

ВЛИЯНИЕ ФИБРИЛЛООБРАЗОВАНИЯ ИНСУЛИНА

THE INFLUENCE OF INSULIN FIBRILLATION

В. Ю. Абакумец, К. Я. Буланова
V. Abakumets, K. Bulanava

*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь*
Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus
abakumecvika99@gmail.com

Нарушение сворачивания белков приводит к тому, что развивается целый ряд системных и нейродегенеративных заболеваний – протеинопатии. При данных патологиях белки приобретают неправильную конформацию, отличную от нативной, становятся функционально неактивными, токсичными, склонными к агрегации и отложению в различных органах и тканях. время широко распространена гипотеза, согласно которой первичными цитотоксическими агентами при развитии протеинопатий являются олигомеры белков, которые склонны к агрегации. К группе данных заболеваний относятся болезнь Паркинсона, болезнь Крейтцфельда-Якоба, сахарный диабет 2-го типа и многие другие.

Violation of protein folding leads to the development of a number of systemic and neurodegenerative diseases-proteinopathy. In these pathologies, proteins acquire an incorrect conformation that differs from the native one, become functionally inactive, toxic, and prone to aggregation and deposition in various organs and tissues. There is a widespread hypothesis that the primary cytotoxic agents in the development of proteinopathies are protein oligomers that are prone to aggregation. These diseases include Parkinson's disease, Creutzfeldt-Jakob disease, type 2 diabetes, and many others.

Ключевые слова: инсулин, фибриллообразование, белок.

Keywords: insulin, fibrillation, protein.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-2-7-10>

Инсулин - является гормоном, который синтезируется поджелудочной железой с помощью особого типа клеток – бета-клетками [1]. Эти клетки локализуются в так называемых островках Лангерганса, которые исключая эти клетки, содержат и другие, например, синтезирующие гормон глюкагон, (D)-клетки, которые синтезируют соматостатин и F-клетки, продуцирующие панкреатический полипептид. Помимо этого, поджелудочная железа также участвует в пищеварении посредством выработки определенных ферментов. Данная функция не нарушена у людей с сахарным диабетом [1].

Инсулин очень необходим для нашего организма, так как механизм его действия для глюкозы подобен как ключик к замку, впускающий ее во внутрь клетки [1].

β-клетки содержат в себе «глюкометр», он способен контролировать уровень глюкозы в крови, если он повышен - кровоток выходит достаточный объем инсулина. Потребляя пищу, уровень и концентрация инсулина в крови моментально увеличивается, что является важным для транспортировки глюкозы, полученной из пищи, в саму - это относится к людям, не страдающим сахарным диабетом. У таких людей глюкоза в норме не повышается более чем на 1-2 ммоль/л после еды [2].

Инсулин транспортируется кровью к разным клеткам организма и взаимодействует на их поверхности со специфическими рецепторами, в результате чего клетки приобретают проницаемость для глюкозы [3]. Но не все клетки организма нуждаются в инсулине как транспортера глюкозы. Есть так называемые «инсулиннезависимые» клетки, они способны адсорбировать глюкозу без содействия инсулина, по концентрационной зависимости глюкозы крови. Данные клетки локализуются в головном мозге, нервных волокнах, сетчатке глаза, почках и надпочечниках, также в сосудистой стенке и форменных элементах крови (эритроцитах) [2].

Образование фибрилл инсулина - это физический процесс, посредством которого частично развернутые молекулы инсулина взаимодействуют друг с другом, образуя линейные агрегаты. Экранирование гидрофобных доменов является основной движущей силой этого процесса, но образование межмолекулярного бета-листа может еще больше стабилизировать фибриллярную структуру [1]. Конформационное смещение С-конца В-цепи с экспонированием неполярных остатков алифатического ядра, включая A2, A3, B11 и B15, играет решающую роль в процессе фибрилляции. Недавние исследования кристаллов и молекулярного моделирования показали, что при фибрилляции инсулина этот открытый домен взаимодействует с гидрофобным поверхностным доменом, образованным алифатическими остатками A13, B6, B14, B17 и B18, обычно скрытыми, когда три димера инсулина образуют гексамер. В экспериментах по иммунизации кроликов фибриллы инсулина не вызывали повышенного

иммунного ответа в отношении образования антител к инсулину IgG по сравнению с нативным инсулином. Напротив, IgE-ответ усиливался с увеличением содержания инсулина в фибриллярной форме. Рассмотрены стратегии и практические подходы к предотвращению образования фибрилл инсулином. Стабилизация гексамерной структуры инсулина и закупорка гидрофобных интерфейсов добавлением поверхностно-активных веществ являются наиболее эффективными средствами противодействия фибрилляции инсулина [1].

Белковые фибриллы - это полипептиды, которые богаты поперечной структурой β -листа и, как известно, нарушают нормальную функцию близлежащих клеток. Белковые фибриллы были связаны с более чем 20 заболеваниями человека, обычно классифицируемыми как амилоидоз, включая болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, прионную болезнь и широкий спектр других заболеваний. В последнее время возрос интерес к пониманию влияния инженерных нано- и субмикронных частиц на фибрилляционное поведение белков. Есть две основные причины такого интереса. Во-первых, из-за патологической природы белковых фибрилл интенсивные исследования сосредоточены на поиске соединений, способных ингибировать их образование. В этой области наноматериалы стали потенциальными кандидатами, и в ряде исследований сообщалось об ингибировании фибрилляции различных белков при взаимодействии с инженерными наночастицами. Включение частиц субмикронного и нанометрового размера в различные промышленные и биомедицинские приложения привело к повышенному риску экспрессии. Поэтому с точки зрения нано-токсичности существует интерес к лучшему пониманию того, как наночастицы могут влиять на поведение фибрилляции белков. В результате влияние присутствия мелких частиц на поведение фибрилляции белков является предметом интереса уже более десяти лет [2]. В то время как большинство исследований было сосредоточено на влиянии частиц на фибрилляцию β -амилоида, из-за его роли в болезни Альцгеймера, влияние частиц на фибрилляцию других белков начинает привлекать внимание. Инсулин - это регулирующий гормон, который участвует в регуляции уровня глюкозы в крови и играет важную роль в метаболизме [3]. Инсулин состоит из 51 аминокислоты, состоящей из двух полипептидных цепей; А и В, с остатками 21 и 30 аминокислот соответственно. В А-цепи дисульфидная связь соединяет две цистеиновые аминокислоты (А6 и А11) [2]. Сама А-цепь связана с В-цепью двумя межцепочечными дисульфидными связями. Аминокислоты, связанные дисульфидными связями argA7-B7 и A20-B19 . Инсулиновая фибрилляция была сообщена в местах повторных инъекций у пациентов с диабетом 2 типа и также может быть проблематичной во время производства и хранения белка. Считается, что фибрилляция инсулина происходит через механизм нуклеации - роста и усиливается условиями, способствующими денатурации белка. Несколько исследований показали, что мелкие частицы могут влиять на поведение фибрилляции инсулина [2]. Частицы, как сообщается, имеют разнообразные эффекты, начиная от стимулирования фибрилляции до отсутствия значительного влияния на фибрилляцию и, наконец, до ингибирования фибрилляции. В то время как эти исследования были проведены с различными частицами, отсутствие консенсуса в наблюдениях ясно указывает на необходимость лучшего понимания механизмов, связанных с индуцированными частицами изменениями фибрилляции инсулина. Настоящее исследование направлено на восполнение этого пробела путем изучения влияния полимерных субмикронных частиц полистирола (200 нм) с аминными и сульфатными поверхностно-функциональными группами на поведение инсулинофибрилляции как в экспериментах, так и на молекулярном уровне [3].

Фибриллообразование включает в себя 2 периода: лаг-период, в процессе которого происходит подготовка к формированию роста фибрилл и олигомеров разного размера. Важным моментом является изучение олигомерных образований так как очень важен для построения и понимания функционирования фибриллообразования [3]. Олигомеры представляют собой малые мультимеры, которые еще не способны удлиняться с такой же скоростью, как и фибриллы. Олигомеры различного размера, от димеров - более токсичные промежуточные вещества на пути образования фибрилл по отношению к зрелым фибриллам.

Особенности в структуре олигомеров и фибрилл все еще довольно активно для изучения. Например, молекулярный состав, кислотность среды, температура, активность перемешивания препарата и т.д. - являются главными факторами, которые влияют на скорость формирования олигомеров и фибрилл [4].

В настоящее время известно, что возникновение нестабильных олигомеров разного размера предшествует появлению фибрилл, а также не до конца ясно, какой из образовавшихся олигомеров сможет послужить компонентом для дальнейшего роста фибриллы [2]. Нельзя исключить того момента, что различная морфология фибрилл может явиться следствием похожих, но не идентичных путей образования зрелых фибрилл. Отличительные особенности могут появляться на начальных стадиях формирования фибрилл, в том числе и на стадии нуклеации.

Было показано, что в процессе начального периода формирования фибрилл могут образовываться промежуточные агрегаты белков, которые в свою очередь, зачастую имеют круглую форму и диаметр, схожий с одиночной фибриллой. При достаточно большом увеличении можно увидеть, что данные олигомерные составные имеют кольцевую структуру [5]. При увеличении времени инкубации препаратов белков, олигомерные соединения пропадают и остаются только зрелые фибриллы. Их длина увеличивается, а полиморфизм усиливается. Возникают крупные кластеры фибрилл различного диаметра [5].

Для амилоидных фибрилл свойственно такое явление как полиморфизм, когда фибриллы могут приобретать различную морфологию (жгуты, плёнки, кластеры фибрилл). Явление полиморфизма амилоидных фибрилл может явиться барьером в процессе их кристаллизации, исходя из чего, для подробного изучения их структуры могут применяться различные биофизические методы исследования. Большое количество информационного материала о структурной организации фибрилл было получено с помощью методов исследования: ЯМР твердого

тела, ЭМ, АСМ, крио-ЭМ, рентгеноструктурного анализа и с помощью применения теоретических методов исследования - молекулярная динамика и молекулярное моделирование [2]. Аналогично, с помощью метода ЯМР твердого тела были получены и модели фибриллярных структур A β (1–40) и A β (1–42) белков. Учеными было показано, что структура A β (1–42) имеет колоссальные различия от структуры A β (1–40) исходя из того, что удлинение С-конца на два аминокислотных остатка привело к быстрой скорости процесса фибриллообразования [4].

Что касается структурных особенностей амилоидных фибрилл - они в среднем имеют диаметр примерно 10 нм, а что касается длины, она может достигать 15 мкм. Одна амилоидная фибрилла может состоять из 2–6 филаментов и при этом иметь различную морфологию. Они могут принимать вид ленты в латеральном направлении, пучка, могут перекрещиваться с различным периодом. Рентгеноструктурный анализ амилоидных структур может показать наличие кросс- β структуры, которая характеризуется построением фибрилл из β -листов, параллельно направленных вдоль всей оси фибриллы. Сам β -лист состоит из β -тяжей, проходящих перпендикулярно оси фибриллы. Именно данная трактовка структурной организации фибрилл сейчас принята во внимание [3]. В настоящее время нет конкретного правильного молекулярного строения амилоидных фибрилл для различного рода белков. Однако, существуют и другие гипотезы о структурной организации данных структур. Олигомеры - неизменным участником процесса фибриллообразования.

Стоит упомянуть, что в большом количестве работ по исследованию инсулина предполагается, что механизм фибриллообразования данного белка на молекулярном уровне может колоссально различаться от структуры самих амилоидных фибрилл из ряда других фибриллярных и синтетических полипептидов. Можно привести пример, что полипептидные цепи могут быть укомплектованы в плоскостях, параллельных оси фибрилл и формировать бета-листы, которые в свою очередь будут расположены перпендикулярно оси фибриллы [2]. Можно сделать вывод, что рентгеноструктурные данные анализа неоднозначны и может потребоваться более точная их расшифровка. Также недавно была получена информация о белке транстеритине, который в амилоидных фибриллах упакован в своей нативной конформации [5].

Что касается влияния гликозилированного инсулина на фибриллообразование, то существуют случаи, когда в организме пониженная концентрация глюкозы, соответственно воспроизводство инсулина замедляется, вплоть до полной остановки, тем самым сберегая глюкозу для более значимых органов. Люди с сахарным диабетом и повышенной концентрацией глюкозы в крови, у них инсулиннезависимые клетки будут потреблять достаточно огромное число глюкозы, по итогу, все это может привести к неисправности клеток и, соответственно, к дисфункции органа или же организма в целом [2].

Организму требуется относительно не большое количество инсулина, чтобы получать глюкозу, высвобождающуюся из печени. Этот процесс называется «базальной» секрецией инсулина [3]. Люди, не страдающие сахарным диабетом, число данного инсулина насчитывается примерно 30-50% от общего количества суточного инсулина. Помимо этого, есть «стимулированная» секреция инсулина, который синтезируется на прием пищи [3].

Достаточное количество углеводов, присутствующих в еде, которую мы потребляем, депонируется в печени в виде гликогена (это углевод, склонный достаточно быстро разрушаться с образованием глюкозы). Если человек есть намного больше нормы, то данный избыток углеводов переходит в жиры, которые в свою очередь депонируются в жировой ткани [2]. Не мало важно, что наш организм имеет абсолютную вероятность накопления жира. Что касается белков, они используются в нашем организме разными тканями, но нет конкретного места хранения. Печень способна вырабатывать глюкозу не только из гликогена, но также и из аминокислот, к примеру, если вы не потребляли пищу на протяжении длительного времени [2]. И при этом совершается деструкция тканей.

Различные работы с амилоидными белками – инсулином, лизпро инсулином, A β (1–42) и A β (1–40) пептидами, их амилоидогенными фрагментами (A β (16–25), A β (31–40), A β (33–42)), а также амилоидогенными фрагментами белка клеточной стенки дрожжей Bgl2 (GluNB, AspNB) показали, что главным строительным блоком при образовании фибрилл является кольцевой олигомер. Он взаимодействует с другим кольцевым олигомером боковыми сторонами, зачастую немного перекрывая один другого [2]. При этом имеются различия в структуре олигомеров различных белков на молекулярном уровне. Исходя из данных по моделированию, структуры кольцевых олигомеров имеют в себе малые фрагменты β -листов. Наибольшее количество данных фрагментов может наблюдаться при рентгеноструктурном анализе, давать рефлексы, характерные для кросс- β структуры [3].

Так же можно предположить, что общее представление о структуре амилоидогенной фибриллы, как о полимере, построенном из β -листов, идущих параллельно вдоль всей оси фибриллы (сами β -листы сформированы из β -участков перпендикулярных оси фибриллы) подлежит более внимательному анализу. Думаем, что следует промоделировать картину дифракции от кольцевых олигомерных структур, с параметрами, полученными из ЭМ анализа и с привлечением данных о молекулярной структуре олигомеров, рассчитанных с помощью теоретических методов [6]. Уже накопилось достаточно данных, которые свидетельствуют, что структура амилоидных фибрилл может быть иной. Исходя из общепринятого взгляда на структурную организацию фибрилл, сложно представить механизм формирования фибрилл и возможность существования проходящего вдоль всей фибриллы β -листа. Кроме того, трудно объяснить полиморфизм фибрилл, их ветвление и дробление. Из полученных нами данных по изучению фибриллообразования различных амилоидогенных белков/пептидов на данный момент можно предположить, что основным строительным блоком для формирования фибрилл является кольцевой олигомер с параметрами и структурой, свойственной соответствующему белку. Ассоциация таких кольцевых олигомеров различным способом приводит к формированию фибрилл разной морфологии [5].

Подводя итог можно сказать, что повышенный уровень сахара в крови (гипергликемия), наблюдаемый при сахарном диабете, сопровождается ускоренным гликированием белков как неферментативный процесс [3]. При гликировании белка альдегидные или кето-группы восстанавливающих сахаров обратимо реагируют со свободными аминокетогруппами белка (известная как реакция Майяра) с образованием оснований Шиффа, а затем необратимой перегруппировкой (перегруппировка Амадори) с образованием конечных продуктов гликирования или AGEs.

Гликирование белков приводит к образованию b-конформации, которая склонна к образованию токсичных агрегатов, известных как растворимые амилоидные прото-фибриллы, которые в конечном итоге становятся нерастворимыми фибриллами. Более того, во время процессов гликирования и фибрилляции образуются повреждающие свободные радикалы, такие как активные формы кислорода (АФК). Поскольку прото-фибриллы и свободные радикалы вместе инициируют события, которые могут вызывать повреждение мембран, вызывая, таким образом, апоптотический ответ и гибель клеток, они известны как причинные факторы апоптоза микроглии, невропатии и развития болезни Альцгеймера (БА) у диабетиков [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Toward understanding insulin fibrillation/ J Brange [ed al.]// journal - 1997 - №86 – p.17-25.
2. Исследование процесса амилоидообразования аβ пептида/ Галзитская О. В. [и др.]// сб. научн. ст./ Институт белков РАН, Пушкино, Московская область. – Москва, 2018. – с.133-172.
3. Novel mechanistic insight into the molecular basis of amyloid polymorphism and secondary nucleation during amyloid formation/ Jeong, J.S [ed al.]// journal – 2013 – №425 – p. 1765-1781.
4. How to determine the size of folding nuclei of protofibrils from the concentration dependence of the rate and lag-time of aggregation. Experimental application for insulin and LysPro insulin: aggregation morphology, kinetics, and sizes of nuclei/ Selivanova [ed al.]// journal – 2014 - №118 – p.1198-1206.
5. Amyloid. A protein related to the subunit structure of human amyloid fibrils/ Benditt, E.P. [ed al.]// journal Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1966 - №55 – p.308-316.

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ И ПРОФИЛАКТИКА РАКА ЛЕГКИХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ INCIDENCE AND PREVENTION OF LUNG CANCER IN THE REPUBLIC OF BELARUS

О. С. Аксёненко

O. S. Aksenenko

*Белорусский государственный университет МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
grebczovao@mail.ru*

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

Проведен статистический анализ заболеваемости раком легких в период с 2013-2019 года и профилактика рака легких. Изучены и проанализированы базы данных Минского городского клинического онкологического диспансера за 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019 года.

A statistical analysis of the incidence of lung cancer in the period from 2013-2019 and the prevention of lung cancer was carried out. The databases of the Minsk City Clinical Oncology Dispensary were studied and analyzed for 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019 years.

Ключевые слова: заболеваемость раком легких, методы диагностики и лечения, выживаемость пациентов.

Key words: lung cancer incidence, diagnostic and treatment methods, patient survival.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-2-10-13>

Рак легких относится к одной из самых распространенных злокачественных опухолей. Рак легких – одна из главных причин смертности на земле. В среднем на 100 зарегистрированных случаев этого заболевания 72 человека умирают в течение первого года после постановки диагноза. По статистике каждый 14-й человек сталкивался или столкнется с этим заболеванием в своей жизни. Чаще всего раку легких подвержены лица пожилого возраста. Примерно в 70% случаев рак легких наблюдается в возрасте выше 65 лет. Люди моложе 45 лет редко подвержены данному заболеванию, их доля в общей массе больных раком составляет всего 3% [1].

Для объяснения такого роста заболеваемости раком легких предложены различные концепции. Предрасполагающие факторы изучены весьма подробно. Основное внимание уделено следующим двум факторам, влияние которых считается общепризнанным: