

Hipodinaminio streso įtaka krūtinės aortos lygiųjų raumenų adrenalino sukeltam susitraukimui

Marija Kušleikaitė, Alė Laukevičienė¹, Igor Korotkich¹, Sigitas Stonkus, Egidijus Kėvelaitis¹

Kauno medicinos universiteto Kardiologijos institutas, ¹Fiziologijos katedra

Raktažodžiai: hipodinaminis stresas, lygieji raumenys, krūtinės aorta, adrenalinas, kontraktiliškumas.

Santrauka. Tyrimo tikslas. Nustatyti hipodinaminio streso įtaką krūtinės aortos lygiųjų raumenų atsakui į adrenalina.

Tyrimo medžiaga ir metodas. Hipodinaminį stresą sukėlėme B. M. Fiodorovo metodu šinšilos veislės triušiams ($n=8$), imobilizavus juos metaliniuose narveliuose 48 paroms. Kontrolinius triušius ($n=8$) laikėme įprastinėmis vivariumo sąlygomis. Krūtinės aortos izoliuotų segmentų lygiųjų raumenų kontraktiliškumą, veikdami juos 10^{-7} mol/l ir 10^{-6} mol/l koncentracijos adrenalinu, registravome in vitro mikromechanografiniu įrenginiu izometrinėmis sąlygomis.

Rezultatai. Triušių, paveiktų streso, aortos lygiųjų raumenų susitraukimas, veikiant 10^{-7} mol/l koncentracijos adrenalinu, buvo statistiškai nereikšmingai ($p>0,05$) stipresnis negu kontrolinės grupės triušių. Pavartojus 10^{-6} mol/l koncentracijos adrenaliną, hipodinaminio streso paveiktų triušių krūtinės aortos lygiųjų raumenų susitraukimas buvo statistiškai reikšmingai ($p=0,021$) stipresnis negu kontrolinių triušių.

Išvada. Esant ilgalaikiam ir nuolatiniam hipodinaminiam stresui, adrenalinas sukelia stipresnį triušių krūtinės aortos lygiųjų raumenų susitraukimą.

Įvadas

Intensyvėjant šiuolaikinio gyvenimo tempui, žmonės dažnai patiria stresą, kuriam įtakos turi laiko trūkumas, nepritekliai, psichologinis diskomfortas šeimoje, darbe. Vyresnis amžius, nedarbas gali skatinti ne tik nerimą, netikrumo jausmą, bet ir fizinio aktyvumo sumažėjimą. Kuo mažiau žmogus juda, tuo didesnė patologinių pokyčių galimybė. Nuo nejudrumo sulėtėja medžiagų apykaita, pakinta galūnių raumenų masė bei jėga, cirkuliuojančio kraujo tūris, bet padidėja azoto, fosforo, kalio, magnio ir kitų elementų išsiskyrimas. Be to, atsiranda nerimo ir priešiško požiūrio, sutrinka miego ritmas ir kt. Tai turi įtakos hipertenzijos, cukrinio diabeto vystymuisi, antsvorio vystymuisi, kurie yra ir išeminės širdies ligos (IŠL) rizikos veiksniai (1). Neretai miokardo infarktas arba staigi mirtis nuo išeminės ligos (IŠL komplikacijos) ištinka jaunos žmones, kuriems iki tol nebuvo šiai ligai būdingų požymių, todėl jie nebuvo kreipęsi į gydytoją. Šių mirčių priežastys gali būti įvairios, tarp jų ir stresas, ypač ilgai užsitiesęs. Užsitiesusio streso laikotarpiu formuojasi adaptacinis sindromas, kuriam vystantis hipotalamo-hipofizės-antinksčių sistemos sąlygojami hormoniniai pokyčiai gali sukelti audinių ir

ląstelių funkcinis bei struktūrinius pažeidimus. Ilgalaikio streso sukelti širdies ir kraujagyslių sistemos funkciniai pokyčiai nėra visiškai ištirti.

Šio darbo tikslas – nustatyti 48 parų hipodinaminio streso įtaką krūtinės aortos lygiųjų raumenų reakcijai į adrenalina.

Tyrimo medžiaga ir metodai

Tyrimas atliktas remiantis Lietuvos Respublikos Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimu (išduotu 2002 02 31, Nr. 0064) atlikti laboratorinius bandymus su gyvūnais.

B. M. Fiodorovo metodu (2) 48 parų trukmės hipodinaminį stresą šinšilos veislės triušiams (2,5–3,0 kg; $n=8$) sukėlėme imobilizavę juos metaliniuose narveliuose. Kontrolinius triušius (2,5–3,0 kg; $n=8$) laikėme įprastomis vivariumo sąlygomis. Pasibaigus eksperimento laikui, triušiai buvo anestezuoti tiopentaliu (35 mg/kg, į veną). Anestezuotiems triušiams atvėrėme krūtinės ląstą ir paėmėme krūtinės aortos segmentų lygiųjų raumenų reakcijai į adrenalina tirti ir iškart juos dėjome į kambario temperatūros modifikuotą Krebso tirpalą. Tirpalo sudėtis (mmol/l): NaCl – 139,3; KCl – 3,5; CaCl₂ – 2,3; MgCl₂ – 1,3; NaH₂PO₄ –

0,58; Na_2HPO_4 – 2,1; NaHCO_3 – iki $\text{pH}=7,4$; gliukozė – 11,1. Tyrimams paimtos kraujagyslės. Aštriu skutimosi peiliuku kraujagyslės buvo padalijamos į 2–3 mm pločio žiedelius. Žiedeliai pakabinami ant 2–3 mm ilgio siūlo kilpučių. Šios procedūros metu buvo imamasi ypatingų atsargumo priemonių endoteliui išsaugoti. Paruošti preparatai įdėti į mikromechanografinio įrenginio kamerą, pripildytą pastovios temperatūros ($37,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$) praturtinto deguonimi Krebso tirpalo.

Tirpalo temperatūra buvo palaikoma ultratermostatu (UTU-2). Kameroje preparatas viena kilpute buvo pritvirtinamas prie mechanotono strypo, kita – prie žingsninio įrenginio, padedančio keisti įtempimą. Prieš pradedant registraciją, preparatas kameroje buvo laikomas 30 minučių, po to įtempimas iki optimalaus įtempimo (10 mN). Optimalus įtempimas nustatytas išankstiniais tyrimais. Po įtempimo preparatas buvo laikomas dar apie 30 min., periodiškai (kas 10–15 min.) koreguojant įtempimą ir keičiant tirpalą šviežiu 37°C temperatūros praturtintu deguonimi Krebso tirpalu. Kraujagyslių tonuso kitimai buvo registruojami mikromechanografiniu įrenginiu, sukonstruotu mechanotonų (6MX1C) pagrindu. Registruojamas signalas stiprintuvu buvo stiprinamas, užrašomas ir saugomas kompiuterio duomenų bazėje. Kontrakcija sukeliamą Krebso tirpalu, kurio KCl koncentracija buvo padidinta iki 80 mmol/l. Preparatas atplaunamas 37°C temperatūros praturtintu deguonimi Krebso tirpalu. Atplaunama keletą kartų, kol preparatas atsipalaiduoja ir įtempimas sumažėja iki optimalaus įtempimo lygio. Preparatų susitraukimo amplitudei stabilizuoti Krebso tirpalas su padidėjusia KCl koncentracija buvo naudojamas keletą kartų (mažiausiai tris), kol dviejų gretimų susitraukimų amplitudė skyrėsi ne daugiau kaip 10 proc. Po to į vonelę įpilama adrenalino iki tiriamos didžiausios koncentracijos. Naudotos dvi adrenalino koncentracijos: 10^{-7} mol/l ir 10^{-6} mol/l atplaunant Krebso tirpalu po reakcijos į pasirinktą koncentraciją užregistravimo.

Statistinė analizė

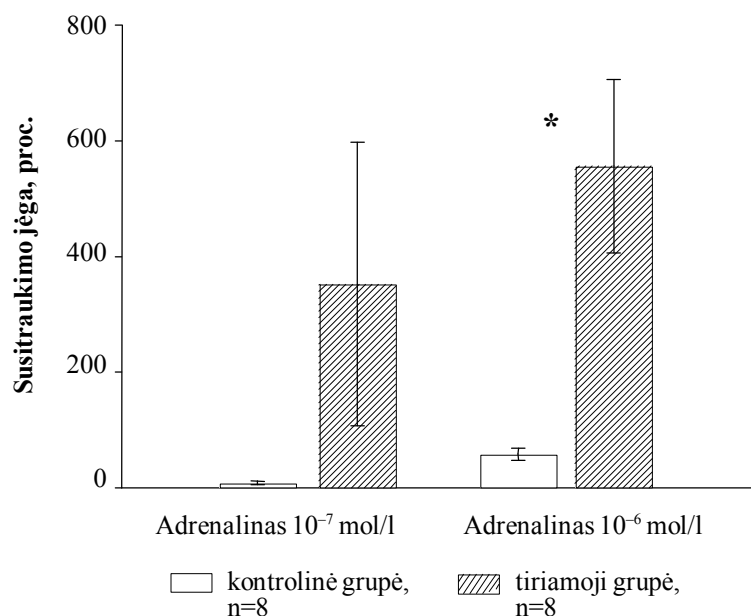
Kontraktiliškumo tyrimo duomenys analizuoti, naudojant „Sigmaplot“ (DEMO versija) programą. Apskaičiuoti duomenų vidurkiai plius/minus vidurkio kvadratinė paklaida. Apskaičiuotas kiekvieno preparato duomenų santykis: laikoma, jog preparato susitraukimas nuo poveikio Krebso tirpalu, kurio KCl koncentracija padidinta iki 80 mmol/l, yra lygus 100 proc. Kontraktiliškumo tarp kontrolinės ir bandomosios grupių skirtumo statistiniam įvertinimui pasirinktas Stjudento (t) testas. Skirtumas statistiškai reikšmingas, kai $p < 0,05$.

Rezultatai

Įvertinę tyrimo duomenis, nustatėme, jog kontrolinės grupės triušių aortos preparatų maksimalus susitraukimas yra $8,11 \pm 3,32$ proc. bei $70,05 \pm 11,17$ proc. veikiant atitinkamai 10^{-7} mol/l ir 10^{-6} mol/l adrenalino koncentracijomis. Bandomosios grupės, t. y. streso paveiktų triušių aortos preparatų maksimalus susitraukimas 10^{-7} mol/l ir 10^{-6} mol/l, paveikus adrenalinui, yra atitinkamai, $352,1 \pm 245,2$ ir $556,2 \pm 150,0$ proc. Palyginus šiuos duomenis, paaiškėjo, jog bandomosios grupės aortos preparatų susitraukimas, sukeltas 10^{-7} mol/l adrenalino, yra statistiškai nereikšmingai ($p > 0,05$) stipresnis, o 10^{-6} mol/l adrenalino sukiamas susitraukimas yra statistiškai reikšmingai stipresnis ($p = 0,021$) palyginus su kontrolinių triušių (pav.).

Rezultatų aptarimas

Stresas, skatinantis aktyviųjų deguonies formų susidarymą, sąlygoja ląstelių membranų pažeidimą. Padidėjus membranų laidumui, pakinta ląstelėse jonų (Na^+/K^+) santykis, sutrinka ląstelės homeostazė. Užsitęsęs nuolatinis stresas sąlygoja ir bioenergijos stygių, fermentų aktyvumo sumažėjimą (2). Sumažėjus membranos fermentų, tarp jų Na^+/K^+ -ATP-azės (vadinamo Na^+/K^+ siurblio) aktyvumui, ląstelėje išlieka sutrikęs minėtų jonų santykis, sąlygojantis intersticinio substrato kaupimąsi ląstelėse, t. y. vakuolių formavimąsi. Mūsų paskelbtais duomenimis (3), esant 48 parų hipodinaminiam stresui, lygiuosiuose raumenyse didelės vakuolės spaudžia branduolius, kurie būna praradę įprastinį savo vaizdą, deformavęsi, raukšlėti. Tai galėjo turėti įtakos šiame eksperimente nustatytam lygiųjų raumenų kontraktiliškumo padidėjimui. Remiantis kitų autorių tyrimų duomenimis, kartu su kraujagyslių lygiųjų raumenų stipriu susitraukimu ir kraujagyslių spazmu būna didelių priebranduolinių vakuolių (4). Be to, lygiųjų raumenų kontraktiliškumą, susijusį su fermentų (fosfodiesterazės, guanilatciklazės) membranos jonų kanalų receptorių aktyvumu (4), veikiant stresui, galėjo trikdyti ir simpatinės nervų sistemos aktyvumo pakitimas. Sunkaus ir užsitęsusio streso metu simpatinė-adrenerginė sistema reaguoja į stresą ne tik išskirdama katecholaminus, bet ir neuropeptidą Y, kuris yra potencialus vazokonstriktorius (5). Taigi užsitęsęs stresas sąlygoja kraujagyslių tonuso padidėjimą, kurį galima sieti ir su organizmo deadaptacija. Dėl ilgalaikio streso hipofizėje mažėja Ca^{2+} jonų koncentracija (6). Kalcio jonai dalyvauja hormonų, tarp jų ir kortikosterono, kuris reikalingas organizmo adaptacijai streso metu, sintezėje. Kortikosterono gamybos mažėjimas deadapt-



Pav. Triušių krūtinės aortos izoliuotų preparatų susitraukimo jėga veikiant adrenalinu

Duomenys apskaičiuoti procentais lyginant su 80 mmol/l KCl sukkelto susitraukimo jėga. Pažymėta susitraukimo jėgos vidurkis ir vidurkio kvadratinė paklaida.

* skirtumas tarp kontrolinės ir bandomosios grupių yra statistiškai reikšmingas, kai $p < 0,05$.

tacijos fazėje galėjo turėti įtakos ir mūsų aptariamam pakitimui – krūtinės aortos lygiųjų raumenų padidėjusiam jautrumui adrenalinui. Streso metu suaktyvėjęs vazokonstriktorių išsiskyrimas (5), kraujagyslių lygiųjų raumenų (3), taip pat ir jų mikrofilamentų (7) ultrastruktūros pažeidimai galėjo veikti ir α -adrenoreceptorių jautrumą, jų koncentraciją bei membranos fermento adenilataciklazės aktyvumą, o kartu ir ciklinio 3,5-adenozinmonofosfato, lemiančio membranos laidumą kalcio jonams, koncentraciją (8). Žiurkių krūtinės aortoje ūminio streso sukeltą konstriktinį efektą, veikiant adrenalinui ir noradrenalinui, silpnina kalcio kanalų blokatoriai nifedipinas. Taigi streso sukeltas vazokonstriktinis efektas susijęs su kalcio jonų mobilizacijos procesu lygiuosiuose raumenyse (9). Negalima neįvertinti ir endotelio reikšmės lygiųjų raumenų kontraktiliškumui. Endotelio ir jo išskiriamų vazoktyviųjų medžiagų įtaką krūtinės aortos lygiųjų raumenų tonusui 48 parų hipodinaminio streso metu mes esame aprašę anksčiau skelbtuose straipsniuose, kur nustatėme, kad hipodinaminis stresas sukelia struktūrinius endotelio pažeidimus (7, 10). Esant endotelio struktūriniams pažeidimams, pasireiškia endotelio disfunkcija – mažiau išsiskiria kraujagyslių lygiuosius raumenis atpalaiduojančio faktoriaus azoto oksido (NO). Susilpnėjusi endotelio NO sintezė gali lemti aortos preparatų stipresnį susitraukimą veikiant adrenalinu. Kaip nurodoma, ūminio streso metu iš-

ryškėja moduliuojantis NO poveikis lygiųjų raumenų kontraktiliškumui (11).

Pažymėtina, jog dabar, sprendžiant IŠL ankstyvos diagnostikos ir šios ligos gydymo problemas, didelis dėmesys skiriamas endotelio, tačiau mažesnis – lygiųjų raumenų funkciniam ir struktūriniams pokyčiams. Mūsų naujausi duomenys, taip pat ir anksčiau skelbti rodo, jog kraujagyslių kontraktiliškumo sutrikimai glaudžiai susiję ne tik su jų endotelio (7, 10) bet ir su lygiųjų raumenų kontraktilinių elementų-mikrofilamentų struktūros pažeidimais (12). Vienam iš kontraktilinių elementų, t. y. miozino fosforilnimui-defosforilnimui tenka pagrindinis vaidmuo reguliuojant kraujagyslių tonusą (13, 14). Esant lygiųjų raumenų, o kartu ir jų kontraktilinių elementų ultrastruktūros pažeidimams (12), turėtų sutrikti ir minėtas tonuso reguliavimo mechanizmas. Taigi kraujagyslių tonusas gali padidėti ne tik dėl aterosklerozinių pažeidimų, kurių įtaka IŠL komplikacijoms rasti plačiai aptariama, bet ir jiems nesant, arba jų formavimosi pradžioje. Tai gali lemti kardiomiocitų ultrastruktūros ir jų funkcijos pakitimus. Mūsų skelbtais duomenimis (15), esant 48 parų hipodinaminiam stresui, kardiomiocitų plazminė membrana vietomis būna visiškai suirusi, mitochondrijos vakuolizuotos, kai kurių kristos fragmentuotos, miofibrilės suirusios, sarkoplazminis tinklas vakuolizuotas, fragmentuotas, žymus ribosomų kiekio sumažėjimas, vieni branduoliai piknotiški, kiti irstantys. Šie organelių struktūriniai po-

kyčiai susiję su elektrokardiografiniais pokyčiais: Q dantelio atsiradimu, ST segmento pakilimu, T dantelio suplokštėjimu (15). Taigi kraujagyslių tonuso padidėjimas ilgalaikio hipodinaminio streso metu gali būti ir IŠL komplikacijų priežastis.

Išvada

Ilgalaikis (48 parų) hipodinaminis stresas sąlygoja reikšmingai stipresnį 10^{-6} mol/l adrenalino koncentracijos sukeltą triušių krūtinės aortos lygiųjų raumenų susitraukimą.

Effect of hypodynamic stress on the adrenaline-induced contraction of the smooth muscles of the thoracic aorta

Marija Kušleikaitė, Alė Laukevičienė¹, Igor Korotkich¹, Sigitas Stonkus, Egidijus Kėvelaitis¹

Institute of Cardiology, ¹Department of Physiology, Kaunas University of Medicine, Lithuania

Key words: hypodynamic stress, smooth muscles, thoracic aorta, adrenaline, contractility.

Summary. Aim of the study was to investigate the influence of hypodynamic stress on the contractile responses of the smooth muscles to adrenaline.

Material and methods. Hypodynamic stress was induced by fixation of Chinchilla rabbits (n=8) in the metal hutches for 48 days (B. M. Fiodorov method). Rabbits in the control group (n=8) were kept in ordinary conditions of vivarium for the same period of time. Isolated preparations of the thoracic aorta were obtained from both groups of the rabbits. The contractile responses of the thoracic aorta preparations to 10^{-7} mol/l and 10^{-6} mol/l of adrenaline were registered *in vitro* by micromechanographic device under isometric conditions.

Results. The contractile responses of the thoracic aorta preparations under the influence of adrenaline at concentration 10^{-7} mol/l were not significantly higher ($p>0.05$) and at concentration 10^{-6} mol/l they were significantly higher ($p=0.021$) in rabbits after hypodynamic stress than in control ones.

Conclusion. Long-term hypodynamic stress in rabbits leads to the significantly increased adrenaline-induced contraction of the smooth muscles of the thoracic aorta.

Correspondence to M. Kušleikaitė, Institute of Cardiology, Kaunas University of Medicine, Sukilėlių 17, 50009 Kaunas, Lithuania. E-mail: m.kusleikaite@delfi.lt

Literatūra

- Bouchard C, Despres JP. Physical activity and health: atherosclerotic, metabolic, and hypertensive diseases. *Res Q Exerc Sport* 1995;66:268-75.
- Fiodorov BM. Stres i sistema krovoobrashchenija. (Stress and system of the blood circulation.) Moskva: Medicina; 1991. p. 3-33.
- Kušleikaitė M, Kirkutis A, Rugevičienė O, Razbadauskas A. Cinko reikšmė kraujagyslių lygiųjų raumenų kontraktiškumui ir jų ultrastruktūrai, esant hipodinaminiam stresui. (The significance of zinc for contractility and ultrastructure of smooth muscles of blood-vessels under hypodynamic stress.) *Visuomenės sveikata* 2002;4(19):60-4.
- Sakurai I. Coronary artery spasm and vascular biology. *Acta Pathologica Japonica* 1991;41(12):865-73.
- Grundemar L, Håkanson R. Neuropeptide Y effector systems: perspectives for drug development. *Trends Pharmacol Sci* 1994;15:153-9.
- Kušleikaitė M, Stonkus S, Kušleika S. Bioelements and adaptation of organism depending on the intensity of hypodynamic stress. *Acta medica Lithuanica* 1999;6(4):299-301.
- Kušleikaitė M, Stonkus S, Kušleika S. Contractility of smooth muscles and ultrastructure of their microfilaments in restriction of physical activity. *Med Sci Monit* 2001;7(1):34-7.
- Krauz D, Wollenberger A, Poppei M, Hecht K. Hormonal stimulation of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate formation in cell-free particles and intact cells of smooth muscle in the aorta and femoral artery of rats during immobilization stress. *Acta Biol Med Ger* 1976;35(7):819-28.
- Zanescio A, De-Moraes S. Effect of acute footshock stress on the responsiveness of the isolated rat tail artery to phenylephrine and epinephrine. *Braz J Med Biol Res* 1992;25(1):63-6.
- Kušleikaitė M, Civinskienė G, Stonkus S, Daukša K, Gailys R, Abratis R. Biocheminiai, fiziologiniai, struktūriniai pokyčiai organizme esant hipodinamijai. (Biochemical, physiological, structural changes in organism under hypodynamic stress.) *Medicina (Kaunas)* 1997;33:701-7.
- Cordellini S, Vassiliev VS. Decreased endothelium-dependent vasoconstriction to noradrenaline in acute-stressed rats is potentiated by previous chronic stress: nitric oxide involvement. *Gen Pharmacol* 1998;30(1):79-83.
- Kušleikaitė M, Stonkus S, Laukevičienė, Kušleika G. Cinko įtaka lygiųjų raumenų kontraktiškumui ir jų mikrofilamentų ultrastruktūrai hipodinaminio streso metu. (The significance of zinc for contractility of smooth muscles and ultrastructure of their microfilaments in case of hypodynamic stress.) *Medicina (Kaunas)* 2003;39(6):579-83.
- Walsh PM, Kargacin GJ, Kendrick JJ, Lincoln TM. Intracellular mechanisms involved in the regulation of vascular smooth muscle tone. *Can J Physiol Pharmacol* 1995;73:565-73.
- Blatter LA, Wier WG. Nitric oxide decreases [Ca] in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current. *Cell Calcium* 1994;15:122-31.
- Kušleikaitė M, Stonkus S, Paužienė N, Daukša K, Kušleika S, Gailys R. Changes of structure, function and concentration of bioelements in the heart depending on the intensity of hypodynamic stress. *Acta medica Lituanica* 1999;6(3):200-4.

*Straipsnis gautas 2004 05 25, priimtas 2004 10 01
Received 25 May 2004, accepted 1 October 2004*