

РОЛЬ ШАПЕРОНОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И КАРДИОПРОТЕКЦИИ

Введение. Медико-социальное значение сердечно-сосудистых заболеваний и связанной с ними смертности в нашей стране сегодня трудно переоценить. На молекулярном уровне главствующая роль в этиологии болезней сердца по праву принадлежит факторам стресса. Их многообразие – от стресса социального, до стресса клеточного и оксидативного – привело к формированию сложной *многоуровневой* системы защиты от подобного рода воздействий.

Поддержание полного набора функционально компетентных белков в каждой клетке в нормальном состоянии и во время стресса и повреждения обеспечивается различными механизмами, в том числе системой белков, названных молекулярными шаперонами.

На сегодняшний день, есть все основания полагать, что эта система является ведущим молекулярным механизмом защиты от самых разнообразных стрессорных воздействий, главным внутриклеточным «стражем». Типичной функцией шаперонов является помощь в придании функциональной конформации образующейся полипептидной цепочке (фолдинге) и доставке «новоиспеченного» белка к тому месту в клетке, где он будет выполнять свою функцию. Повреждение белков с изменением их вторичной структуры и нарушение функции шаперонов – типичные спутники старения и множества заболеваний, в первую очередь – сердечно-сосудистых и нервных.

Шапероны, кодирующиеся генами, которые активируются стрессорными факторами, обозначаются как стресс-белки. Если стрессорным фактором является тепловой шок, то такие белки называются белками теплового шока (HSP – от англ. Heat Shock Protein). По историческим причинам, термин «белок теплового шока» используется и в том случае, если экспрессия родительского гена индуцируется не только собственно тепловым шоком, но и иными факторами. В то же время, многие белки теплового шока не являются шаперонами. Отдельно нужно выделить *шаперонины* – шапероны с более сложной олигомерной (кольцевой) организацией. Таким образом, указанные термины следует использовать очень аккуратно, дабы не допустить неправильного понимания и разночтений.

В данной работе мы постараемся обобщить новые данные о действии системы стресс-белков в адаптивных реакциях и патогенезе заболеваний сердечно-сосудистой системы, а также оценить перспективы использования измерения уровня шаперонов в клинике.

Краткая историография вопроса

Интенсивное исследование протеинов, появление которых индуцируется тепловым шоком (повышение температуры на $\approx 5^{\circ}\text{C}$), началось после изучения в 1962 г. феномена появления пuffed на хромосомах слюнных желез мушек Дрозофил в ответ на тепловое воздействие. Названные впоследствии белками теплового шока, они обеспечивали транзиторную толерантность к высоким, обычно летальным, температурам, индуцируясь умеренным прогреванием тела. Впоследствии выяснилось, что при этом растет резистентность не только к высоким температурам, но и к иным повреждающим факторам: воспалению, гипоксии и ишемии, токсинам и свободным радикалам. Важно подчеркнуть, что такой ответ характерен практически для всех живых организмов, органов и тканей, включая миокард.

Активное изучение шаперонов привело к раскрытию их участия во огромном множестве процессов – фолдинге протеинов, реализации эффектов гормонов, (ауто)иммунных реакциях, апоптозе, кардиопротекции и др.

Контроль клеточного стресса

Чрезвычайно высокая консервативность аминокислотных последовательностей шаперонов позволяет судить об их критической важности практически для всех живых организмов.

Самые разнообразные стрессорные факторы (табл. 1) обуславливают изменения внутриклеточной среды и приводят к повреждению белков, генетического материала и биомембран. Защищаясь, клетка снижает экспрессию генов домашнего хозяйства и начинает активно транслировать стресс-гены, что приводит к росту в цитозоле содержания стресс-белков. Есть и другие способы увеличения концентрации шаперонов, среди которых: регуляция интенсивности трансляции, изменение стабильности соответствующих мРНК, модификация их молекул (в том числе, фосфорилирование), а также высвобождение активных шаперонов из внутриклеточных конъюгатов.

Среди значимых последствий клеточного стресса особняком стоит *денатурация* белков, при которой утрачивается их функциональная конформация. В том случае, если клеточный стресс не сопровождается рефолдинговой поддержкой шаперонов, внутриклеточные белки необратимо денатурируют и становятся нерастворимыми. Денатурированные и агрегированные белки не могут выполнять свою функцию и должны быть спасены или уничтожены, опять же при помощи шаперонов. Подобный механизм представляется критически важным как при хроническо текущих патологических процессах в ССС, таких как атеросклероз, так и при острых повреждениях – инфаркте миокарда.

Тип стрессорного фактора	Описание
Физический	Тепло (включая лихорадку), холод, различные типы излучения, в том числе ультрафиолетовое; магнитное поле, шум
Кислородный	Свободные радикалы, пероксид водорода, сдвиг от анаэробного к аэробному метаболизму, гипоксия, аноксия, а также эбселен (антиоксидант), липид А, эндотоксин, ксантинооксидаза/гипоксантин/ксантин, ФНО α , oxLDL
Биологический	Инфекционный процесс, воспаление, лихорадка
pH	Ацидоз, алкалоз, изменение pH
Осмотический	Изменения концентрации соли, сахаров и тп (гипо-, гиперосмотический шок)
Алиментарный	Голодание или недостаточность одного из компонентов питания
Метаболический (АТФ↓)	Ротенон, 2-дезоксиглюкоза/лактат, анаэробный метаболизм
Психологический	Эмоции, эмоциональный конфликт, социальный стресс, гормональный дисбаланс
Химиотерапевтический	Действие антибиотиков (пурамицина, тетрациклина, наликсидиновой кислоты); адриамицин; ингибиторы тирозин-киназы (гербимицин-А), амфетамин
Алкогольный	Этанол, метанол, бутанол, пропанол, октанол
Индукцированный металлами	Cd, Cu, Zn, Cr, Sn, Al, Hg, Pb, Ni, As, тд
Механический	Компрессия, растяжение, напряжение сдвига
Ответ на иммуногены	Пикорнавирусная инфекция
Другие	Подсушивание, бензол, фенол и их дериваты, тератогены, канцерогены, мутагены, аналоги аминокислот (например, канаванин), никотин, анестетики, пестициды, инсектициды
Специфичные для сердечно-сосудистой системы	
Острая гипертензия	В/в введение ангиотензина II, адреналина, вазопрессина, эндотелина-1
Резкие изменения нагрузки	Искусственное растяжение стенки левого желудочка, физическая нагрузка
Гипертрофия миокарда	Аортальный стеноз, в/в введение монокроталина
Филогенетическое развитие	Развитие сердца в эмбриогенезе
Ишемия/реперфузия	Региональная/глобальная ишемия миокарда, постишемическая реперфузия, клеточная ишемия
Хирургическое вмешательство	Аллотрансплантация, кардиохирургическая операция

Таблица 1. Общие факторы, приводящие к клеточному стрессу и индукции белков теплового шока, а также таковые, особо значимые для сердечно-сосудистой системы. Отметим, что в различных тканях эффекты от воздействия этих стрессоров неодинаковые, в ряде ситуаций может наблюдаться не только индукция, но и снижение синтеза шаперонов, что сильно зависит и от интенсивности воздействия. oxLDL = окисленные липопротеины низкой плотности; ФНО α = фактор некроза опухоли α .

С другой стороны, белки теплового шока высокоиммуногенны и способны выполнять функции цитокинов. Их высвобождение из клеток и формирование (ауто)иммунного ответа способно способствовать прогрессии атеросклероза, что будет подробно рассмотрено ниже.

Семейства белков теплового шока и их функции

Шапероны и белки теплового шока классифицируются в различные семейства согласно филогении и структуре, а также молекулярной массе в килодальтонах. В отношении HSP, можно выделить следующие семейства: HSP с высокой молекулярной массой (более 100 кДа), HSP 90 (81 – 99 кДа), HSP 70 (65 – 80 кДа), HSP 60 (55 – 64 кДа), HSP 40 (35 – 54 кДа) и малые HSP (менее 34 кДа). Соотношение между конститутивно экспрессируемыми (например, Hsc70, Hsp90 β) и индуцибельными изоформами (Hsp70, Hsp90, соответственно) сильно варьирует в зависимости от ткани, клеточного типа и физиологического состояния. Их специфические функции с фокусом на сердечно-сосудистой системе и патологии кратко рассмотрены в таблице 2.

Семейство	Представители	Функции, локализация	Место в патологии
Убиквитины	Убиквитин	Конститутивный; Цитоплазма/ядро; Помечает белки, подлежащие деградации с участием 26S-протеазы	Совместно с лигазами, такими как атрогин-1, задействован в процессах атрофии – гипертрофии миокарда
HSP 10	Hsp10	Конститутивный; Митохондрии; Высвобождение субстрата из комплекса с HSP60	
Малые HSP	α A-кристаллин	Конститутивные; Цитоплазма/ядро; Сборка F-актина, стабилизация цитоскелета в области Z-полосок; шапероны	Изменения ассоциированы со старением. \uparrow в мышцах при миозите
	α B-кристаллин		\downarrow в головном мозге при б-ни Гентигтона, \uparrow в глиальных включениях при тауопатии (фронтотемпоральная деменция с паркинсонизмом)
	Hsp27 (Hsp25 [мышь]) Hsp27 [человек, собаки и крысы], Hsp28 [хомяки])	Конститутивный; Цитоплазма/перинуклеус, Стресс-индуцированное фосфорилирование и транслокация в ядро; Гиперэкспрессия обуславливает протекцию от теплового шока, реперфузионного повреждения; может формировать агрегаты, Участие в динамике актина	Атеросклероз. Изменения также ассоциированы со старением. \downarrow в мотонейронах при амиотрофическом латеральном склерозе
	Hsp32 (HO-1)	Цитоплазма, Индуктируется гипоксией Антиоксидантные свойства	Ишемия миокарда
HSP 40	Hsp40 (Hdj-1)	Конститутивный, Цитоплазма/ядро, митохондрии, Характерна стресс-индуцированная транслокация в ядро; фолдинг белков (совместно с Hsp70 и Hsc70), транспорт коллагена	Атеросклероз, Б-нь Гентингтона.
	Hsp47	Конститутивный; ЭР; Связывание и транспорт коллагена из ЭР в комплекс Гольджи	Титры антител в плазме нарастают при ревматоидном артрите, системной красной волчанке, б-ни Шегрена,

			различных болезнях соединительной ткани; Участие в реактивном и репаративном интерстициальном фиброзе
HSP 60	Hsp60 (Hsp58, Hsp65)	Конститутивный, Участие в транспорте протеинов в митохондрии совместно с Hsp70 и через мембраны, АТФ-зависимый гидролиз и высвобождение субстратов совместно с Hsp10, ускорение фолдинга белков	Атеросклероз, сахарный диабет, адьювантный и ревматоидный артриты, системная склеродермия, шизофрения, б-нь Альцгеймера. Фракция в плазме крови снижается при старении
	Grp58	Конститутивный; ЭР	
	TCP-1 (TriC, CCT)	Цитозоль, шаперонин, фолдинг протеинов	20 – 50 % снижение содержания в цереброспинальной жидкости ассоциировано со старением
HSP 70	Hsc70 (Hsp73, hsc70, ly-hsc73)	Конститутивный (незначительно индуцируемый); Цитоплазма/пероксисомы/ядро; Транслокация в ядро во время митоза и под действием стресса; участие в фолдинге, митохондриальном импорте белков и деградации протеинов	Количественные и качественные изменения ассоциированы со старением. Снижение индуцированного тепловым шоком ответа в стареющих гепатоцитах (также Hsp70), а также сетчатке пожилых, участие в Б-ни Альцгеймера; ↓ в головном мозге при б-ни Гентигтона
	Hsp70 (Hsp72, Hsx70, Hsp70l, Hsp70-1, 72K, Hsp71, sp71, Hsp68)	Цитоплазма/ядро; Высокоиндуцибельный, Транслокация в ядро во время митоза и под действием стресса низкая конценрация в норме, синтез и транспорт белка, фолдинг и рефолдинг, а также связывание и регуляция активности некоторых белков (p53), кардиопротекция	Атеросклероз, туберкулез, лепра, филяриаз. Роль в старении: ↓ в фибробластах пожилых людей и прошедших множество пассажей меланоцитах. ↑ при б-ни Альцгеймера (тельца, бляшки, кора головного мозга). Фракция в плазме крови снижается при старении, в то время как титры аутоантител с возрастом нарастают, что коррелирует со снижением слуха
	HspA12B	Эндотелиоспецифичный	Атерогенез
	Hsp75, (Grp75, mt-hsp75, PBP74)	ЭР, цитоплазма, митохондрии; Конститутивный; транспорт и фолдинг белков в митохондриях	Б-нь Альцгеймера (↑),
	Grp78 (BiP, p78, Grp80, Hsp78)	ЭР, цитоплазма, ядро; Конститутивный/индуцибельный; высокий уровень конститутивной экспрессии в железистой ткани, индукция при снижении концентрации глюкозы, ингибитор гликозилирования, фолдинг протеинов	Б-нь Альцгеймера (↑), Б-нь Чагаса (молекулярная мимикрия)
	Морталин	Цитоплазма/ядерная мембрана	
HSP 90	Hsp90-α Hsp90-β (конститутивный)	Цитоплазма/ядро; транслокация в ядро во время стресса; Конститутивные, но способны к ир-регуляции и фосфорилированию во время стресса; Связываются с ядерными рецепторами гормонов и некоторыми другими белками, модулируют транспорт некоторых тирозин-киназ к клеточным мембранам	Шистоматоз, системная красная волчанка. Старение. ↓ в стареющих фибробластах и гепатоцитах; Участие в антиатеросклеротическом действии эстрогенов; роль в иммуносупрессии при пресадке сердца

	Grp94 (Grp90, Grp100, Erp99, ERP100, эндоплазм ин)	ЭР; Индуцибельный в сателлитных миоцитах; Связывает кальций	Б-нь Альцгеймера, Ишемическо-реперфузионное повреждение
HSP 110	Hsp94	Мозговое вещество почек; Индуктируется теплом и осмотическим стрессом	
	Hsp104, (Hsp105)	Цитоплазма <u>дрожей</u> ; термотолерантность	
	Hsp110 (Apg-1 [мыши])	Цитоплазма/ядрышки; Конститутивный, синтез увеличивается во время стресса, рефолдинг	
	Grp170	ЭР; конститутивная экспрессия	

Табл. 2. Семейства шаперонов и белков теплового шока, их функции и вовлеченность в патологические процессы. Альтернативные названия белков указаны в скобках. ЭР = эндоплазматический ретикулум

Шапероновые машины

Шапероны редко работают в одиночку, а чаще – в бригадах, состоящих из различных молекул, включающих шапероны и кошапероны. Кошапероны взаимодействуют с шаперонами, такими как HSP70 и HSP90, и помогают в выполнении их различных ролей. Например, кошаперон с нуклеотидо-обменной активностью BAG-1 содействует обмену АТФ – АДФ, который необходим для энергетической подпитки HSP70 во время фолдинга. Именно шаперонно-кошаперонные комплексы помогают новосформированной полипептидной цепочке проходить фолдинг, восстанавливать поврежденные белки (рефолдинг) или направляют их в протеазные комплексы при невозможности восстановления. Различные функциональные домены молекулы шаперона распознают полипептид с нарушенной структурой, взаимодействуют с другими членами команды для формирования шаперонинговых комплексов и обширной сети с другими подобными комплексами или с убиквитин-протеасомной системой деградации протеинов (рис 1).

Главные шапероновые бригады клетки:

- Шапероновая машина (состоит из HSP70, HSP40 и нуклеотидно-обменного фактора);
- Шаперонин-содержащий 8-ми субъединичный комплекс TSP-1;
- Шаперон префолдинга из пяти субъединиц;
- Малые HSP, формирующие мультимеры различного размера;
- Комплексы HSP60 – HSP10, в которых HSP10 представляет собой шаперонин. Эти комплексы локализованы в митохондриях, в то время как остальные – в цитозоле, ядре и других клеточных компартментах.

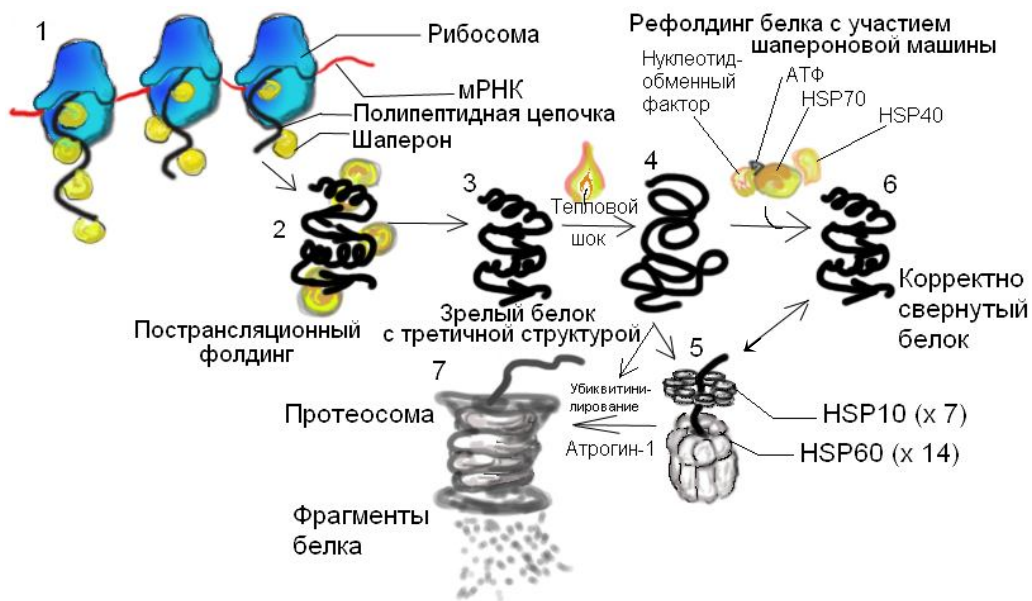


Рис. 1. Судьба белков в клетке. 1. Новые полипептидные цепочки синтезируются на рибосомах. Уже на этом этапе необходима поддержка HSP70, которые, связываясь с гидрофобными участками полипептида, поддерживают его в «расправленной» форме и тем самым предотвращают агрегацию. Так же они помогают пройти белку через мембраны (на рисунке не показано). 2. Шапероны участвуют в посттрансляционном фолдинге – придании белковой молекуле функциональной конформации (3). 4. После теплового или иного шока белковая молекула утрачивает вторичную структуру. Именно здесь (6) подключается шапероновая машина, которая способна восстановить утраченную вторичную структуру. Другим комплексом шаперонов, участвующим в рефолдинге, является локализованный в митохондриях HSP60 – HSP10 (5), состоящим из «боченка» (14 молекул HSP 60) и «крышечки» (7 молекул HSP 10). Полипептидная цепочка целиком устремляется в его просвет, после чего «крышечка» из HSP 10 опускается. Внутри «боченка» полипептид, «кувыкаясь» и перестраивая S-S связи, принимает энергетически выгодную конформацию, так заново формируется его вторичная структура. В цитоплазме работает похожий на него, однако лишенный изящной крышечки, комплекс TCP-1 из восьми субъединиц (на рисунке не показан). Порой восстановление вторичной структуры белка невозможно. В этом случае он помечается убиквитином, например с помощью E3 лигазы Атрогина-1 и устремляется для деструкции в протеасому. Неэффективность этого пути, в свою очередь, приводит к агрегации протеинов и формированию внутриклеточных включений.

Но что же происходит, когда шапероны неэффективны, например, ввиду масштабов повреждения? Необратимо поврежденные белки, структуру которых невозможно восстановить, за счет специальных лигаз помечаются по лизиновым остаткам аминокислот и по большей части отправляются в протеасому для разрушения. На наш взгляд, равновесие между шаперонами и лигазами, участвующими в деградации протеинов, такими как атрогин-1, очень тонкое и все еще недостаточно изучено. В

этой связи особый интерес представляют биомолекулы, определяющие скорость деградации белков.

Одна из таких молекул – Атрогин-1 за счет ингибирования кальцинейрина, с одной стороны, ведет к снижению степени гипертрофии миокарда, а с другой – одним из первых начинает гиперэкспрессироваться на самой ранней, преคลินิกческой стадии алкогольной кардиомиопатии (*неопубликованные результаты*), что может обуславливать развитие дилатации миокарда в последующем.

Этим примером мы хотим показать тесную взаимосвязь процессов регуляции структуры белков в клетках и патогенеза атрофии и гипертрофии миокарда.

Регуляция транскрипции генов шаперонов

Указанные в таблице 1 факторы и многие другие приводят к значимому увеличению экспрессии генов белков теплового шока, в том числе в клетках, формирующих сердечно-сосудистую систему.

Ключевым моментом здесь является активация транскрипционных факторов теплового шока HSF, индуцированная изменениями внутриклеточной среды. И центральное место в этом процессе занимает равновесие между связыванием свободных молекул белков теплового шока, таких как HSP70 с HSF, с одной стороны, и опосредованным стрессом нарушением вторичной и третичной структур белков – с другой. Любое увеличение концентрации неправильно свернутых белков смещает баланс в сторону образования комплексов HSP-белки, при этом высвобождаются свободные мономеры HSF, которые впоследствии, активируются, олигомеризуются и направляются в ядро для активации там чувствительных генов белков теплового шока HSE (см. Рис. 2).

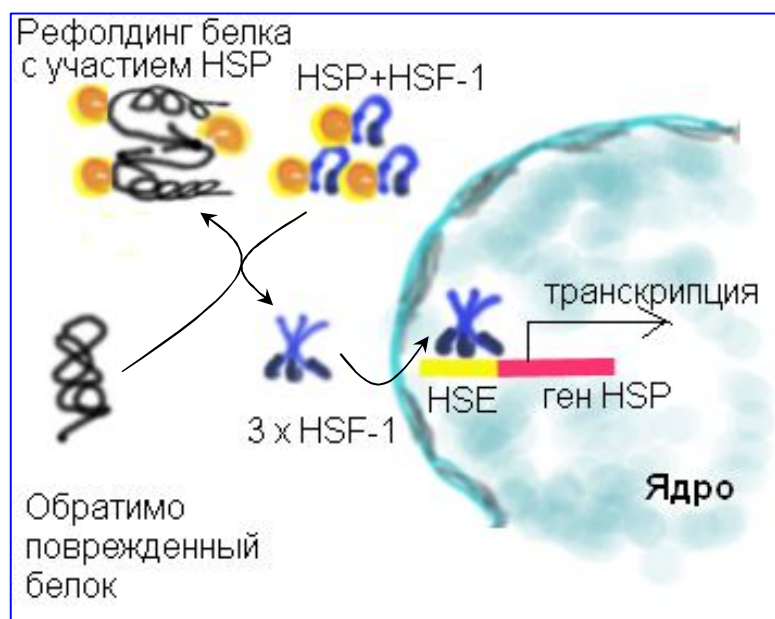


Рис. 2. Факторы, указанные в таблице 1, прямо или опосредованно вызывают повреждение белковых молекул и утрату ими вторичной структуры. Высвобождающиеся из комплексов с HSF-1 молекулы белков теплового шока стремятся ее восстановить. Свободные молекулы HSF-1 недолго остаются в одиночестве, так как тримеризация оказывается для них энергетически более выгодным состоянием. Тримеры молекул HSF-1, проникая в ядро, вызывают индукцию регуляторных элементов (HSE) генов белков теплового шока, что приводит к резкому увеличению скорости их транскрипции. Образовавшиеся молекулы мРНК служат матрицами для постройки на рибосомах новых молекул шаперонов, когда клетка нуждается в этом. На рисунке не показаны иные механизмы активации HSF-1 (см. текст).

Также HSF-HSE могут активироваться ненапрямую различными стрессорами, а также и другими молекулярными каскадами, например:

- Свободнорадикальное повреждение мембран → фосфолипаза C → ... → протеинкиназа C;
- H_2O_2 → Янус-киназа → STAT;
- Скавенджер-рецепторы + охЛНП → O^{2-} ;
- Оксид азота → нитрозирование белков;
- Механический стресс → интегрины → SAK.

Или ингибироваться, например следующим образом:

- Механический стресс → интегрины → Ras/Rac → ERK.

На сегодняшний день описано 4 фактора HSF, из которых HSF-1 охарактеризован наиболее полно. Подробное описание указанных выше путей и особенностей активации разных HSF выходит за границы данного обзора.

Работа шаперонов во время стресса

Последствия теплового и ишемического шоков для клетки во многом схожи. И тепловой шок, и ишемический, приводят к обширному повреждению цитоскелета, включая разрушение сети промежуточных филаментов и формирование ее агрегатов вокруг ядра, реорганизации цитоплазмы, релокализации актиновых филаментов в перинуклеарную область, дезинтеграции микротрубочек и митотических веретен. Для относительно ранних стадий обоих этих видов шока также характерны набухание и потеря митохондрий, разобщение окисления и фосфорилирования.

Фосфорилирование таких факторов инициации, как eIF2 α во время клеточного стресса, например, сублетального теплового шока, тормозит синтез многих белков в клетке на уровне рибосом. На этом фоне гены белков теплового шока активно экспрессируются, структура их мРНК стабилизируется теплом, при этом внутриклеточная концентрация белков

теплового шока достигает 15 – 20 % от общего содержания белков в клетке в течение всего нескольких минут после начала действия подобного стрессора. Параллельно некоторые цитозольные шапероны перемещаются в ядро, где индуцированное теплом ингибирование организации ДНК в хроматин делает ее конформацию более подверженной действию нуклеаз. Таким образом, процесс запуска апоптоза ишемией и тепловым шоком вполне сопоставим также. Прекращение действия вредоносного стимула ведет к быстрой деградации мРНК белков теплового шока.

Интересно, что предшествующий сублетальный тепловой шок или ишемическое preconditionирование очень основательно уменьшают тяжесть клеточных последствий последующих высокотемпературных воздействий. Более того, такие воздействия обуславливают рост перекрестной резистентности к самым разнообразным видам физиологического стресса, которая может длиться от часов до дней.

Экспрессия шаперонов в сердце

Шапероны конститутивно экспрессируются и индуцируются как в миокарде, так и в сосудах сердца. Однако, паттерн экспрессии все же несколько различается. Например, Hsp27 обнаруживается в кардиомиоцитах, эндотелиальных и гладкомышечных клетках, α B-кристаллин специфичен для кардиомиоцитов (1 – 3 % от общего содержания в них белка), а HspB12A – для эндотелия. Транскрипционные факторы HSF 1, 2 и 4 также обнаружены в миокарде. Уровень мРНК Hsp70 в сердце резко возрастает уже спустя несколько минут после стрессорного воздействия, а концентрация соответствующего белка постепенно, в течение часов, повышается, оставаясь значимо увеличенной даже спустя 192 часа после действия стимула.

В последнее время была показана мощная и реализуемая на различных уровнях антиапоптотическая активность многих элементов системы белков теплового шока (рис. 3). Интересно, что, если, противодействие реализации программы запрограммированной клеточной смерти при остром инфаркте миокарда (ОИМ) может расцениваться как безусловно желаемое, ситуация в случае онкологических заболеваний принципиально иная. Именно такая многогранность системы шаперонов определяет важность работ по их стимуляции в кардиологии и ингибировании активности – в онкологии.

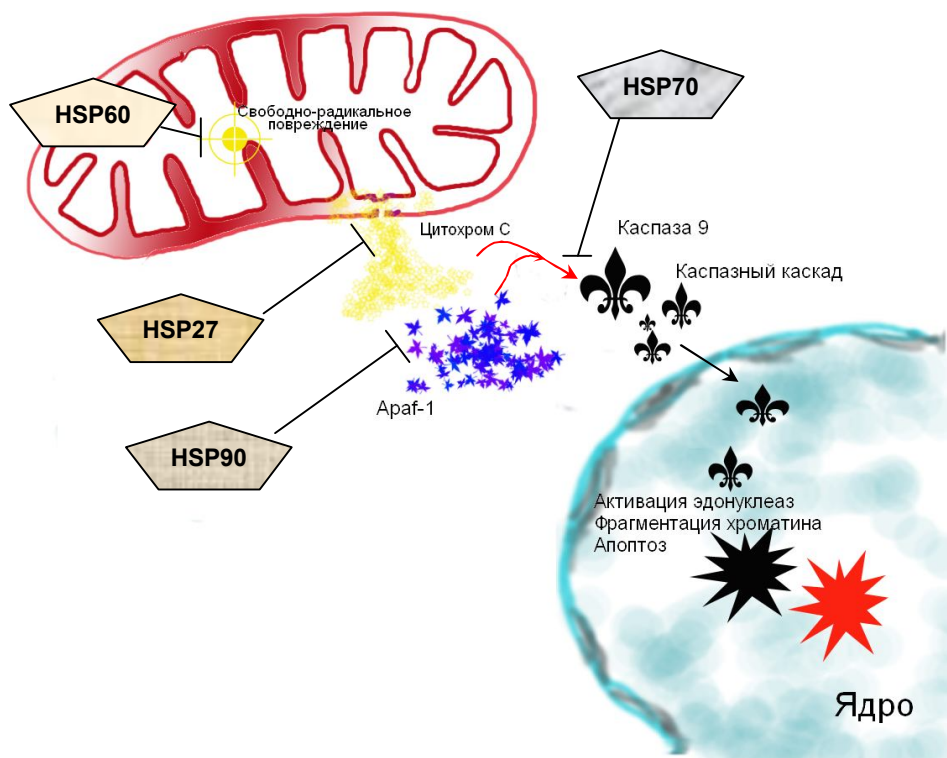


Рис. 3. Противостояние апоптозу немыслимо без шаперонов (рисунок сильно упрощен, показаны только ключевые моменты). На ранних этапах они способны уменьшить последствия свободно-радикального повреждения мембран митохондрий, ведущего к сливанию с них цитохрома С и, впоследствии, к митоптозу. Высвобождение цитохрома С эффективно блокируется HSP 27. Если это все же происходит, HSP90, взаимодействуя с Араф-1, предотвращает формирование в цитоплазме комплекса Цитохром С – Араф-1, основная задача которого – активация каскада смертоносных каспаз. И на этом этапе другой белок теплового шока – HSP70 – противостоит активации ключевого звена каскада – каспазы 9. В случае значимого перевеса на стороне проапоптотических стимулов, запущенный каспазный каскад сшивает цитоплазму, приводит к активации нуклеаз и реализации программы запрограммированной клеточной смерти – апоптоза.

Основное внимание далее будет уделено репаративному действию шаперонов в ишемическо-реперфузионном повреждении и атеросклерозе, прогностической значимости измерения уровня белков теплового шока, важности их циркулирующих форм, роли аутоантител и возможностей фармакологического воздействия на эти системы.

Шапероны и процессы старения

Во большинстве тканей и клеток содержание шаперонов значительно снижается в процессе старения (см. табл. 2), возможной причиной чего является снижение способности регуляторного фактора HSF-1 связываться с промотором HSE. К сожалению, сердце не является здесь исключением. Учитывая относительно низкие темпы пролиферации кардиомиоцитов (Zipes et al, 2005), способность миокарда к регенерации

во многом определяется именно внутриклеточными системами, среди которых шапероны играют одну из первых ролей. Поэтому не всегда возможно трактовать снижение эффективности шаперонов как болезнь или «шаперонопатию».

Во время повреждения клеток шапероны высвобождаются из них и попадают в плазму, о чем будет подробно написано ниже. Повышенный уровень шаперонов плазмы во время старения скорее указывает на «плохое» здоровье, нежели на «хорошее». Однако, видится важным научиться определять, когда рост уровня шаперонов плазмы вызван их утечкой из поврежденных клеток, а когда он является следствием активной экскреции их в кровоток для поддержания высоких, протективных концентраций.

Роль шаперонов в атеросклерозе

Атеросклероз сегодня рассматривается как хроническое воспалительное заболевание крупных артерий, дебютирующее в детстве или еще в утробе матери. Поведение белков теплового шока здесь довольно диалектично. Адекватными стимулами для гиперэкспрессии белков теплового шока являются окисленные ЛНП, играющие критическую роль на ранней стадии атерогенеза, механический сосудистый стресс и многие другие проатерогенные воздействия.

По всей видимости, первичная вазопротективная роль сменяется на патогенную после высвобождения шаперонов из клеток и формирования аутоиммунной агрессии по отношению к этим высокоиммунногенным молекулам (рис. 4).



Рис. 4. Роль белков теплового шока в протекции и прогрессировании атеросклероза (на примере HSP 60). Внутриклеточные формы HSP 60 сами по себе обуславливают кардио- и вазопротекцию, однако высвобождение растворимых форм этих белков в кровотоки вызывает стимуляцию воспаления и аутоиммунного ответа – неотъемлемых компонент атерогенеза (По Xu et al, 2002).

Определенное значение здесь могут иметь и перекрестное реагирование с белками теплового шока инфекционных агентов (*Chlamidia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, вирусы герпеса, тд.), а также стимуляция ими экспрессии и высвобождения собственных белков теплового шока миокарда. Здесь мы подходим к обсуждению значения растворимых в плазме шаперонов и аутоантител к ним.

Шапероны плазмы и аутоантитела

Механизм высвобождения белков теплового шока из клеток остается неясным. Мы предполагаем, что одним из таких путей может быть выделение с участием отпадающих мембранных микрочастиц. Изучение этих механизмов очень актуально, так как у здоровых лиц с высокими титрами шаперонов плазмы и больных механизмы высвобождения могут различаться принципиально.

Данные о прогностическом значении растворимых форм белков теплового шока сильно разнятся. Xu показал увеличение титров sHSP60 у пациентов с атеросклерозом брахиоцефальных артерий, а Rockley – у лиц с начальной стадией гипертензии. Однако, Zhu и соавт. в исследовании, включавшем 421 пациента, продемонстрировали, что, напротив, повышенные плазменные уровни HSP70 ассоциируются с низким риском ишемической болезни сердца (ИБС).

По всей видимости, молекулы белков теплового шока *per se* обладают вдобавок ко всему еще и функциями цитокинов. В низких концентрациях (< 1 µg/ml) и без каких-либо кофакторов они способны стимулировать продукцию провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли, IL-1, 6, 12, а также оксида азота, и С-С хемокинов моноцитов, макрофагов и дендритных клеток (Tsan and Gao, 2004). Некоторые авторы в этой связи даже предлагают использовать термин «шаперокины». Многие их функции, как было показано в дальнейшем, опосредуются CD14/Toll-like рецепторами, способными активировать MAP-киназный каскад и связанные с NF-κB и другими важными системами регуляции клеточного цикла. Именно эти сигнальные пути задействованы в прогрессировании атеросклероза.

Антитела к белкам теплового шока обнаруживаются в плазме здоровых лиц, однако при множестве болезней, особенно сердца и мозга, их титры резко возрастают. Во многих наблюдениях было показано, что при длительном воздействии стрессора может приводить к росту аутоантител к белкам теплового шока, что ведет дальнейшему развитию или прогрессированию заболевания. Результаты многих работ

свидетельствуют, что повышение титров антител против HSP60 (а в ряде работ – и против высокомолекулярных микобактериальных HSP65) сопряжено с ухудшением прогноза и тяжести ИБС, распространенного атеросклероза, а также может использоваться в качестве нового фактора риска ИБС. Отмечается тенденция повышения их титров с возрастом. Некоторые авторы полагают, что существует субпопуляция Т-лимфоцитов, специфически реагирующая на HSP60/65 непосредственно в атеросклеротических бляшках, ответственная за его прогрессирование.

До настоящего времени методика определения анти-HSP не была стандартизована, поэтому ее применение в клинической практике затруднительно.

Шапероны, защита миокарда, сосудов и противостояние ишемическо-реперфузионное повреждению

Результаты всевозрастающего числа современных исследований, посвященных белкам теплового шока и, в частности, Hsp70, свидетельствуют о важности их роли в восстановлении миокарда после ишемии и реперфузии, ограничении объема инфаркта, а также в ишемическом preconditionировании.

Как мы уже указывали, практически все клеточные элементы отвечают на стресс гиперэкспрессией белков теплового шока. По всей видимости, данная система в сосудистой стенке также интимно связана с каскадом оксида азота, так как применение ингибитора NO-синтазы L-NAME снижает эффективность транскрипции гена Hsp70.

Еще в 1993 г. Amrani и соавт. показали, что эндотелиоциты коронарных артерий крыс оказываются защищенными от ишемическо-реперфузионного повреждения предшествующим нагреванием тела животных, и кардиопротекция в данном случае опосредуется именно Hsp70. В последующих экспериментах было показано, что указанные положительные эффекты устраняются после удаления эндотелиальных клеток с применением сапонины, что послужило дополнительным доказательством критической важности гиперэкспрессии белков теплового шока эндотелиоцитах для обеспечения высокой степени кардиопротекции. Другие белки теплового шока, в частности, Hsp27, также играют немаловажную роль. В фосфорилированном виде Hsp27 стабилизирует F-актин, а также способствует поддержанию приемлимой для сохранения жизни кардиомиоцитов концентрации АТФ во время ишемии.

Даже общеизвестная эффективность кардиopleгии и ишемического preconditionирования (особенно более позднего, «второго окна» кардиопротекции) также может в определенной степени обуславливаться активацией синтеза белков теплового шока.

Исследования, проведенные на культурах клеток, ввиду множества ограничений, требуют особо аккуратной трактовки. Их результаты во многом противоречивы. Тем не менее, было продемонстрировано, что индуцированный гипоксией, но не тепловым шоком, синтез Hsp70

способен вызывать рост толерантности к летальному тепловому шоку в культуре эмбриональных миобластов.

Не вдаваясь в подробности, отметим также, что защитные свойства белков теплового шока были продемонстрированы и подтверждены в множестве экспериментов с их гиперэкспрессией, ингибированием синтеза, а также в моделях трансгенных животных (Snook et al, 2001).

Белки теплового шока в остром инфаркте миокарда

Интерес большинства работ прошлого века, посвященных ОИМ, фокусировался на гемодинамике, реперфузии, фибринолизе и свободно-радикальном повреждении. Мы не станем здесь приуменьшать значение вышеуказанных факторов, определивших прорыв в лечении ОИМ, однако полагаем, что, в погоне за скоростью реперфузии миокарда, неоправданно малое значение уделялось собственным **внутриклеточным** системам защиты кардиомиоцитов от ишемии. Даже в отношении участия в этих процессах наиболее мощных внутриклеточных эффекторов кардиопротекции, таких как белки теплового шока, ситуация все еще далека от сколько-нибудь полного понимания.

На экспериментальных моделях было показано, что во время инфаркта миокарда и в постинфарктном периоде HSP70 активно экспрессируются в поврежденном миокарде, исключая центральное некротическое ядро (Plumier et al, 1996).

В этой связи интересна работа Dybdahl и соавт., которые изучали высвобождение в системный кровоток Hsp70 у пациентов с инфарктом миокарда. Исследование показало, что плазменная концентрация Hsp70 на фоне ОИМ действительно быстро и значительно возрастает, причем ее пик коррелирует с пиками тропонина Т и МВ фракции креатинкиназы. Авторы расценивают циркулирующие Hsp70 как маркеры повреждения миокарда, потенциально связанные с последующим воспалительным ответом. Однако одним из значимых ограничений работы была невозможность установить источник циркулирующих Hsp70. В работе Zal и соавт. было продемонстрировано, что циркулирующие Hsp 60 во время острого коронарного синдрома способны активировать CD4⁺ CD28^{null} Т-лимфоциты, которые могут вести к дальнейшему повреждению сосудистой стенки.

В то же время, в экспериментальных моделях ишемии-реперфузии уверенно была показана кардиопротективная роль белков теплового шока. Здесь очень важно дифференцировать адаптивный подъем концентрации Hsp70 в крови, который, как показали Zhu и соавт., ассоциирован с низким риском развития ИБС, от высвобождения молекул Hsp70 из поврежденных кардиомиоцитов. В то же время ясно, что простое измерение концентраций циркулирующих белков теплового шока не может адекватно отражать ситуацию с их прямым действием в качестве внутриклеточной системы защиты. Ввиду полиморфизма *hsp70* шаперонов и факторов индукции их экспрессии, ответ этой системы на ишемическо-

реперфузионное повреждение у пациентов с ОИМ может принципиально различаться.

Безусловно, основные трудности анализа ситуации непосредственно в миокарде при ОИМ сопряжены с невозможностью получения биопсийного материала от пациентов по этическим или техническим причинам. Однако, как же внутриклеточная система белков теплового шока действует при ОИМ? Насколько её активность и характер реагирования могут определять прогноз и течение ОИМ?

Для того, чтобы приоткрыть завесу тайны, мы провели собственное исследование, в котором с помощью иммуноблоттинга измерялось базальное и индуцированное тепловым шоком содержание Hsp72 – индуцибельной формы Hsp70 – в лимфоцитах 25 больных ОИМ.

Лимфоциты здоровых людей в контрольной группе, культивированные при 37°C, имели незначительное исходное содержание HSP72. Увеличение температуры до 42°C приводило к выраженному накоплению этих белков. Такая реакция была типична для лимфоцитов, выделенных от разных здоровых добровольцев, и не имела существенных индивидуальных различий. Активация синтеза HSP72 после действия высокой температуры отражала хорошо известный феномен «ответ теплового шока» или «стресс ответ».

Визуальный анализ иммуноблотов больных в 1 день инфаркта миокарда действительно выявлял существенные качественные отличия в содержании HSP72 в лимфоцитах, выделенных от разных больных.

У 8 из 25 больных в 1 день заболевания HSP72 не определялся ни при 37°C, ни после теплового шока. Это свидетельствовало об угнетении как базальной, так и индуцированной активности системы синтеза HSP72 лимфоцитов в 1 день инфаркта миокарда. Эту группу больных мы условно обозначили как первую подгруппу.

На иммуноблотах второй подгруппы, в которую вошли 7 из 25 больных, в 1 день инфаркта миокарда HSP72 определялся только после теплового шока, и не обнаруживался в непрогретых клетках. Это свидетельствовало об угнетении синтеза HSP72 в базальных условиях, и сохранении способности к активации синтеза HSP72 в ответ на тепловой шок.

На иммуноблотах третьей подгруппы, в которую вошли оставшиеся 10 из 25 обследованных больных, в 1 день ИМ HSP72 определялся и при 37°C и после теплового шока. Иммуноблоты этих больных практически не отличались от иммуноблотов здоровых добровольцев.

Таким образом, больные в первый день инфаркта миокарда по характеру изменений содержания HSP72 в лимфоцитах (или другими словами по характеру стресс ответа) четко разделились на три группы. Первая группа или первый тип стресс ответа характеризовался отсутствием как базального, так и стресс-индуцированного синтеза HSP72; вторая группа или второй тип стресс ответа характеризовался отсутствием базального, но сохраненного стресс-индуцированного синтеза HSP72 и

наконец в третьей группе или при третьем типе стресс ответа отсутствовали изменения как в базальном, так и стимулированном синтезе HSP72i, по сравнению с группой добровольцев.

На следующем этапе был проведен сравнительный анализ анамнестических данных, клинического состояния и тяжести течения заболевания групп больных с разным типом стресс ответов в лимфоцитах периферической крови в 1 день инфаркта миокарда. Принимая во внимание данные литературы о неблагоприятном течении и прогнозе ИМ у пожилых людей, перед сравнительным анализом группы больных были рандомизированы по возрасту и первичности ИМ. Данные сравнительного анализа показали, что больные с разными типами стресс ответов, также различаются и по клинической картине заболевания.

У пациентов первой группы, течение ИМ было наиболее благоприятным. Среди них не было больных с левожелудочковой недостаточностью и не было летальных исходов. Первую группу характеризовали достаточно высокая фракция выброса ЛЖ и умеренные изменения ЭКГ и активности КФК.

Наиболее тяжелым в острый период ИМ было состояние больных из 2 группы. Оно характеризовалось явлениями левожелудочковой недостаточности (зарегистрировано у 5 больных) и большой длительностью ангинозных болей в начале ИМ. В этой группе был наибольший при поступлении класс Killip и максимальные ЧСС и ЧДД в первую неделю заболевания. Активность КФК при поступлении и максимальная активность КФК во второй группе были существенно выше, по сравнению с другими. Вторую группу также характеризовала минимальная среди других групп фракция выброса ЛЖ.

Третья группа, по показателям, отражающим тяжесть состояния больных в острый период ИМ, заняла промежуточное положение между 1 и 2 группами. В 3 группе левожелудочковая недостаточность осложнила течение ИМ у 2 больных. Важно также отметить, что летальные исходы были только в этой группе.

Не обнаружено существенных отличий между группами в картине ЭКГ при поступлении, по степени дилатации ЛЖ (КДР ЛЖ), общему числу зон гипо- и акинеза, частоте визуализации при ЭХО КГ аневризм ЛЖ и тромбов в его полости, по частоте возникновения постинфарктной стенокардии и рецидивов ИМ, по частоте таких факторов риска развития ИМ, как артериальная гипертензия, степень гипертрофии миокарда ЛЖ, числу курящих и стажу курения. Вместе с тем, число пациентов с гиперлипидемией в первой группе было минимальным (только 1) и достоверно отличалось от 2 и 3 групп. В первой группе был также наименьший индекс массы тела и наименьшее общее число факторов риска развития ИМ.

По параметрам не связанным с тяжестью течения ИМ, группы отличались друг от друга следующим образом. Первая группа отличалась от двух других картиной периферической крови и низкой частотой

дислипидемии. В первой группе было наименьшим абсолютное число моноцитов в 1 сутки ИМ. По этому параметру первая группа достоверно отличалась от третьей группы, а по числу лейкоцитов в 1 и 7 сутки и числу полиморфноядерных нейтрофилов в 1 сутки ИМ от 2 группы. Вторую группу характеризовал высокий лейкоцитоз крови в 1 и 7 сутки ИМ и длительный болевой синдром (*status anginosus*) в начале ИМ. Наконец, в третьей группе в отличие от других групп отсутствовали пациенты, у которых ИМ был дебютом ИБС.

Таким образом, в настоящем исследовании мы продемонстрировали, что больные ОИМ реагируют на заболевание включением в лимфоцитах периферической крови системы синтеза HSP72i, и тип этой реакции имеет прогностическое значение.

Дальнейшие перспективы

Новое понимание роли шаперонов в патогенезе болезней сердца и сосудов делает очень заманчивой идею фармакологического воздействия на неё. В то время, как кардиологи с нетерпением ждут результатов клинических испытаний активатора синтеза белков теплового шока радицикола, онкологи, напротив, не менее заинтересованы в применении ингибиторов их синтеза, таких как танеспимицин.

Мы ожидаем, что в течение нескольких лет такие препараты войдут в клиническую практику, а вместе с ними – и методика измерения уровня белков теплового шока, причем именно лимфоциты плазмы крови представляются для этого наиболее подходящей моделью.

Продemonстрированное нами прогностическое значение оценки содержания HSP72 у пациентов с ОИМ показывает, что далеко не все важные критерии включены в современные системы оценки сердечно-сосудистого риска, что снижает их точность. Исключительная важность учета действия антирисковых факторов уверенно показана на примере холестерина ЛВП.

Многообещающими представляются исследования недавно открытого специфичного для эндотелия HSPA12B, механизмы регуляции которого могут изменить представление о протекции эндотелия.

История помнит пример с резким снижением в Финляндии конца прошлого века смертности от сердечно-сосудистых заболеваний, достигнутым во многом благодаря пропаганде здорового образа жизни. Сегодня мы начинаем понимать, что положительное действие многих эффективных немедикаментозных мер по снижению сердечно-сосудистого риска, таких как физические нагрузки, прекращение курения, снижение массы тела, оказывается тесно связанным с индукцией белков теплового шока, аутоантителами к ним или полиморфизмом их генов. Возможно, даже положительное действие контрастных душ и столь любимых в России бань может найти свое объяснение в активации процессов экспрессии генов и синтеза шаперонов.

Список литературы

1. Beere H. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways // *J. Clin. Invest.* 115:2633–2639 (2005).
2. Benjamin I. and McMillan D. Stress (Heat Shock) Proteins : Molecular Chaperones in Cardiovascular Biology and Disease // *Circ. Res.* 1998;83;117-132
3. Birnie D. et al. Increased titres of anti-human heat shock protein 60 predict an adverse one year prognosis in patients with acute cardiac chest pain // *Heart* 2005;91;1148-1153
4. Ciocca I D. and Calderwood S. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications // *Cell Stress & Chaperones* (2005) 10 (2), 86–103
5. Clinical application of lymphocytic HSP72 production assessment as myocardial infarction prognostic criterion // *Acute Cardiac Care Journal*, Vol. 8, Prague 2006
6. Delogu G. et al. Heat shock proteins and their role in heart injury // *Current Opinion in Critical Care* 2002, 8:411–416
7. Dybdahl B. et al. Myocardial ischaemia and the inflammatory response: release of heat shock protein 70 after myocardial infarction // *Heart* 2005;91;299-304
8. Guisasaola M. Heat shock proteins, end effectors of myocardium ischemic preconditioning? // *Cell Stress & Chaperones* (2006) 11 (3), 250–258
9. Hu G. A novel endothelial-specific heat shock protein HspA12B is required in both zebrafish development and endothelial functions in vitro // *Journal of Cell Science* 119, 4117-4126
10. Hutter M et al. Heat-shock protein induction in rat hearts. A direct correlation between the amount of heat-shock protein induced and the degree of myocardial protection // *Circulation* 1994;89;355-360
11. Ivashkin V.T., Drapkina O.M, Ashikhmin Ya.I Clinical Application of Lymphocytic HSP72 Production Assessment as Myocardial Infarction Prognostic Criterion. Sixteen European meeting on hypertension. Abstract book. Madrid, 2006
12. Johnson J and Fleshner F Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72 // *Journal of Leukocyte Biology* Volume 79, March 2006
13. Latchman D. Heat shock proteins and cardiac protection // *Cardiovascular Research* 51 (2001) 637–646
14. Macario A. and Conway de Macario E. Sick Chaperones, Cellular Stress, and Disease // *N Engl J Med* 2005;353:1489-501.
15. Martin-Ventura J, Identification by a Differential Proteomic Approach of Heat Shock Protein 27 as a Potential Marker of Atherosclerosis // *Circulation* 2004;110;2216-2219;
16. Patterson C and Cyr D Welcome to the Machine: A Cardiologist's Introduction to Protein Folding and Degradation // *Circulation* 2002;106;2741-2746
17. Pockley A. and Frostegård J. Heat shock proteins in cardiovascular disease and the prognostic value of heat shock protein related measurements // *Heart* 2005;91;1124-1126
18. Pockley A. Heat Shock Proteins, Inflammation, and Cardiovascular Disease // *Circulation* 2002;105;1012-1017
19. Radford N. et al. Cardioprotective effects of 70-kDa heat shock protein in transgenic mice // *PNAS* 1996;93;2339-2342
20. Snoeckx L et al. Heat Shock Proteins and Cardiovascular Pathophysiology // *Physiological reviews* Vol. 81, No. 4, October 2001
21. Steagall R. et al. HSPA12B Is Predominantly Expressed in Endothelial Cells and Required for // *Angiogenesis Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26;2012-2018;
22. Tedgui A. and Mallat Z. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways // *Physiol Rev* 86: 515–581, 2006;
23. Tsan M and Gao B Cytokine function of heat shock proteins // *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C739–C744, 2004;
24. Veres A. et al. Relationship of Anti-60 kDa Heat Shock Protein and Anti-Cholesterol Antibodies to Cardiovascular Events // *Circulation* 2002;106;2775-2780;
25. Yokota S et al Anti-HSP auto-antibodies enhance HSP-induced pro-inflammatory cytokine production in human monocytic cells via Toll-like receptors // *International Immunology*, Vol. 18, No. 4, pp. 573–580
26. Zal B Heat-Shock Protein 60-Reactive CD4+CD28null T Cells in Patients With Acute Coronary Syndromes // *Circulation* 2004;109;1230-1235;
27. Zhu J et al. Increased Serum Levels of Heat Shock Protein 70 Are Associated With Low Risk of Coronary Artery Disease // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003;23;1055-1059;

28. Zhu J et al.. Association of Serum Antibodies to Heat-Shock Protein 65 With Coronary Calcification Levels: Suggestion of Pathogen-Triggered Autoimmunity in Early // Circulation 2004;109;36-41
29. Zipes D, Braunwald et al. Braunwald's heart disease, 7e, 2005
30. Zou et al. Heat Shock Transcription Factor 1 Protects Cardiomyocytes From Ischemia/Reperfusion Injury // Circulation 2003;108;3024-3030;
31. Драпкина О.М. Особенности синтеза оксида азота и белков теплового шока у больных острым инфарктом миокарда и постинфарктным кардиосклерозом / Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук, 2004
32. Ивашкин В.Т., Драпкина О.М. Клиническое значение оксида азота и белков теплового шока, 2001
33. Марченков В. и соавт. Молекулярные шаперонины прокариотических и эукариотических клеток // Успехи биологической химии, т. 46, 2006, с. 279–237029
34. Наградова Н.К. Внутриклеточная регуляция формирования нативной пространственной структуры белков // Соросовский образовательный журнал, №7, 1996