

© Онищенко Н.А., 2016
УДК: 577.125.8:615.217.4+616.12-008.331.1

Онищенко Н.А.

Цитогенетическая рекапитуляция, индуцированная медикаментозными препаратами, как универсальный этап формирования срочной защиты органов от повреждения при трансплантации

ФГБУ «ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России, отдел Биомедицинских технологий и тканевой инженерии, Россия, 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1

В обзоре рассмотрены современные представления о клеточных механизмах формирования фармакологическими препаратами срочной защиты органов от повреждения при трансплантации. На примере ишемического повреждения почек показано, что при использовании препаратов разных фармакологических групп наиболее выраженным защитным эффектом обладают те из них, которые действуя в рамках неспецифического адаптационного синдрома клеточных систем, отчетливо индуцируют в органах эволюционно выработанные признаки цитогенетической рекапитуляции: поддерживают клеточный гомеостаз на сниженном уровне за счет активации гликолиза и конформационных перестроек макромолекул, а также изменения в клетках содержания воды — снижения свободной и повышения связанной.

Ключевые слова: ишемия; противоишемические препараты; неспецифический адаптационный синдром клеточной системы; цитогенетическая рекапитуляция.

Для корреспонденции: Онищенко Нина Андреевна, гл. науч. сотр., доктор мед. наук, проф., отдел «Биомедицинских технологий и тканевой инженерии», ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России, e-mail: allanik64@yandex.ru

Для цитирования: Онищенко Н.А. Цитогенетическая рекапитуляция, индуцированная медикаментозными препаратами, как универсальный этап формирования срочной защиты органов от повреждения при трансплантации. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 148–153.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 21.02.2016

Onishchenko N.A.

Cytogenetic recapitulation, induced by medical preparations, as the universal stage of formation of urgent protection against damage at organ transplantation

Federal State Budgetary Institution «Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs», Ministry of Health of the Russian Federation, 1, Schukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation

In this article modern representations about cellular mechanisms of formation by pharmacological preparations of urgent protection of organs against damage are given at transplantation. On an example of ischemic damage of kidneys it is shown, that at use of preparations of different pharmacological groups by the most expressed protective effect those from them which operating within the limits of a nonspecific adaptive syndrome of cellular systems, clearly induce in organs the evolutionary developed signs of cytogenetic recapitulation possess: support a cellular homeostasis at the lowered level at the expense of activation of a glycolysis and conformational reorganizations of macromolecules, and also change in cells of water contain- decrease of free and increase of bound.

Keywords: ischemia, anti-ischemic preparations, nonspecific adaptive syndrome of cellular system, cytogenetic recapitulation.

For correspondence: Nina A. Onishchenko, chief scientific worker, doctor med. sci, professor, Federal State Budgetary Institution «Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs», Ministry of Health of the Russian Federation, 1, Schukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation, department of biomedical technologies and tissue engineering. E-mail: allanik64@yandex.ru

For citation: Onishchenko N.A. Cytogenetic recapitulation, induced by medical preparations, as the universal stage of formation of urgent protection against damage at organ transplantation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2016; 60 (4): 148–153. (in Russ.).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 21.02.2016

Введение

Согласно современному определению, рекапитуляция — это повторение в онтогенезе организмов признаков эволюционного развития их далеких предков, проявляющихся в их структуре, химизме и функциях [1].

Подробный анализ масштабности явления рекапитуляции в биологии и медицине содержится в монографии А.Г. Бабаевой и Н.М. Геворкян «О рекапитуляции при регенерации и заболеваниях» (2013) [2].

Между тем, важный эволюционно выработанный неспецифический механизм выживания клеток и органов при действии различных стресс-раздражителей заслуживает отдельного рассмотрения. Сведения о возникновении признаков рекапитуляции в клетках на ранних стадиях развития неспецифического адаптационного синдрома клеточных систем (НАСКС) имеют большое значение не только в теоретическом плане, но и для выбора стратегии и тактики применения лечебных и профилактических воздействий в клинической медицине, в частности для ускоренного повышения толерантности клеток и органов к повреждению. Именно от степени выраженности ранних стадий адаптационного синдрома в значительной степени зависит дальнейший исход НАСКС: задержится ли он на стадии устойчивой адаптации и обеспечит выживание или перейдет в стадию дезадаптации и вызовет гибель клеточных систем. С помощью этих ранних стадий клеточная система может обеспечить коррекцию своего состояния и быть чувствительной к корригирующим факторам, в качестве которых могут выступать медикаментозные препараты.

Цели обзора — показать:

- на примере ишемического повреждения донорских органов при трансплантации показать, что признаки цитогенетической рекапитуляции (функциональной, структурной и биохимической) ускоренно возникают в донорском органе при ишемии и изоляции;
- что признаки цитогенетической рекапитуляции можно профилактически вызвать в переживающих органах с помощью некоторых фармпрепаратов и тем самым улучшить их состояние;
- что фармпрепараты наиболее активно индуцируют признаки цитогенетической рекапитуляции в интактных органах (до их ишемического повреждения), за счёт которых оптимизируются резервы устойчивости донорских органов к предстоящему повреждению.

1. Механизмы реализации неспецифического адаптационного синдрома клеточных систем

Известно, что воздействие на ткань раздражителей слабой или умеренной силы, не превышающей эволюционно выработанную норму адаптации, индуцирует в клетках животных, находящихся на разных уровнях эволюционного развития, комплекс стереотипных приспособительных изменений, позволяющий объединить их понятием «неспецифический адаптационный синдром клеточной системы» (НАСКС) [3]. В отличие от сохраняемых различий в специфичности функции клеток разных органов количественные изменения специфичности функций и субстанционные клеточные проявления НАСКС (морфологическое, физико-химическое и биохимическое состояние клеток) — неспецифичны и наблюдаются у любых клеток при действии разнообразных неблагоприятных факторов. При этом адаптационный синдром, как известно, в своём развитии проходит четыре стадии: мобилизации, формирования устойчивой адаптации, устойчивой адаптации и дезадаптации, приводящей клетки к гибели.

В первой стадии действия любого раздражителя, в том числе подавляющего жизнедеятельность, обычно возникает аварийная мобилизация функционального и метаболического резервов клеток для сохранения их гомеостаза. Клетка в создавшихся условиях функционирует на пределе нормы адаптации, причем этот феномен мобилизации отмечен не только у высших животных и человека (например, при переходе животных к спячке, при введении организма в состояние искусственной гипотермии), но и у растений (например, повышение интенсивности фотосинтеза на ранних стадиях увядания листьев — эффект Бриллианта). Мобилизационный эффект выражается в том, что дыхание клетки уже в первую минуту может возрасти до 300%, образование молочной кислоты до 600—2000%, тогда как содержание креатинфосфата и АТФ падает до крайне низкого уровня, свидетельствуя о развитии энергодифицитного состояния.

В дальнейшем на фоне продолжающегося действия раздражителя наступает стадия формирования устойчивой адаптации, при которой происходит перераспределение клеточных энерготрат, но не на процессы, связанные со специфической функцией (работа может снижаться), или с поддержанием температуры тела (температура тела также может снижать-

ся), а на качественную перестройку энергетического обмена и самих функционирующих структур. Адаптивная перестройка энергетики клетки характеризуется сохранением повышенной активности гликолиза, а также активацией процессов разобщения окисления и фосфорилирования в митохондриях, что позволяет за счет изменения соотношения между мощностью и эффективностью образования энергии в клетках обеспечить большую скорость накопления в них АТФ.

В результате в ткани повышается уровень креатинфосфата, АТФ и суммарных адениннуклеотидов до 150—200% и таким образом ликвидируется возникшая энергетическая задолженность.

На мобилизационной стадии адаптационного синдрома, также как и на стадии формирования устойчивой адаптации в клетках накапливаются и выходят по градиенту концентраций во внеклеточное пространство ионы H^+ , K^+ , Mg^{2+} , ионы неорганического фосфата, ферменты гликолиза и гидролиза, свободные жирные кислоты, свободные радикалы, перекиси и другие продукты деградации липидов. В клетку же из внеклеточного пространства вследствие повышения проницаемости мембран по градиенту концентрации поступают ионы Na^+ , Ca^{2+} и вода. Возникающие в тканях биохимические перестройки связывают с изменением физико-химических и коллоидно-осмотических свойств цитоплазмы, а также с полимеризацией универсального белка — G-актина и денатурацией других клеточных белков, которые ведут к снижению функции клеток, но одновременно формируют проявления цитогенетической рекапитуляции [4—7], которые выражаются в изменении соотношения свободной и связанной воды в сторону уменьшения свободной, а также в повышении соотношения H_2O связанная / общие SH группы белка [4].

Полагают, что полимеризация актина, снижение рН, выход K^+ , накопление неорганического фосфата и другие биохимические сдвиги дают животной клетке ряд преимуществ, которыми она ранее не располагала: способствуют фиксации состояния клетки и выключению большинства биохимических процессов с тем, чтобы в благоприятных условиях клетка могла вновь перейти к прежней метаболической активности [7—9].

На стадии формирования устойчивой адаптации начинает нарастать также активация генетического аппарата, что способствует повышению нативных антиденатурационных свойств цитоплазмы [4]. Таким образом, из накопленных фактов следует, что цитогенетическая рекапитуляция, возникающая на ранних стадиях реализации НАСКС, характеризуется следующими свойствами:

1) способностью клеток снижать интенсивность своего функционирования и поддерживать гомеостаз

клеточной системы на новом сниженном уровне за счёт активации гликолиза и перераспределения энерготрат на качественную перестройку метаболизма для повышения устойчивости самих клеточных структур;

2) способностью поддерживать клеточный гомеостаз на новом сниженном уровне за счёт способности макромолекул цитоскелета и цитоплазмы осуществлять конформационные перестройки, поддерживаемые метаболитами, накапливающимися в клетках и внеклеточном пространстве на стадиях мобилизации и формирования устойчивой адаптации;

3) способностью клеток и клеточных систем снижать уровень своей жизнедеятельности путём уменьшения в клетках содержания свободной и увеличения количества связанной воды, способствуя их выживанию при неблагоприятных условиях.

2. Формирование резистентности трансплантируемых органов (почка) к ишемии при использовании фармакологических препаратов разных групп

Изучение проблем жизнеобеспечения донорских органов перед трансплантацией позволило констатировать стадийность развития их повреждения при ишемии, являющейся, как известно, основным повреждающим фактором в трансплантологии.

Было показано, что на ранних сроках воздействия ишемического фактора (для почки продолжительностью до 30—40 мин; для сердца — до 15—20 мин) возникающие в органах биохимические и структурные изменения были обратимы (устранялись при реперфузии) и сопровождалась сдвигами, аналогичными проявлениям НАСКС на мобилизационной стадии [10]: развивался ацидоз, снижался мембранный потенциал покоя клеток в результате выхода K^+ из клеток и резко активировался гликолиз и гликогенолиз. В почке крыс к 40 мин ишемии гликоген снижался с $2,85 \pm 0,089$ до $1,78 \pm 0,04$ мкмоль/г $p < 0,05$, лактат повышался с $2,7 \pm 0,3$ до $7,0 \pm 0,3$ мкмоль/г, $p < 0,05$; развивались конформационные перестройки макромолекул, что выражалось в изменении содержания общей, свободной и связанной воды: с $76,3 \pm 0,4$ до $76,7 \pm 0,5\%$; с $62,5 \pm 0,9$ до $56,0 \pm 0,7\%$ ($p < 0,05$); с $13,8 \pm 0,6$ до $20,7 \pm 0,6\%$ ($p < 0,05$) соответственно; в повышении SH-групп общих и быстрореагирующих: с $4,87 \pm 0,31$ до $6,71 \pm 0,17$ моль/ 10^5 г белка, $p < 0,05$ и с $3,2 \pm 0,21$ до $4,53 \pm 0,18$ моль/ 10^5 г белка, $p < 0,05$ соответственно; а также в снижении цАМФ с $406 \pm 8,2$ до $184 \pm 3,9$ пмоль/г ткани, $p < 0,05$. При увеличении срока ишемии почки с 40 до 90 мин развивалось необратимое повреждение этого органа, которое происходило на фоне глубокого торможения гликолиза

(убыль гликогена за этот период составила всего $0,38 \pm 0,05$ мкМоль/г ткани, а прирост лактата только $0,8 \pm 0,3$ мкМоль/г ткани) и развития выраженных деструктивных изменений почечной ткани (статистически значимое увеличение общей и свободной воды; снижение общих и быстрореагирующих SH-групп ниже исходного уровня). Полученные данные позволили констатировать, что уже на ранних сроках ишемического повреждения в клетках органа мобилизуются эволюционно выработанные механизмы рекапитуляции, но таким путем обеспечивается лишь краткосрочная защита клеток донорского органа от гибели. Предстояло ответить на вопрос: как и с помощью каких механизмов фармакологические препараты, традиционно используемые в клинической практике, способны формировать и пролонгировать повышение резистентности донорских органов к ишемии.

2.1. Влияние фармакологических препаратов на структуру тканевых макромолекул, функцию и энергоснабжение ткани почки при ишемии

Было изучено 7 препаратов разных фармакологических групп, которые вводились подкожно однократно и в терапевтически допустимых дозах за 1 ч до моделирования ишемии. Среди препаратов были: лазикс-диуретик; пентоксил — регулятор метаболических процессов; гидрохинон — регулятор окислительно-восстановительных процессов; витамин E-антиоксидант; трентал — ингибитор фосфодиэстеразы, лидокаин — ингибитор мембранных фосфолипаз, стабилизатор клеточных мембран; преднизолон — гормональный препарат с выраженным мембран — стабилизирующим эффектом.

Оценку эффективности защитного действия препаратов производили у крыс с ишемией единственной почки, которую моделировали путём пережатия почечной артерии сроком на 90 мин. Оценивали выживаемость животных и состояние функциональных тестов (диурез, креатинин крови и клиренс эндогенного креатинина). Было установлено [10], что 90 мин ишемии в контроле (без введения медикаментозных препаратов) приводили к резкому нарушению азото-выделительной функции почек, и на 2-е—7-е сут. все крысы погибали. В тоже время при предварительном введении всех фармакологических препаратов (за исключением лазикса) удавалось, хотя и в разной степени, снизить повреждающие эффекты ишемии на почечную ткань и добиться выживания значительной части животных [10].

Было отмечено, однако, что у препаратов преимущественно метаболического типа действия (лазикс, пентоксил, гидрохинон) эффект противоишемической защиты был выражен в меньшей степени, чем у пре-

паратов с мембранотропной активностью (витамин E, трентал, лидокаин, преднизолон). Полученные результаты позволили предположить, что степень выраженности защиты почек, использованными препаратами, зависит от степени выраженности перестроек, возникающих, прежде всего, в тех структурах клеток, которые характеризуют развитие НАСКС.

Изучение изменения содержания общей, свободной и связанной воды, содержания общих и быстрореагирующих SH-групп, а также ц-АМФ (показатель адаптивной перестройки клеточных структур) в почечной ткани позволило установить [10], что все предварительно введенные фармакологические препараты приводили к статистически значимому снижению в ткани ишемизированной почки содержания общей воды, связанному в одних случаях больше со снижением содержания свободной воды, а в других — со снижением связанной воды. Эффективность защиты почек препаратами особенно тесно коррелировала с повышением цАМФ, с накоплением в их ткани общих и быстрореагирующих SH-групп и со снижением отношения $H_2O_{\text{связ.}}/SH_{\text{общ}}$, которое указывало на связь между изменением содержания связанной воды и изменением структуры белков, но косвенно также на связь структуры клеточной воды с активностью клеточных белков.

В норме отношение $H_2O_{\text{связ.}}/SH_{\text{общ}}$ в почке составляет 2,8, а через 90 мин ишемии это отношение увеличивается до 4,7. Предварительное введение лазикса, пентоксила и гидрохинона практически не влияло на изменение этого параметра по сравнению с контролем (ишемия), тогда как при применении всех остальных препаратов — витамина E, трентала, лидокаина и преднизолона — этот показатель через 90 мин ишемии снижался и был близок к показателю в интактной почке.

Высокая концентрация быстрореагирующих SH-групп и большее содержание цАМФ в клетках ишемизированной почки после предварительного введения эффективно действующих (мембранотропных) средств косвенно указывало на вызываемую ими перестройку энергетического метаболизма в клетках. Действительно, введение фармакологических препаратов до ишемии во всех опытах с последующей ишемией увеличивало продолжительность снижения в них окислительно-восстановительного потенциала, а также снижало темп расхода гликогена и накопление лактата в почечной ткани в процессе ишемии. Оказалось также, что в отличие от препаратов метаболического типа действия (лазикс, пентоксил, гидрохинон) препараты мембранного типа действия (витамин E, трентал, лидокаин, преднизолон), использованные в предишемическом периоде, при ишемическом воздействии были более мощными

блокаторами гликолиза в почечной ткани, следствием чего и явилось снижение темпа убыли гликогена и прироста лактата в ткани ишемизированных почек крыс.

Полученные результаты позволили нам заключить, что фармакологические препараты после предварительного введения улучшают сохранность всех макромолекулярных структур в почке при воздействии ишемии, так как формирование толерантности их к ишемии происходит уже в предишемическом периоде.

2.2. Влияние фармакологических препаратов разных групп на структуру тканевых макромолекул, функцию и энергоснабжение ткани интактной почки

Предварительное введение большинства из использованных препаратов уже через 1 ч приводило в клетках интактной почки к изменениям [10], которые являются ничем иным, как проявлением индуцированной цитогенетической рекапитуляции в них на медикаментозное стресс-воздействие. Это выражалось как в изменении конформации макромолекулярных веществ, так и в стимуляции реакций гликолиза и гликогенолиза в клетке (снижение содержания гликогена и накопление лактата наступало после введения практически всех эффективно действующих фармпрепаратов). Кроме того некоторые из препаратов мембранного типа действия — преднизолон, лидокаин и трентал уменьшали содержание свободной и увеличивали содержание связанной воды, тогда как другие — (витамин Е), наоборот, значимо увеличивали содержание свободной и уменьшали содержание связанной воды. Лазикс, пентоксил и гидрохинон достоверно не меняли распределение воды в клетках здоровой почечной ткани.

Такие индивидуальные различия в направленности изменений при воздействии медикаментозных препаратов можно объяснить тем, что показатель содержания связанной воды является интегративным, отражающим изменения в состоянии всех макромолекул клетки и поэтому специфика действия препаратов (т.е. конкретная мишень, на которую действует тот или иной мембранотропный препарат) может существенно влиять на этот показатель. Предварительное введение всех фармакологических препаратов в большей или меньшей степени увеличивало также общее содержание SH-групп в клеточных белках интактной почки. Однако статистически значимое увеличение этого показателя вызывали только преднизолон, лидокаин, трентал, и витамин Е. Увеличение содержания SH-групп в результате действия лазикса, пентоксила и гидрохинона было статистически незначимым. Содержание быстрореаги-

рующих SH-групп существенно увеличивалось при введении пентоксила, витамина Е и лидокаина. Примечательно, что обнаруженные нами изменения в содержании гликогена, лактата, связанной воды и общих SH-групп в ткани интактных почек через 1 час после введения наиболее эффективных фармакологических препаратов соответствовали изменениям тех же параметров при ишемии почек длительно до 40 мин, что, как известно, является сроком развития еще обратимых изменений.

Доказательства активации НАСКС и индукции цитогенетической рекапитуляции были получены нами также при формировании противоишемической резистентности сердца при предварительном введении витамина Е [11, 12], а также при формировании защиты донорских органов (почка) от гипотермического и криогенного повреждения при предварительном использовании мембранотропных фармпрепаратов, в том числе криопротектора ДМСО [13].

Заключение

Таким образом, формирование резистентности клеток, тканей и органов к действию повреждающих факторов при трансплантации (ишемия, низкотемпературное воздействие при консервации органов) происходит всегда с участием универсального эволюционно выработанного механизма — НАСКС, причем медикаментозным препаратам при этом отводится роль адаптогенов, чаще всего умеренной силы. Включение НАСКС на стадии мобилизации и формирования устойчивой адаптации всегда сопровождается стереотипными энергозависимыми функциональными (снижение функции) и структурными перестройками (конформационными, физико-химическими, биохимическими), которые следует отнести к проявлениям цитогенетической рекапитуляции, реализующим процессы срочной адаптации. Для выработки резистентности органов к действию повреждающих факторов в клинической медицине широко применяют препараты, индуцирующие в их клетках признаки цитогенетической рекапитуляции, например: используют антагонисты Ca^{+} , ингибиторы реabsорбции Na^{+} , K^{+} -содержащие препараты, ингибиторы мембранных АТФ-аз, фосфолипаз, фосфоорилаз и др. для снижения параметров клеточного гомеостаза до эволюционно допустимого уровня, чтобы активировать включение НАСКС. Между тем, во избежание развития дезадаптации при применении фармпрепаратов следует всегда учитывать исходный уровень энергетической задолженности в клетках и адаптирующий дозо-зависимый эффект используемого препарата.

References

1. Babaeva A.G., Gevorkjan N.M., Elchaninov A.V. Recapitulation and its signs at pathological processes. *Klinicheskaya I eksperimentalnaya morfologiya*. 2012, 2: 4-8 (in Russian)
2. Babaeva A.G., Gevorkjan N.M. *About recapitulation at regeneration and diseases*. Moscow: Publ. house «4 Mpress»; 2013 (in Russian)
3. Braun A.D., Mozjenok G.P. *Nonspecific adaptive syndrome of cellular system*. L.: Publ. House, «Nauka»; 1987 (in Russian)
4. Goldovsky A.M. *Basis of the doctrine about conditions of organisms*. L.: Publ. house «Nauka»; 1977. (in Russian)
5. Korn E.D. Action polymerization and its regulation by proteins from non-muscle cells. *Physiol. Rev.* 1982, v. 62: 672-737.
6. Therien H.M., Gruda J., Carrier F. Interaction of filamentous action with Isolated liver plasma membranes. *Europ. J. Cell Biol.* 1984, v.35: 112-21.
7. Permjakov E.A. *Pervalbumin and related Ca-binding proteins*. M., Medicine, 1985.(in Russian)
8. Penttila A., Glaumann H., Trump B.F. Protective effect of extra cellular acidosis against anoxia, thermal and p-chloro-mezcurebenzene sulfonic acid treatment of isolated rat liver cells. *Life Sci.* 1976, v. 18: 1419-30.
9. Melehov E.I. The Principle of regulation of damage process rate and reaction of protective inhibition of a metabolism (RPIM). *J. Common Biology*. 1985; 46(2): 174-89. (in Russian)
10. Shumakov V.I., Onishchenko N.A., Kirpatovsky V.I. *Pharmacological graft protection*. M.: Publ. House «Medicine» 1983. (in Russian)
11. Artamonov S.D., Danilov M. A, Lubjako A.A., Onishchenko N.A. Action of vitamin E on a myocardium energetic balance in norm, at an ischemia and a re-oxygenation. *Farmakologiya i toksikologiya*. 1985, 6: 28-33.(in Russian)
12. Kirpatovsky V.I., Lubjako A.A., Artamonov S.D. To the mechanism of various stability of heart and kidneys to action of a thermal ischemia. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 1985; 3: 31-5. (in Russian)
13. Onishchenko N.A., Kirpatovsky V.I. Influence of low temperatures on structurally functional integrity of the isolated organs. In Shumakov V.I. (ed.) «*Sketches on physiological problems of transplantology and application of artificial organs*». Tula: Publ. House. «Repronics Ltd.»; 1998, 152-179. (in Russian)