

АПОПТОЗ И КРИООБНОВЛЕНИЕ КАК ОСНОВА СОВРЕМЕННОЙ ЦИТОХРОМНОЙ ТЕРАПИИ

Академик НАН Украины В.И. ГРИЩЕНКО, к. биол. н. Э.И. АЛЕКСЕЕВСКАЯ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

Представлен краткий обзор основных направлений развития цитохромной терапии. Показаны причины большей эффективности цитохромной терапии с применением криобиологических технологий. Дано теоретическое обоснование способности цитохрома С тормозить развитие неизлечимых заболеваний и преждевременное старение организма.

В середине XX в. в медицинской науке произошли события, предопределившие главные направления развития цитохромной терапии на XXI ст. Было дано теоретическое обоснование лечебного эффекта цитохрома С, основанное на его способности проникать в клетки и взаимодействовать с митохондриальными мембранами [1], раскрыт и обоснован молекулярный механизм, согласно которому система переноса цитохрома С состоит из двух процессов. Один из них — перенос полипептида, который «входит» в наружную митохондриальную мембрану с помощью апоцитохрома С, заменяющего рецепторную функцию [2]. Он зависит прежде всего от присутствия НАД.Н и коферментов ФАД или ФМН. НАД.Н совместно с флавиннуклеотидами восстанавливает гем, которому в восстановленном состоянии необходима ковалентная привязанность к апоцитохрому С. Данную функцию выполняет фермент цитохром С-гемолизаза для последующего передвижения цитохрома С через наружную митохондриальную мембрану. Второй процесс импорта цитохрома С осуществляется при условии «энергизованного состояния» внутренней сопрягающей мембраны, т.е. способности ее к энергетическому сопряжению.

Эти открытия стали основанием для широкого применения цитохрома С в медицинской практике.

В 1957 г. D.V. Van Bekkum [3] обнаружил повышение коэффициента Р/О после добавления цитохрома С к митохондриям облученной селезенки. Через час этот эффект усилился. Через 4 ч величина Р/О была в два раза выше исходной, хотя и не достигла нормы. Это явление было названо «цитохромным эффектом». Автор пришел к выводу, что облучение вызывает в митохондриях селезенки дефицит цитохрома С, и показал инактивирующий характер радиации, а не простое отмывание цитохрома С от митохондрий. Несколько позже российские ученые [4] изучили влияние экзогенного цитохрома С на окислительное фосфорилирование в некоторых органах животных при экспериментальном опухолевом росте и лучевой болезни, что предопределило дальнейшее направление подобных работ в онкологии и радиационной медицине.

В целом препарат цитохрома С применяют в тех случаях, когда в тканях организма нарушены окислительные процессы, т.е. при гипоксии различного происхождения. Механизм лечебного действия цитохрома С заключается в его ингибирующем влиянии на перекисное окисление липидов (ПОЛ), что проявилось

в снижении конъюгантов, малонового альдегида и стимуляции синтеза ингибиторов протеолиза [5]. Цитохром С стабилизирует мембраны лизосом и обеспечивает сохранение кислых фосфатаз и ДНК, в основном в связанном со структурами органелл состоянии. Способность препарата снижать процессы ПОЛ является одним из механизмов его лечебного действия при остром вирусном гепатите [6]. Цитохром С оказывает стимулирующее влияние на синтез иммуноглобулинов, в связи с чем его используют, например, в комплексном лечении больных тифопаратифозными заболеваниями [7]. Установлено, что уровень Ig G в группе больных, леченных цитохромом С, был на 17% выше по сравнению с теми, кого лечили традиционным методом. При этом уровень Ig M и A также превышал контрольный уровень, но менее интенсивно. Благодаря стимуляции иммуногенеза на 5–10-й день лечения прекратилось бактериовыделение. Положительное влияние цитохрома С на иммуногенез является результатом его стимулирующего действия на процессы окислительного фосфорилирования и дыхания.

В акушерстве и гинекологии среди причин перинатальной смертности гипоксия внутриутробного плода стоит на первом месте. При патологическом течении беременности (токсикозы, невынашивание и др.) происходит перерождение плацентарной ткани, нарушаются маточно-плацентарное кровообращение и функция плаценты, прекращается поступление лактата и пирувата через плаценту и пуповину, что приводит к развитию хронической гипоксии [8]. Плацента содержит 6,0–8,0 мг цитохрома С на 1 кг сухого остатка. При тяжелых токсикозах беременности активность цитохрома С и цитохромоксидазы снижается. После внутривенного введения цитохрома С в родах сердечная деятельность плода существенно улучшается, что связано с благоприятными изменениями функции плаценты, а также с непосредственным действием препарата на миокард плода.

В хирургии показаны преимущества парентерального введения цитохрома С в сочетании с гипербарической оксигенацией (ГБО) при лечении гнойно-воспалительного процесса челюстно-лицевой области по сравнению с традиционными методами лечения. Сочетанное применение цитохрома С и ГБО усиливает лейкоцитарную местную реакцию, ускоряет отторжение секвестров и активизирует рост сосудов и нервных окончаний [9].

Обосновано применение цитохрома С для лечения сердечной мышцы при ее недостаточности [10].

Выявлена положительная динамика показателей энцефалограммы, а также ряда психофизиологических тестов при лечении этим препаратом. У больных с цереброкardiaльными синдромами введение препарата улучшало как церебральные показатели, так и показатели сердечной деятельности. Цитохром С рекомендован в качестве компонента комплексной терапии сосудистой патологии мозга.

Дано клинико-цитохимическое обоснование использования цитохрома С в метаболической коррекции при осложненной форме острой пневмонии у детей раннего возраста (1 мес — 2 года) [11]. Хорошие результаты получены у детей с сердечно-сосудистой недостаточностью, гипотрофией, рахитом, анемией, а также после родовой травмы и асфиксии. Показанием к применению считается снижение активности сукцинатдегидрогеназы, НАД-, НАДФ.Н-дегидрогеназ в нейтрофилах крови. Действие препарата направлено на восстановление ферментного статуса этих клеток, в которых цитохром С нормализует нарушенные окислительные процессы фосфорилирования и энергообеспечения.

Таким образом, метод цитохромной терапии завоевал право на жизнь при лечении ряда патологических состояний организма.

Недавно на клетках яичника китайского хомяка было показано, что проникающая способность митохондрий играет важную роль в регуляции освождения митохондриального цитохрома С [12]. Это может быть краеугольным камнем на пути апоптоза (программы гибели клетки). Один из пусковых механизмов процесса апоптоза заключается в выходе из поврежденных митохондрий цитохрома С, взаимодействующего с цитозольным белком Араф-1, что обеспечивает переход каспазы 3 (остаток аспарагиновой кислоты) в каталитически активную форму [13].

Криообновление (программа жизни клетки, переход ее на более высокий уровень гомеостаза) представляет собой противовес апоптозу и является альтернативой репарируемых повреждений. Термин «криообновление», введенный нами в 1989 г. [14], обозначает совокупность реакций, активирующих жизнедеятельность клетки, и переводит ее на более высокий уровень гомеостаза. Процессы криообновления регулируются генетической программой, которая запускается внутриклеточными физиологическими факторами. Одним из пусковых механизмов криообновления является увеличение концентрации цитохромов в митохондриях и гомогенатах печени крыс и появление митохондрий с новыми свойствами, более устойчивых к повреждающим факторам. Усиление митохондриогенеза коррелирует с морфологическими изменениями этих структур, вследствие чего формируются новые взаимоотношения цитохрома С с митохондриальными мембранами. Благоприятные изменения в системе транспорта электронов обеспечивают низкие температуры благодаря их способности регулировать гены, под контролем которых находится цитохром С и НАД.Н, участвующий в его транспортной функции через наружную митохондриальную мембрану. В настоящее время выявлены и локализованы гены, участвующие в процессах криообновления.

Концепция криообновления, широко представленная на страницах журнала «Успехи современной биологии и медицины» [14], служит теоретическим обоснованием эффективности криобиологических технологий в цитохромной терапии. В результате лечения цитохромом С и гипотермией больных с острым отравлением (алкоголем, наркотиками) у них сокращаются продолжительность коматозного состояния и сроки пребывания в реанимационном отделении в среднем на 3–5 сут. После 1–2 инъекций цитохрома С больные с ишемической и геморрагической патологией выходят из коматозного состояния, включая и тех, кто не поддавался методам традиционной гипотермии. На протяжении ряда лет успешно проводится трансплантация размороженных клеток костного мозга и эмбриональной печени, обогащенных цитохромом С. В результате использования цитохрома С и гипотермии удалось активизировать подвижность и жизнеспособность спермиев человека на 30–32%, что дало возможность повысить фертильность мужских гамет и способствовало увеличению частоты наступления беременности. Примечательно, что у всех новорожденных, полученных от этих мужчин, отсутствовали признаки асфиксии, гемолитической желтухи и статуса недоношенности, что нередко встречается при использовании традиционных методов. Наблюдения последних лет свидетельствуют о том, что «криообновленные» дети с использованием цитохрома С, достигшие 14-летнего возраста, практически не болеют инфекционными и другими заболеваниями.

Вышеупомянутые криобиологические технологии защищены патентами РФ и Украины.

Положительный эффект сочетания низких температур и цитохрома С при лечении бесплодия мы связываем с открытым нами ранее деконденсирующим свойством криоконсервирования и активацией процессов транскрипции. Гораздо позже подобную мысль высказали и зарубежные авторы, которые показали положительную корреляцию между деконденсацией хроматина в спермиях человека и животных (свиньи) и их оплодотворяющей способностью [15]. Потерю оплодотворяющей способности у мужчин связывают по крайней мере с чрезвычайной конденсацией хроматина [16]. Конденсированный хроматин лишает гены функциональной активности, деконденсированный (разрыхленный) — ведет к включению в работу генов и открывает возможность реализации их регуляторной деятельности.

Суммируя сказанное, можно предположить, что низкие температуры, активно воздействуя на гены, под контролем которых находится цитохром С, активизируют систему транспорта электронов и тем самым в значительной степени способствуют интенсификации подвижности спермиев и их фертильности. Теоретические предпосылки подтверждены экспериментально: при осеменении икры осетра и карпа размороженными спермиями значительно увеличился процент выклева личинок и возросла их средняя масса [17]. Молодь этих рыб также отличалась большей средней массой тела, а также более высоким уровнем гематологических, биохимических и иммунологиче-

ских параметров. Недавно идентифицированы белки холодового шока (ХШ, CIRP) в клетках человека [18]. Результатом функционирования белков-ХШ является повышенная выживаемость человека и животных. Поэтому согласно универсальности кода можно прогнозировать получение более жизнеспособного потомства во всех поколениях.

В настоящее время в клинической практике для лечения коматозных, гипоксических, постлучевых состояний, а также при нарушении гемопоэза и бесплодии все чаще используют криобиологические технологии. В основе высокой эффективности цитохромной терапии с использованием низких температур лежит ряд следующих генетически обусловленных факторов: 1) деконденсация хроматина и активация процессов транскрипции; 2) экспрессия генов холодовой адаптации, синтез белков-ХШ и *de novo*; 3) интенсификация системы транспорта электронов; 4) стабилизация клеточных мембран; 5) индукция с помощью цитохрома С процессов пиноцитоза; 6) повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера; 7) корректировка динамического равновесия между уровнем и состоянием топоизомераз I и II типа и многие другие, широко освещенные в обзорной работе [14].

Согласно данным зарубежных авторов радиактивно-индуцируемый апоптоз вызывает освобождение цитохрома С из митохондрий [19]. Освобожденный цитохром С стимулирует процессы апоптоза путем стимуляции каспазы 9. Цитохром С, вышедший из митохондрий, индуцирует апоптоз в раковых клетках [20]. Цитохром С, введенный в организм, стимулирует процессы криообновления и тем самым оказывает благоприятное действие на течение пост-

радиационных осложнений и опухолевой болезни. Высокая терапевтическая эффективность обусловлена способностью препарата тормозить рост опухоли, предотвращать падение биоэнергетических процессов в митохондриях.

В иммунологических исследованиях доказано, что иммунодефицит проявляется только при истощении ферментных систем, главным образом лимфоцитов и моноцитов. Применение цитохрома С существенно повышает эффективность лечения и нормализует иммунный статус больных туберкулезом. Положительное действие цитохрома С на иммуногенез является результатом его стимулирующего влияния на синтез иммуноглобулинов, процессы дыхания и фосфорилирования. Подобно туберкулезу СПИД также является следствием проявления иммунодефицита. Лечебная эффективность цитохрома С обусловлена его способностью проникать в клетки мозга для последующей коррекции в них энергетического обмена, стимуляции иммуногенеза и биоэнергетических процессов. Поэтому путем использования цитохромной терапии можно прогнозировать задержку развития иммунодефицита.

Итак, на основании теоретических предпосылок и собственных экспериментальных данных, полученных за последние 35 лет, нами разработаны технологии, открывающие возможность воздействовать на неизлечимые заболевания и предупредить преждевременное старение организма. Теоретически обоснована эффективность использования цитохрома С в экспериментальной и клинической медицине, в основу которого положено динамическое взаимодействие двух разнонаправленных процессов апоптоза и криообновления.

Литература

1. *Маноилов С.Е.* Теоретическое обоснование использования цитохрома С в медицине // Лечебные препараты из крови и тканей: Сб. науч. тр. НИИ гематол. и перел. крови.— Л., 1974.— С. 122–124.
2. *Nicolson D.W., Conler H., Neupert W.* Import of cytochrome C into mitochondria: cytochrome C heme lyase // *Eur. J. Biochem.*— 1987.— Vol. 164.— P. 147–157.
3. *Van Bekkum D.V.* Oxidative phosphorylation in irradiated tissues // *Chem. Weekbl.*— 1957.— № 53.— P. 233–238.
4. *Хансон К.П., Маноилов С.Е., Полосова П.Г.* Влияние экзогенного цитохрома С на окислительное фосфорилирование в некоторых органах животных при экспериментальном опухолевом росте и лучевой болезни // *Митохондрии.*— М.: Наука, 1967.— С. 68–71.
5. *Новиков В.С.* Применение цитохрома С для нормализации нарушения резистентности // *Цитохром С и его клиническое применение: Сб. науч. тр. НИИ гематол. и перел. крови.*— Л., 1990.— С. 52–57.
6. *Мхитарян Л.М.* Механизм лечебного действия цитохрома С при остром вирусном гепатите «В» // *Эксп. и клин. мед.*— 1987.— Т. 27, № 6.— С. 585–589.
7. *Мусабаев И.К., Мецкан Т.И., Хамитов М.Х.* Применение цитохрома С в комплексном лечении больных тифопаратифозными заболеваниями // *Матер. IV съезда гигиенистов, сан. врачей, эпидемиологов, микробиологов и инфекционистов Узбекистана.*— Ташкент: Медицина Уз ССР, 1980.— С. 29–30.
8. *Поляк А.Я.* Применение цитохрома С для профилактики и лечения гипоксии внутриутробного плода // *Физиол. и патол. беременности и дети.*— 1973.— № 1.— С. 136–140.
9. *Балин В.Н., Лотовин А.П.* Применение цитохрома С и оксигенобаротерапии в гнойной хирургии челюстно-лицевой области / *Цитохром С и его клиническое применение: Сб. науч. тр. НИИ гематол. и перел. крови.*— Л.— 1990.— С. 65–68.
10. *Чазов Е.И., Николаева Л.Ф.* Пути воздействия на некоторые метаболические процессы в сердечной мышце при ее недостаточности // *Арх. анатомии.*— 1976.— № 9.— С. 3–8.
11. Клинико-цитохимическое обоснование эффективности цитохрома С в метаболической коррекции при осложненной форме острой пневмонии у детей раннего возраста / *А.А. Гаджиев, Р.П. Нарциссов, С.Ш. Гасанов, Р.А. Гашимова* // *Педиатрия.*— 1990.— № 1.— С. 111–112.
12. *Darul E., Latinder S., Diane L., Steven P.* Cyclosporin A inhibits chromium (YI)-induced apoptosis and mitochondrial cytochrome C release and restores clonogenic survival in CHO cells // *Carcinogen.*— 2000.— Vol. 21, № 11.— P. 2027–2033.

13. Губский Ю.И. Токсическая гибель клетки: свободнорадикальное повреждение ДНК и апоптоз // Лик. та диагност.— 2001.— № 4.— С. 8–13.
14. Грищенко В.И., Алексеевская Э.И. Кривообновление — основа для прогресса современных технологий в биологии и медицине // Успехи совр. биол. и мед.— 2003.— 123.— № 5.— С. 435–444.
15. Chan P.I., Fredway. D.R. Assotiation of human sperm nuclear decondensation and in vitro penetration ability // Androl.— 1992.— Vol. 24, № 2.— P. 77–81.
16. Chromatin alterations induced by freeze-thaving influence the fertilising ability of human sperm / D. Roure, S. Hamamah, J.C. Nicolle, J. Lansac // J. Androl.— 1991.— Vol. 14, № 5.— P. 328–335.
17. Савушкина С.И., Цветкова Л.И. Рост молоди карпа, полученной с применением криоконсервированной спермы в условиях водоема охладителя ГРЭС // Рыбное хоз-во. Сер. Аквакультура.— 1994, № 1.— С. 17–18.
18. Increased transkript level of RBM3, a member of the glicine-rich RN-binding protein family, in human cells in response to cold stress / S. Danno, H. Nishiyama, H. Higashitsuji et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun.— 1997.— Vol. 236, № 3.— P. 804–807.
19. Protein Kinase C inhibitor and irradiation-induced Apoptosis: Reivance of the Cytochrome c-mediated Caspase-9 Death Pathway / R. Sonia, S. Martia, W. Scott et al. // Cell. Growth. Different.— 2000.— № 11.— P. 491–499.
20. Epidermal Growth Factor Protects Epithell-derived Cells from Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand-induced Apoptosis by inhibiting Cytochrome C Release / M.G. Erika, S. Elizabeth, H. Nell, V. Jaclyyn // Canc. Research.— 2002.— № 62.— P. 488–496.

Поступила 09.07.2004

APOPTOSIS AND CRYORESTORATION AS A BASIS OF CONTEMPORARY CYTOCHROME THERAPY

V.I. Grischenko, E.I. Alekseyevskaya

S u m m a r y

A brief review of main directions of cytochrome therapy development is presented. The causes of higher efficacy of cytochromic therapy with the use of cryobiology technology are shown. The ability of cytochrome C to inhibit development of incurable diseases and pre-term aging of the organism was substantiated.