

**И.В. Бабушкина, А.А. Рунович, Г.Б. Боровский, В.К. Войников, Т.Е. Курильская,
Ю.И. Пивоваров, Б.К. Бадуюев, А.С. Сергеева**

ЭНДОГЕННАЯ ЗАЩИТА МИОКАРДА: РОЛЬ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА В МЕХАНИЗМАХ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ

**НЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН (Иркутск)
СИФИБР СО РАН (Иркутск)**

Рассматриваются возможные механизмы прекогдационной защиты сердца, роль белков теплового шока в ее формировании. Обсуждается использование феномена метаболической адаптации.

Ключевые слова: прекогдационирование, белки теплового шока

ENDOGENOUS PROTECTION OF MYOCARDIUM: ROLE OF HEAT SHOCK PROTEINS IN MECHANISMS OF PRECONDITIONING (REVIEW)

**I.V. Babushkina, A.A. Runovich, G.B. Borovskiy, V.K. Voynikov, T.E. Kuril'skaya,
Yu.I. Pivovarov, B.K. Baduyev, A.S. Sergeeva**

**SC RRS ESSC SB RAMS, Irkutsk
Siberian Institute of Physiology and Biology of Plants SB RAS, Irkutsk**

The authors consider the possible mechanisms of preconditional protection of the heart, and role of heat shock proteins in its formation. The use of metabolic adaptation phenomenon is discussed.

Key words: preconditioning, heat shock proteins

Открытие таких ишемических синдромов как «гибернация», «оглушенность» и метаболическая адаптация миокарда («прекогдационирование») привело к разработке качественно новых подходов в современной клинической практике [22]. Впервые «прекогдационирование» было описано Murry et al. как повышение резистентности миокарда к ишемическому воздействию в результате повторяющихся кратковременных эпизодов сублетальной ишемии, чередующихся с периодами реперфузии [21]. Выделяют два периода прерывистой ишемии: ранний (классическое прекогдационирование) и поздний, получивший название «второго окна защиты». Ранний — защищает миокард в интервале от нескольких минут до 2-х часов. Поздний — развивается через 12–24 часа после адаптационного воздействия и длится до 72 часов [26]. В литературе также распространены следующие названия этого феномена «феномен адаптации к ишемии» [6, 7], «феномен прерывистой ишемии» [4, 14], «феномен ишемической предпосылки» [5] или «аутоиндуцированная толерантность миокарда к ишемии» [8]. Фундаментальные исследования, проведенные в последние годы, показали, что метаболическая адаптация является наиболее эффективным из известных способов защиты клеток от ишемического повреждения. В связи с чем, раскрытие механизмов «аутоиндуцированной толерантности миокарда к ишемии» имеет большое клиническое значение. Целью данного обзора был анализ современных литературных данных, рассматривающих этот феномен.

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ МЕХАНИЗМЫ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АДАПТАЦИИ МИОКАРДА

В последние годы достигнут значительный прогресс в изучении феномена прекогдационирования, однако процессы, лежащие в основе ишемической метаболической адаптации, остаются не до конца понятыми.

Существуют несколько гипотез, объясняющих феномен прекогдационирования. Эффект целого ряда индукторов, таких как аденозин, опиоиды, норадреналин, ацетилхолин и брадикинин, опосредуется через активацию рецепторов, регулируемых G белком (Gi), чувствительным к коклюшному токсину [17]. Так, действие катехоламинов опосредуется через стимуляцию α_1 -адренергических рецепторов, а ацетилхолина — через его действие на мускариновые рецепторы M_2 [15]. Аденозин стимулирует активацию аденозиновых A_1 рецепторов, которая, по мнению ряда авторов, является одним из пусковых элементов реакции адаптации [23]. В свою очередь, активация этих рецепторов, сопряженных с Gi белком, различными лигандами запускает каскад киназных реакций, центральное место в которых занимает протеинкиназа C (ПКС) [17]. Конечным итогом процессов передачи сигнала является фосфорилирование и активация одного или нескольких конечных эффекторов. Имеются данные о том, что одними из этих эффекторов являются АТФ-зависимые калиевые каналы [18, 20]. Открытие АТФ-зависимых K^+ -каналов уменьшает вход Ca^{++} , что приводит к снижению сократительной спо-

способности кардиомиоцитов, уменьшению потребления клетками энергии и расхода АТФ [15]. Кроме того, показана роль АТФ-зависимых K^+ -каналов в формировании механизма так называемого дистанционного прекодиционирования, когда кратковременная региональная ишемия ткани на известном расстоянии от органа мишени способна обеспечить его защиту, сходную по эффективности с локальным ишемическим прекодиционированием [24].

Ацетилхолин и брадикинин, как было показано, запускают прекодиционное состояние по одному механизму, который включает открытие АТФ-зависимых K^+ -каналов и продукцию активных форм кислорода (АФК). Способность брадикинина запускать генерацию АФК в кардиомиоцитах зависит от фосфатидилинозитол 3-киназы, как и в случае для ацетилхолина. Последние исследования показали, что для того, чтобы запустить продукцию АФК как для ацетилхолина, так и для брадикинина требуется активация протеинкиназы В, которая имеет целый ряд фосфорилируемых мишеней в каскаде реакций, включая эндотелиальную синтазу оксида азота [16]. Таким образом, действие ацетилхолина также связано с активацией выработки NO эндотелием, что в свою очередь стимулирует растворимую гуанилатциклазу в кардиомиоцитах и существенно повышает в них уровень циклического гуанилатмонофосфата. Последний вызывает вазодилатацию за счет открытия K^+ -каналов и одновременной блокады входа Ca^{++} через кальциевые каналы [15].

Любопытно, что аденозин, четвертый Gi-сцепленный рецептор, отклоняется от этой общей схемы и обходит как открытие АТР-зависимых калиевых каналов, так и продукцию АФК в его триггерном пути [16]. Также существует мнение, что главной причиной развития аутоиндуцированной толерантности к ишемии является снижение метаболической активности миокарда, проявляющееся в виде снижения скорости распада АТФ, ослабления гликолиза [8].

Все возможные механизмы, перечисленные выше, вносят свой вклад в развитие раннего периода ишемического прекодиционирования. Проявление эффекта «второго окна защиты» связано, в том числе, с усилением экспрессии генов белков теплового шока семейства HSP (heat shock protein).

ФУНКЦИИ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА

Своим названием белки теплового шока обязаны тому случайному обстоятельству, что впервые они были обнаружены в клетках, подвергнутых острому тепловому воздействию. Далее было показано, что синтез HSP увеличивается при разных ситуациях и воздействиях. Поэтому более компромиссным обозначением для этих белков является название «стресс-белки» [9].

HSP отличаются по специфике связывания и клеточной локализации. Большое количество HSP изменяет клеточное распределение в ответ на

стресс. HSP60 считался до недавнего времени митохондриальным белком, но он также обнаружен в цитозоле и от 25 до 30 % суммарного HSP60 имеет цитозольную локализацию в сердце и мышечных клетках в норме. HSP имеют сложную роль в апоптозе, но главенствующая роль это антиапоптотическая. Объединяющая особенность их антиапоптотической роли это ингибирование протеолитического созревания и/или активности каспаз, и расщепление их мишеней-субстратов. Сверхэкспрессия HSP27 и HSP72 предотвращает апоптоз, сверхэкспрессия HSP90 не всегда защищает от апоптоза, а в ряде случаев даже ускоряет его.

Снижение содержания HSP60 ускоряет апоптоз, но в то же время HSP60 ускоряет активацию каспазы 3 при апоптозе. Таким образом, роль HSP60 в апоптозе может быть как про-, так и антиапоптотической, что возможно, зависит от клеточного типа и стимула, вызывающего апоптоз [19].

Наиболее изученным на сегодняшний день является семейство белков теплового шока с молекулярной массой 70 кДа — HSP70. Несмотря на то, что исторически индукция синтеза HSP была обнаружена в условиях стресса, белки этой группы играют существенную роль и в нормальных условиях, отвечая за: 1) образование третичной и четвертичной структур некоторых вновь синтезированных белков; 2) транслокацию белков через мембраны различных органелл клеток; 3) разборку олигомерных белковых комплексов; 4) регуляцию протеолиза нестабильных белков; 5) контроль биологической активности регуляторных белков, в том числе, транскрипционных факторов (рис. 1).

Все эти функции определяются АТФ/АДФ регулируемым связыванием HSP70 с короткими гидрофобными участками на молекуле субстрата,

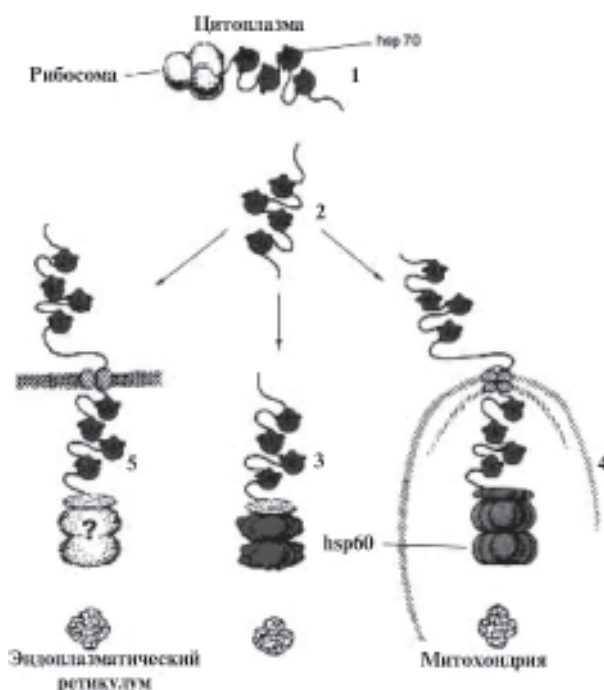


Рис. 1. Функции шаперонов в клетке [13].

предотвращая тем самым дальнейшую сборку или агрегацию, закрывая этот участок. В процессе связывания/высвобождения из комплекса с белком участвуют белки-«помощники»: HSP40, Хип и Хоп. Функция связывания с внутриклеточными белками и оказания им помощи в достижении функциональной конформации получила название «шаперонной», а белки, участвующие в этих процессах, отнесены к классу «молекулярных шаперонов» (фр. *chaperon* – компаньонка) [2, 3].

В условиях стресса общий биосинтез белка снижается, а синтез HSP70 резко увеличивается. При этом большинство HSP70 находится в ядре среди поврежденных в результате стресса прерибосом. Постепенно содержание HSP70 в ядре уменьшается, а в цитоплазме увеличивается. К этому времени поврежденная структура прерибосом восстанавливается, а общий биосинтез достигает исходного дострессорного уровня. В более позднюю фазу после стресса HSP70 накапливаются в цитоплазме (рис. 2) [25].

Известно, что характерным клеточным проявлением стресса является агрегация и накопление денатурированных белков, активация свободнорадикальных процессов и кальциевая перегрузка. Как оказалось, HSP70 могут ограничивать эти сдвиги, дизагрегируя аномальные белковые агрегаты, участвуя в деградации необратимо поврежденных белков, повышая мощность антиоксидантных ферментов и ограничивая повреждающие эффекты кальциевой перегрузки за счет связывания рецептора кальция – кальмодулина. Наконец недавно стали появляться данные еще об одном механизме защитного действия HSP70 – блокаде гиперпродукции оксида азота (NO). Значимость этого эффекта HSP70 определяется тем, что гиперпродукция NO играет ключевую роль в развитии многих патологических состояний, таких как вос-

паление, гипотензия, ишемические повреждения органов и т.д.

РОЛЬ БЕЛКОВ ТЕПЛОвого ШОКА В ПРЕКОНДИЦИОННОЙ ЗАЩИТЕ СЕРДЦА

Развитие ишемического повреждения сердца связано с активацией свободнорадикальных процессов, кальциевой перегрузкой, денатурацией белков, истощением запасов АТФ и глюкозы, накоплением токсических метаболитов и снижением клеточного pH. Все эти факторы в той или иной мере вовлечены в активацию синтеза HSP70. Значение индуцированного ишемией синтеза HSP70 стало понятным при изучении феномена ишемического preconditionирования. Было показано, что кратковременная ишемия (несколько минут), индуцирующая накопление в сердце HSP70, значительно повышает устойчивость миокарда к последующей длительной ишемии. Аналогичная ситуация наблюдается при тепловом preconditionировании, когда синтез HSP70 предварительно стимулируют с помощью теплового шока.

В результате был сделан вывод о том, что активация HSP70 с помощью повреждающих факторов лежит в основе адаптации миокарда к повреждениям (рис. 3) [9].

Необходимо также отметить возможность сопряжения различных потенциальных механизмов феномена preconditionирования сердца. Например, HSP70 и HSP90 являются основными структурными компонентами глюкокортикоидного, стероидного и прогестеронового рецепторов, тем самым участвуя в генерации сигнала после взаимодействия рецептора со своим лигандом. Кроме того, HSP70 связывает рецептор кальция кальмодулин и участвует в регуляции транскрипции NO-синтазы [2].

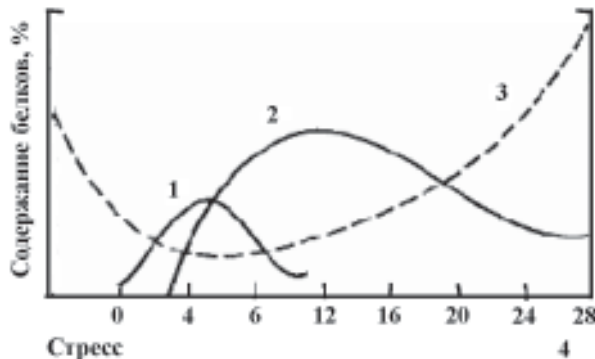


Рис. 2. Влияние перенесенного стресса на внутриклеточное содержание HSP70 и общий белковый синтез [12]. Примечание: по оси абсцисс – время после стресса, ч; по оси ординат: **1** – динамика содержания HSP70 в ядре; **2** – то же в цитоплазме; **3** – динамика постстрессорного восстановления общего белкового синтеза.



Рис. 3. Роль белков теплового шока на основных этапах адаптационной защиты сердца.

**ВОЗМОЖНЫЕ ПОДХОДЫ
К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕХАНИЗМА
ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ**

В настоящее время использование HSP70 в качестве прогностического параметра в клинике сопряжено с рядом трудностей. Сложность клинических исследований состоит в невозможности оценить содержание HSP70 непосредственно в миокарде у нехирургических больных [9], кроме того, методы выявления HSP достаточно трудоемки, чтобы быть введенными в клиническую практику.

Ввиду того, что протективная активность HSP70 была выявлена на значительном числе типов клеток и агентов, специалисты наряду с изучением механизмов этого эффекта переходят к проектированию средств, позволяющих повысить внутриклеточное или внутритканевое содержание этого белка. Существуют два способа увеличения количества HSP70 — трансфекция клеток соответствующим геном под контролем сильного конститутивного промотора и мобилизация клетками или тканью собственных резервов HSP путем нагрева или другими средствами.

Результаты первых экспериментов в этом направлении показывают высокую эффективность метода трансфекции в защите от ишемического повреждения клеток первичной культуры нейронов и глий [10]. Однако, использование этих методов в клинике возможно только при их тщательном и многостороннем изучении.

Альтернативный подход для защиты сердца могут обеспечить методы адаптационной медицины, разрабатываемые профессором Ф.З. Меерсоном и его учениками в течение последних 30 лет. Это направление науки и практики опирается на известное теперь положение о перекрестном защитном эффекте адаптации, который состоит в том, что адаптация к определенному фактору повышает не только устойчивость к нему, но также защищает от многих других факторов и болезней. Так, адаптация к умеренным систематическим физическим нагрузкам уменьшает атерогенные нарушения липидного обмена, улучшает функцию сердца при ишемической болезни и даже после перенесенного инфаркта миокарда [11, 12].

Также недавно было показано, что суспензионные культуры эмбриональных и неонатальных клеток содержат высокий уровень HSP70 и трансплантация клеточных органоидных ксеногенных культур способна значительно увеличить скорость накопления стрессовых белков в клетке, причем только при повреждающем на нее воздействии. Эти исследования открывают несколько новых направлений. Во-первых, перспективным кажется изучение того, сможет ли превентивная, органоспецифическая, клеточная трансплантация защитить сердце от влияния различных патогенных факторов? И, если это возможно, то, как долго будет сохраняться этот эффект? Это открыло бы прямой путь к созданию «защиты» сердечной мышцы от негативных последствий предполагаемого инфаркта миокарда. Во-вторых, не менее важно определить, какие фак-

торы (нуклеиновые кислоты, белки, пептиды, оргanelлы и т.п.) порождают активацию накопления HSP при трансплантации? Ответ на этот вопрос дал бы в перспективе возможность перейти на очищенные лиофилизированные препараты, удобные в применении и, вероятно, более доступные по цене [1]. Кроме того, может быть перспективным использование трансплантации суспензий клеток с повышенным содержанием HSP.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атеросклероз и клеточная терапия / А.А. Руневич, В.К. Войников, Ю.И. Пивоваров и др. — Иркутск, 2005. — 300 с.
2. Аутоиндуцированная толерантность миокарда к ишемии: роль стресс-белков в механизмах ее возникновения / Ю.Л. Шевченко, А.С. Свистов, В.В. Тыренко и др. // Физиология человека. — 1999. — Т. 25, № 1. — С. 134 — 139.
3. Белки теплового шока: новые перспективы миокардиальной цитопротекции / Ю.Л. Шевченко, А.С. Свистов, В.В. Тыренко и др. // Вестник РАМН. — 1999. — № 7. — С. 16 — 20.
4. Гурин А.В. Прерывистая ишемия — уникальный адаптационный феномен. Перспектива новых путей фармакологического воздействия / А.В. Гурин, А.И. Молош, Г.И. Сидоренко // Кардиология. — 1997. — № 6. — С. 45 — 52.
5. Защитный эффект ишемической предпосылки (прекондиционирования): влияние длительности ишемии / А.Н. Хаткевич, С.Н. Дворянцев, В.И. Капелько и др. // Кардиология. — 1998. — № 5. — С. 4 — 8.
6. Каган-Пономарев М.Я. Влияет ли предшествующая инфаркту миокарда стенокардия на его размер, лечение и прогноз? Клинические аспекты феномена адаптации к ишемии / М.Я. Каган-Пономарев, А.Н. Самко, Г.В. Ходеев // Кардиология. — 1998. — № 9. — С. 60 — 64.
7. Кузнецов В.А. Оценка феномена адаптации к ишемии методом суточного мониторинга ЭКГ / В.А. Кузнецов, В.В. Тодосийчук // Кардиология. — 1998. — № 9. — С. 4 — 6.
8. Кулешова Э.В. Аутоиндуцированная толерантность миокарда к ишемии / Э.В. Кулешова, П.А. Казеннов // Рос. физиол. журн. — 1997. — Т. 83, № 11 — 12. — С. 105.
9. Малышев И.Ю. Белки теплового шока и защита сердца / И.Ю. Малышев, Е.В. Малышева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1998. — Т. 126, № 12. — С. 604 — 611.
10. Маргулис Б.А. Белки стресса в эукариотической клетке / Б.А. Маргулис, И.В. Гужова // Цитология. — 2000. — Т. 42, № 4. — С. 323 — 339.
11. Меерсон Ф.З. Защита сердца от ишемических повреждений: роль стресс-лимитирующих систем и стабилизации структур миокарда / Ф.З. Меерсон // Российский кардиологический журнал. — 2001. — № 5 (31). — С. 49 — 59.
12. Меерсон Ф.З. Феномен адаптационной стабилизации структур и защита сердца / Ф.З. Меерсон, И.Ю. Малышев. — М., 1993. — 158 с.

13. Наградова Н.К. Внутриклеточная регуляция формирования нативной пространственной структуры белка / Н.К. Наградова // Соросовский Образовательный Журнал. — 1996. — № 7. — С. 10–18.
14. Феномен прерывистой ишемии у человека и его роль в клинических проявлениях ишемической болезни / Г.И. Сидоренко, А.В. Гурин, Ю.В. Сополева и др. // Кардиология. — 1997. — № 10. — С. 4–16.
15. Шабалин А.В. Защита кардиомиоцита. Современное состояние и перспективы / А.В. Шабалин, Ю.П. Никитин // Кардиология. — 1999. — № 3. — С. 4–10.
16. Acetylcholine and bradykinin trigger preconditioning in the heart through a pathway that includes Akt and NOS / T. Krieg, Q. Qin, S. Philipp et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2004. — N 287. — P. 2606–2611.
17. Brooks G. Role of protein kinase C in ischemic preconditioning: player or spectator? / G. Brooks, D. Hearse // *Circ. Res.* — 1996. — N 79. — P. 627–630.
18. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanisms of cardioprotection / K.D. Garlid, P. Paucek, V. Yarov-Yarovoy et al. // *Circ. Res.* — 1997. — N 81. — P. 1072–1082.
19. Gupta S. HSP60, Apoptosis and the Heart / S. Gupta, A.A. Knowlton // *J. Cell. Mol. Med.* — 2005. — Vol. 9, N 1. — P. 51–58.
20. Mitochondrial ATP dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection / Y. Liu, T. Sato, B. O'Rourke et al. // *Circulation.* — 1998. — N 97. — P. 2463–2469.
21. Murry C.E. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium / C.E. Murry, R.B. Jennings, K.A. Reimer // *Circulation.* — 1986. — N 74. — P. 1124–1136.
22. Opie L.H. Недавно выявленные ишемические синдромы и эндогенная цитопротекция миокарда: их роль в клинической кардиологии сегодня и в будущем / L.H. Opie // *Медикография.* — 1999. — Т. 21, № 2. — С. 65–73.
23. Protect against infarction afforded by preconditioning is mediated by A₁ adenosine receptors in rabbit heart / G.S. Liu, J. Thornton, D.M. Van Winkle et al. // *Circulation.* — 1991. — N 84. — P. 350–356.
24. Remote preconditioning reduces ischemic injury in the explanted heart by a K ATP channel-dependent mechanism / S.B. Kristiansen, O. Henning, R.K. Kharbanda et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2005. — N 288. — P. 1252–1256.
25. Welch W.J. Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress / W.J. Welch, J.P. Suhan // *J. Cell. Biol.* — 1986. — N 103. — P. 2035–2052.
26. Yellon D.M. Эндогенная защита миокарда: значение метаболической адаптации («прекондиционирования») / D.M. Yellon, A. Dana, J.M. Walker // *Медикография.* — 1999. — Т. 21, № 2. — С. 80–83.