

А.Г. ЧУМАК, В.А. КОСТЮК, Г.Т. МАСЛОВА, А.И. ПОТАПОВИЧ, А.В. СИДОРОВ,
В.Б. КАЗАКЕВИЧ, Е.Н. ВЛАДЫКОВСКАЯ, Г.С. ПОЛЮХОВИЧ, Т.В. КОСТЮК, Т.О. СУХАН,
Т.П. ШУХНО

ИССЛЕДОВАНИЯ КАФЕДРЫ ФИЗИОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ В СВЕТЕ ВЕДУЩИХ ТЕНДЕНЦИЙ СОВРЕМЕННОЙ ФИЗИОЛОГИИ

The main scientific results of various projects supported by Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research observed. The data on central and peripheral mechanisms of nitric monoxide (NO) influence on tissue oxygen consumption are demonstrated. Creation of natural polyphenol-metal ions complexes and investigation of their biological activity are also discussed.

Исторически сложилось так, что уже в 1922 г. при создании кафедры физиологии человека и животных, общей для двух факультетов - биологического и медицинского, ее первым руководителем Л.П. Розановым были заложены основы двух тенденций в физиологических исследованиях, сохранившиеся и до настоящего времени. Речь идет об интегративной и аналитической физиологии, или, как говорят современные теоретики науки применительно к последней, молекулярной физиологии. Профессор Л.П. Розанов, ученик И.П. Павлова, по результатам опытов опубликовал первую научную работу кафедры в 1923 г. Из Германии он привез электрический рН-метр, что послужило методической основой для аналитических экспериментов в области физиологии пищеварения. В последующие годы преподаватели, сотрудники и студенты кафедры постоянно стремились сочетать точные методы оценки функционирования клеток, органов и систем с теоретическими представлениями синтетической физиологии, особенно успешно развиваемой отечественными физиологическими школами.

В настоящее время на кафедре интенсивно проводятся исследования по изучению физиологической роли монооксида азота (NO) - одной из ключевых сигнальных молекул, вовлеченных в реализацию и контроль самых разнообразных физиологических функций организма. В частности, при поддержке БРФФИ совместно с коллегами из Института физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины выполняется работа, связанная с оценкой центральных и периферических механизмов влияния NO на эффективность использования кислорода тканями.

К настоящему времени в литературе имеется много свидетельств, подтверждающих строгую взаимосвязь процессов дыхания и симпатического управления тонусом периферических сосудов [1], а также накапливаются сведения и о том, что монооксид азота может использоваться нервными сетями ЦНС как сигнальная молекула, способная влиять на механизмы генерации периодической активности симпатических преганглионарных нейронов [2,3].

Имеются основания считать межклеточную коммуникацию с использованием монооксида азота филогенетически древней, поскольку она присутствует у разных типов животных. Наличие NO-ергических нейронов в составе ЦНС моллюска *Lymnaea stagnalis* было впервые отмечено около 10 лет назад сотрудником кафедры физиологии Л.Л. Морозом [4, 5]. Как оказалось, NO-синтаза локализована в клетках буккальных ганглиев, контролирующего пищедобывательное поведение моллюска, а NO выделяется из указанных нейронов при активации органов, отвечающих за реализацию пищевого поведения *Lymnaea*. Таким образом, данные гистохимических исследований, приведенные в литературе, дают основание полагать, что NO широко используется нейронными ансамблями для регуляции автономных функций. Имеются и физиологические доказательства, связанные с результатами внутривенного, интравентрикулярного и интратекального введения NO-активных препаратов.

В собственных опытах на крысах было установлено, что в различных по функциональной принадлежности нервных стволах, почечных и брюшноаор-

тальных, сосудодвигательные симпатические эфферентные волокна демонстрируют различные паттерны тонической активности с преобладанием дыхательной и пульсовой ритмики. Однако протекание ее в различных нервах неuniformно и обеспечивается разными факторами как афферентного, так и нейрорхимического происхождения. Интравентрикулярное и интратекальное введение NO-активных препаратов существенно меняет характер дыхательной ритмики симпатических эфферентов. Повышение концентрации NO в ликворе головного мозга (50 ± 200 мкг/кг) приводило к торможению эфферентной активности почечного нерва. Введение же донора монооксида азота в ликвор спинного мозга (Th9) сопровождалось иной картиной. Как оказалось, сразу после инъекции раствора нитропруссид натрия (5 мкг/кг, 0,1 мл) симпатическая эфферентная импульсация в брюшноаортальном нерве возросла на 24 % к 15-й минуте. Далее (к часу наблюдения) развилось торможение. Аналогичным образом менялась частота сердечных сокращений и интенсивность дыхания. Таким образом, были получены доказательства вовлечения монооксида азота в формирование ритмики преганглионарных симпатических нейронов [6].

Иные отношения между активностью симпатических эфферентных волокон и частотой пульса и дыхания складываются при ишемии органов. В частности, ишемия кишечника активизирует афферентные волокна и вызывает стойкий подъем артериального давления, обусловленный как усилением тонических влияний симпатических нервов, так и ростом частоты сердечных сокращений [6, 7]. Ишемия же миокарда при общем усилении симпатических влияний приводит к возникновению постшемических или реперфузионных аритмий.

У крыс контрольной серии 12-минутная окклюзия левой коронарной артерии провоцировала развитие разнообразных и многочисленных желудочковых нарушений ритма, которые появлялись с началом 7-й минуты (экстрасистолия - в 100 %, тахикардия - в 57,1 %, трепетание - в 42,9 %, фибрилляция - в 28,6 % случаев) и сохранялись на высоком уровне до конца ишемии. Реперфузионные желудочковые аритмии, включая и самые тяжелые - фибрилляции, развивались с первых секунд восстановления кровотока и, постепенно ослабевая, поддерживались в течение 10 мин наблюдения. У подопытных животных предварительно проведенная локальная прерывистая ишемия приводила не только к изменению динамики развития, но и к достоверному снижению манифестаций ишемических, а затем и реперфузионных желудочковых аритмий, т. е. вызывала адаптацию миокарда к последующим повреждениям.

В литературе протекторное действие предварительной ишемии связывают в том числе и с влиянием на повторно подвергаемый действию ишемии миокард монооксида азота. В наших экспериментах доноры NO нитропруссид натрия и ДЕА-NO (1,1-диэтил-2-гидрокси-2-нитрозогидразина нитриевая соль), введенные в кровоток за 2 мин до начала ишемии миокарда, так же как и прерывистая ишемия, предотвращали нарушения сердечного ритма в ходе коронароокклюзии и после нее [8].

Наконец, в модельных опытах с использованием нервных сетей моллюсков были уточнены интимные процессы, обусловленные действием монооксида азота на дыхательные нейроны. Установлено, что доноры NO (ДЕА/NO, нитропруссид натрия - оба в конечной концентрации 10^{-4} М) в течение 30-40 с после начала действия угнетают работу центрального генератора ритма дыхания в нервной системе моллюска *Lymnaea stagnalis*. В основе наблюдаемого явления лежит снижение эффективности передачи сигнала через химические синапсы. Так, выраженное падение амплитуды постсинаптических потенциалов в дофамин- и пептид- (FMRFамид-)ергических синапсах произошло уже через 30 с после аппликации доноров монооксида азота на поверхность препаратов изолированной нервной системы моллюска. При этом действие NO реализуется как на пресинаптическом (снижение выброса нейромед-

диатора), так и на постсинаптическом (изменение уровня мембранного потенциала постсинаптической клетки) уровнях. Кроме того, данная сигнальная молекула способна эффективно изменять проводимость щелевых контактов (электрических синапсов), что обуславливает ее регулируемую роль в координации электрической активности групп нейронов [9, 10], прежде всего респираторных.

Полученные данные демонстрируют не только важную роль монооксида азота в формировании активности функциональных систем, поддерживающих нормальное снабжение тканей кислородом у филогенетически далеких организмов, крыс и моллюсков, но и наглядно демонстрируют необходимость интеграции различных функциональных систем, в частности дыхания и кровообращения [1], при событиях, угрожающих жизнедеятельности организма. При этом общим звеном, синхронизирующим их активность, может выступать простая и функционально очень древняя сигнальная молекула - монооксид азота.

Еще один проект, финансируемый БРФФИ и выполняемый сотрудниками НИЛ проблем терморегуляции, заключается в исследовании биологической активности комплексов природных полифенолов с ионами металлов. Экспериментально и клинически доказана эффективность терапевтического использования супероксиддисмутазы (СОД), однако ее применение (как и других белков) в качестве лекарственного препарата осложняется возможностью развития в организме иммунной реакции. Кроме того, молекуле СОД, имеющей значительные размеры, не всегда доступны центры генерации активных форм кислорода. Поэтому актуальным является получение низкомолекулярных аналогов СОД, которые, обладая высокой антирадикальной активностью в отношении анион-радикала кислорода, лишены недостатков, присущих макромолекулам. СОД-подобная активность выявлена у медных комплексов некоторых аминокислот, салицилатов, макроциклических полиаминов и индометацина. Однако указанные лиганды являются достаточно слабыми хелаторами, их комплексы с медью весьма неустойчивы [11], поэтому и не могут рассматриваться в качестве потенциальных лекарственных препаратов. Еще в конце 1980-х гг. было показано, что флавоноиды наряду с эффективным антирадикальным действием способны связывать ионы металлов с переменной валентностью, образуя стабильные хелатные комплексы [12, 13]. Поскольку ионы металлов с переменной валентностью играют ключевую роль в образовании биорадикалов и иницировании свободнорадикальных процессов посредством реакции Фентона, хелатирование металлов рассматривается как дополнительный механизм антиоксидантного действия флавоноидов. Кроме того, установлено, что комплексы рутина, лютеолина, таксифолина, эпикатехина с ионами Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} обладают значительно более эффективным антирадикальным действием, чем исходные лиганды, поскольку ион металла в таких комплексах способен катализировать реакцию дисмутации анион-радикала кислорода [14, 15]. Вместе с тем ионы металлов в комплексе с флавоноидами сохраняют в определенной степени и способность разлагать гидропероксиды, в частности пероксид водорода, по механизму Фентона, т. е. путем гомолиза связи O-O, и наиболее эффективен в этом отношении медный комплекс рутина. Образующийся гидроксильный радикал (*ОН) способен эффективно окислять любые биомолекулы и иницировать свободнорадикальные процессы. Однако, как свидетельствуют полученные нами данные, при разложении пероксидов металлокомплексами флавоноидов в первую очередь окисляется преимущественно комплексобразующий лиганд. В частности, показано, что даже 500-кратный избыток в среде инкубации такой эффективной ловушки *ОН, как маннит, не влияет на скорость окисления рутина. Это означает, что гидроксильный радикал, образующийся при разложении пероксида водорода в области локализации хелатированного иона, взаимодействует с лигандом практически в месте образования, т. е.

сайт-специфически. Таким образом, металлокомплексы флавоноидов являются уникальными агентами, способными эффективно дисмутировать анион-радикал кислорода и «безопасно» для окружающих биомолекул и клетки в целом разлагать образующийся в результате реакции дисмутации пероксид водорода.

Фармакологический потенциал металлокомплексов рутина и ряда других флавоноидов исследовался на экспериментальных моделях различных патологий, для которых характерным признаком является повышенная продукция биорадикалов и развитие окислительного стресса. Так, известно, что начальным звеном цепи патологических изменений в легких при вдыхании минеральной пыли природного и техногенного происхождения являются чрезмерная активация фагоцитирующих клеток и гиперпродукция активных форм кислорода (АФК), ведущие к повреждению и неопластической трансформации эпителиальных и фагоцитирующих клеток [16]. С использованием адекватных клеточных моделей установлено, что комплексы флавоноидов с металлами значительно лучше, чем свободные лиганды, защищают от повреждения хризотил-асбестом фагоцитирующие клетки (макрофаги, нейтрофилы) и эритроциты [14]. Эффективность антисудорожного действия комплекса рутин-медь было показано при моделировании травматической эпилепсии *in vivo* [17]. Синдром ишемии-реперфузии, относящийся к числу свободнорадикальных патологий, приводит к желудочковым нарушениям ритма, способным полностью выключить насосную функцию сердца. Установлено, что металлокомплексы рутина и эпикатехина обладают выраженным антиаритмическим действием, эффективно подавляя эктопическую активность левого желудочка в начальный период восстановления кровотока. Детальное исследование биологической активности металлокомплексов рутина и эпикатехина *in vivo* было проведено на модели острого повреждения печени с использованием гепатотоксина тиаоацетамида (ТАА). Исследования проводились на гомозиготных мышах 129s7/SvEv-Brd-Mt1^{tm1Bri} Mt2^{tm1Bri}, характеризующихся отсутствием генов, кодирующих металлотионин. Поскольку этот небольшой белок является одним из важнейших эндогенных антиоксидантов, животные этой линии характеризуются повышенной чувствительностью к окислительному стрессу, индуцированному ксенобиотиками. Выявлено, что пероральное введение ТАА в субтоксичной дозе (125 мг/кг) вызывает в печени развитие окислительного стресса. В результате происходит значительное снижение уровня восстановленного глутатиона и активности ферментов антиоксидантной защиты: СОД, глутатионпероксидазы I и II, глутатионредуктазы (ГР) и глутатион-S-трансферазы (ГТ) и повреждение гепатоцитов, о чем свидетельствует увеличение уровня лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ) в плазме крови. Установлено, что снижение активности ключевых антиоксидантных ферментов обусловлено их инактивацией биорадикалами, поскольку экспрессия мРНК этих белков не изменялась (ГР) или даже увеличивалась (СОД, ГТ). Предварительное введение металлокомплексов флавоноидов оказывало выраженный защитный эффект в условиях ТАА-индуцированного повреждения печени, достоверно снижая плазматический уровень ЛДГ и АлАТ и нормализуя уровень экспрессии и активность антиоксидантных ферментов.

Таким образом, результаты, полученные *in vitro* и *in vivo*, свидетельствуют, что металлокомплексы флавоноидов являются перспективными соединениями для создания новых средств профилактики и терапии свободнорадикальных патологий различной этиологии и локализации.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (проекты Б05К-113, Б05М-055, Б05М-172).

1. Судаков К. В. Информационный феномен жизнедеятельности. М., 1999.

2. Gourine A.V., Kulchitsky V.A., Gourine V.N. / J. Physiol. (L). 1995. Vol. 486. P. 72.

3. Krukoff T. L. // Brain Research Reviews. 1999. Vol. 30. P. 52.
4. Moroz L.L., Park J.H., Winlow W. // Neuroreport. 1993. Vol. 4. № 6. P. 643.
5. Moroz L.L. // Microsc. Res. Tech. 2000. Vol. 49. № 6. P. 557.
6. Чумак А.Г., Солтанов В.В., Кульчицкий В.А. // Современные проблемы физиологии вегетативных функций. Самара, 2001. С. 81.
7. Чумак А.Г., Рудая А.Ю. // Роль нейромедиаторов и регуляторных пептидов в процессах жизнедеятельности. Мн., 1999. С. 266.
8. Костюк В.А., Полюхович Г. С. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1999. № 2. С. 137.
9. Sidorov A.V., Kazakevich V.B. // Protein Modules in Cellular Signalling. NATO Science Series: Life Sciences. 2001. Vol. 318. P. 150.
10. Sidorov A.V., Kazakevich V.B., Moroz L.L. // Acta Biol. Hung. 1999. Vol. 50. № 1-3. P. 229.
11. Костюк В.А., Потапович А.И., Терещенко С.М., Афанасьев И.Б. // Биохимия. 1988. Т. 53. № 8. С. 1365.
12. Afanas'ev I. B., Dorozhko A.I., Brodskii A.V. et al. // Biochem Pharmacol. 1989. Vol. 38. P. 1763.
13. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. Free radicals in biology and medicine. Oxford, 1999.
14. Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Vladykovskaya E.N. et al. // Arch. Biochem. Biophys. 2001. Vol. 385. P. 129.
15. Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Strigunova E.N. et al. // Ibid. 2004. Vol. 428. P. 204.
16. Shvedova A.A., Kisin E.R., Mercer R. et al. // Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol. 2005. Vol. 289. № 5. P. L698.
17. Царюк В.В., Потапович А.И., Костюк В.А. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2002. Т. 133. № 4. С. 388.

Поступила в редакцию 27.02.06.

Анатолий Георгиевич Чумак - доктор биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий кафедрой физиологии человека и животных. Область научных интересов: физиология автономной нервной системы, нейробиология. Автор более 100 научных публикаций, в том числе монографии.

Владимир Андреевич Костюк - доктор химических наук, заведующий НИЛ проблем терморегуляции при кафедре физиологии человека и животных. Область научных интересов: физиология и биохимия клетки, свободнорадикальная биология. Автор более 200 научных публикаций, монографии, 5 авторских свидетельств (патентов).

Галина Трофимовна Маслова - кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, доцент кафедры физиологии человека и животных. Область научных интересов: физиология и биохимия клетки, свободнорадикальная биология, механизмы терапевтического действия низкоинтенсивного лазерного излучения. Автор более 200 научных публикаций, 16 авторских свидетельств (патентов).

Алла Ивановна Потапович - кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник НИЛ проблем терморегуляции. Область научных интересов: физиология и биохимия клетки, свободнорадикальная биология. Автор более 150 научных публикаций, монографии, 2 авторских свидетельства (патентов).

Александр Викторович Сидоров - кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных. Область научных интересов: нейробиология, клеточная физиология, нейронные основы поведения. Автор 65 научных и 8 учебно-методических публикаций.

Виктор Бернардович Казакевич - кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ проблем терморегуляции. Область научных интересов: физиология медиаторных систем, влияние физиологических факторов на функционирование нервных клеток. Автор 38 научных публикаций.

Елена Николаевна Владыковская - кандидат биологических наук, научный сотрудник НИЛ проблем терморегуляции. Область научных интересов: биохимия окислительного стресса, свободнорадикальная биология. Автор более 20 научных публикаций.

Галина Сергеевна Полюхович - старший преподаватель кафедры физиологии человека и животных. Область научных интересов: физиология сердечно-сосудистой системы, электрокардиография. Автор более 50 научных публикаций, 6 авторских свидетельств (патентов).

Татьяна Владимировна Костюк - младший научный сотрудник НИЛ проблем терморегуляции. Область научных интересов: биохимия полифенолов. Автор 11 научных публикаций.

Татьяна Олеговна Сухан - младший научный сотрудник НИЛ проблем терморегуляции. Область научных интересов: биохимия и молекулярная биология клетки; молекулярные механизмы ангиогенеза. Автор 10 научных публикаций.

Татьяна Петровна Шухно - аспирант кафедры физиологии человека и животных. Область научных интересов: физиология автономной нервной системы. Автор 8 научных публикаций.