

## Влияние парафармацевтика «Вин-Вита» на уровень метаболитов оксида азота в тканях органов молодых и взрослых крыс

Е.А.Орлова, О.А.Лазарчук

Луганский государственный медицинский университет, кафедра фармацевтической химии и фармакогнозии  
Луганск, Украина

Целью данного исследования было изучение влияния геропротекторного средства «Вин-Вита» на уровень метаболитов оксида азота в тканях печени, почек, сердца и мозга молодых и взрослых крыс. Установлено достоверное увеличение количества  $\text{NO}_x$  в тканях исследуемых органов интактных взрослых крыс. Отмечена тенденция увеличения концентрации как  $\text{NO}_2^-$ , так и  $\text{NO}_3^-$ . Для всех исследуемых тканей выявлено снижение доли  $\text{NO}_2^-$  от общего количества метаболитов. Выявлена возможность коррекции уровня оксида азота по его метаболитам у взрослых организмов под действием парафармацевтика с геропротекторными свойствами «Вин-Вита».

**Ключевые слова:** метаболиты оксида азота, антиоксидантная система, ткани, геропротектор.

### ВВЕДЕНИЕ

Сдвиги в NO-продуцирующей системе являются тканеспецифичными и зависят от возраста [3]. Согласно свободнорадикальной теории старения Хармана, накопление повреждений в результате оксидативного стресса приводит к повреждению тканей, канцерогенезу и, наконец, преждевременному старению [13].

В пожилом возрасте оксидативному повреждению органов и тканей отводится особенно важная роль. Недостаточная эффективность системы антиоксидантной защиты с возрастом приводит к тому, что клетки постоянно подвергаются окислительному стрессу. Оксид азота — один из ключевых звеньев в его развитии [1].

Оксид азота содержится практически во всех тканях человеческого организма. В настоящее время выделены NO-синтазы, специфичные для разных тканей и клеток [2]. Активность eNOS и nNOS постоянна и весьма низка. При воздействии активаторов синтеза этих ферментов (ацетилхолина, брадикинина, серотонина, АДФ, глутамата и др.) происходит увеличение образования оксида азота до пикомолей (пмоль) на короткое время (несколько минут). Индуцибельная NO-синтаза под влиянием иммуногенных и провоспалительных факторов (эндотоксина, бактериальные липополисахариды, гамма-интерферон и др.) стимулирует выделение оксида азота на протяжении многих часов, иногда дней в больших количествах наномолях (нмоль). Установлено, что в макрофагах, нейтрофилах, гепатоцитах синтез оксида азота в норме определяет также индуцибельная NO-синтаза [4, 11].

Биологические эффекты оксида азота обусловлены активацией клеточной растворимой гуанилатциклазы. В организме человека он выполняет функции универсального мессенджера внутри- и межклеточной сигнализации.

Противодействие окислительному стрессу может играть существенную роль в механизме геропротекторного действия эндогенных и экзогенных антиоксидантов. В настоящее время геропротекторы пептидной природы занимают лидирующее положение [14] в изучении их эффектов на процессы старения. Среди средств растительного происхождения, которые обладают геропротекторными свойствами и содержат низкомолекулярные соединения (витамины А, С, Е, Д и К, биофлавоноиды и т.д.), интерес вызывает парафармацевтик «Вин-Вита». Биофлавоноиды кожицы и косточек красного винограда являются мощнейшими антиоксидантами — в 50 раз более сильными, чем витамин Е. Также они обладают капилляроукрепляющим, антигипоксическим, антигипертензивным, противовоспалительным

тельным, противовирусным, антиаллергическим, противострессовым, кардио-, гепато- и радиозащитным действием [15, 16]. Геронтологами было экспериментально доказано, что длительное употребление биофлавоноидов с мощным капилляроукрепляющим и антиоксидантным действием вызывает достоверное увеличение продолжительности жизни [14, 16].

Анализ полученных на сегодня данных [7, 8, 9] позволяет обосновать целесообразность применения в качестве геропротекторного средства растительного происхождения, обладающего выраженным антиоксидантным действием, парафармацевтика «Вин-Вита».

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на белых крысах двух возрастных групп — 14-недельные (молодые) и 30-недельные (взрослые). Экспериментальную группу составили взрослые крысы, которые получали парафармацевтик с геропротекторным действием «Вин-Вита» на протяжении 30 дней. Группами контроля служили 14-недельные и 30-недельные интактные крысы.

Животных декапитировали под легким эфирным наркозом, затем извлекали органы (печень, почки, сердце, мозг).

Уровень метаболитов оксида азота определяли с помощью реактива Грисса. Метод определения нитратов и нитритов достаточно точно

отражает степень активности NO-синтазы. Гомогенат тканей готовили в среде выделения, содержащей 0,25 М сахарозы и 1 мМ ЭДТА в соотношении 1:9. Далее проводили диализ в течение 2 ч против дистиллята. Затем отбирали образцы проб и измеряли объем диализата. Белки в диализате осаждали смесью 0,5 Н КОН и 5% ZnSO<sub>4</sub> в объемном соотношении 2:5. При определении содержания нитритов отбирали 10 мл пробы и приливали 1 мл реактива Грисса (5°C). Через 15 минут после интенсивного встряхивания пробирок развивается окраска. Спектрофотометрирование проводили при λ=540 нм, контролем служил дистиллят. Т.к. реактив Грисса позволяет идентифицировать только нитриты, то для определения нитратов было проведено восстановление их до нитритов цинковой пылью. Восстановление и диазотирование проходило при 5°C. Через 10 минут пробирки центрифугировали и отбирали супернатант. Спектрофотометрировали при λ=540 нм против «холостой пробы». Определение содержания нитрит- и нитрат-ионов проводили при помощи калибровочной кривой, построенной по натрию нитриту.

Полученные в результате исследования показатели обрабатывались на персональном компьютере в программе Excel 2007 для Windows XP с использованием методов вариационной статистики. Достоверность средних отличий оценивали с использованием t-критерия Стьюдента.

ТАБЛИЦА 1

Содержание нитратов и нитритов (мкг/мг) в тканях молодых и взрослых крыс

Орган	Показатель	Группы животных		
		14-недельные интактные крысы	30-недельные интактные крысы	экспериментальная группа
Печень	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	4,5±0,1	5,6±0,2**	5,1±0,3
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	13,7±0,2	21,3±0,5**	18,6±0,4*
	NO <sub>x</sub>	18,2±0,2	26,9±0,8**	23,7±0,7*
Почки	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	3,6±0,2	4,3±0,3**	4,6±0,1
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	13,8±0,3	19,1±0,6**	14,9±0,5*
	NO <sub>x</sub>	17,4±0,3	23,4±0,5**	19,5±0,6*
Сердце	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	3,2±0,2	3,8±0,2**	3,5±0,1
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	12,1±0,3	19,7±0,3**	13,4±0,2*
	NO <sub>x</sub>	15,3±0,4	23,5±0,4**	16,9±0,5*
Мозг	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	3,9±0,1	4,2±0,2**	3,5±0,2*
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	11,5±0,4	21,6±0,2**	15,6±0,5*
	NO <sub>x</sub>	15,4±0,2	25,8±0,5**	19,1±0,4*

Примечания: \* – достоверность результатов относительно 30-недельных интактных крыс (p<0,05), \*\* – достоверность результатов относительно 14-недельных интактных крыс (p<0,05).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение уровня продукции стабильных метаболитов оксида азота в различных тканях органов группы 14-недельных интактных крыс выявило следующие различия. Максимальное содержание  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  наблюдалось в ткани печени. Возможно, это обусловлено активацией не только конститутивной, но и индуцибельной NO-синтазы гепатоцитов. По литературным данным [2], iNOS печени обладает уникальными свойствами, характерными как для индуцибельных (индуцируется комбинацией факторов: интерлейкин-1, фактор некроза опухолей, интерферон и липополисахарид), так и для конститутивно экспрессируемых NO-синтаз, и является основой неспецифической резистентности организма.

В ткани почек содержание нитратов и нитритов было на 4,4% меньше, чем в ткани печени. Показатели содержания метаболитов оксида азота были равнозначными для ткани сердца и мозга (табл. 1).

Помимо количественного содержания  $\text{NO}_x$  информативным является и соотношение стабильных метаболитов между собой. Анализ соотношения  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  для разных тканей показал, что в ткани мозга молодых крыс процентное содержание нитрит-ионов от общего количества метаболитов оксида азота наиболее высокое. В ткани печени доля  $\text{NO}_2^-$  составила 24,7%, в сердце — 21%, а в почках — 20,7%. Процентное содержание нитрат-ионов для ткани печени — 75,3%, почек — 79,3%, сердца — 79%, для ткани мозга было, соответственно, меньшим и составило 74,7%. В тканях преобладают нитраты, так как  $\text{NO}_3^-$ , образовавшиеся в результате основного пути метаболизма оксида азота, являются более стабильными и в условиях организма практически не восстанавливаются в нитриты [5].

Следовательно, у молодых крыс содержание  $\text{NO}_x$  в разных тканях не однозначно. Но при этом количественное содержание метаболитов оксида азота в тканях печени и почек (между собой) достоверно не отличается, в тканях сердца и мозга — аналогично.

Сравнительная оценка содержания  $\text{NO}_x$  интактных 14-недельных и 30-недельных животных показала тенденцию к увеличению уровня метаболитов с возрастом во всех исследуемых тканях. В ткани печени взрослых крыс наблюдалось достоверное увеличение содержания  $\text{NO}_x$  по сравнению с группой молодых в 1,5 раза, в ткани почек — в 1,3 раза, а в тканях сердца и мозга — в 1,5

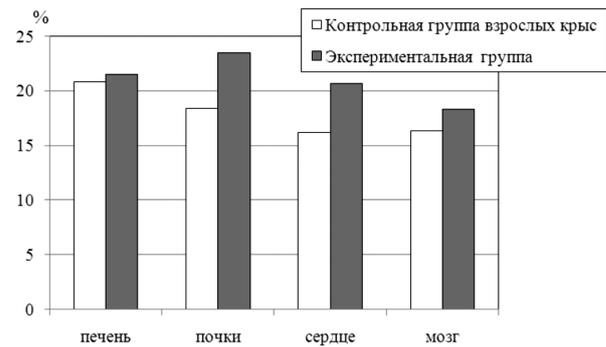


Рис. 1. Процентное содержание  $\text{NO}_2^-$  в структуре метаболитов оксида азота в различных тканях 30-недельных интактных и экспериментальных животных.

и 1,7 раза соответственно (табл. 1). При этом увеличивалось содержание как нитритов, так и нитратов для всех тканей 30-недельных интактных крыс по сравнению с 14-недельными интактными животными.

Накопление метаболитов оксида азота в тканях взрослых крыс можно связать с полученными нами ранее результатами об увеличении продуктов окислительной модификации белков (ОМБ), образованных на стадии инициации свободнорадикального окисления [8]. Можно судить о вкладе оксида азота в процессы ОМБ с возрастом.

Динамика изменения соотношения  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  в тканях взрослых интактных крыс по сравнению с молодыми была различной. В ткани печени доля  $\text{NO}_2^-$  снизилась на 3,9%, в ткани почек — на 2,3%, в ткани сердца — на 4,8%. Максимальное снижение содержания нитрит-анионов ( $\text{NO}_2^-$ ) наблюдалось в ткани мозга и составило 9%. Соответственно, при этом доля  $\text{NO}_3^-$  увеличивалась во всех тканях (рис. 1). Восстановление нитрат-ионов в нитрит-ионы малоэффективно, и основная часть нитратов выводится с мочой. Полученные данные позволяют предположить, что изменение баланса  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  может привести к увеличению дефицита оксида азота [6].

Применение парафармацевтика «Вин-Вита» привело к снижению содержания стабильных метаболитов оксида азота во всех тканях: в ткани печени — на 11,8%, почек — на 16,7%, сердца — на 28,1%; мозга — на 26%. Ранее нами была установлена возможность нормализации состояния энергетического обмена и уровня ОМБ с возрастом под действием парафармацевтика «Вин-Вита» [7], что, возможно, связано с более эффективным функционированием антиоксидантной системы (АС). Так как оксид азота является бифункциональной молекулой, то механизм ее действия за-

висит от условий, в которых она синтезируется. Уменьшение содержания  $\text{NO}_x$  можно объяснить отсутствием потребности в оксиде азота за счет активного действия АС, вследствие воздействия антиоксиданта.

При анализе уровня  $\text{NO}_2^-$  в тканях печени, почек и сердца не установлено достоверных изменений, а в ткани мозга — достоверное снижение показателя  $\text{NO}_2^-$ . Однако только в ткани сердца экспериментальной группы содержание  $\text{NO}_2^-$  достоверно приближено к данному показателю группы молодых интактных крыс. Снижался уровень  $\text{NO}_3^-$  в экспериментальной группе по сравнению со взрослыми интактными животными: в ткани печени — на 12,7%, почек — на 15,2%, сердца — на 32%, мозга — на 27,8% (табл. 1). Следует отметить, что для всех тканей экспериментальной группы характерно увеличение доли  $\text{NO}_2^-$  относительно общего числа метаболитов и снижение процентного содержания  $\text{NO}_3^-$  (рис. 1).

Таким образом, полученные данные указывают, что применение парафармацевтика с геропротекторной активностью способствует снижению содержания стабильных метаболитов оксида азота в разных тканях крыс с возрастом.

## ВЫВОДЫ

1. Выявлена возможность коррекции уровня оксида азота по его метаболитам у взрослых организмов под действием парафармацевтика с геропротекторными свойствами «Вин-Вита».

2. Установлено достоверное увеличение количества  $\text{NO}_x$  в тканях сердца, мозга, печени и почек у интактных взрослых крыс. Отмечена тенденция увеличения концентрации как  $\text{NO}_2^-$ , так и  $\text{NO}_3^-$ . Для всех исследуемых тканей выявлено снижение доли  $\text{NO}_2^-$  от общего количества метаболитов.

3. Парафармацевтик «Вин-Вита» способствовал снижению уровня стабильных метаболитов оксида азота у 30-недельных крыс за счет достоверного снижения  $\text{NO}_3^-$  для всех исследуемых тканей. Изменение содержания  $\text{NO}_2^-$  в ткани мозга достоверное, в отличие от других тканей.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Звенигородская Л.А. Оксид азота как маркер воспаления при стеатогепатите у больных с метаболическим синдромом / Л.А.Звенигородская, Т.В.Нилова // РМЖ — Независимое издание для практикующих врачей. — 2008. — №2. — С. 33-38.
2. Кульчицкий О.К. Возрастные особенности влияния иммобилизационного стресса на состояние системы монооксида азота у крыс / О.К.Кульчицкий,

- Р.И.Потапенко, С.Н.Новикова, О.В.Степанова, М.К.Бурчинская // Проблемы старения и долголетия. — 2009. — Т.18. — №1. — С. 51-59.
3. Курбанов И.С. Депонирование и транспорт оксида азота в биологических системах / И.С.Курбанов // Journal of Qafqaz University. — 2009. — №25. — С. 76-91.
4. Лапшина Л.А. Значение определения нитритов-нитратов как маркеров дисфункции эндотелия при сердечно-сосудистой патологии / Л.А.Лапшина, П.Г.Кравчун, А.Ю.Титова, О.В.Глебова // Укр. мед. часопис. — 2009. — №6 — С. 49-53.
5. Недоспасов А.А. Биогенные оксиды азота / А.А.Недоспасов, Н.В.Беда // Природа. — 2005. — №7. — С. 35-42.
6. Орлова Е.А. Роль NO-синтазы в стимуляции опитных рецепторов и устойчивости почек к оксидативному стрессу / Е.А.Орлова, И.А.Комаревцева // Укр. біохім. журн. — 2004. — Т.76. — №1. — С. 97-102.
7. Орлова О.А. Активність окислювальної модифікації білків у різних тканинах дорослих щурів під впливом парафармацевтика «Вин-Вита» / О.А.Орлова, О.О.Лазарчук // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. — 2009. — Т.4. — №4. — С. 86-90.
8. Орлова О.А. Вплив парафармацевтика «Вин-Вита» на стан енергетичного обміну у дорослих щурів / О.А.Орлова, О.О.Лазарчук // Укр. мед. альманах. — 2009. — Т.12. — №5 — С. 124-128.
9. Пеклина Г.П. Исследование действия «Вин-Вита» на перекисное окисление липидов и антиоксидантную систему организма у ликвидаторов последствий Чернобыльской аварии / Г.П.Пеклина, К.Д.Бабов, С.А.Пичугина [и др.]. // Медична реабілітація. Курортологія. Фізіотерапія. — 2000. — №2. — С. 24-32.
10. Реутов В.П. Оксид азота и цикл в миокарде: молекулярные, биохимические и физиологические аспекты / В.П.Реутов, В.Е.Охотин, А.В.Шуклин [и др.]. // Успехи физиол. наук. — 2007. — Т. 38. — №4. — С. 39-58.
11. Серая И.П. Современные представления о биологической роли оксида азота / И.П.Серая, Я.Р.Нарциссов // Успехи современной биологии. — 2002. — Т.122. — №3. — С. 249-258.
12. Сомова Л.М., Плехова Н.Г. Оксид азота как медиатор воспаления / Л.М.Сомова, Н.Г.Плехова // Вестник ДВО РАН. — 2006. — №2. — С. 77-80.
13. Harman D. Free-radical theory of aging: invreasing the functional life span / D.Harman // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1994. — Vol. 717. — P. 1-15.
14. Khavinson V. Peptides and Ageing / V.Khavinson // Neuro Endocrinol Lett. 2003. — Vol. 23. — P.11-14.
15. Kozina L.S. The valuation of biological activity of regulatory peptides in model experiments in vitro / L.S.Kozina, A.V.Arutjunyan, S.L.Stvolinsky // Advances in Gerontology. — 2008. — №1. — P.68-73.
16. Liu P. Age-related in arginine and its metabolites in memory-associated / P.Liu, Y.Jing, H.Zhang // Neuroscience. — 2009. — Vol. 164. — P.11-28.

**О.А.Орлова, О.О.Лазарчук.** Вплив парафармацевтика «Він-Вита» на рівень метаболітів оксиду азоту в тканинах органів молодих та дорослих щурів. Луганськ, Україна.

**Ключові слова:** метаболіти оксиду азоту, антиоксидантна система, тканини, геропротектор.

Метою дослідження було вивчити вплив геропротекторного засобу «Він-Вита» на рівень метаболітів оксиду азоту в тканинах печінки, нирок, серця, мозку молодих та дорослих щурів. Встановлено вірогідне підвищення кількості  $\text{NO}_x$  в тканинах досліджуваних органів інтактних дорослих щурів. При цьому відзначалася тенденція збільшення як  $\text{NO}_2^-$ , так і  $\text{NO}_3^-$ . Для всіх досліджуваних тканин 30-тижневих інтактних тварин виявлено зниження частки  $\text{NO}_2^-$  від загальної кількості метаболітів. Встановлена можливість корекції рівня оксиду азоту за його метаболітами у дорослих організмів під дією парафармацевтика з геропротекторними властивостями «Він-Вита».

**E.A.Orlova, O.A.Lazarchuk.** Effect parapharmaceutic «Vin-Vita» at the level of nitric oxide metabolites in the tissues of young and adult rats. Lugansk, Ukraine.

**Key words:** nitric oxide metabolites, antioxidant status, tissue, geroprotector.

The purpose of this study was to investigate the influence geroprotector means «Vin-Vita» at the level of nitric oxide metabolites in liver, kidney, heart and brain of young and adult rats. Found a significant increase in the amount of  $\text{NO}_x$  in the tissues intact adult rats. This tended to increase as  $\text{NO}_2^-$ , and  $\text{NO}_3^-$ . For all tissues examined 30-week-intact animals showed a reduction in the proportion of  $\text{NO}_2^-$  of the total metabolites. Revealed the possibility of correcting the level of NO in adult organisms under the influence of parapharmaceutic with geroprotector properties «Vin-Vita».

Надійшла до редакції 25.01.2010 р.