



БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ В ГЕРОНТОЛОГИИ

УДК 613.495

МЕХАНИЗМЫ ГЕРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ БИОАНТИОКСИДАНТНОГО КОМПЛЕКСА ИЗ БИОМАССЫ ЖЕНЬШЕНЯ

М.С. Борц¹
Е.Г. Николаева¹
Н.В. Кожемякина¹
И.В. Борзова²

*¹Химико-биологическое объединение
при РАН «Фирма Вита»,
г. Санкт-Петербург*

*²Санкт-Петербургский институт
биорегуляции и геронтологии
СЗО РАМН*

e-mail: galina@gerontology.ru

Работа посвящена исследованию механизмов геропротекторного действия биоантиоксидантного комплекса, выделенного из биомассы женьшеня. Положительное влияние комплекса на репаративные процессы в тканях было доказано в испытаниях, проведенных на мышцах с термическими ожогами легкой степени. Исследования, проведенные на фибробластах человека, отчасти помогли объяснить положительное влияние комплекса на процессы регенерации. Показано, что под его воздействием усиливалась интенсивность клеточного дыхания и увеличивалась скорость размножения клеток.

Ключевые слова: биоантиоксидантный комплекс женьшеня, геропротектор, регенерация, клеточное дыхание.

Введение. Одной из главных причин возрастных изменений в клетках человека является накопление в них повреждений, вызванных свободными радикалами – частицами, обладающими повышенной химической активностью из-за наличия неспаренного электрона [7, 15]. Активные формы кислорода, которые образуются в митохондриях каждой клетки, использующей кислород в процессе нормальной жизнедеятельности, представляют собой наиболее опасную разновидность свободных радикалов [6, 13]. Основной мишенью их поражающего действия являются фосфолипиды клеточных мембран, при окислении которых образуется целый спектр химически активных продуктов, оказывающих токсическое действие на клетки и ткани организма. Перекисное окисление липидов играет важнейшую роль в геронтогенезе (старении организма), а также приводит к развитию заболеваний «свободнорадикальной патологии», в том числе атеросклероза, ишемической болезни сердца, диабетической ангиопатии, сосудистых заболеваний головного мозга и др., значительно сокращающих продолжительность жизни [10, 12, 16]. Организм человека обладает физиологической системой антиоксидантной защиты, способной нейтрализовать вредное действие свободных радикалов и других природных окислителей. Эта сложная система работает как в норме, так и в экстремальных для организма условиях – под воздействием ионизирующего излучения, ультрафиолетовых лучей, химических соединений, стресса [17]. Со временем её активность снижается: если естественная концентрация антиоксидантов в организме оказывается значительно меньше, чем необходимо для сдерживания окислительных процессов, развивается оксидативный стресс [3]. Чтобы этого избежать, необходимо регулярно восполнять образующуюся в организме нехватку антиоксидантов, например за счет использования веществ природного происхождения, способных сти-



мулировать их выработку. В недавних исследованиях показано, что гинзенозиды (панаксозиды), входящие в состав биомассы женьшеня, способны индуцировать выработку эндогенной супероксиддисмутазы [4, 9]. Этот фермент катализирует реакцию дисмутации (обратного превращения) супероксидного аниона в кислород и перекись и таким образом играет одну из ключевых ролей в антиоксидантной защите организма [2, 8]. В настоящее время женьшень является основой для получения многочисленных адаптогенов, иммуностимуляторов, нутрицевтиков и парафармацевтиков. Его применение показано в качестве стимулирующего средства при умственном и физическом напряжении, артериальной гипотензии, неврозах, неврастении, нейроциркуляторной дистонии по гипотоническому типу, астении различной этиологии, реконвалесценции после перенесенных заболеваний [14]. Одним из очень интересных и перспективных направлений является использование женьшеня в качестве одного из основных компонентов, обладающих биоантиоксидантными и геропротекторными свойствами, в составе косметических средств.

Цель данной работы заключалась в исследовании механизмов геропротекторного действия биоантиоксидантного комплекса, выделенного из биомассы женьшеня *Panax ginseng* С.А. Meyer.

Материалы и методы. Общую антиоксидантную активность комплекса, выделенного методом экстракции из биомассы женьшеня, определяли по стандартной методике спектрофотометрически с дианизидиновым реактивом и рибофлавином при длине волны 460 нм [5]. Определение суммарных гликозидов (сапонинов) в комплексе производили по методу [1], который основан на реакции гликозидов с ванилином с последующей регистрацией окрашенного продукта при 544 нм. В качестве стандарта использовали эргокальциферол.

Для оценки регенерирующих свойств комплекса использовали модель термического ожога, вызванного у лабораторных мышей. Время воздействия на животных зависело от тяжести повреждения. В опытах использовали 110 белых беспородных мышей самок с массой тела 20-24 г (питомник «Рапполово» РАМН). Участок спины площадью 7,5 % от общей поверхности тела выстригали и на него наносили термический ожог III степени (3 опыта) и I степени (2 опыта) с помощью установки с кварцевогалогеновыми лампами (экспозиция 2 секунды при ожоге III степени и 0,5 секунды при ожоге I степени). Крем, содержащий 6% биоантиоксидантного комплекса, наносили на поверхность ожога III степени сразу после ожога на протяжении 4-5 дней (2 опыта) и на 4-е сутки после ожога на протяжении 10 дней (1 опыт), а также при степени ожога I степени (2 опыта) на 4-е сутки после ожога на протяжении 4 дней. Об эффективности лечения судили как по местным признакам: скорости и качеству заживления и эпителизации ожоговой поверхности, так и по общему состоянию животных, зависящему от тяжести и исхода ожоговой болезни.

Для оценки интенсивности клеточного дыхания и скорости размножения клеток под действием биоантиоксидантного комплекса использовали фибробласты человека в культуре, которые выращивали по стандартной методике в 24-луночных планшетах до получения сплошного монослоя. Биоантиоксидантный комплекс разводили поддерживающей средой Игла и исследовали в концентрациях 50%, 40%, 30%, 20%, 10% и 5 %. Ростовую среду в лунках заменяли препаратом, разведенным поддерживающей средой Игла в указанных выше концентрациях, инкубировали в течение 24 ч в среде с добавлением 10% сыворотки крови, или 2 ч в бессывороточной среде. Интенсивность клеточного дыхания оценивали в тесте с нитросиним тетразолием, скорость размножения – по содержанию общего белка в образцах по методу Лоури [11].

Все исследования с участием животных проводили в строгом соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 1964 г. с изменениями от 1975, 1983 и 1989 гг.

Для статистической обработки результатов исследования использовали общепринятые математико-статистические методы (расчет параметров вариации признаков, t-критерий Стьюдента для зависимых равновеликих и независимых разновеликих выборок).



Результаты и обсуждение. В ходе исследования установлено, что комплекс, выделенный из биомассы женьшеня, обладает высокой антиоксидантной активностью, которая составляет 25,5 ед. опт. плот./мг белка, что в 3,5 раза превышает антиоксидантную активность рибофлавина – известного антиоксиданта ($p < 0,01$). Сравнение активности комплекса, выделенного из биомассы женьшеня, и широко применяемой в медицине настойки корня женьшеня показало, что настойка по антиоксидантным свойствам значительно уступает экстракту из биомассы: её активность составила всего 3,5 ед. опт. плот./мг белка ($p < 0,05$). Антиоксидантные свойства женьшеня, вероятно, связаны с наличием в его составе гликозидов – гинзенозидов [9]. Комплекс из биомассы женьшеня давал цветную реакцию на тритерпеновые 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%.

Для изучения влияния биоантиоксидантного комплекса на репаративные процессы использовали модели термического и лучевого ожога у лабораторных мышей. Положительное влияние комплекса на репаративные процессы в тканях было доказано в испытаниях, проводимых на мышцах с термическими повреждениями кожи легкой степени (табл. 1).

Таблица 1

Действие биоантиоксидантного комплекса на репаративные процессы на модели термического ожога у мышей

Опыт	Контроль (крем без комплекса)			Крем, содержащий 6% биоантиоксидантного комплекса		
	Количество мышей в опыте	Выживаемость мышей, %	Эпителизация ожоговой поверхности, сут.	Количество мышей в опыте	Выживаемость мышей, %	Эпителизация ожоговой поверхности, сут.
Ожог III степени						
1 опыт сразу после ожога в теч. 4-5 дн.	10	67	27,1±1,5	12	55	29,0±1,9
2 опыт сразу после ожога в теч. 4-5 дн.	10	64	28,5±0,7	12	52	30,0±2,5
3 опыт на 4-е сут. после ожога в теч. 10 дн.	10	68	30,2±1,7	12	57	33,2±1,8
Ожог IБ степени						
1 опыт с 4 сут. после ожога в теч. 4 дн.	10	70	24,1±1,5	12	97*	17,9±1,2*
2 опыт с 4 сут. после ожога в теч. 4 дн.	10	71	28,5±0,7	12	98*	18,0±1,5*

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

Легкая степень ожоговой болезни приводила к гибели части подопытных животных (21%) 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% биоантиоксидантного комплекса из биомассы женьшеня, 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 ($p < 0,01$). Крем обладал противовоспалительным действием, способствовал эпителизации кожи и исчезновению эритемы и отечности.

Использование крема при тяжелых термических ожогах (ожог IIIб степени) было неэффективно. Тяжелая форма ожоговой болезни приводила к гибели 34% подопытных животных в течение 2,5 месяцев наблюдения вследствие шока, потери плазмы, отравления тканевыми ядами, бактериальными токсинами и гнойно-инфекционных осложнений, вызываемых локальными (вплоть до некрозов) повреждениями кожи и подкожной клетчатки. Результаты опытов показали, что местное применение крема при тяжелой ожоговой болезни несколько увеличивало количество погибших животных – с 34 до 45%. Несколько замедлилась эпителизация ожоговой поверхности, составив в среднем при применении крема 29-34 дня (в контроле 27-30 дней). Возможно, причиной негативного влияния крема являлся наблюдаемый в опытах феномен замедления под его воздействием процесса некротизации и отторжения кожи. Благодаря этому продлевался период всасывания в организм токсинов поврежденной кожи и запаздывала эпителизация. Однако эти факты свидетельствуют о способности крема улучшать трофику (питание, кровоснабжение) обожженных участков, что делает перспективным его использование при некоторых патологических состояниях, например, при трофических язвах конечностей. Таким образом, в результате проведенных испытаний было установлено выраженное противоожоговое действие комплекса из женьшеня при экспериментальных ожогах легкой степени. Отмечали как местный, так и общий благоприятный эффект.

Таблица 2

Влияние биоантиоксидантного комплекса на интенсивность клеточного дыхания в бессывороточной среде

Опытная группа		Интенсивность клеточного дыхания, %
Контроль (без комплекса)		100,0
Биоантиоксидантный комплекс, С%	50%	78,3±12,4
	40%	88,8±10,4
	30%	93,1±8,6
	20%	113,1±12,2*
	10%	106,5±9,9*
	5%	105,7±6,9*

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

Таблица 3

Влияние биоантиоксидантного комплекса на интенсивность клеточного дыхания и содержание общего белка в присутствии 10% сыворотки

Опытная группа		Интенсивность клеточного дыхания, %	Содержание общего белка, мкг/мл
Контроль (без комплекса)		100,0	156,0±11,5
Биоантиоксидантный комплекс, С%	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*

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

Исследования, проведенные на фибробластах человека, отчасти помогли объяснить положительное влияние биоантиоксидантного комплекса на процессы регенерации. Установлено, что под воздействием комплекса усиливалась интенсивность клеточного дыхания и увеличивалась скорость размножения клеток, а это напрямую определяет скорость регенерации в целом (табл. 2, 3).

Установлено, что в среде, содержащей 10% сыворотки крови, биоантиоксидантный комплекс в концентрациях 20%, 10% и 5% значительно повышал интенсивность



клеточного дыхания и увеличивал скорость размножения клеток (показатель содержания общего белка), стимулируя таким образом накопление клеточной биомассы (табл. 3). Длительное инкубирование фибробластов в присутствии 50% раствора комплекса 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. В косметических средствах это действие может приводить к эффекту отшелушивания мертвых клеток и подготовки эпидермиса к так называемому «эффекту омоложения» за счет наличия в них сурфактанта – сапонины. Отшелушивание клеток стимулирует в эпидермисе рост молодых клеток, а значит, усиливает кровообращение, что в свою очередь приводит к повышению тургора кожи и разглаживанию морщин. Таким образом, показана перспективность использования биоантиоксидантного комплекса в косметических средствах в качестве компонента, обладающего геропротекторным действием и стимулирующего регенерацию клеток.

Заключение. Таким образом, положительное влияние биоантиоксидантного комплекса, выделенного из биомассы женьшеня *Panax ginseng* С.А. Meyer, на репаративные процессы в тканях было доказано в испытаниях, проводимых на мышах с термическими повреждениями кожи легкой степени. Крем, содержащий 6% биоантиоксидантного комплекса, обладал противовоспалительным действием, способствовал эпителизации кожи и исчезновению эритемы и отека, оказывал благоприятное воздействие на течение ожоговой болезни в целом, увеличивая выживаемость подопытных животных на 27% по сравнению с контролем ($p < 0,01$). Использование крема при тяжелых термических ожогах (ожог IIIБ степени) было неэффективно. Исследования, проведенные на фибробластах человека, отчасти помогли объяснить положительное влияние комплекса на процессы регенерации за счет усиления под его действием интенсивности клеточного дыхания и увеличения скорости размножения клеток.

Регенерирующие свойства комплекса, выделенного из биомассы женьшеня, в сочетании с выраженной антиоксидантной активностью, стабильностью и безвредностью делают его перспективным для использования в составе косметических средств, предназначенных для коррекции возрастных изменений кожи.

Литература

1. Bannister, J. Aspects of the Structure, Function, and Applications of Superoxide Dismutase / J. Bannister, W. Bannister // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. – 1987. – Vol. 22. – No. 2. – P. 111-180.
3. Cadenas, E. Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, and Aging / E. Cadenas, K. Davies // *Free Radic Biol Med*. – 2000. – Vol. 29. – P. 222-230.
4. Feng-Jie, L. Allelopathic effects of ginsenosides on in vitro growth and antioxidant enzymes activity of ginseng callus / L. Feng-Jie (and oth.) // *Allelopathy Journal*. – 2010. – Vol. 26(2). – P. 13-22.
5. Fridovich, I. Superoxide dismutase / I. Fridovich, J. McCord // *J Biol Chem*. – 1969. – Vol. 244(22). – P. 6049-6055.
6. Grivennikova, V.G. Generation of superoxide by the mitochondrial complex / V.G. Grivennikova, A.D. Vinogradov // *Biochim Biophys Acta*. – 2006. – Vol. 1757(5-6). – P. 553-561.
7. Harman, D. Aging: A theory based on free radicals and radiation chemistry // *J. Geront*, 1956. – Vol. 11. – P. 298-300.
8. Johnson, F. Superoxide dismutases and their impact upon human health / F. Johnson, C. Giulivi // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2005. – Vol. 26(4-5). – P. 340-352.
9. Kitts, D. Efficacy and safety of ginseng / D. Kitts, C. Hu // *Public Health Nutrition*. – 2000. – Vol. 4a. – P. 473-485.
10. Knight, J.A. Free radicals: their history and current status in aging and disease // *Ann Clin Lab Sci*. – 1998. – Vol. 28(6). – P. 331-346.
11. Lowry, O.H. // *J. Biol. Chem*. – 1951. – No 193. – P. 265.
12. Moriel, P. Lipid peroxidation and antioxidants in hyperlipidemia and hypertension / P. Moriel (and oth.) // *Biol. Res* – 2000. – Vol. 33(2). – P. 105-112.
13. Murphy, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species // *Biochem J*. – 2009. – Vol. 417(1). – P. 1-13.
14. *Panax ginseng*. Monographs. ND: *Alternative Medicine Review*. – 2009. – Vol. 14(2). – 172 p.



15. Rattan, S.I. Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals // *Free Radic Res.* – 2006. – Vol. 40(12). – P. 1230-1238.
16. Sevanian, P. Mechanisms and Consequences of Lipid Peroxidation in Biological Systems / P. Sevanian, P. Hochstein // *Annual Review of Nutrition.* – 1985. – Vol.5. – P. 365-390.
17. Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants // *Exp Physiol.* – 1997. – Vol. 82(2). – P. 291-295.

MECHANISMS OF GEROPROTECTIVE ACTION OF BIOANTIOXIDANT COMPLEX FROM BIOMASS OF PANAX GINSENG

M.S. Borts¹

E.G. Nikolaeva¹

N.V. Kozhemyakina¹

I.V. Borzova²

*¹⁾St.-Petersburg Chemico-Biological
Enterprise of the Russian Academy
of Sciences "Firma Vita"*

*²⁾St.Petersburg Institute
of Bioregulation and Gerontology,
NMB of RAMS*

e-mail: galina@gerontology.ru

The work is devoted to the study of mechanisms of action geroprotective bioantioksidantnogo complex isolated from biomass of ginseng. The positive impact of the complex on the reparative processes in tissues has been proven in tests carried out on mice with a mild thermal burns. Studies on human fibroblasts, in part helped to explain a positive effect on the complex processes of regeneration. It is shown that under its influence increases the intensity of cell respiration and the increased rate of cell proliferation.

Key words: Complex bioantioksidantny ginseng geroprotector, regeneration, cellular respiration.