

О.Г. Шадрін, С.М. Гоцуляк, А.Г. Ципкун

## Індукована скоротлива активність гладеньких м'язів товстого кишечника щура за умов блокади NO-синтази

*Исследовано участие NO в механизмах сократительной активности гладкомышечных клеток кишечника. Установлены различия действия различных медиаторов на характеристики кинетики сократительной активности в условиях блокады NO-синтазы.*

### ВСТУП

Порушення скоротливої активності товстого кишечника, які в клінічній медицині частіше об'єднують під термінами “синдром подразненого кишечника”, “функціональний закреп”, “функціональна діарея”, надзвичайно широко розповсюджені у світі та зумовлюють розвиток провідних в інтестинальній патології больового і диспептичного синдромів. За даними різних авторів 14–48 % усього населення мають скарги, характерні для моторних порушень кишечника [5,9], серед дітей цей відсоток, за деякими даними [10] становить 16,2%, а серед дітей з абдомінальним больовим синдромом – більше ніж 50%. Патогенез моторно-евакуаторних розладів вивчений недостатньо, але передбачається, що вони виступають як клінічні прояви дисбалансу в нейротрансмітерних системах, зокрема серотонінергічної та допамінергічної [2,3].

Кінець 80-х років минулого століття ознаменувався серією фундаментальних відкриттів, які визначили біологічну роль оксиду азоту (NO). Показано, що ця сполука є однією з найважливіших молекул-посередників, що регулюють більшість фізіологічних функцій організму. Сучасні дослідження довели, що NO є одним із

медіаторів, який бере участь у неадренергічній, нехолінергічній нейропередачі у шлунково-кишковому тракті (ШКТ) [1,4]. Екзогенний NO викликає гіперполяризацію мембрани та розслаблення гладеньком'язових клітин ШКТ подібно до відповіді на електричне подразнення неадренергічних, нехолінергічних нейронів. Ентеральні нейрони, що є джерелом оксиду азоту розташовані по всьому ШКТ. Нейрональна NO-синтаза виявлена також у постгангліонарних холінергічних і нехолінергічних нервових закінченнях [6]. Мета нашої роботи – дослідити модулюючу роль оксиду азоту в механізмах індукованої скоротливої активності дистального відділу товстого кишечника щурів.

### МЕТОДИКА

Досліди проведено на гладеньком'язових смужках сигмоподібної кишки самців щурів лінії Вістар віком 8–10 тиж. Тварин утримували в стандартних умовах віварію. Для дослідів зі стінки кишки вирізали подовжні смужки довжиною 7–8 і шириною 1 мм. Таку смужку закріплювали в проточній термостатованій експериментальній камері при сталій температурі 37 °С. Місткість камери була 400 мкл, а швидкість протікання

розчину 3 мл/хв (стандартний розчин Кребса із концентрацією кальцію 2,5 ммоль/л). Після вміщення смужки в камеру їй надавалося пасивне напруження до 1000 мг для створення умов, близьких до ізометричного режиму скорочень. Скоротливу активність реєстрували за допомогою механоелектричного перетворювача 6СМЗ. Реєстрацію починали після досягнення стабільних спонтанних скорочень. Використовували збуджувальні медіатори – ацетилхолін (АХ), простагландин F2 $\alpha$  та серотонін. Електричний сигнал запам'ятовувався на комп'ютері в цифровому вигляді. Результати обробляли за допомогою програм Origin 5.0 та Excel. Вірогідність змін визначали за допомогою критерію t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У всіх проведених експериментах для гладеньком'язових смужок товстого кишечника була характерна спонтанна скоротлива активність, що проявлялася в ритмічних скороченнях та розслабленнях з частотою 0,01–0,3 Гц. Особливих відмінностей у скоротливих проявах різних смужок не спостерігалось. В проміжках між спонтанними фазними скороченнями спостерігалися скорочення із меншою амплітудою, частотою 0,35–0,4 Гц.

При внесенні в проточний розчин блокатора NO-синтази – N-метил-L-аргініну (L-NMMA) в концентрації 10<sup>-5</sup> моль/л спостерігали зміну характеру спонтанної скоротливої активності, а саме збільшення частоти до 0,1–0,2 Гц з одночасним зменшенням амплітуди м'язових скорочень.

Дія основного медіатора скоротливої активності гладеньких м'язів ШКТ – АХ, починаючи з концентрації 5·10<sup>-8</sup> до 5·10<sup>-7</sup> моль/л призводила до збільшення частоти м'язових скорочень майже вдвічі. Подальше підвищення концентрації Ах призводило до менш прогресивного збільшення частоти скорочень, але супроводжувалося підви-

щенням тонічного напруження і загального інтегралу скорочення.

Дія АХ на фоні блокатора синтезу NO – L-NMMA мала свої особливості порівняно із дією тільки одного АХ. Так, особливо слід відмітити значне збільшення частоти м'язових скорочень за умов блокади синтезу NO-синтази. Якщо порівняти дію АХ в дозі 10<sup>-8</sup> моль/л на скоротливу активність і його комбіновану дію разом із L-NMMA (рис. 1,а,д) то можна побачити, що приріст частоти скорочень за таких умов перевищує 80%. При застосуванні зростаючої концентрації 2·10<sup>-8</sup> моль/л за наявності L-NMMA ця різниця стає трохи меншою – 38%, а в дозі 3·10<sup>-8</sup> моль/л частота навіть зменшується (близько 20%), але на фоні більш різкого зростання тетанічних м'язових скорочень та інтегралу скорочення. Щодо м'язового напруження, то при збільшенні концентрації АХ від 10<sup>-8</sup> до 3·10<sup>-8</sup> моль/л воно зростає помірно ступінчасто, а у разі використання блокатора NO-синтази збільшується (див. рис. 1,д).

Таким чином можна припустити, що послаблення NO-ергічного гальмування гладеньких м'язів товстого кишечника буде призводити до посилення його моторної функції.

Дію простагландину F2 $\alpha$  на м'язові скорочення за умов блокади NO-синтази досліджували в інтервалі доз 10<sup>-7</sup>–10<sup>-5</sup> моль/л. При цьому спостерігалось незначне збільшення амплітуди скорочень. При дії простагландину (10<sup>-5</sup> моль/л) та його комбінації з блокатором синтезу NO вона збільшувалася більше ніж на 110%.

Збуджувальна дія серотоніну (10<sup>-8</sup>–10<sup>-6</sup> моль/л) проявлялася як у збільшенні амплітуди, так і частоти скорочень гладеньком'язового препарату (див. рис.2,б,д).

В проведених нами дослідженнях за умов блокади NO-синтази при дії серотоніну спостерігалось значне зменшення амплітуди скорочень, яке становило 57,46;

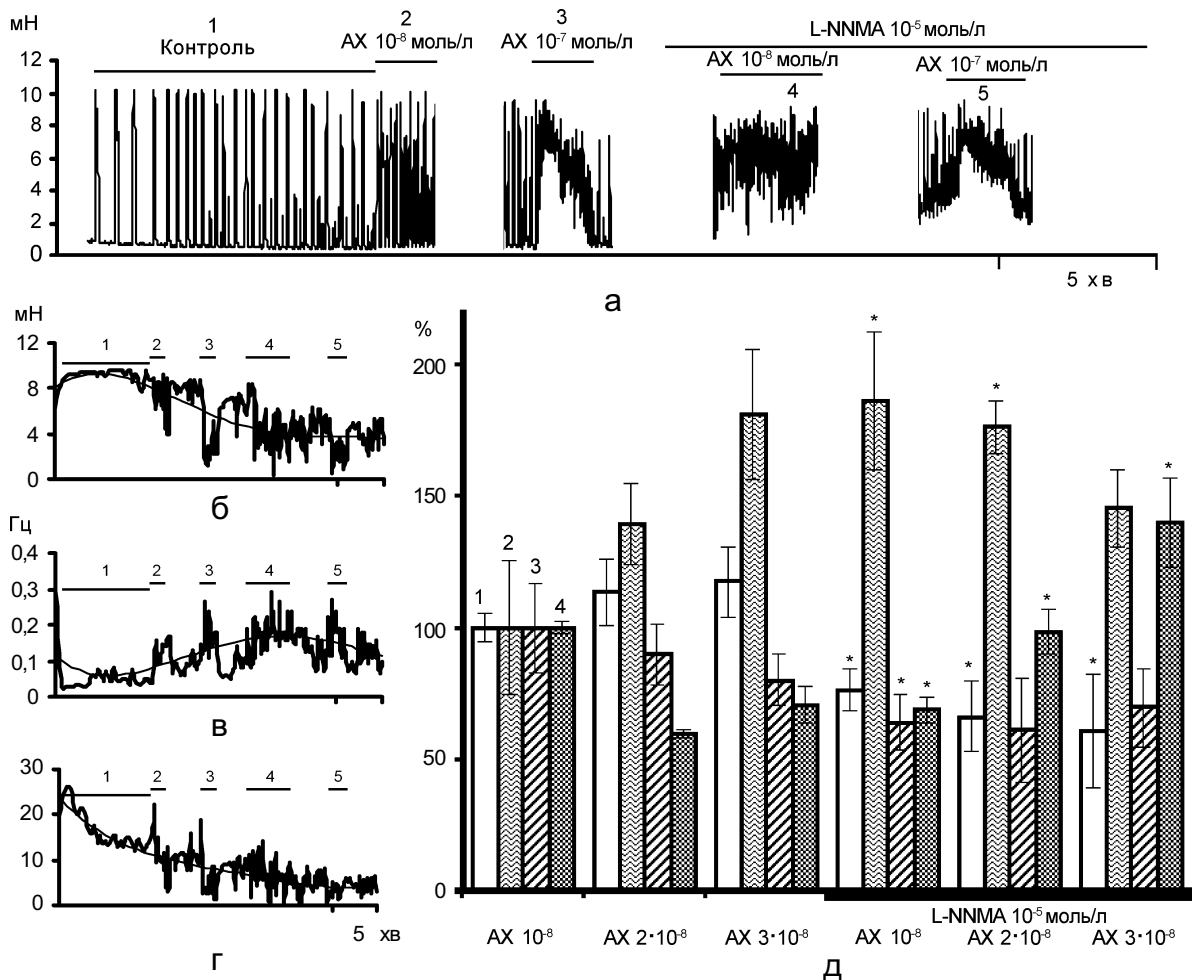
71,29; 51,81% для доз серотоніну  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  моль/л відповідно і значне збільшення частоти скорочень до 116,39; 172,46; 146,15% для тих же доз, але без блокування NO-синтази. Інтеграл скорочення дещо знижувався до 73 і 67% для доз  $10^{-7}$   $10^{-6}$  моль/л відповідно.

Відомо, що неадренергічне, нехолінергічне гальмування має велике значення для гладеньком'язової мускулатури товстого кишечника. Це гальмування значною мірою

опосередковано NO-залежними механізмами. Особливо важливу роль у реалізації моторно-евакуаторної функції товстого кишечника відіграє ендогенне NO [7,8].

## ВИСНОВКИ

Блокатор NO синтази – L-NNMA активує спонтанну активність гладеньких м'язів товстої кишки щурів. Дія L-NNMA на активність спонтанних та індукованих



Фиг.1. Характер скоротливої активності гладеньком'язової смужки щура при аплікації ацетилхоліну (Ах) в різних концентраціях в поєднанні з блокатором NO-синтази – L-NNMA: а - типовий приклад запису індукованих ацетилхоліном скорочень без блокування NO-синтази та за умов її пригнічення, б - зміна амплітуди скорочень, в - частоти, г - інтегрального показника, д - співвідношення амплітуди - 1, частоти - 2, інтегрального показника - 3 та тонічного напруження 4, (%)

\* P < 0,05

м'язових скорочень, що проявлялася в проведених дослідженнях їх активацією, свідчить про важливу роль неадренергічного медіатора NO в гладеньком'язових клітинах товстого кишечника. Вплив збуд-

жувальних медіаторів – АХ, простагландину F2 $\alpha$ , серотоніну за умов блокади NO-синтази призводить до підвищення частоти скорочень, напруження гладеньких м'язів і зменшення (P<0,05) амплітуди та

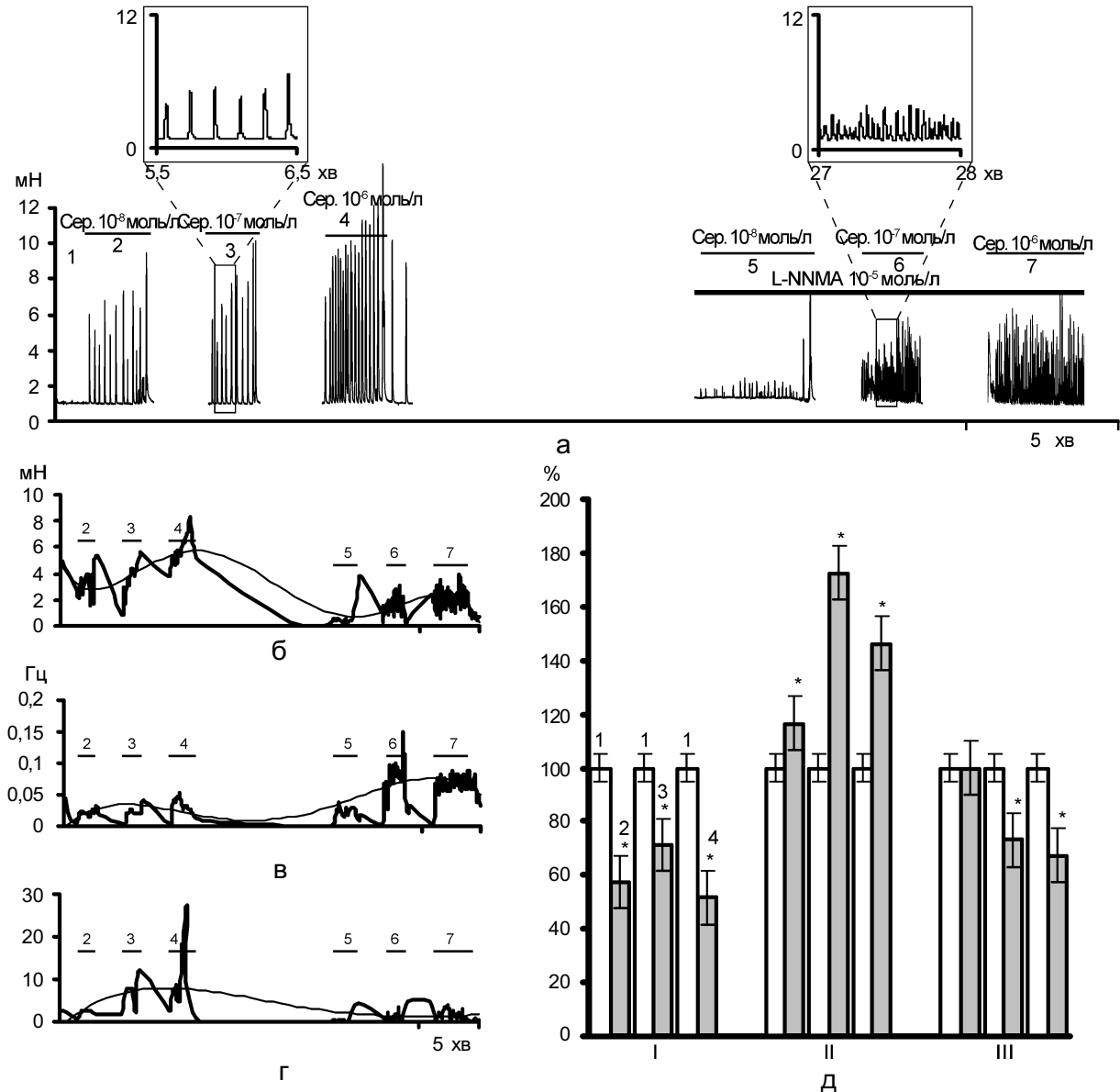


Рис.2. Характер скоротливої активності гладеньком'язової смужки щура при аплікації серотоніну (Сер) в різних концентраціях у поєднанні з блокатором NO-синтази – L-NNMA: а - типовий приклад запису індукованих серотоніном скорочень без блокування NO-синтази та за умов її пригнічення, б - зміна амплітуди скорочень, в - частоти, г - інтегрального показника скорочень, д - співвідношення амплітуди - I, частоти - II, інтегрального показника - III за умов дії 10<sup>-8</sup> моль/л серотоніну - 2, 10<sup>-7</sup> моль/л серотоніну - 3, 10<sup>-6</sup> моль/л серотоніну в поєднанні з 10<sup>-5</sup> моль/л L-NNMA порівняно з дією серотоніну в тих же концентраціях -1, (%)  
\* P < 0,05

інтегралу індукованих скорочень. Виявлені ефекти зміни скоротливої активності за умов відсутності NO-ергічних впливів будуть відображатися на моторно-евакуаторних властивостях дистального відділу товстого кишечника. Таким чином, одержані факти дають підстави говорити про значення NO-ергічних гальмівних впливів у регуляції скоротливої активності кишечника не тільки у лабораторних тварин, а і у людини. Це дає підстави проведення клінічних досліджень цього феномену і розробки методів його корекції.

**O.G. Shadrin, S.M. Gotsulyak, A.G. Tsykrun**

#### **INDUCED CONTRACTILE ACTIVITY OF SMOOTH MUSCLES OF THE COLON IN RATS AFTER NO-SYNTASE INHIBITION**

NO involvement in the mechanisms of the contractile activity of the smooth muscle cells was studied in the colon. The differences in the effects of different transmitters on the kinetics of the contractile activity after NOS inhibition have been determined.

*Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е. и соавт. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. – М.: Наука, 1998. – 156 с.
2. Физиология и патофизиология желудочно-кишечного тракта. Под ред. Дж.М.Полак (пер. с англ.) М.: Медицина, 1989. – 496 с.
3. De Ponti F., Tonini M. Irritable bowel syndrome. New agents targeting serotonin receptor subtypes // *Drugs*. – 2001. – **61**, №3. – P. 317-32.
4. Gustafsson L.E., Wiklund N.P., Wiklund S.U., Cedervqvist B., Persson M.G. and Moncada S. Modulation of autonomic neuroeffector transmission by nitric oxide-like activity in guinea pig smooth muscle. In: *Nitric Oxide from L-arginine: A Bioregulatory System*, ed. By Moncada S & Higgs E.A., Elsevier, Amsterdam. – 1990. – P. 177-181.
5. Jones R, Lydeard S. Irritable bowel syndrome in the general population // *BMJ*. – 1992. – **304**. – P. 87-90.
6. Lundberg J.O., Lundberg J.M., Alving K., Weitzberg E. Nitric oxide and inflammation: The answer is blowing in the wind // *Nature Medicine*. – 1997. – **3**. – P. 30-31.
7. Mizuta Y., Takahashi T., Owyang C. Nitregic regulation of colonic transit in rats // *Amer. J. Physiol.* – 1999. – **227**. – P. G275-G274.
8. Takahashi T., Owyang C. Regional differences in the nitregic innervation between the proximal and the distal colon in rats // *Gastroenterology*. – 1998. – **115**. – P. 1504-1512.
9. Thompson W.G., Irvine E.J., Pare P., Ferrazzi S., Rance L. Functional gastrointestinal disorders in Canada: first population-based survey using Rome II criteria with suggestions for improving the questionnaire // *Dig. Dis. Sci.* – 2002. – **47**, №1. – P. 225-235.
10. Thomson S, et al. Symptoms of irritable bowel in school children: prevalence and psychosocial effects // *J. Pediatr. Health. Care*. – 1996. – **10**, №6. – P. 280-285.

*Інститут педіатрії, акушерства та гінекології АМН України, Київ*

*Матеріал надійшов до редакції 17.12.03*