Волонтеры, средний возраст (лет)	Показатели импеданса, Ом						
	До применения крема, ZA			После применения крема, ZB			ΔZ, %
	Прав. пред- плечье	Левое пред- плечье	Среднее	Прав. пред- плечье	Левое пред- плечье	Среднее	
n=25; 49,2±1,7	250,93 ±4,87	252,43±7 ,13	251,68±6,0	194,41 ±7,68*	200,21 ±1,34*	197,31±4,51*	78,4
% по отно- шению к контролю	100	100	100	77,5	79,3	78,4	-

Примечание:* $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем до применения крема.

Средний показатель импеданса кожи у 25 волонтеров в возрасте от 34 до 67 лет до использования крема находился в пределах $251,68 \pm 6,0$ Ом; после применения крема – $197,31 \pm 4,51$ Ом ($p < 0,05$), т.е. импеданс кожи волонтеров уменьшился и составил 78,4 % по отношению к исходному уровню. Таким образом, через 5 дней ежедневного использования крема с ПАК влажность кожи увеличилась на 21,6%, то есть крем обладал хорошим увлажняющим эффектом.

На основании полученных данных клинического исследования можно сделать заключение о том, что крем, содержащий ПАК, способствовал улучшению тургора кожи, восстановлению или сохранению эластичности кожи вокруг глаз, при этом данный эффект был связан с улучшением уровня кровотока и повышением влагоемкости кожи.

Исследование способности спортивных кремов, содержащих 6% ПАК, ускорять процесс микроциркуляции проводили на базе аккредитованного испытательного лабораторного центра ФГУ «РНИИТО им. Р. Р. Вредена Росздрав». Все исследования проводили после интенсивных физических нагрузок с помощью тепловизионного метода.

После физической нагрузки показатель теплового излучения достоверно увеличился по сравнению с контролем на 3,43% ($p < 0,05$). Сразу после завершения обработки участка кожи кремом разница в тепловом излучении кожи по сравнению с необработанной кожей (контролем) составила 4,1%; через 15 мин после прекращения обработки показатель теплового излучения оставался на достигнутом уровне - $37,13 \pm 0,11$ °C, или 4,24% от исходного уровня ($p < 0,05$). Усиление теплового излучения свидетельствует об улучшении процесса микроциркуляции в тканях, что, в свою очередь, косвенно влияет на уменьшение болевых ощущений в мышцах и связках, а также на расслабление мышц. Полученные результаты представлены в таблице 7.

Отдельную группу составили волонтеры в возрасте от 38 до 64 лет, получившие при занятиях спортом гематомы, отеки при ушибах, ссадины. На следующий день наблюдения волонтеры с гематомами и ушибами отмечали изменение цвета поврежденных участков, отеков и ссадин, уменьшение жжения в поврежденных участках, а также болевых ощущений и усталости в области суставов. Через 3 суток наблюдения волонтеры отмечали полное заживление ссадин, снятие отеков, болевых ощущений и исчезновение гематом на травмированных участках тела. У волонтеров, не обрабатывавших поврежденные уча-

стки кремом с ПАК, сроки полного заживления поврежденных участков составили более 5 суток. Это обусловлено стимуляцией микроциркуляции в коже под действием трипептида Lys-Glu-Asp, который оптимизирует метаболизм в клетках сосудистой стенки и восстанавливает ее функциональную активность, а также противовоспалительным действием экстракта из биомассы женьшеня в составе ПАК.

Таблица 7

Оценка теплового излучения тканей в области бедер волонтеров после интенсивной физической нагрузки до и после использования крема с пептидно-антиоксидантным комплексом

Волонтеры, средний возраст (лет)	ИКР тестируемого участка кожи, °C			
	Контроль (до физ. нагрузки)	Опыт 1 (после физ. нагрузки)	Опыт 2 (сразу после завершения УЗ-обработки с кремом)	Опыт 3 (через 15 мин после УЗ-обработки с кремом)
n=10; 47,2±1,2	35,62±0,11	36,84±0,14*	37,08±0,12*	37,13±0,11*
%	100,00	103,43	104,10	104,24

Примечание: * p<0,05 по сравнению с соответствующим показателем до применения геля.

Таблица 8

Показатели импеданса кожи при использовании крема с пептидно-антиоксидантным комплексом

Волонтеры, средний возраст (лет)	Показатели импеданса, Ом				
	Контроль	Опыт 1 (после получения травмы)	Опыт 2 (сразу после обработки УЗ-аппаратом с кремом)	Опыт 3 (через 24 ч после обработки УЗ-аппаратом с кремом)	Опыт 4 (через 48 ч после обработки УЗ-аппаратом с кремом)
n=20, 51,3±1,8	218,16±8,31	125,78±12,09*	147,70±10,43*	163,90±10,63*	213,48±7,60
Д Z, %	-	57,65	67,70	75,13	97,85

Примечание: * p<0,05 по сравнению с контролем.

При исследовании противоотечного действия крема оказалось, что средний показатель импеданса кожи у 20 волонтеров на неповрежденном участке составил 218,16±8,31 Ом; на поврежденном – 125,78±12,09 Ом (табл. 8). Таким образом, увеличение гидратности поврежденных тканей было достоверным и составило 42,35% по сравнению с контролем. Сразу после применения крема и через 24 ч этот показатель достоверно снижился (на 10,05% и 17,48%, соответственно), хотя и отличался от контроля (p<0,05). Через 48 ч после использования крема показатель импеданса достоверно не отличался от такового в контроле, т.е. до повреждения, что свидетельствовало о выраженном противоотечном действии крема, содержащего 6 % пептидно-антиоксидантного комплекса (p>0,05).

При проведении pH-метрии кожи у 25 волонтеров до и после применения крема с ПАК установлено, что изученное средство изменяло исходный уровень pH кожи в пределах физиологических колебаний, который полностью восстанавливался в среднем в течение 6-10 часов. Полученные в ходе исследования аутофлоры кожи данные показали от-

существование влияния крема на иммунную систему волонтеров: изменение аутофлоры кожи лица происходило в пределах физиологической нормы. Это свидетельствует о физиологичности исследуемого средства с ПАК, поскольку стабильность показателя pH и состава аутофлоры являются очень важными для нормального состояния кожи у лиц любого возраста, в первую очередь, старшей возрастной группы.

Таким образом, результаты клинических исследований свидетельствовали о хорошей переносимости волонтерами косметических средств (крема, геля), имеющих в составе ПАК на основе трипептида Lys-Glu-Asp и экстракта из биомассы женьшеня. Показано, что ПАК способствовал улучшению микроциркуляции в тканях, повышению эластичности, расслаблению мышц и снятию напряжения, уменьшению чувства усталости и болевых ощущений. Полученные результаты исследования доказывают целесообразность применения косметических средств с пептидно-антиоксидантным комплексом на основе трипептида Lys-Glu-Asp и экстракта из биомассы женьшеня для коррекции возрастных изменений кожи, в первую очередь, у лиц старших возрастных групп.

Исследование эффективности применения пептидно-антиоксидантного комплекса при мезотерапии у лиц пожилого возраста

В таблице 9 представлены данные исследования интенсивности ПОЛ и активности системы АОЗ в периферической крови пациентов возрастной группы 25 – 40 лет при проведении мезотерапии и использовании ПАК для коррекции выявленных нарушений.

Таблица 9

Влияние пептидно-антиоксидантного комплекса на интенсивность перекисного окисления липидов и активность системы антиоксидантной защиты при мезотерапии в сыворотке крови женщин в возрасте 25 – 40 лет

Показатель, ед. измерения	Группа пациенток	Срок проведения исследования			
		Исходный	Через 7 дней	Через 14 дней	Через 30 дней
ПОЛ, отн.ед.	Контрольная	246,84 ± 22,52	327,75 ± 37,63*	296,72 ± 27,66*	248,34 ± 25,08
	Основная	232,13 ± 26,23	219,48 ± 27,63^	228,24 ± 21,36^	230,64 ± 25,08
ОАА (отн.ед.)	Контрольная	0,585 ± 0,155	0,508 ± 0,112	0,512 ± 0,123	0,574 ± 0,098
	Основная	0,547 ± 0,132	0,523 ± 0,106	0,584 ± 0,136	0,594 ± 0,107
СОД, Ед./мг белка	Контрольная	25,6 ± 2,3	16,4 ± 2,8*	17,9 ± 3,5*	23,7 ± 1,9
	Основная	28,3 ± 3,5	26,1 ± 2,4^	25,5 ± 2,9^	25,1 ± 1,7
ГП, мкмоль GSH/мг б.мин	Контрольная	62,25 ± 7,04	45,78 ± 6,05*	48,15 ± 8,93*	60,26 ± 7,22
	Основная	60,14 ± 8,12	58,12 ± 6,48^	61,27 ± 7,45^	59,18 ± 6,83

Примечание: * p<0,05 по сравнению с исходным показателем; ^ p<0,05 по сравнению с показателем в контрольной группе.

Установлено, что процедуры мезотерапии приводят к усилению процессов ПОЛ и ощутимому понижению общей антиокислительной активности и активности антиоксидантных ферментов. Спустя неделю после внутрикожных инъекций у женщин контрольной группы в возрасте 25-40 лет наблюдалось увеличение интенсивности ПОЛ на 24,75%, сопровождающееся снижением ОАА на 13,2 %, активности СОД на 35,5% и активности ГП на 20,6%. Эти изменения сохранялись и через две недели после окончания курса мезо-

терапии, однако спустя 1 месяц после повреждающего воздействия происходила нормализация исследуемых показателей.

У женщин основной группы в возрасте 25–40 лет (табл. 9) в условиях применения крема, содержащего ПАК, как следует из данных таблицы 9, восстановление исходного баланса между интенсивностью ПОЛ и активностью системы АОЗ происходило значительно раньше: через 7 дней после окончания курса внутривенных инъекций показатели ПОЛ, ОАА, СОД и ГП достоверно не отличались от исходных показателей.

Иная динамика изучаемых параметров свободнорадикального окисления отмечалась у лиц старшей возрастной группы. При сопоставлении данных, полученных у пациенток в возрасте 55 лет и старше, было показано, что у женщин в контрольной группе (без применения ПАК) показатели СРО при мезотерапии претерпевали более выраженные изменения, чем у женщин в группе 25–40 лет и не восстанавливались до нормальных значений на протяжении всего времени наблюдения – 1 месяц (табл. 10). Так, у пациенток контрольной группы в возрасте старше 55 лет даже через 30 дней после окончания курса внутривенных инъекций интенсивность ПОЛ была выше по сравнению с исходным уровнем в 1,3 раза, а величина ОАА – на 13 % ниже, чем до процедур. Активность СОД и ГП была при этом, соответственно, на 55,5 % и 23 % ниже по сравнению с исходным уровнем. Следует отметить также, что по сравнению с пациентками 25–40 лет в пожилом возрасте возрастали показатели интенсивности ПОЛ, ОАА и активность СОД при неизменном уровне активности ГП.

Таблица 10

Влияние пептидно-антиоксидантного комплекса на интенсивность перекисного окисления липидов и активность системы антиоксидантной защиты при мезотерапии в сыворотке крови женщин в возрасте старше 55 лет

Показатель, ед. измерения	Группа пациенток	Срок проведения исследования			
		Исходный	Через 7 дней	Через 14 дней	Через 30 дней
ПОЛ, отн.ед.	Контрольная	355,42 ± 28,84	502,36 ± 31,43*	487,82 ± 26,44*	461,15 ± 26,71*
	Основная	338,32 ± 22,14	511,37 ± 23,47*	424,18 ± 23,61*^	358,87 ± 34,51^
ОАА (отн.ед.)	Контрольная	0,634 ± 0,096	0,521 ± 0,112	0,498 ± 0,126	0,552 ± 0,103
	Основная	0,641 ± 0,108	0,517 ± 0,099	0,487 ± 0,112	0,511 ± 0,134
СОД, Ед./мг белка	Контрольная	38,4 ± 3,4	19,1 ± 2,7*	17,3 ± 2,6*	17,8 ± 2,8*
	Основная	36,8 ± 3,6	22,5 ± 3,0*	27,2 ± 2,4*^	32,6 ± 2,8^
ГП, мкмоль GSH/мг б.мин	Контрольная	63,18 ± 6,93	44,49 ± 8,05*	43,11 ± 7,78*	45,57 ± 7,14*
	Основная	64,23 ± 5,94	48,31 ± 6,13*	53,62 ± 6,76	60,34 ± 5,77^

* $p < 0,05$ по сравнению с исходным показателем; ^ $p < 0,05$ по сравнению с показателем в контрольной группе.

Как видно из данных, приведенных в таблице 10, при использовании крема, содержащего ПАК, уже через 14 дней после окончания курса мезотерапии наблюдалась тенденция к нормализации показателей СРО, а через 30 дней показатели ПОЛ, ОАА, СОД и ГП

в крови пациенток старшей возрастной группы соответствовали исходным значениям, т.е. применение пептидно-антиоксидантного комплекса способствует полному восстановле-

нию нарушенного при мезотерапии окислительного гомеостаза у женщин старшей возрастной группы.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что изменения окислительного гомеостаза при воздействии на кожу повреждающих внешних факторов (в том числе, мезотерапии) носят системный характер, так как проявляются не только в ткани кожи, но и в периферической крови, как это было установлено нами ранее в экспериментальных исследованиях, а также получено и в исследованиях других авторов [Arıcan O., Kurutas E.V., 2008]. Как показали проведенные нами клинические исследования, при мезотерапии на фоне усиления процессов ПОЛ показатели антиоксидантной системы кожи и организма в целом ухудшаются, однако в более молодом возрасте репаративных способностей кожи достаточно для нормализации показателей антиоксидантного статуса в течение месяца после окончания повреждающего воздействия. У пациенток контрольной группы в возрасте старше 55 лет до окончания срока наблюдения (1 месяц) нормализации показателей системы антиоксидантной защиты не происходило, что свидетельствует о снижении адаптационного потенциала организма и необходимости применения средств, способных усилить резервные возможности организма.

Одним из наиболее вероятных механизмов положительного влияния обладающего антиоксидантными свойствами крема, содержащего пептидно-антиоксидантный комплекс, при мезотерапии является способность ПАК стимулировать регенерирующую активность кожи при старении за счет усиления под его действием интенсивности клеточного дыхания и увеличения скорости размножения клеток [Борц М.С. и соавт., 2012].

Результаты проведенных экспериментальных и клинических исследований показали, что пептидно-антиоксидантный комплекс на основе трипептида Lys-Glu-Asp, обладающего тканеспецифическим действием на ткани сосудистой стенки, и экстракта из биомассы женьшеня обладает выраженными антиоксидантными свойствами, противовоспалительным, регенерирующим и противоотечным действием. Эти свойства комплекса лежат в основе эффективности его применения для коррекции возрастных изменений кожи, в том числе подверженной влиянию негативных факторов, включая мезотерапию, и свидетельствуют о целесообразности его использования в геронтокосметологии.

ВЫВОДЫ

1. Применение пептидно-антиоксидантного комплекса на основе трипептида Lys-Glu-Asp и экстракта из биомассы женьшеня в модели эксцизионных ран у молодых мышей привело к незначительному снижению интенсивности свободнорадикальных процессов в 1-е сутки после повреждения по сравнению с показателями у контрольных животных (без применения ПАК), к 10-м суткам наблюдений показатели возвращались к исходным значениям. У старых животных эффект применения комплекса проявлялся лишь на 10-е сутки наблюдения, но при этом все показатели антиоксидантной защиты достигали исходных значений в отличие от контрольных животных.

2. В экспериментальной модели термического ожога наблюдалось нормализующее влияние пептидно-антиоксидантного комплекса на интенсивность свободнорадикальных процессов и активность антиоксидантной системы уже в 1-е сутки его применения, но отчетливо проявлялось спустя 15 суток, когда все изучаемые показатели достигли нормы как у молодых, так и старых животных.

3. При легкой степени ожоговой болезни применение крема, содержащего 6% пептидно-антиоксидантного комплекса, способствовало достоверному ускорению эпителизации поверхности кожи у молодых животных в 1,3 раза, а у старых мышей – в 1,6 раза по сравнению с соответствующим контролем, при этом сроки эпителизации поверхности ко-

жи у молодых и старых животных при применении комплекса практически не отличались ($17,9 \pm 1,2$ сут и $18,0 \pm 1,5$ сут, соответственно).

4. В среде, содержащей 10% сыворотки крови, пептидно-антиоксидантный комплекс в концентрациях 20%, 10% и 5% повышал интенсивность клеточного дыхания и на 8% увеличивал скорость размножения клеток, проявляя регенеративные свойства.

5. В экспериментальной модели линейных ран у крыс показатель тензиометрии при местном применении пептидно-антиоксидантного комплекса был в 1,85 раза больше, чем в контроле, что свидетельствует о его ранозаживляющем действии.

6. В экспериментальной модели адреналинового отека при внутрибрюшинном введении пептидно-антиоксидантного комплекса в дозе $1/20$ LD₅₀ через 5 мин после введения адреналина, стимулирующего свободнорадикальное окисление на фоне развивающегося отека, легочный коэффициент уменьшался на 31,8%, что совпадает с эффективностью будафона. Протекторное действие комплекса проявлялось при введении его не позднее, чем за 45 мин до введения адреналина – легочный коэффициент при этом уменьшался на 24,2%.

7. Пептидно-антиоксидантный комплекс обладает выраженным регенерирующим действием, его применение в составе крема способствовало достоверному уменьшению количества морщин на коже в области вокруг глаз через 2-4 часа после нанесения крема до 60% от исходного уровня.

8. При мезотерапии у пациенток молодого и среднего возраста от 25 до 40 лет нарушение антиоксидантного статуса корригировалось применением пептидно-антиоксидантного комплекса, под действием которого показатели про- и антиоксидантной систем организма возвращались к норме через 7 дней после завершения процедур мезотерапии, а в контрольной группе только через 30 дней. С увеличением возраста пациентов (55 лет и старше) показатели про- и антиоксидантной систем организма нормализуются только под воздействием пептидно-антиоксидантного комплекса.

9. Пептидно-антиоксидантный комплекс на основе трипептида Lys-Glu-Asp и экстракта из биомассы женьшеня обладает геропротекторным действием, основанным на антиоксидантных, противовоспалительных, регенерирующих свойствах, и может быть рекомендован для применения в геронтокосметологии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При проведении косметологических процедур, направленных на коррекцию возрастных изменений кожи, в том числе мезотерапии, пилингов и других методов, сопровождающихся повреждением поверхности кожи, рекомендуется применять средства, содержащие пептидно-антиоксидантный комплекс на основе коротких пептидов и экстракта из биомассы женьшеня, с целью ускорения эпителизации поврежденных участков кожи и оптимизации антиоксидантной системы организма, особенно у лиц старших возрастных групп.

2. При разработке новых косметических средств, предназначенных для применения у лиц пожилого и старческого возраста, рекомендуется включать в их состав пептиды, восстанавливающие нарушенный метаболизм в различных структурах кожи, и биоантиоксидантный комплекс, экстрагированный из биомассы женьшеня, обладающий выраженными антиоксидантными, противовоспалительными, регенерирующими свойствами.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах, включенных в Перечень ВАК

Министерства образования и науки РФ

1. *Борзова И.В.* Эффективность применения пептидно-антиоксидантного комплекса при мезотерапии у пациентов пожилого возраста/*И.В. Борзова, В.А. Арутюнов, Л.С. Козина // Научные Ведомости Белгородского государственного университета. Серия Медицина. Фармация. Геронтология и гериатрия. – 2012. - Вып. 20/1. – С.43-47.*
2. *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. Серия Медицина. Фармация. Геронтология и гериатрия. – 2012. - Вып. 17/1. – С. 5-10.*
3. *Нарушения оксидативного метаболизма в коже мышей разного возраста, вызванные механическим повреждением и ожогом, и их коррекция с помощью пептидно-антиоксидантного комплекса/И.В. Борзова, Арутюнов В.А., Козина Л.С., Рыжак Г.А. // Научные Ведомости Белгородского государственного университета. Серия Медицина. Фармация. Геронтология и гериатрия. – 2012. - Вып. 20/1. – С. 7-11.*
4. *Противовоспалительное и регенерирующее действие геропротектора на основе экстракта из биомассы женьшеня/М.С. Борц, Е.Г. Николаева, Н.В. Кожемякина, И.В. Борзова//Успехи геронтологии. – 2011. – Т. 24, № 4. – С. 701-706.*
5. *Роль окислительного стресса в старении кожи/Л.С. Козина, И.В. Борзова, В.А. Арутюнов, Г.А. Рыжак//Успехи геронтологии. – 2012. – Т. 25, № 2. – С. 217-222.*

Тезисы докладов

6. *Борзова И.В.* Коррекция пептидно-антиоксидантным комплексом нарушения системы антиоксидантной защиты крови при мезотерапии/*И.В. Борзова, Г.А. Рыжак// Сб. науч. работ VIII научн.-практ. геронтологической конф. с междунар. участием «Пушковские чтения». Санкт-Петербург, 2012. – С. 295-296.*
7. *Борзова И.В.* Нарушения оксидативного метаболизма в коже мышей различного возраста, вызванные механическим повреждением и ожогом, и их коррекция с помощью пептидно-биоантиоксидантного комплекса/*И.В. Борзова, В.А. Арутюнов, Л.С. Козина// Сб. научн. работ VIII научн.-практ. геронтологической конф. с междунар. участием «Пушковские чтения». Санкт-Петербург, 2012. – С. 295-296.*
8. *Козина Л.С.* Антиоксидантное действие геропротекторного пептидно-антиоксидантного комплекса из женьшеня/ *Л.С. Козина, И.В. Борзова, М.С. Борц /Матер. междунар. Форума «Старшее поколение», 11-14 апреля, 2012 г. – СПб. – С. 55.*
9. *Регенерирующие свойства геропротекторного пептидно-антиоксидантного комплекса из женьшеня/ Борзова И.В., Козина Л.С., Борц М.С., Рыжак Г.А. // Матер. междунар. Форума «Старшее поколение», 11-14 апреля, 2012 г. – СПб. – С. 50.*

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Арутюнян А. В., Дубинина Е. Е., Зыбина Н. Н.* Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. Методические рекомендации. СПб.: ИКФ «Фолиант». – 2000. – 104 с.; *Атан А.С.* // Химико-фармацевтический журнал. 1995. № 6. С. 57.; *Борц М.С., Николаева Е.Г., Кожемакина Н.В., Борзова И.В.* Механизмы геропротекторного действия биоантиоксидантного комплекса из биомассы женьшеня. Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2012, № 17/1. – С. 5-10.; *Войцеховская М.А., Чалисова Н.И., Концевая Е.А., Рыжак Г.А.* Влияние биорегуляторных трипептидов на культуру клеток кожи молодых и старых крыс // Булл. экп. биол. мед. – 2011. – Т. 152, № 9. – С. 327-330; *Гланц С.* Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. - М: Практика, - 1999. - 459 с., *Григорьев С.Г.* Многомерные методы статистического анализа категоризированных данных медицинских исследований. – СПб.: ВМА, 2002. – 103 с.; *Костылева В.В., Борц М.С., Николаева Е.Г., Белякова А.В., Рыжак Г.А.* Геропротекторные свойства биоантиоксидантного комплекса женьшеня в радиационной модели преждевременного старения // Успехи геронтологии. – 2009. – Т. 22, № 3. – С 459-462; *Костылева В.В., Борц М.С., Николаева Е.Г., Белякова А.В., Рыжак Г.А.* Геропротекторные свойства биоантиоксидантного комплекса женьшеня в радиационной модели преждевременного старения // Успехи геронтологии. – 2009. – Т. 22, № 3. – С 459-462; *Николаева Е.Г., Рахманинова Т.Ф., Борц М.С., Орлов А.И.* Косметическое средство. Патент РФ № 2096032. 1997. J. Buege J.A., Aust S.D. Methods Enzymol. – 1978. V.52. – P.302-310; Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ /Под ред. Хабриева Р.У.. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.; *Слепян Л.И., Рахманина Т.Ф., Александрович Д.Г.* Способ выделения ферментного комплекса из культивируемых растительных клеток. РФ патент № 2046140. 20.10.1995; *Arican O., Kurutas E.B.,* Oxidative stress in the blood of patients with active localized vitiligo//Acta Dermatoven APA. – 2008. - Vol. 17. – N 1. - P. 12 – 16; *Ewing J.F., Janero D.R.* Anal. Biochem. – 1995. – V.232. – P. 243-248; *Fridovich I., McCord J.* Superoxide dismutase // J Biol Chem. 1969. 244(22). P. 6049-6055; *Harman D.* Aging: A theory based on free radicals and radiation chemistry. J. Geront. 1956. Vol. 11. P. 298–300; *Johnson F., Giulivi C.* Superoxide dismutases and their impact upon human health // Molecular Aspects of Medicine. 2005. 26(4-5). P. 340-352; *Lowry O.H., Rosbrough N., Farr A., Randall R.* // J. Biol. Chem. 1951. No 193. P. 265. *Lim S., Cho C., Choi U., Kim Y.* Antioxidant activity and ginsenoside pattern of fermented white ginseng // J Ginseng Res. 34(3). P 168-174; *Kitts D., Hu C.* Efficacy and safety of ginseng // Public Health Nutrition. 2000. 4a. P. 473-485; *Panax ginseng. Monographs.* ND: Alternative Medicine Review. 2009. 14(2). 172 p.; *Rattan S.I.* Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals. Free Radic Res. 2006. 40(12). P. 1230-1238; *Rivers J.K.* The role of cosmeceuticals in anti-aging therapy. Skin Therapy Lett. 2008. 13(8). P. 5-9; *Saunhya S.M., Mahaboob B.* In vitro evaluation of free radical scavenging activities of *Panax ginseng* and *Lagerstroemia speciosa*: a comparative analysis // Int J Pharm Pharm Sci. 2011. 3(1). P. 165-169; *Sedlak J., Lindsay R.H.,* Anal. Biochem. –1968. –V 25. – P.192-205; *Singh R.P., Agarwal R.* Cosmeceuticals and silibinin // Clin Dermatol. 2009. 27(5). P. 479-484; *Tappel A.I.* Methods Enzymol. – 1978. – V 52. – P. 506-513.]. [Lowry O.H., Rosbrough N., Farr A., Randall R. // J. Biol. Chem. – 1951. – No 193. – P. 265.

БОРЗОВА Ирина Владимировна ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПЕПТИДНО-АНТИОКСИДАНТНОГО КОМПЛЕКСА В ГЕРОНТОКОСМЕТОЛОГИИ /Автореф. дис. канд. мед. наук: 14.01.30. – СПб., 2012. – 24 с.

Подписано в печать «22» октября 2012. Формат 60/84 1/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Печ. л. 1,0.

Тираж 100 экз. Заказ 74.

Отпечатано с готового оригинал-макета.

ЗАО «Принт-Экспресс»

197101, С.-Петербург, ул. Большая Монетная, 5 лит. А.