

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ГОРМОНЫ СТРЕССА И КОРОНАРНЫЙ СИНДРОМ Х
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ)Л.Е. Панин¹, П.В. Мокрушников¹, Р.А. Князев¹, А.Р. Колпаков¹, Б.Н. Зайцев²¹ ФГБУ «НИИ биохимии» СО РАМН, 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2² ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово

Экспериментальными исследованиями показано, что гормоны стресса (кортизол, адреналин) взаимодействуют с эритроцитарными мембранами, приводя к грубым структурным изменениям, сопровождающимся повышением микровязкости мембран как в области липид-липидных, так и белок-липидных взаимодействий. Природа этих изменений обусловлена одновременным взаимодействием активных групп гормонов (NH, OH и их гидрофобных колец) с липидным и белковым компонентом мембраны с образованием сложных доменов. Эксперименты с перфузируемым сердцем крыс показали, что эритроциты с повышенной микровязкостью мембран не способны продвигаться по капиллярному руслу. Это приводит к резкому снижению коронарного потока и быстрой остановке сердца. Высказано предположение, что данный механизм проявляется и при коронарном синдроме Х у человека.

Ключевые слова: коронарный синдром Х, микровязкость мембран, гормоны стресса, структурные изменения мембран эритроцитов.

Термин «коронарный синдром Х» используется во врачебной практике с 1973 г. В зарубежной литературе он обозначается как кардиальный синдром Х (синоним – микроваскулярная стенокардия [1]). Такая формулировка диагноза ставит его в один ряд с ишемической болезнью сердца (ИБС). Эта форма сердечно-сосудистой патологии сегодня встречается более чем в 20 % случаев. Публикуется достаточно много работ, направленных на выяснение механизма возникновения данного синдрома. Клинически он проявляется стенокардией напряжения, на ЭКГ – депрессией сегмента ST ишемического типа без ангиографических признаков сужения коронарных артерий и при нормальной функции левого

желудочка, возникает чаще всего в состоянии эмоционального или физического напряжения [2, 3]. Большой вклад в его появление вносит эндотелиальная дисфункция, которая способствует развитию микроваскулярной ишемии [4]. Часто коронарному синдрому Х сопутствует метаболический синдром. У больных с таким заболеванием в сыворотке крови значительно выше, чем в контрольной группе, содержание общего холестерина, холестерина липопротеидов низкой плотности и триглицеридов. Содержание последних положительно коррелирует с активностью гамма-глутаминтрансферазы [5].

Отсутствие четких представлений о патогенезе коронарного синдрома Х привело к тому,

Панин Лев Евгеньевич – академик РАМН, директор, e-mail: ibch@soramn.ru

Мокрушников Павел Валентинович – канд. физ.-мат. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии клетки, e-mail: pwm64@ngs.ru

Князев Роман Александрович – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов межклеточных взаимодействий, e-mail: Knjazev@soramn.ru

Колпаков Аркадий Ростиславович – д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии клетки

Зайцев Борис Николаевич – канд. физ.-мат. наук, зав. лабораторией ультраструктурных исследований, e-mail: borzay@ngs.ru

что на данный момент нет достаточно обоснованных методов его лечения. Рекомендуется применение статинов, ингибиторов ангиотензин-превращающего энзима, эстрогенов, изменение питания и образа жизни [4].

Ранее нами было показано, что метаболические изменения, характерные для коронарного синдрома Х, развиваются под влиянием гормонов стресса (адреналина и кортизола) [6]. Увеличение продукции этих гормонов всегда наблюдается в условиях эмоционального и физического напряжения. Прогностически особенно опасно длительное психоэмоциональное напряжение, которое приводит к переизбытку гормонов стресса в крови. Известно, что гормоны стресса легко взаимодействуют с эритроцитами [7]. Возникает вопрос, не может ли это приводить к структурным изменениям эритроцитарных мембран и повышению их микровязкости? Если данные изменения происходят даже в части эритроцитов, то в капиллярах сердца они могут снижать скорость кровотока до критической величины и вызывать появление ишемических болей и даже остановку сердца. Представленная работа посвящена экспериментальной проверке вклада этого механизма в развитие коронарного синдрома Х.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Атомно-силовая микроскопия эритроцитов.

Эритроциты получали из свежeweыделенной крови после декапитации самцов крыс линии Вистар под легким нембуталовым наркозом. Кровь разбавляли втяеро изотоническим фосфатным буфером рН 7,35, содержащим 0,043 М KH_2PO_4 и 0,136 М Na_2HPO_4 . После осаждения клеток с помощью центрифугирования при 330 g в течение 10 мин надосадочную жидкость сливали и процедуру повторяли еще 2 раза. Все опыты проводились при 4 °С. К взвеси добавляли гормон и наносили на предметное стекло, делали тонкий мазок. После предварительного подсушивания на воздухе влажностью 40 % просматривали в атомно-силовом микроскопе «Solver Bio» (NT-MDT, Россия) в полуконтактном режиме при температуре 24 °С. Использовались зонды NSG11 (NT-MDT, Россия) с резонансной частотой от 120 до 180 кГц и константой упругости ~ 6 Н/м.

Флюоресцентный анализ теней эритроцитов.

Измерения флюоресценции проводили на спектрофлуориметре «Шимадзу» RF-5301(PC)SCE. В кварцевую кювету размером $1 \times 1 \times 4$ см³ наливали 4 мл гипотонического фосфатного буфера, содержащего 2,75 мМ KH_2PO_4 и 8,5 мМ Na_2HPO_4 , рН 7,35 и тени эритроцитов. Концен-

трацию белков теней определяли методом Варбурга и Кристиана по изменению оптической плотности взвеси [7]. В среднем она колебалась в пределах 0,100–0,250 мг/мл.

Кювету с взвесью теней помещали в термостат спектрофлуориметра на один час. Выход температуры в кювете на стационарный режим контролировали электронным термометром. Во всех экспериментах температура в кювете была 36 °С. После выхода температуры в кювете на стационарный режим проводили контрольные измерения интенсивности собственной флюоресценции остатков триптофана в белках мембран. Снимался спектр излучения триптофана в диапазоне $300 \text{ нм} \leq \lambda \leq 400 \text{ нм}$ при длине волны возбуждения $\lambda = 281 \text{ нм}$, при этом максимум интенсивности излучения приходился на $\lambda = 332 \text{ нм}$. Среднее значение интенсивности излучения получали графически после непрерывного измерения его в течение 4 мин. Спектральная ширина щелей 1,5/10. Спектр поглощения триптофана снимали в диапазоне $220 \text{ нм} \leq \lambda \leq 300 \text{ нм}$ при длине волны излучения $\lambda = 332 \text{ нм}$. Кортизол фирмы «SERVA» растворяли в смеси диметилсульфоксид (ДМС) – этанол (1:1 об.). Концентрация гормона в исходном маточном растворе составляла 10^{-3} М. При необходимости данный раствор разбавляли фосфатным гипотоничным буфером до нужной концентрации. Готовили также раствор адреналина или кортизола в том же буфере с концентрацией 10^{-6} М. Время инкубации гормонов с тенями составлял один час. Снимали спектры поглощения и излучения, измеряли среднее значение интенсивности излучения.

При вычислениях в величину интенсивности излучения F и интенсивности поглощения D вносились поправки на разведение взвеси после внесения раствора с гормоном, тушение излучения триптофана растворителем (смесью ДМС и этанола), собственное свечение гормонов и испарение воды из кюветы. Для получения поправки на растворитель проводили титрование взвеси теней растворителем. Для контрольного образца теней были сняты спектры поглощения, далее к этому образцу было добавлено 10 мкл смеси ДМС и этанола (1:1 об.). Через час снова были сняты спектры поглощения. Установлено, что растворитель вызывает уменьшение максимума интенсивности поглощения триптофана $\lambda = 227,8 \text{ нм}$ на 33 % и его длинноволновое смещение до $\lambda = 230,2 \text{ нм}$. Интенсивность максимума поглощения для $\lambda = 281 \text{ нм}$ изменялась лишь на 1,3 % без длинноволнового смещения. Максимум интенсивности излучения контрольного образца регистрировался при $\lambda = 332 \text{ нм}$,

он смещался после добавления растворителя, но его интенсивность уменьшилась на 1,3 %. Измеряли спектры поглощения, излучения, а также среднее значение интенсивности излучения до и после добавления гормонов. Кортизол имел весьма незначительную интенсивность собственной флуоресценции. Адреналин имел высокую интенсивность собственной флуоресценции при $\lambda=332$ нм, поэтому для него снимался только спектр поглощения.

Измерение микровязкости мембран эритроцитов. Тени эритроцитов получены после гемолиза в гипотоническом фосфатном буфере (рН 7,35), содержащем 2,75 мМ KH_2PO_4 и 8,5 мМ Na_2HPO_4 . Тени осаждались центрифугированием при 5500 г, надосадочная жидкость сливалась. Процедура повторялась четыре раза. Получение и хранение теней проводилось при 4 °С. Микровязкость мембран эритроцитов измеряли спектрофлуориметром «Шимадзу» RF-5301(PC)SCE. Опытный образец готовили следующим образом. В кварцевую кювету размером $1 \times 1 \times 4$ см³ наливали 4 мл гипотонического фосфатного буфера (рН 7,35), содержащего 2,75 мМ KH_2PO_4 и 8,5 мМ Na_2HPO_4 , тени эритроцитов, необходимое количество гормона, флуоресцентный зонд пирен. Все компоненты до этого хранились при 4 °С.

Концентрация белка теней в кювете составляла 0,100 – 1,250 мг/мл, пирена – $7,76 \cdot 10^{-6}$ М. Пирен разводился в этаноле, его исходная концентрация составляла $1,5 \cdot 10^{-3}$ М. Пробу энергично встряхивали в течение одной минуты, затем помещали в термостат спектрофлуориметра на 10 мин, после чего измеряли флуоресценцию при температуре 36 °С.

Для измерения флуоресценции теней при нагружении их другим количеством гормонов готовилась новая проба. Такая процедура связана с тем, что пирен способствует быстрой деградации мембран эритроцитов.

Микровязкость липидного бислоя вблизи мембранных белков (область белок-липидного взаимодействия) измеряли при длине волны возбуждения $\lambda = 281$ нм и спектральной ширине щелей 1,5/5, вдали от мембранных белков (область липид-липидного взаимодействия) – при $\lambda = 337$ нм и спектральной ширине щелей 1,5/3. Максимумы излучения наблюдались при $\lambda = 374$ и 393 нм (вибронные пики излучения мономеров пирена) и $\lambda = 468$ нм (максимум излучения димеров пирена).

Относительная микровязкость мембран описывалась отношением $L = \eta(A)/\eta(0)$, где $\eta(A)$ и $\eta(0)$ – микровязкости мембран при добавлении во взвесь гормонов концентрации A и без до-

бавления гормона соответственно. Для области липид-липидного взаимодействия относительная микровязкость L вычислялась по формуле

$$L = \frac{\eta(A)}{\eta(0)} = \frac{F_{468}(0)}{F_{468}(A)} \cdot \frac{F_{393}(A)}{F_{393}(0)},$$

где $F_{468}(A)$ – интенсивность флуоресценции пирена при $\lambda = 468$ нм с концентрацией A гормона во взвеси; $F_{468}(0)$ – интенсивность флуоресценции пирена при $\lambda = 468$ нм при отсутствии гормона во взвеси; $F_{393}(A)$ и $F_{393}(0)$ – интенсивность флуоресценции пирена при $\lambda = 393$ нм с концентрацией A гормона во взвеси и при отсутствии гормона во взвеси соответственно.

Для области белок-липидного взаимодействия относительная микровязкость L вычислялась следующим образом:

$$L = \frac{\eta(A)}{\eta(0)} = \frac{F_{468}(0) - I_{468}}{F_{468}(A) - I_{468}} \cdot \frac{F_{393}(A) - I_{393}}{F_{393}(0) - I_{393}},$$

где I_{393} , I_{468} – интенсивность флуоресценции триптофановых остатков в мембранных белках при $\lambda = 393$ и 468 нм соответственно. Относительная погрешность измерения относительной микровязкости равна 6 %.

Перфузия изолированного сердца крысы. Изолированное сердце получали от крыс массой 250–300 г. За час до опыта животным внутривенно вводили гепарин в дозе 500 ЕД на крысу. После декапитации сердце быстро извлекали и канюлировали аорту. Перфузию проводили по Лангердорфу под постоянным давлением 60 см водяного столба. Для этого использовали модифицированный буфер Кребса–Хензеляйта [8] рН 7,4 при насыщении его газовой смесью 95 % O_2 и 5 % CO_2 . Температура перфузата составляла 37,5 °С, в этих условиях изолированное сердце могло сокращаться более 2 ч.

Для регистрации амплитуды и частоты сердечных сокращений к верхушке сердца прикрепляли крючок из платиновой проволоки, который через систему блоков соединяли с устройством, преобразующим механические колебания в электрические сигналы. Показатели регистрировали с помощью быстродействующего самописца Н3021-1.

Исходные фоновые значения показателей работоспособности сердца у разных животных существенно варьировали, поэтому все величины оценивали в процентах по отношению к исходным данным (контроль). Объемная скорость коронарного потока определялась объемом оттекающей от сердца жидкости (мл/мин). Контроль рН поступающего к сердцу перфузата

осуществляли с помощью рН-метра. Содержание O_2 в притекающем и стекающем перфузате регистрировали с помощью электрода Кларка. Поглощение O_2 оценивали в мкл/мин.

Выделенное сердце 10 мин отмывали от крови до установления постоянных показателей частоты и амплитуды сокращений. Эти величины в дальнейших расчетах принимали за 100 %. Затем в раствор вносили исследуемый компонент, после чего наблюдали за работой сердца в течение 30 мин. Контролем служили опыты с перфузией раствора Кребса–Хензеляйта без добавок.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Атомно-силовая микроскопия. Эритроциты здоровых животных в атомно-силовом микроскопе выглядели как крупные двояковогнутые диски диаметром $\sim 6\text{--}7$ мкм (рис. 1, а). При боль-

шем увеличении на их поверхности выявлялась незначительная неоднородность, обусловленная присутствием мембранно-связанных белков (см. рис. 1, б). При добавлении к взвеси эритроцитов ДМС и этанола (10 % от объема смеси) неоднородность поверхности возрастала, по-видимому, в связи с денатурирующим действием на поверхностные структурные белки растворителя. При добавлении к взвеси эритроцитов кортизола в конечной концентрации 10^{-7} М картина резко менялась. На ровной поверхности появлялись многочисленные мезополосы разрыхления структуры клеточной мембраны (см. рис. 1, в).

Еще более значительные изменения структуры эритроцитарных мембран вызывал адреналин (см. рис. 1, г). На поверхности мембраны эритроцитов появлялись выпуклые уплотнения (домены), имеющие квазишахматное распре-

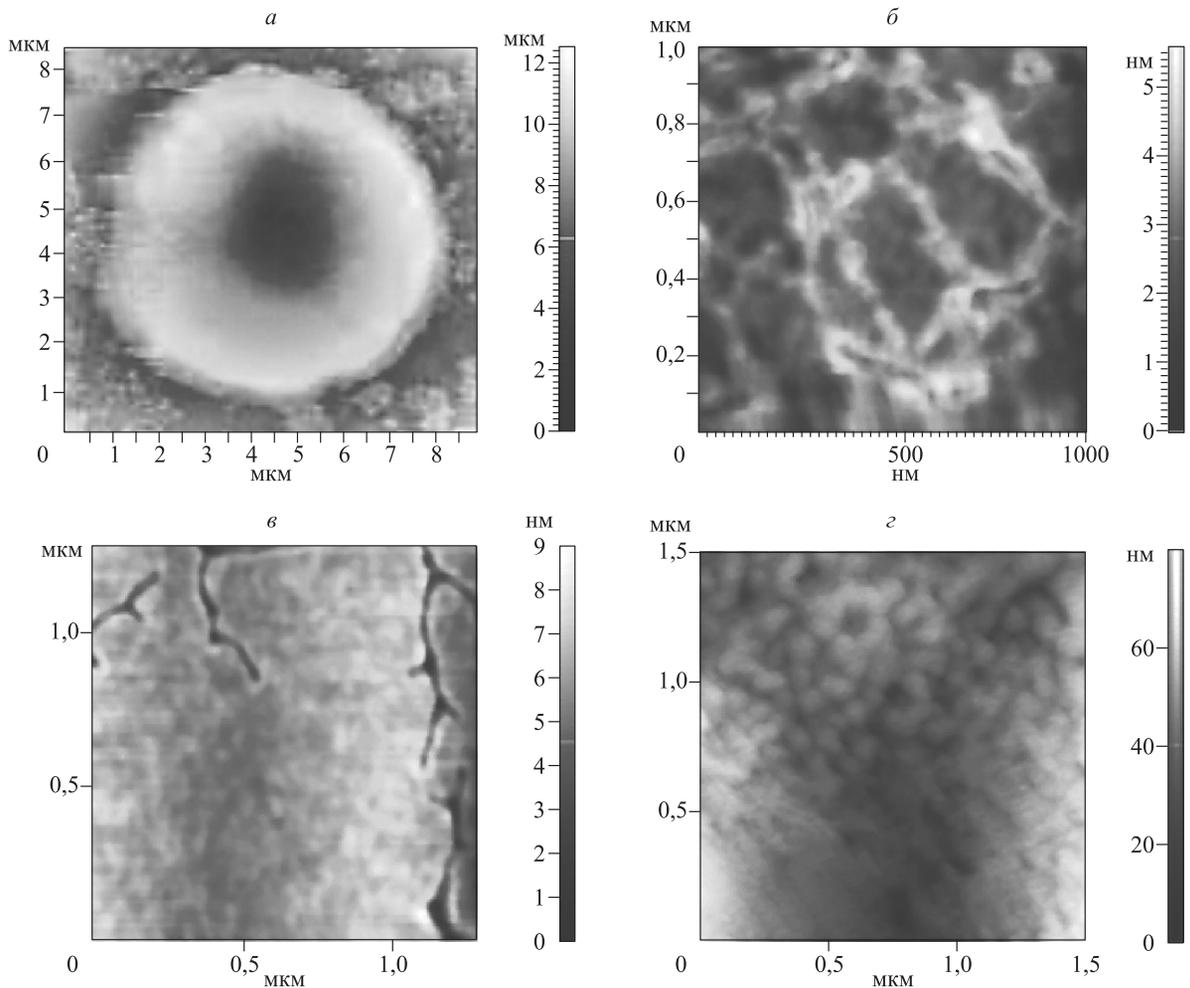


Рис. 1. Интактный эритроцит крысы, АСМ, размер скана 9×9 мкм (а); мембрана эритроцита, АСМ, размер скана 1000×1000 нм (б); изменение мембраны эритроцита под действием кортизола, концентрация кортизола во взвеси 10^{-7} М, размер скана $1,3 \times 1,3$ мкм (в); изменение мембраны эритроцита под действием адреналина, концентрация адреналина во взвеси 10^{-7} М, АСМ, размер скана 1×1 мкм (г)

Параметры связывания гормонов с мембраной эритроцита на основании тушения собственной флуоресценции триптофана белков мембраны

Стероидный гормон	Константа связывания K_c , M^{-1}	Количество связанного гормона B_{max} , моль/мг белка	Изменение свободной энергии ΔG , кДж/моль
Кортизол	$(1,23 \pm 0,12) \cdot 10^6$	$(4,69 \pm 0,47) \cdot 10^{-10}$	-36,0
Адреналин	$(6,3 \pm 0,6) \cdot 10^6$	$(1,60 \pm 0,16) \cdot 10^{-11}$	-40,2

ление, которые чередовались с участками значительного разрыхления поверхности.

Вклад белка в инициацию структурных переходов в эритроцитарных мембранах под влиянием гормонов удалось наблюдать с помощью флуоресцентного анализа. С этой целью использовался как эффект поглощения света, так и тушение собственной флуоресценции триптофана при измерении вторичной структуры белков.

Флуоресцентный анализ. Кортизол, как уже отмечалось ранее [9], не может проникать глубоко в фосфолипидный бислой и взаимодействует с белками на поверхности клеточной мембраны. Это приводит к существенным изменениям их вторичной структуры и сопровождается снижением максимума поглощения при 228 нм. При добавлении гормона в среду инкубации в концентрации $1,8 \cdot 10^{-7}$ М интенсивность поглощения снижалась на 30 у.е., что составляло 4,6 % по отношению к контролю (гипохромный эффект). Гипохромный эффект связывают с переходом молекулы белка из статистического клубка в α -спираль [10], т.е. речь идет об увеличении упорядоченности его структуры.

Спектр поглощения макромолекул, имеющих упорядоченное строение в возбужденном состоянии, отражает взаимодействие между возбужденными мономерными звеньями и существенно зависит от их пространственного расположения внутри молекулы.

О структурных переходах в белках при взаимодействии кортизола с эритроцитарными мембранами говорят также кривые тушения флуоресценции триптофана. Максимум снижения флуоресценции отмечался при концентрации гормона в среде инкубации $1,16 \cdot 10^{-7}$ М при содержании белка 0,256 мг/мл, уменьшение интенсивности излучения ΔF составляло 34 у.е., т.е. 11 % по отношению к контролю. На основе данных о тушении флуоресценции триптофана были рассчитаны константы связывания гормона (K_c), количество связавшегося гормона (B_{max} , моль/мг белка) и изменение свободной энергии (ΔG , кДж/моль) при взаимодействии гормона с эритроцитарной мембраной (табл. 1). Оказалось, что K_c для кортизола составляет $(1,23 \pm 0,12) \cdot 10^6$ M^{-1} . Аналогичная величина для

транскортина (специфического рецептора) равна $3 \cdot 10^7$ M^{-1} [11], т.е. на порядок выше. Однако даже в норме 6–8 % гормона находится в связанном с клетками крови состоянии. Это главным образом эритроциты. В условиях стресса данная величина может существенно увеличиваться. Наши расчеты показали, что максимальное насыщение гормоном эритроцитарных мембран *in vitro* составляет $(4,7 \pm 0,4) \cdot 10^{-10}$ моль/мг белка, т.е. достаточно низкая величина. При взаимодействии кортизола с эритроцитарными мембранами значение свободной энергии ΔG всей системы снижалась на величину $-30,0$ кДж/моль. Таким образом, под влиянием гормона степень упорядоченности структурных компонентов мембран эритроцитов возрастает, а их энтропия снижается.

Аналогичные результаты получены нами и для адреналина. Гипохромный эффект для него выражен даже в большей степени, чем у кортизола. Это говорит об увеличении упорядоченности структуры мембранных белков в связи с переходом клубок \rightarrow β -структура \rightarrow α -спираль. Снижение поглощения может быть связано с изменением направления дипольных моментов квантовых переходов мономерных остатков белков, сопровождающее переход их в другую конформацию.

По измерениям собственной флуоресценции триптофановых остатков белков рассчитаны K_c , B_{max} и ΔG при связывании адреналина с мембраной эритроцита (см. табл. 1). В целом они были того же порядка, что и у кортизола. У адреналина выше оказалась K_c , ниже количество связанного гормона B_{max} и более значительные изменения ΔG ($-40,2$ кДж/моль). Последний факт свидетельствует о том, что адреналин в большей степени, чем кортизол, повышает степень упорядоченности структурных компонентов эритроцитарных мембран. Он обеспечивает также больший эффект деформации эритроцитарных мембран, что и согласуется с данными атомно-силовой микроскопии.

Структурные переходы в эритроцитарных мембранах под влиянием гормонов стресса чрезвычайно важно было связать с изменением их эластичности и вязкости.

Измерение микровязкости мембран эритроцитов. При добавлении к теням эритроцитов кортизола и адреналина происходило увеличение микровязкости эритроцитарных мембран (рис. 2). Эффект был более выраженным в присутствии адреналина (на 40 %), чем кортизола (на 25 %). У адреналина повышение микровязкости мембран отмечалось при значительно меньшей концентрации гормона в среде инкубации. В данном случае выход на плато происходил при концентрации гормона $1,7 \cdot 10^{-8}$ М, для кортизола — при концентрации $6 \cdot 10^{-8}$ М. Микровязкость в области липид-белковых взаимодействий для всех гормонов увеличивалась при меньших концентрациях и была более выраженной, чем в области липид-липидных взаимодействий. Увеличение микровязкости эритроцитарных мембран коррелировало с уменьшением поглощения триптофана в мембранно-связанных белках. Можно думать, что структурные переходы в эритроцитарных мембранах под влиянием гормонов стресса инициируются в большей степени в белках и в меньшей степени в липидах. В целом мембрана реагирует на гормоны как кооперативная система.

Перфузия изолированного сердца крыс. Перфузия изолированного сердца раствором Krebs-Хензелята без добавок не отражалась на

работе сердца: через 10 и 30 мин рециркуляции перфузионного раствора все измеряемые показатели работоспособности не отличались от исходных и между собой (табл. 2). Несколько снижалась величина коронарного потока к 30 мин (различие с контролем недостоверно).

Через 15 мин перфузии адреналином показатель работоспособности сердца в 2 раза превышал исходный (в конце периода отмывки) в значительной степени за счет увеличения частоты сердечных сокращений (ЧСС), что характерно для адреналина. Величина коронарного потока также возрастала, хотя и не так заметно. Если выполняемую условную работу сердца отнести к величине коронарного потока на данный момент времени, то через 15 мин это соотношение возрастало вдвое при перфузии адреналина.

К 30-й минуте перфузии частота сокращений сердца продолжала оставаться высокой, но за счет отчетливо наблюдаемого повышения тонуса мышц уменьшалась диастола, снижалась амплитуда (60 % от исходной) и, как следствие, общая работа. Снижался и показатель работа/коронарный поток. Таким образом, установлено двухфазное действие адреналина на изолированное сердце при рециркуляции раствора. Если сравнить 30 мин перфузии адреналина с простой перфузией — рециркуляцией обычно

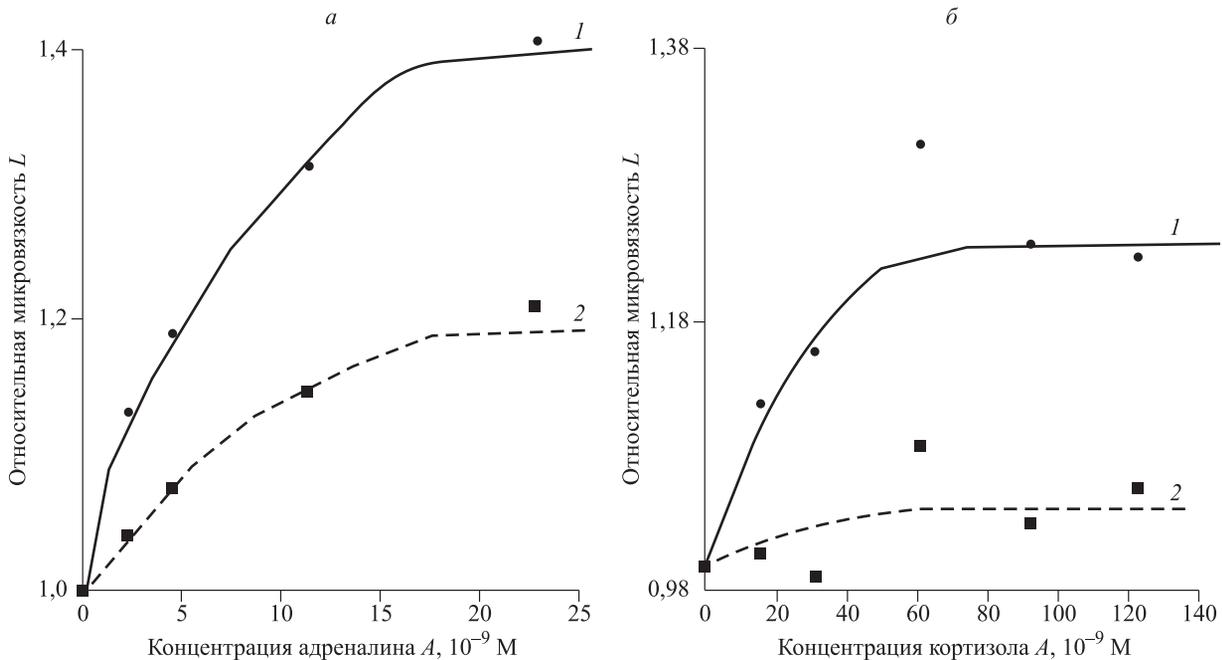


Рис. 2. Изменение относительной микровязкости мембран при добавлении к взвеси «теней» адреналина (а) и кортизола (б) концентрации A и без добавления гормонов соответственно. 1 — изменение относительной микровязкости в области белок-липидного взаимодействия; 2 — изменение относительной микровязкости в области липид-липидного взаимодействия. Концентрация теней $C = 0,128$ мг белка/мл, концентрация пирена во взвеси $7,7 \cdot 10^{-6}$ М, температура образцов $309,1 \pm 0,1$ К (36°C), взвесь имеет рН 7,35.

Влияние адреналина на функциональные показатели изолированного сердца крыс
(в процентах к исходным величинам)

Условие эксперимента	Длительность перфузии, мин	Частота Ч, %	Амплитуда А, %	Работа Ч×А, %	Коронарный поток, %	Работа/коронарный поток	Потребление кислорода, %
Контроль	15	102,3±2,3	114,3±3,6	117,1±10,8	—	—	105,2±1,8
	30	93,8±7,2	106,0±4,2	95,0±11,5	83,0±6,2	1,1	99,8±2,0
Адреналин	15	174,1±18,3	124,4±31,2	233,3±47,7	123,5±29,8	1,6±0,39	139,9±8,7
	30	164,0±8,7	60,7±26,7	95,7± 8,2	112,3±27,7	0,8±0,15	154,7±16,3

го раствора Кребса–Хензеляйта (см. табл. 2), видно, что одинаковые с контролем показатели общей работоспособности обеспечивались на фоне адреналина высокой ЧСС, что не является рациональным с позиции энергетики миокарда. Возможным объяснением повышения тонуса сердца при длительном поступлении адреналина может быть способность катехоламинов усиливать гликолиз и гликогенолиз. Известно, что гликолиз ограничивает скорость поглощения Ca^{2+} , а значит, и скорость расслабления сердечной мышцы [12].

В следующей серии экспериментов в перфузат добавляли отмытые в фосфатном буфере эритроциты крысы (500 тыс./см³). Присутствие эритроцитов снижало частоту сердечных сокращений и одновременно увеличивало их

амплитуду (рис. 3). Это свидетельствует о более эффективном снабжении сердца кислородом. Использование эритроцитов после предварительной обработки адреналином с последующей отмывкой в фосфатном буфере для удаления несвязанных гормонов из взвеси приводило уже через 5 мин к снижению ЧСС и резкому снижению амплитуды сердечных сокращений. Через 7 мин сердце останавливалось. На розовой поверхности левого желудочка обнаруживались зоны поражения темного цвета (рис. 4). Причиной остановки сердца являлась острая гипоксия миокарда.

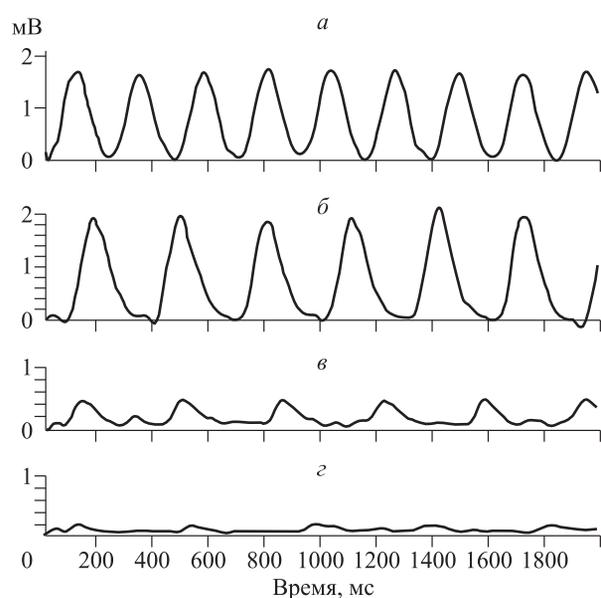


Рис. 3. Работа левого желудочка сердца крысы: а – в норме (перфузия одним раствором Кребса–Хензеляйта); б–г – при перфузии раствором Кребса–Хензеляйта с интактными эритроцитами (б); с эритроцитами, обработанными адреналином, время перфузии 5 мин (в), 7 мин (г).

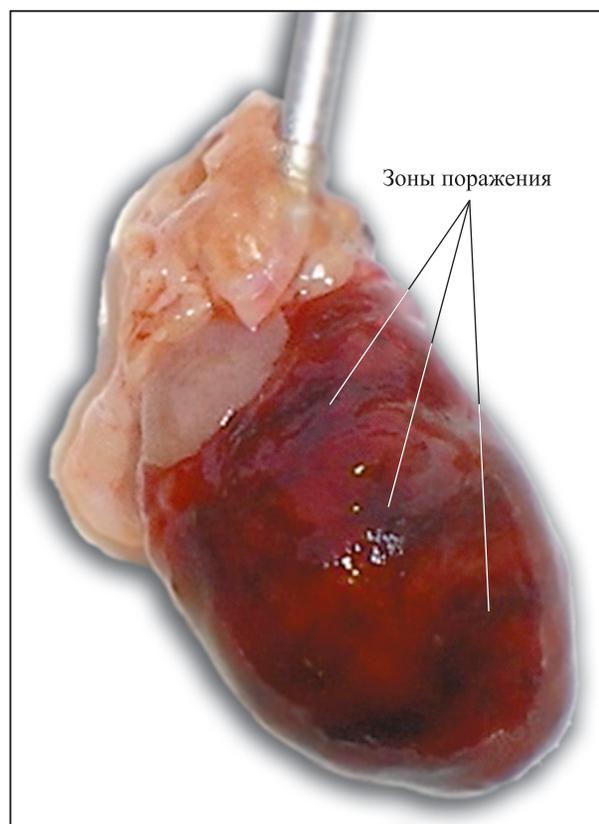


Рис. 4. Зона поражения (темный цвет) на поверхности левого желудочка сердца крысы

ОБСУЖДЕНИЕ

Коронарный синдром X можно с полным основанием отнести к болезням цивилизации. Высокий уровень социального напряжения (stress of life) сегодня отмечается во всем мире. Для человека особенную важность приобретает длительное психоэмоциональное напряжение на фоне развития тревожности, когда содержание адаптивных гормонов в крови резко увеличивается [13]. В этих условиях масштаб взаимодействия их с эритроцитарными мембранами существенно возрастает.

Важную роль в данном механизме играют водородные связи, гидрофобные и электростатические взаимодействия. Известно, что кортизол является гидрофобным соединением – он плохо растворим в воде. Однако в его структуре присутствуют три ОН-группы (в 11, 17 и 19 положениях) и 2 кето-группы (в 3 и 18 положениях). Именно они принимают участие в образовании водородных связей с СО- и NH-группами мембранно-связанных белков и фосфолипидов, что и подтверждается данными ИК-спектроскопии [9]. Это приводит к тому, что при участии кортизола на поверхности эритроцитарных мембран формируются белково-липидные домены. За счет появления дополнительных сил в доменах усиливаются «сжимающие» напряжения, и диполи воды начинают вытесняться в смежные области мембраны. Этому способствует усиление гидрофобных взаимодействий за счет дополнительных двух СН₃-групп (в 10 и 11 положениях) и гидрофобных колец самого гормона. Избыточное содержание воды в смежных областях приводит к появлению «растягивающих» напряжений за счет действия гидродинамических сил. На поверхности эритроцитов формируются мезополосы, разрыхляющие мембрану (см. рис. 1, в). Однако в целом жесткость мембраны возрастает, особенно в области липид-белковых взаимодействий. Степень упорядоченности мембран увеличивается, а свободная энергия системы ΔG уменьшается. Такие эритроциты уже не могут выполнять свои функции в полном объеме. Более того, в капиллярной сети они способны образовывать многочисленные тромбики, которые могут приводить к развитию гипоксии и, возможно, инфаркту.

Как сочетается с этим механизмом действие второго гормона стресса – адреналина? Наши исследования показали, что K_c у него выше, т.е. он обладает еще большим сродством к эритроцитарным мембранам. Однако в целом механизм структурных переходов в мембранах под влиянием данного гормона практически тот же самый, что и у кортизола. На это указывают ре-

зультаты ИК-спектроскопии. В молекулу входит три ОН-группы, способных участвовать в образовании водородных связей, NH-группа, имеющая положительный заряд, и смежная СН₃-группа, усиливающая влияние этого положительного заряда. То есть действуют те же самые силы, но дополняется влияние спектрин-актин-анкериновой сети, которое может усиливаться при взаимодействии адреналина с его рецептором [14]. При атомно-силовой микроскопии эритроцитов в присутствии адреналина видно образование крупных доменов, возвышающихся над поверхностью эритроцита, между которыми находятся участки очень рыхлого вещества (углубления). Вероятно, это участки с избыточным содержанием молекулярной воды. Здесь действуют растягивающие касательные напряжения. По-видимому, за счет них происходит «выдавливание» некоторых доменов, и на их месте иногда удается видеть сквозные отверстия.

Изменение структуры и повышение микровязкости эритроцитарных мембран при взаимодействии их с избыточным количеством гормонов стресса (кортизол, адреналин) может иметь катастрофические последствия для организма. Известно, что диаметр эритроцита сопоставим с диаметрами некоторых кровеносных капилляров и даже превышает их [15]. Чтобы эритроциту пройти через капиллярное русло, его мембрана должна обладать повышенной текучестью. Структурные переходы, которые происходят в мембранах под влиянием гормонов стресса, повышают их микровязкость как в области липид-липидных, так и белок-липидных взаимодействий, что затрудняет продвижение эритроцита по капиллярному руслу и способствует развитию диффузной гипоксии, а в некоторых случаях может привести к внезапной остановке сердца. Экспериментальная проверка подтвердила эту гипотезу. Перфузия изолированного сердца крысы раствором Кребса–Хензеляйта, содержащего эритроциты, предварительно проинкубированные с адреналином, быстро приводила к остановке сердца. Среди спортсменов внезапная остановка сердца в период ответственных соревнований в наше время стала нередким явлением.

ВЫВОДЫ

1. Гормоны стресса (кортизол, адреналин) в эритроцитарных мембранах вызывают структурные переходы с повышением микровязкости в области как липид-липидных, так и белок-липидных взаимодействий.

2. Перфузия изолированного сердца крыс раствором Кребса–Хензеляйта, содержащим эри-

троциты, предварительно проинкубированные с гормонами стресса, резко снижает скорость коронарного потока и быстро приводит к его остановке.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Lampedola P., Tarzia P., Milo M., Laurito M., Lanza G.** Coronary microvascular dysfunction. An update // *Recenti Prog. Med.* 2011. Vol. 102. P. 329–337.
2. **Eshtehardi P., Dhawan S.S., McDaniel M.S., Quyyumi A.A., Samady H.** Intravascular imaging findings in severe coronary vasospasm // *J. Cardiovasc. Med.* (Hagerstown). 2011. Vol. 12, N 8. P. 578–580.
3. **Cotrim C., Almeida A.G., Carrageta M.** Exercise-induced intra-ventricular gradients as a frequent potential cause of myocardial ischemia in cardiac syndrome X patients // *Cardiovasc. Ultrasound.* 2008. Vol. 6. P. 3–6.
4. **Hurst T., Olson T.H., Olson L.E., Appleton C.P.** Cardiac syndrome X and endothelial dysfunction: new concepts in prognosis and treatment // *Am. J. Med.* 2006. Vol. 119, N 7. P. 560–566.
5. **Demir B., Temizhan A., Keskin G., Baser K., Turak O., Cay S.** Comparison of serum gamma-glutamyltransferase levels between patients with cardiac syndrome X and healthy asymptomatic individuals // *Kardiol. Pol.* 2012. Vol. 70, N 1. P. 312–337.
6. **Панин Л.Е.** Стресс, сердце и сосуды // *Вопросы атеросклероза* / Ред. Ю.П. Никитин и др. Новосибирск: СО РАМН, 2005. С. 20–34.
7. **Dawson M.C., Rex D.C., Elliot D.C., Elliot W.H., Jones K.M.** Data for biochemical research. Oxford: Clarendon Press, 1986.
8. **Алюхин Ю.С.** Энергетика сердца и температурная адаптация организма // *Физиол. журн.* 1975. № 5. С. 749–757.
9. **Панин Л.Е., Mokrushnikov P.V., Kunitsyn V.G., Zaitsev B.N.** The interaction mechanism of cortisol and catecholamines with structural components of erythrocyte membranes // *J. Phys. Chem. B.* 2010. Vol. 114. P. 9462–9473.
10. **Оои Т., Ицака Е., Онари С.** Биополимеры. М.: Мир, 1988.
11. **Сергеев П.В., Галенко-Ярошевский П.А., Шимановский Н.Л.** Очерки биохимической фармакологии. М.: Фармединфо, 1996. 384 с.
12. **Опи Л.Х.** Обмен веществ и энергии в миокарде // *Физиология и патфизиология сердца* / Ред. Н.М. Сперелакиса. М.: Медицина, 1990. Т. 2. С. 7–63.
13. **Панин Л.Е., Усенко Г.А.** Тревожность, адаптация и донозологическая диспансеризация. Новосибирск: СО РАМН, 2002. 315 с.
14. **Сторожок С.А., Санников А.Ж., Захаров Ю.М.** Молекулярная структура эритроцитарных мембран и их механические свойства. Тюмень: Изд-во Тюм. ун-та, 1997. 220 с.
15. **Кровь, кровообращение, дыхание** // *Физиология человека* / Ред. Р. Шмидт, Г. Тевс. М.: Мир, 1986. Т. 3. С. 287.

HORMONES OF STRESS AND CORONARY SYNDROME X (EXPERIMENTAL RESEARCH)

L.E. Panin, P.V. Mokrushnikov, R.A. Knjazev, A.R. Kolpakov, B.N. Zajitsev

Experiments studies which showed are carried out that stress hormones (a cortisol, adrenaline) can bind to erythrocyte membranes with high affinity, leading to rough structural changes. The last are accompanied by increase of microviscosity of membranes as in area a lipid-lipid, and protein-lipid of interactions. The nature of these changes is caused by simultaneous interaction of active groups of hormones (NH, OH and their waterproof rings) at the same time with a lipid and protein components of a membrane with formation of domains. Experiments with heart perfusion of rats showed that erythrocytes with the increased microviscosity of their membranes are incapable to move ahead on the capillary course that leads to sharp decrease in a coronary stream and fast cardiac arrest. The assumption is come out that this mechanism is shown and at a coronary syndrome X at the person.

Keywords: coronary syndrome X, microviscosity of membranes, stress hormones, structural changes of membranes of erythrocytes.

Статья поступила 21 ноября 2012 г.