

the value of $\lambda_{\max}$. Therefore, $C_8H_{17}N$ may be used for development of filters in order to adsorption of carbon monoxide as environmental pollution.

REFERNCES

1. M. Sheikhi, S. Shahab, L. Filippovich, M. Khaleghian, E. Dikumar, M. Mashayekhi, Interaction between new synthesized derivative of (E,E)-azomethines and BN(6,6-7) nanotube for medical applications: Geometry optimization, molecular structure, spectroscopic (NMR, UV/Vis, excited state), FMO, MEP and HOMO-LUMO investigations, J. Mol. Struct. 1146 (2017) 881–888.
2. S. Shahab, M. Sheikhi, L. Filippovich, E. Dikumar Anatol'evich, H. Yahyaei, Quantum chemical modeling of new derivatives of (E,E)-azomethines: Synthesis, spectroscopic (FT-IR, UV/Vis, polarization) and their thermophysical investigations, J. Mol. Struct. 1137 (2017) 335–348.
3. M. Sheikhi, S. Shahab, L. Filippovich, M. Khaleghian, E. Dikumar, M. Mashayekhi, Interaction between new synthesized derivative of (E,E)-azomethines and BN(6,6-7) nanotube for medical applications: Geometry optimization, molecular structure, spectroscopic (NMR, UV/Vis, excited state), FMO, MEP and HOMO-LUMO investigations, J. Mol. Struct. 1146 (2017) 881–888.
4. S. Shahab, M. Sheikhi, L. Filippovich, R. Kumar, E. Dikumar, H. Yahyaei, M. Khaleghian, Synthesis, geometry optimization, spectroscopic investigations (UV/Vis, excited states, FT-IR) and application of new azomethine dyes, J. Mol. Struct. 1148 (2017) 134–149.

РОЛЬ ШАПЕРОНОВ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ THE ROLE OF CHAPERONES IN DIABETES MELLITUS

В. Ю. Абакумец, Н. В. Богданова, Р. В. Барановский, К. Я. Буланова
V. Abakumets, N. Bogdanova, R. Baranovskiy, K. Bulanava

*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
abakumecvika99@gmail.com*

Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

Шапероны – уникальные ремоделирующие белки, участвующие во множестве внутриклеточных событий, вовлеченные в процессы коррекции структуры белков, предотвращения агрегации неправильно свернутых белков, разрушения белковых агрегатов, а также разворачивания нативных белков-мишеней для транслокации их через мембраны. Кроме того, шапероны участвуют, как в разборке активных олигомерных структур до состояния неактивных развернутых мономеров для их последующей протеолитической деградации, так и в формировании специфических комплексов и белковых ансамблей. В обзоре обобщены сведения о строении и функционировании молекулярных шаперонов Hsp70 и их роли в развитии сахарного диабета 2 и его осложнений.

Chaperones are unique remodeling proteins that participate in a variety of intracellular events and are involved in the protein structure correction process, preventing aggregation of incorrectly folded proteins, destroying protein aggregates, and deploying native target proteins to translocate them across membranes. In addition, chaperones are involved both in the disassembly of active oligomeric structures to the state of inactive expanded monomers for their subsequent proteolytic degradation, and in the formation of specific complexes and protein ensembles. The review summarizes information about the structure and functioning of Hsp70 molecular chaperones and their role in the development of diabetes type 2 and its complications.

Ключевые слова: Hsp70, сахарный диабет (СД), инсулин, β -клетки.

Keywords: Hsp70, diabetes mellitus (DM), insulin, β -cells.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-10-13>

Сахарный диабет (далее – СД) и его осложнения являются одной из серьезнейших медико-социальных и экономических проблем современного здравоохранения. По данным Международной диабетической федерации, в настоящее время в мире СД болеют около 366 млн человек, и к 2030 г. эта цифра превысит 552 млн человек, в основном за счет больных СД2 типа (СД2). У больных с СД2 наблюдается уменьшенная экспрессия генов белка теплового шока HSP70, что коррелирует со сниженной чувствительностью к инсулину. Это стимулировало появление исследований с целью установления возможности использования препаратов и методов стимулирования экспрессии HSP70 для защиты от развития резистентности к инсулину [1]. Шапероны – уникальные ремоделирующие белки, участвующие во множестве внутриклеточных событий, вовлечены

в процессы коррекции структуры белков, предотвращения агрегации неправильно свернутых белков, разрушения белковых агрегатов, а также разворачивания нативных белков-мишеней для транслокации их через мембраны [3]. Молекулярные шапероны преимущественно являются белками теплового шока (heat shock proteins, Hsps), принадлежащими к следующим пяти высоко консервативным семействам: обладающие АТФ-азной активностью белки Hsp100, Hsp90, Hsp70 и Hsp60 (цифры – усредненные значения молекулярных масс в кДа), а также не-АТФ-азные малые белки теплового шока (small Hsps, sHsps, мол. массы 12–43 кДа). Из них первым белком, названным шапероном, является Hsp70. Шапероны семейств Hsp60–Hsp100, обладающие АТФ-азной функцией, значительно различаются и по структуре, и по олигомерному состоянию, но при этом субъединицы всех шаперонов имеют доменную организацию. Основой функционирования шаперонов служит различие сродства их АТФ- и ADP-содержащих форм к белкам-мишеням. АТФ-форма шаперона 70 обладает низким сродством к белкам-мишеням и высокой скоростью обмена субстратов, в то время как его ADP-форма проявляет высокую аффинность к субстратам и демонстрирует низкую скорость их обмена [3]. Особое внимание из семейства шаперонов привлекает Hsp70, содержание и, следовательно, функция которого снижена при СД2. Различают 2 вида Hsp70: конституционный и индуцибельный. Эти шапероны способствуют фолдингу вновь синтезирующихся или рефолдингу денатурированных вследствие стресса полипептидных цепей, последующей их сборке в биологически активные олигомерные структуры, а также участвуют в доставке белков в определенные органеллы. Конституционные шапероны в норме, кроме ассистирующего участия в сборке макромолекулярных структур и фолдинге белков, служат также для разрушения белковых агрегатов и разворачивания белков в целях последующей транслокации или презентации их в качестве мишеней протеолитическим ферментам. В целом, биологические функции молекулярных шаперонов заключаются в коррекции структуры и конформации других белков в клетке, предотвращении агрегации неправильно свернутых или частично развернутых белков, разрушении и солюбилизации стабильных белковых агрегатов, разворачивании нативных белковых субстратов для транслокации их через мембраны, разборке активных олигомерных структур и поддержании их в состоянии неактивных мономеров, разворачивании активных мономеров для их последующей деградации [3]. Шаперонная функция Hsp70 основана на его способности взаимодействовать с гидрофобными участками белков-мишеней. Гидрофобные участки могут быть экспонированы на молекулах вновь синтезированных пептидов или у белков, утративших вследствие стресса свою нативную конформацию. Шаперон может восстанавливать исходную укладку полипептидной цепи благодаря циклическим актам ассоциации-диссоциации с молекулами-мишенями, что невозможно осуществлять без взаимодействия Hsp70 с белками-помощниками, или кошаперонами, Hdj1 и Bag-1 [4]. Шаперонные свойства Hsp70 определяют его защитную функцию, но проявляться они могут по-разному. В первом варианте именно неправильные, агрегировавшие и даже мутантные белки при моделировании протеотоксических заболеваний становились мишенью для Hsp70. Если его количество в клетке в момент формирования нерастворимых агрегатов было достаточным, то, связываясь с этим мутантным полипептидом, белок препятствовал образованию агрегата, демонстрируя работу классического шаперонного механизма. Другой вариант действия шаперона нацелен на проведение фолдинга, результатом которого является инактивация белка. Дело в том, что гидрофобные сайты могут открываться и на нормальных, зрелых и неповрежденных белковых молекулах, в тот момент, когда они изменяют свою конформацию для передачи сигнала, в том числе и апоптозного. Связывание Hsp70 с такими молекулами приводит к тому, что шаперон, образуя с ними комплекс, существующий довольно продолжительное время, выключает эти молекулы из сигнальной цепи, следовательно, прерывает и всю цепь [4]. Таким образом, шаперон различными способами способствует сохранению жизнедеятельности клетки в условиях действия огромного числа негативных факторов, в том числе, вызывающих апоптоз. Защитная функция шаперона Hsp70 было доказана в многочисленных опытах *in vitro* и *in vivo* с использованием широкого спектра модельных организмов, находящихся на разных ступенях эволюции. Индуцибельный представитель семейства белков теплового шока Hsp70 особенно востребован для сохранения жизнедеятельности клетки при действии стрессорных, температурных факторов, при попадании токсичных химических веществ, в частности, тяжелых металлов, таких как мышьяк, медь, ртуть и др., для формирования адаптации к огромному числу цитотоксических факторов, как ксенобиотических, так и естественного происхождения. Любая клетка в ходе реакции на действие стрессового фактора начинает синтез этого белка. В ответ на тепловой шок, в частности, в клетках эукариот включает в себя активацию транскрипции всех генов, индуцируемых стрессом, что осуществляется через специальный транскрипционный фактор (фактор теплового шока HSF). В клетках, не подвергшихся стрессу, HSF присутствует и в цитоплазме, и в ядре в виде мономерной формы, связанной с Hsp70, и не имеет ДНК-связывающей активности. В ответ на тепловой шок или другой стресс Hsp70 отсоединяется от HSF и начинает корректировать третичную структуру денатурированных белков, придавая им функционально активную форму. Высвободившиеся молекулы HSF собираются в тримеры, вследствие чего у этого комплекса появляется ДНК связывающая активность и он аккумулируется в ядре, где и связывается с промотором. При этом транскрипция шаперонов в клетке возрастает во много раз. По данным иммуоблоттинга с применением антител, узнающих только Hsp70, содержание этого белка в клетке заметно возрастает в течение 12 ч после теплового шока и затем остается постоянным в течение, по меньшей мере, 48 ч. Данный шаперон необходим для выживания (клеточного восстановления и обеспечения нормальных клеточных функций) в неблагоприятных условиях. После

того, как стресс прошел, освободившийся Hsp70 опять присоединяется к HSF, который при этом теряет ДНК-связывающую активность и все компоненты возвращаются в первоначальное состояние. Аналогичным образом процесс происходит и при других стрессах. Активация экспрессии при стрессах является важным свойством многих шаперонов [4]. В том случае, когда шаперонов не хватает для укладки всех поврежденных белков, как при СД2, то сохраняется неправильная структура молекул и такие белки будут подвергаться деградации с помощью протеаз и/или агрегировать. Представляет интерес выявить, какие белковые структуры являются мишенными для Hsp70 в структуре сигнального пути инсулина. Многие исследования показали, что HSP70 способен связываться с рецептором инсулина, повышая его скорость рециркуляции после теплового шока, что предполагает, что белки теплового шока могут иметь прямое влияние на функцию и активность рецептора инсулина [5]. Таким образом, недостаток HSP70 у больных СД2 может негативно сказаться на состоянии рецепторной передачи инсулин-опосредованного сигнала из-за торможения рецептора. Восполнение недостатка Hsp70 при СД2 должно привести к функциональному растормаживанию рецептора. Известно, что шапероны также контролируют процессы ремоделирования нативного состояния регуляторных и сигнальных белков, в том числе, и самого инсулина в клетке. В данном случае функции шаперонов направлены на предотвращение (и/или обращение) некорректных взаимодействий ненативных полипептидных цепей, приводящих к образованию биологически нефункциональных продуктов [3]. HSP70 способен влиять также на активность митохондриальных ферментов через несколько механизмов. Один из шаперон HSP70 задействован в импорте внутрь митохондрий тех белков, которые закодированы в ДНК ядра, а не в ДНК митохондрий. Синтезированные на основе ДНК ядра препротейны не могут быть транслоцированы через митохондриальные мембраны в присущей им глобулярной форме; они должны быть в определенной мере развернутыми, чтобы иметь возможность пройти через каналы импорта [3]. Однако, эти препротейны также должны сохранять от разрушений определенные сигнальные последовательности, которые распознаются рецепторами, ассоциированными с транслоказами наружной митохондриальной мембраны. Чтобы сохранить от агрегации эти полуразвернутые формы препротейнов используются шапероны. Центральную часть АТФ-зависимого молекулярного мотора, который управляет импортом препротейнов в матрикс формирует митохондриальный термошоковый белок heat-shock-protein 70 (mHsp70). Не исключено, что ингибирование экспрессии Hsp70 при СД2 способно негативно повлиять на энергообеспечивающую функцию митохондрий, процесс фосфорилирования рецепторов инсулина и еще более усугубить течение заболевания. Важной особенностью физиологии HSP70 является выявленная недавно особенность индуцирования антагонистических действий на сигнальный путь инсулина в зависимости от расположения шаперонов извне и внутри клетки. В настоящее время обнаружили 2 формы Hsp70: помимо известной эндо-формы (iHsp70) существует еще и экзо-(eHsp70). Если iHSP70 оказывает сильное противовоспалительное действие, то eHSP70 играет противоположную роль, вызывая активацию нескольких провоспалительных путей, что отмечается при его хроническом воздействии. Недавно обнаружили, что eHsp70 положительно коррелирует не только с воспалением, но и резистентностью к инсулину у пожилых людей. Это может указывать на роль функционального доминирования eHsp70 над iHsp70 в нарушении сигнального пути инсулина в скелетной мышце в пожилом возрасте. В то время как iHsp70 является явно защитным, антиапоптотическим, противовоспалительным и связанным с нормальной чувствительностью к инсулину, то eHsp70 определяет не только провоспалительный ответ, но и уменьшенную экспрессию противовоспалительного iHsp70 и сниженную чувствительность к инсулину [4]. Очевидно, изменяя отношение eHsp70 и iHsp70, обеспечивая увеличение содержания iHsp70, можно влиять на исход воспаления и на связанную с ним резистентность к инсулину. Интересно, что в разных тканях и клетках организма уровень экспрессии Hsp70 различается. Например, он очень высок в тканях сердца, и крайне низок в некоторых типах нейронов головного мозга. В этой связи следует отметить, что Hsp70 может накапливаться неравномерно внутри клетки, предпочитая наиболее «уязвимые» участки клетки (ядро, затем в перинуклеарную, присарколеммальную зоны и вдоль актиновых филаментов). Смысл накопления Hsp70 в ядре заключается в избирательной защите генетического материала от повреждения. Hsp70 играет значительную роль в повышении устойчивости клеточного аппарата биосинтеза белка к повреждающим воздействиям [5]. Возможно, по этой причине уровень экспрессии Hsp70 высок в опухолях, особенно злокачественных, что придает им преимущественную устойчивость. В последние годы значительно активизировались исследования с целью применения протективных возможностей Hsp70 для терапии СД2 и воспалительных процессов. Важно было выявить помимо рецептора и инсулина также другие белки-мишени, которые нарушаются при диабете и чувствительны к коррекции шаперонами. Обнаружено, что фактор некроза опухоли — внеклеточный белок и, как многофункциональный провоспалительный цитокин, синтезируемый, в основном, моноцитами и макрофагами, является одним из важных факторов устойчивости к инсулину. Секреция фактора некроза опухоли α стимулируется воспалительными процессами, появлением в крови воспалительных цитокинов, что приводит к активации серин-треонинкиназ, а именно: c-jun-аминоконцевой киназы (JNK) и ингибитора киназы κ B (IKK) в тканях, чувствительных к инсулину, таких как жировая ткань, скелетные мышцы и печень. У тучных, резистентных к инсулину людей, уменьшенная экспрессия белка HSP70 сочеталась с повышенным фосфорилированием JNK в скелетных мышцах [3]. В экспериментах *in vitro* показано, что шаперон HSP70 может блокировать активацию этого процесса и активацию киназ. Эти данные свидетельствуют о том, что восстановление чувствительности к инсулину

связано с блокированием шапероном HSP72 повышенной активности JNK. Каким образом можно добиться активизации синтеза Hsp70? Известно, что в нормальных условиях в тканях человека экспрессия Hsp72 всегда имеет место, но происходит она на низком уровне. Поэтому рационально этот процесс активировать, используя, в первую очередь, природой обусловленный путь – вызвать экспрессию шаперона как ответную реакцию на стресс. Выявлено, что избыточная экспрессия индуцируемого Hsp72 обнаруживается в клетках, лишенных глюкозы. Во-вторых, тепловая терапия способна также улучшить клинические результаты у пациентов с сахарным диабетом 2 типа. В-третьих, гидроксиламины действуя на гиперструктуры мембраны, посредством их высокоспецифичных влияний на липидный компонент, способствовали генерированию и передачи сигналов стресса для активирования генов HSP. В экспериментах на мышах было показано, что повышение уровня белка HSP72, достигаемое различными методами (путем термообработки, трансгенной сверхэкспрессией или фармакологическими средствами) способно защитить мышей от гипергликемии, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы и резистентности к инсулину. Эта защита была тесно связана с предотвращением фосфорилирования JNK. Выяснена важная роль HSP72 в блокировании воспаления и предотвращении резистентности к инсулину при генетическом ожирении или кормлении с высоким содержанием жира. В совокупности все эти предварительные данные, полученные на моделях с индуцированной ожирением инсулинорезистентности, позволяют определиться с реалистичной терапевтической стратегией лечения ожирения, приводящего к инсулинорезистентности. Таким образом, можно отметить, что активирование важнейших функций Hsp72 позволяет им служить в качестве молекулярных шаперонов нативных или мутированных белков, стабилизировать функциональную структуру ряда белков, защитить от инсулинорезистентности, диабета 2-го типа. В целом, приведенные данные указывают на важную роль активации экспрессии Hsp72 в предотвращении резистентности к инсулину, вероятно, вследствие блокирования процессов воспаления. Ингибирования роли жиров в провокации СД2: лечение мышей с дефицитом лептина (с BGP-15) в течение только 15 дней, повышением экспрессии белка HSP72 в скелетной мышце на $\approx 50\%$, привело к заметному снижению фосфорилирования JNK и уменьшению резистентности к инсулину как в печени, так и в периферических чувствительных к инсулину тканях. Учитывая генетическую предрасположенность к СД2 у людей, целесообразно было проанализировать также достижения в этой области. В настоящее время накоплено достаточное количество доказательств, что в развитии СД2 важная роль принадлежит генетическим факторам [1]. Первоначальные исследования были направлены на выявление полиморфных маркеров в генах-кандидатах, продукты (белки) которых вовлечены в патогенез СД2. Так были идентифицированы гены, ассоциированные с инсулинорезистентностью, ожирением, дисфункцией β -клеток, снижением инкретинного ответа, повышением продукции глюкозы в печени, усилением реабсорбции глюкозы, активацией процессов липолиза, снижением захвата глюкозы мышцами, дисфункцией нейротрансмиттеров. Однако, наибольший прогресс в определении генетических предпосылок развития СД2 был достигнут с использованием полногеномных исследований, которые начали проводиться в начале XXI века [1]. Результаты первого полногеномного исследования были опубликованы в 2007 г. и сообщали о девяти генах, связанных с развитием СД2. Также благодаря достижениям молекулярной генетики, описано более 100 общих генетических вариантов, связанных с риском развития СД2. На данный момент лишь для небольшого количества генов определен продукт гена (белок), изменения в котором лежат в основе молекулярных механизмов дисфункции β -клеток. Так, ген SLC30A8 кодирует трансмембранный белок-транспортёр ионов цинка типа 8 (ZnT-8). Наибольший уровень экспрессии этого гена наблюдается именно в β -клетках. ZnT-8 выполняет функцию канала, через который ионы Zn^{2+} поступают в секреторные везикулы. Внутри везикул ионы Zn^{2+} образуют комплекс с инсулином, который приобретает гексамерную структуру [1]. Таким образом, было доказано, что каналы транспорта ионов цинка играют важную роль в регуляции созревания, хранения и секреции инсулина β -клетками, но не установлены причины ингибирования экспрессии Hsp70.

ЛИТЕРАТУРА

1. Генетические основы сахарного диабета 2 типа: сб. научн. ст./ ГБОУ ВПО Новосибирский гос. мед. университет: Бондарь И.А, ГБУЗ НСО Гос. Новосибирская областная клин.больница, : Шабельникова О.Ю. – Новосибирск, 2013. – 11с, 14с.
2. Роль специфических шаперонов в патогенезе ожирения и ассоциированных с ним заболеваний: сб. научн. ст. / ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ РФ, Москва: к.м.н. О.В. Васюкова, П.Л.Окороков. – Москва, 2012. – 48с.
3. Молекулярные шапероны: научн. ст./ Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академ. М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва: Э. Э. Мельников, Т. В. Ротанова. – Москва, 2010. – 1с., С. 3-4.
4. Гужова, И. В. Механизмы работы шаперона Hsp70 в нормальных клетках и при клеточной патологии: автореф. дис. д-ра биол. наук. 4.02.05/ Гужова И. В.; Ин-т цитологии РАН Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2004. – 1с.,7с.,10с.,23с.,34с.
5. Гипотеза баланса шаперонов: важность внеклеточного и внутриклеточного отношения HSP70 к диабету, вызванному воспалением типа 2, эффекту упражнения и последствиям для клинического управления : научн. журнал/ академ. редактор: Магдалена Клинка. – 2015. – 1с., 7с.,11с.