

◆ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2004

УДК 612.173.1.06:612.018.1.08

Л. Е. Панин, В. Ф. Максимов, А. Р. Колпаков, И. М. Коростышевская

ВЛИЯНИЕ АДРЕНАЛИНА И КОРТИКОСТЕРОНА НА ЗАХВАТ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АТЕРОГЕННЫХ И АНТИАТЕРОГЕННЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ В МИОКАРДЕ¹

ГУ НИИ биохимии (дир. — акад. РАМН Л. Е. Панин) Сибирского отделения РАМН, Новосибирск

В модели перфузируемого по Лангендорфу сокращающегося сердца крыс с использованием методов электронной микроскопии показано влияние адреналина, кортикостерона, ЛПВП и ЛПНП на миокард, а также выявлена роль гормонов в захвате и межклеточном распределении меченных коллоидным золотом липопротеинов. Адреналин усиливал растворение ЛПНП на поверхности эндотелия, замедлял их проникновение в миокард, но не влиял на проникновение и распределение меченых ЛПВП, которые не покидали стенки капилляров. Кортикостерон резко увеличивал рецепторопосредованное поглощение ЛПВП эндотелием капилляров и обеспечивал их проникновение в интерстициальные макрофаги, но не оказывал влияния на проникновение меченых ЛПНП в миокард. Кортикостерон во всех опытах вызывал снижение содержания гликогена в мышечных клетках сердца, секвестрацию в саркоплазме его остатков и выделение их в интерстиций. Адреналин и кортикостерон по-разному влияют на проникновение и распределение в миокарде атерогенных и антиатерогенных липопротеинов. В условиях стресса это обеспечивает мобилизацию разных метаболических путей для энергообеспечения миокарда.

Ключевые слова: адреналин, кортикостерон, липопротеины, атерогенность, миокард.

An electron microscopic study of a model of the rat contracting heart perfused by the Langendorff procedure has indicated the myocardial effects of epinephrine, corticosterone, high density lipoproteins (HDL), and low density lipoproteins (LDL) and revealed a role of hormones in the uptake and intercellular distribution of colloidal gold-labeled lipoproteins. Epinephrine enhanced LDL dissolution onto the endothelial surface, by slowing down their myocardial penetration, but failed to affect the penetration and distribution of labeled HDL that did not leave the capillary walls. Corticosterone drastically increased receptor-mediated absorption of HDL by the capillary endothelium and ensured their penetration into the interstitial macrophages, but it did not affect the myocardial penetration of labeled LDL. In all experiments, corticosterone caused the lowered content of glycogen in the myocardial cells, sarcoplasmic sequestration of its residues and their interstitial release. Epinephrine and corticosterone differently affect the myocardial penetration and distribution of atherogenic and antiatherogenic lipoproteins. Under stress, it ensures mobilization of different metabolic pathways for myocardial energy supply.

Key words: epinephrine, corticosterone, lipoproteins, atherogenicity, myocardium.

Роль липопротеинов (ЛП) в развитии сердечно-сосудистой патологии в литературе обсуждается в разных аспектах: в связи с влиянием гормонов стресса и активацией лизосомального аппарата клеток [6], с развитием аутоиммунных процессов [1], нарушением обмена насыщенных и ненасыщенных жирных кислот [10] и др. Однако влияние катехоламинов, глюкокортикоидов и ЛП крови (атерогенных и антиатерогенных) непосредственно на миокард в литературе практически не раскрыто. Это особенно справедливо по отношению к ЛП, которые являются важнейшим поставщиком жирных кислот как энергетического материала во многие ткани, в том числе в сердце. В условиях стресса регуляторное влияние катехоламинов и глюкокортикоидов на энергетику миокарда дополняется регуляторными свойствами отдельных аполипипропротеинов (апо-ЛП). Например, апоСII повышает активность липопротеинлипазы [14], апоAI — активность ЛХАТ [15]. Можно говорить и о других регуляторных свойствах апо-ЛП. Нами впервые было показано, что апоAI присутствует также в ядрах многих клеток, в том числе в сердце [7]. Оказалось, что в комплексе с восстановленными формами сте-

роидных гормонов (тетрагидросоединениями) они участвуют в регуляции экспрессии генов [7, 8].

В данной работе мы попытались оценить влияние адреналина, кортикостерона, ЛП высокой (ЛПВП) и низкой (ЛПНП) плотности на миокард в модели перфузируемого сокращающегося сердца крыс, а также показать роль гормонов в захвате и межклеточном распределении атерогенных и антиатерогенных ЛП.

Материалы и методы

В опытах с перфузией сердца по Лангендорфу использовали крыс линии Вистар массой около 300 г. Перфузатом служил буферный раствор Кребса—Хензелята [3]. В перфузионный раствор добавляли меченные коллоидным золотом сывороточные ЛПНП (1,006—1,063 г/мл, 15—20 мг%) или ЛПВП (1,063—1,21 г/мл, 200—250 мг%) (6 опытов). В других сериях в перфузат добавляли ЛП совместно с адреналином в концентрации 1 мг/л (6 опытов) или кортикостероном 2 мг/л (8 опытов). Контролем служили 5 опытов с перфузией сердца раствором Кребса—Хензелята и 7 опытов с добавлением гормонов без ЛП.

Скорость гликогенолиза в сердце определяли у крыс линии Вистар массой 180—200 г. Животных забивали под легким эфирным наркозом, сердце извлекали и отмывали от крови в охлажденном

¹Работа выполнена при поддержке Регионального общественного фонда содействия отечественной медицине.

трис-НСI-буфере рН 7,4. После гомогенизации и центрифугирования при 50 000 g в течение 30 мин получали надосадок, в котором гликогенолиз изучали в реконструированной системе, содержащей все необходимые для этого кофакторы и субстраты. Состав среды инкубации: 20 мМ трис-НСI-буфера рН 7,4, 7 мМ фосфатного буфера рН 7,4, 5 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ НАД, 1 мМ АТФ, 5 мМ никотинамида, 2 мМ цистеина и 0,1% раствор гликогена. Содержание лактата определяли по НАДФ при длине волны 340 нм и выражали в наномолях в минуту на 1 мг белка.

Для электронно-микроскопического исследования миокард левого желудочка после 30 мин перфузии фиксировали в 2,5% растворе глutarальдегида и 2% растворе параформальдегида, дофиксировали в 1,5% растворе OsO_4 , заливали в смесь эпон с аралдитом. Ультратонкие срезы контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца, просматривали в электронном микроскопе JEM 100SX при увеличении от 5 до 20 тыс. раз. Оценивали распределение метки (в процентах от общего количества), подсчитывая гранулы золота в эндотелиоцитах, макрофагах и интерстициальном пространстве на площади среза $0,01 \text{ мкм}^2$. Определяли распределение метки в инвагинациях, эндосомах, лизосомах и свободно в цитоплазме эндотелиоцитов (в процентах от количества гранул в эндотелии). Проводили качественный анализ структур кардиомиоцитов и интерстициальных макрофагов.

Статистическую обработку данных проводили в пакете Statgraphics 4.0. Различия оценивали с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни при 5% уровне значимости.

Результаты и их обсуждение

В проведенных экспериментах в режиме рециркуляции раствором Кребса—Хензеляйта сердце могло работать достаточно стабильно, поддерживая частоту и амплитуду сокращений, а также величину коронарного потока постоянными не менее 2 ч.

Влияние адреналина и кортикостерона на биохимические и структурные характеристики миокарда

Добавление в перфузионную среду адреналина вызывало увеличение коронарного потока, амплитуды и частоты сокращений в среднем в 1,5 раза. Морфологически при этом микроциркуляторное русло было расширено, а в кардиомиоцитах выявлены пересокращения миофибрилл, расширения каналов саркоплазматической сети и плотные осадки в митохондриях, что соответствует ультраструктурным признакам легкой кальциевой перегрузки по В. Г. Шарову [11]. В цитоплазме некоторых кардиомиоцитов на месте гликогена располагалась пылевидная зернистость.

Известно, что увеличение сократительной активности миокарда под влиянием адреналина связано не только с повышением коронарного кровотока и обеспечением сердца кислородом, но и с активацией гликогенолиза. Возможно, последний

механизм является определяющим. Он связан с возрастанием концентрации цАМФ в ткани и активности фосфорилазы под влиянием адреналина [19]. Оказалось, что цАМФ в концентрации 10^{-4} — 10^{-3} М значительно повышал скорость гликогенолиза как в сердце, так и в мышцах (табл. 1). Этот процесс был выражен в еще большей степени под влиянием АМФ — специфического активатора фосфорилазы В. Полученные биохимические результаты хорошо согласуются с картинами распада гликогена в кардиомиоцитах под влиянием адреналина, выявленного с помощью электронной микроскопии.

Добавление кортикостерона в перфузат не оказывало существенного влияния на сердечную деятельность, не уменьшало перфузионные изменения в миокарде, выявленные в контрольных опытах с раствором Кребса—Хензеляйта [2], что подтверждает отсутствие прямого влияния кортико-стероидов на работу сердца [4]. Однако при этом снижалось содержание гликогена в мышечных клетках сердца, наблюдались его секвестрация в саркоплазме и выделение остатков в интерстиций. Механизм повышенного распада гликогена под влиянием кортикостерона аналогичен вышеописанному. Он связан с возможностью действия гормона через β -адренорецепторы как в случае с адреналином [6], т. е. с повышением активности фосфорилазы под влиянием цАМФ.

Влияние ЛПВП и ЛПНП на ультраструктуру миокарда

Добавление в перфузат нативных ЛПНП не отражалось на сократительной способности миокарда, а ЛПВП в тех же условиях увеличивали частоту и амплитуду сокращений. Повышение работоспособности сердца под влиянием ЛПВП мы связываем с активацией гликолиза. Ранее нами было показано, что под влиянием ЛПВП происходит повышение скорости гликолиза в печени [5], однако механизм этого явления остался нераскрытым. Электронно-микроскопические исследования показали, что за 30 мин меченые ЛП обоих классов взаимодействовали с эндотелиоцитами (табл. 2). Более активно рецепторопосредованным путем захватывались ЛПВП и располагались в опущенных пузырьках, не покидая стенки капилляров. ЛПНП проникали в интерстиций быстрее и накапливались в лизосомах активированных макрофагов

Таблица 1

Влияние цАМФ в различных концентрациях и АМФ на гликогенолиз в сердечной и скелетной мышцах крыс

Ткань	Без добавок (контроль)	цАМФ		АМФ
		10^{-4} М	10^{-3} М	10^{-3} М
Сердце	$61 \pm 8,6$	$74 \pm 10,0^*$	$73 \pm 9,7^*$	$94 \pm 8,0^*$
Мышца	$93 \pm 10,4$	$113 \pm 15,0^*$	$121 \pm 13,7^*$	$163 \pm 18,0^*$

При м е ч а н и е. Скорость гликогенолиза дана в наномолях лактата в минуту на 1 мг белка ($M \pm m$). В каждой группе было по 7 животных. * — статистически значимые различия с контролем при $p < 0,05$.

Таблица 2

Число (М, min—max) и распределение метки внутри эндотелиальных клеток (в %) при перфузии изолированного сердца крыс мечеными ЛП и гормонами

Условия опыта	Число метки в 0,01 мм ²	Расположение, %		
		контакт	эндосомы	свободно
ЛПНП	21 (8—42)	45	47	8
Ад + ЛПНП	70 (51—90)	84	14	—
Кс + ЛПНП	13 (10—18)	77	23	—
ЛПВП	153 (146—163)	56	38	6
Ад + ЛПВП	125 (96—151)	72	28	—
Кс + ЛПВП	651 (509—787)	30	68	2

Примечание. Ад — адреналин, Кс — кортикостерон.

(рис. 1). Качественный и морфометрический анализ доказал, что ЛП предохраняют ультраструктуру капилляров и кардиомиоцитов от перфузионных повреждений [3].

Влияние адреналина и кортикостерона на связывание и распределение ЛП в миокарде

Совместное добавление адреналина и меченых ЛПВП в перфузат не влияло на проникновение и распределение последних в миокарде. Метки на срезах было достаточно много, но она, как и в опытах без адреналина, не выявлялась за пределами сосудистого русла (см. рис. 1). При этом почти 3/4 метки находилось на люминарной поверхности эндотелиоцитов и в опущенных инвагинациях, остальная часть — в опущенных пузырьках (см. табл. 2). В этих опытах эндотелиоциты и макрофаги приобретали ультраструктурные признаки активного функционирования. Кардиомиоциты содержали активированные ядра с минимальным количеством гетерохроматина, многочисленными порами в оболочке и очень крупными ядрышками нуклеонного строения. В саркоплазме встречались умеренные обратимые повреждения, характерные для функционального перенапряжения органоидов. Известно, что ЛПВП являются активным участником липолитических процессов, обеспечивающих ткани свободными жирными кислотами [10].

При совместном добавлении адреналина и ЛПНП количество метки, связанной с эндотелием, возрастало в 3 раза, а ее распределение свидетельствовало о более медленном проникновении в ткани по сравнению с ЛПНП без адреналина (см. рис. 1, табл. 2). Абсолютное большинство метки (см. табл. 2) располагалось в контакте с люминарной поверхностью эндотелиоцитов (прилипание и инвагинации). За 30 мин перфузии с адреналином в макрофаги проникало только 11% метки, при этом она концентрировалась исключительно в эндосомах (рис. 2, см. на вклейке), в то время как без адреналина метки в макрофагах фиксировалось в 4 раза больше (см. рис. 1), и почти половина ее располагалась уже в лизосомах. В этих опытах были выявлены некоторые особенности проникновения в миокард меченых ЛПНП, которые не поглощались целиком, а претерпевали частичное разрушение (лизис) на поверхности эндотелиоцитов. Это

хорошо согласуется с данными о том, что липопротеинлипаза способна связываться с мембранами эндотелиальных клеток через глюкозаминогликаны и одновременно взаимодействовать с ЛП [1]. В этом случае количество фермента определяет число ЛП частиц, которое он удерживает на поверхности клеток [13]. Таким образом, регулируется поступление главного энергетического материала — жирных кислот в миокард. Есть данные о том, что кардиотоксическое действие катехоламинов обусловлено увеличением образования свободных радикалов [17]. Способность ЛП связывать свободные радикалы может лежать в основе их кардиопротекторного эффекта [12, 16].

При совместной перфузии сердца кортикостероном и ЛП обоих классов отмечены уменьшение содержания гликогена в клетках, секвестрация его внутри кардиомиоцитов, отделение участков цитоплазмы с остатками гликогена (клазматоз) в интерстиции и капиллярное русло. Данный эффект, вероятно, связан с относительным избытком гормона по отношению к ЛП.

Добавление кортикостерона вызывало увеличение числа связанной с эндотелием метки почти в 5 раз по сравнению со всеми другими опытами с ЛПВП (см. рис. 1). Резкое усиление рецепторопосредованного эндцитоза (рис. 3, см. на вклейке) в эндотелии проявлялось в том, что метка накапливалась преимущественно в опущенных пузырьках (см. табл. 2). К концу эксперимента много метки располагалось около базальной поверхности эндотелия, где зафиксированы многочисленные картины открытия эндосом. Иногда скопления гранул располагались вблизи расширенных межклеточных контактов, что не исключало их выход, минуя эндотелиоциты. Принципиальное отличие опытов с кортикостероном и ЛПВП заключалось в том, что метка была обнаружена в интерстиции и макрофагах, хотя и в небольшом количестве (см. рис. 1). Неожиданной находкой явилось обнаружение ме-

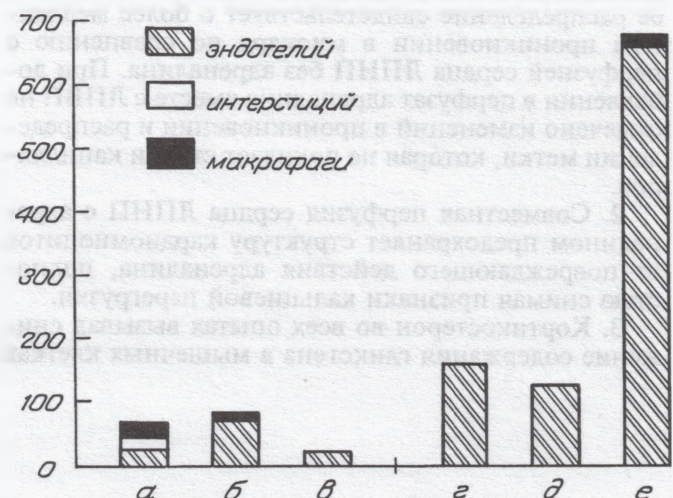


Рис. 1. Влияние гормонов стресса на количество и распределение меченных коллоидным золотом ЛП в миокарде через 30 мин перфузии сердца in vitro.

Ад — адреналин, Кс — кортикостерон.

По оси ординат — число метки в 0,01 мм².

а — ЛПНП; б — Ад + ЛПНП; в — Кс + ЛПНП; г — ЛПВП; д — Ад + ЛПВП; е — Кс + ЛПВП.

ченных комплексов не только в эндотелии и интерстиции, но и в просветах лимфатических сосудов, которые располагались в тесном сплетении с кровеносными капиллярами (в подсчетах эту метку не учитывали).

Известно, что ЛПВП связывают и переносят широкий набор глюкокортикоидов [9]. В данном случае коллоидным золотом визуализируется сложный комплекс ЛП с кортикостероном. Можно предположить, что этот комплекс поглощается значительно активнее, чем просто ЛПВП. Возможно, в сердце, как и в печени, срабатывает кооперативный эффект ЛПВП и глюкокортикоидов, направленный на активацию генома и усиление биосинтеза белка в клетках [2, 18]. Это свидетельствует о том, что ЛП крови могут не только принимать участие в транспорте различных лигандов (гормонов), но вместе с ними оказывать регуляторное влияние на геном клеток.

При совместном введении ЛПНП и кортикостерона убедительно показано их стимулирующее влияние на функциональные показатели сердца. Большая часть кардиомиоцитов находилась в состоянии мягкого пересокращения, лишь некоторые из них имели признаки умеренного миоцитоллиза. Просветы большинства капилляров были расширены, иногда очень сильно. Метки, связанной с эндотелием (см. рис. 1), было очень мало (13 на $0,01 \text{ мм}^2$), в основном она находилась в связи с ЛП на люминарной поверхности и в инвагинациях, и лишь единичные гранулы располагались в опущенных пузырьках (см. табл. 2). Это можно объяснить активно протекающим процессом липолиза на поверхности эндотелия, обеспечивающим миокард свободными жирными кислотами.

Выводы

1. Адреналин усиливает растворение меченных коллоидным золотом ЛПНП на поверхности эндотелия, общее число связанной метки возрастает, а ее распределение свидетельствует о более медленном проникновении в миокард по сравнению с перфузией сердца ЛПНП без адреналина. При добавлении в перфузат адреналина вместе с ЛПВП не отмечено изменений в проникновении и распределении метки, которая не покидает стенки капилляров.

2. Совместная перфузия сердца ЛПНП с адреналином предохраняет структуру кардиомиоцитов от повреждающего действия адреналина, полностью снимая признаки кальциевой перегрузки.

3. Кортикостерон во всех опытах вызывал снижение содержания гликогена в мышечных клетках

сердца, секвестрацию в саркоплазме его остатков и выделение их в интерстиций.

4. Добавление в перфузат ЛПВП совместно с кортикостероном в 5 раз усиливало их рецепторопосредованное поглощение эндотелием капилляров и обеспечивало их проникновение в интерстициальные макрофаги. Кортикостерон затруднял проникновение меченых ЛПНП в миокард при их совместном добавлении в перфузат по сравнению с аналогичными опытами без гормона.

5. Адреналин и кортикостерон по-разному влияют на проникновение и распределение в миокарде ЛПНП и ЛПВП. В условиях стресса это обеспечивает мобилизацию разных метаболических путей для энергообеспечения миокарда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Климов А. Н., Никульчева Н. Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения: Руководство для врачей. — СПб., 1999.
2. Максимов В. Ф., Коростышевская И. М. // Бюл. СО РАМН. — 1998. — Т. 89, № 3. — С. 47–51.
3. Максимов В. Ф., Колпаков А. Р., Коростышевская И. М. и др. // Цитология. — 2002. — Т. 44, № 1. — С. 40–47.
4. Опи Л. Х. // Физиология и патофизиология сердца / Под ред. Н. Сперелакиса: Пер. с англ. — М., 1990. — Т. 2. — С. 7–63.
5. Панин Л. Е. Биохимические механизмы стресса. — Новосибирск, 1983.
6. Панин Л. Е., Маянская Н. Н. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении. — Новосибирск, 1987.
7. Панин Л. Е., Русских Г. С., Поляков Л. М. // Биохимия. — 2000. — Т. 65, № 12. — С. 1684–1689.
8. Панин Л. Е., Клейменова Е. Ю. // Иммунология. — 2002. — № 4. — С. 206–208.
9. Поляков Л. М., Панин Л. Е. // Успехи соврем. биол. — 2000. — Т. 120, № 3. — С. 275–282.
10. Титов В. Н. Атеросклероз как патология полиеновых жирных кислот. Биологические основы теории атерогенеза. — М., 2002.
11. Шаров В. Г., Игашев Ш. Б., Мавроди Д. И., Могилевский Г. М. // Ультразвуковая структура сердца. — Ташкент, 1988. — С. 53–65.
12. Ahoitupa M., Ruutu M., Mantyla E. // Clin. Biochem. — 1996. — Vol. 29, N 2. — P. 139–144.
13. Amies D., Greten H. // Esterases, Lipases, and Phospholipases: From Structure to Clinical Significance. — 1994. — P. 121–128.
14. Baggio G., Manzato E., Gabelli C. et al. // J. Clin. Invest. — 1986. — Vol. 77. — P. 520–527.
15. Jones A. // J. Lipid Res. — 1986. — Vol. 27. — P. 689–698.
16. Matsumoto F., Mitchell A., Kurata H. et al. // J. Biol. Chem. — 1997. — Vol. 272, N 27. — P. 16778–16789.
17. Noronha-Dutra F. F., Steen-Dutra E. M., Woolf N. // Br. Heart J. — 1991. — Vol. 65, N 6. — P. 322–325.
18. Panin L. E., Usynin I. F., Kharkovski A. V. et al. // Cells of the Hepatic Sinusoid. — 1997. — Vol. 6. — P. 156–157.
19. Sutherland E. W., Rall T. W. // Pharmacol. Rev. — 1960. — Vol. 42. — P. 265.

Поступила 28.02.03