

РЕАЛИЗАЦИЯ ВЛИЯНИЙ БЛУЖДАЮЩЕГО НЕРВА НА МОТОРИКУ КИШЕЧНИКА В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРНЫХ АМИНОКИСЛОТ

М.В. Белобородая, С.А. Руткевич, А.Г. Чумак

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

Классическая концепция, согласно которой аминокислотные медиаторы осуществляют передачу сигналов преимущественно в центральной нервной системе, в последние десятилетия была пересмотрена. Участие нейромедиаторов в рефлекторных процессах периферической нервной системы, выявлено во многом благодаря исследованию энтеральной нервной сети *in vitro* и *in vivo* [1–4]. Согласно [5–8], на нейронах кишечных сплетений, кроме рецепторов к медиаторам пептидной природы, холино- и адренорецепторов, присутствуют также глутаматные рецепторы (NMDA, AMPA и метаботропные), рецепторы γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), глициновые рецепторы и др. Установлено, что глутамат, ГАМК и глицин, наряду с множеством других медиаторов энтеральной нервной системы (ацетилхолин, нейропептиды, серотонин, монооксид азота) регулируют моторную и секреторную функции пищеварительного тракта, поддержание водно-электролитного баланса, процесс холекинеза [5, 8]. Тем не менее, в работах разных исследователей существуют противоречия относительно направленности регуляторных влияний, опосредованных аминокислотными медиаторами. Известны работы, в которых приводятся убедительные доводы в пользу возникновения деполяризующего влияния глицина и ГАМК на мембраны нейроцитов кишки и энтероцитов [6–9]. Вместе с тем, другие авторы приводят аргументы, указывающие на традиционный, то есть тормозный эффект ГАМК [1, 7]. Установление роли аминокислотных тормозных медиаторов (глицина и ГАМК) в реализации моторной активности различных отделов пищеварительного канала, будет способствовать разработке доступного, без побочных эффектов пути коррекции функциональных дискинезий.

Целью работы являлся анализ характера влияния глицина и γ -аминомасляной кислоты на реализацию сократительной активности в тощей кишке крысы в ответ на электростимуляцию ветвей блуждающего нерва под диафрагмой.

Методы исследования

Эксперименты выполнены на 27 наркотизированных (уретан 500 мг/кг и нембутал 30 мг/кг) крысах (250–300 г) в условиях «острого опыта». Всем животным выполнялась лапаротомия. Для поддержания жизнедеятельности органов брюшной полости их орошали теплым свежеприготовленным раствором Рингера. Блуждающий нерв (*n. vagus*) отделяли от брюшного отдела пищевода под диафрагмой с помощью стеклянных вытянутых крючков и пересекали. Периферический фрагмент брали на лигатуру и помещали на биполярные хлорсеребряные электроды для воздействия электрическим током прямоугольной формы (длительность стимула 1 мс, интенсивность раздражения 5 В, частота следования стимулов 1 Гц) в течение 20 с. Регистрацию электрических потенциалов гладких мышц кишки выполняли с помощью прижимных хлорсеребряных биполярных электродов. Для регистрации и обработки сигналов использовали стандартную электрофизиологическую установку, программу «InputWin», разработанную в Институте физиологии НАН Беларуси [1]. Анализировали показатель площади базального ритма (интеграл суммарной активности по времени в машинных единицах, м.е.) и количество «быстрых» пиков в минуту (имп/мин). Для определения влияния нейроактивных аминокислот на реализацию сократительной активности гладких миоцитов кишки растворы глицина и ГАМК (20 мг в 1 мл дистиллированной воды) вводили в полость тощей кишки. Дозы заимствованы из

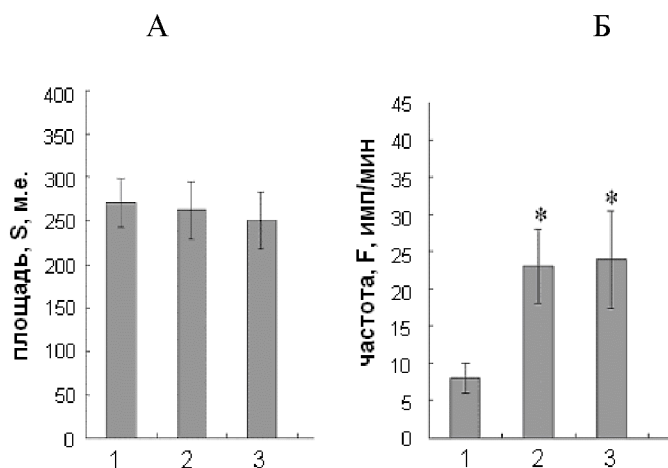
литературы [1, 9, 11, 12], в качестве контроля вводили дистиллированную воду объемом 1 мл.

Статистическую обработку данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента после проверки соответствия распределения данных нормальному. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При регистрации электрических потенциалов тощей кишки наблюдались характерные для этого вида животных длительные периоды плавного нарастания и уменьшения амплитуды медленных волн базального ритма, на экстремумах которых периодически появлялись короткие высоковольтные всплески импульсов, отражающие суммарную активность потенциалов действия при сокращениях гладких мышц. Частота следования медленных волн никогда не меняется и, как известно, является важнейшей физиологической константой для каждого отдела кишки. Амплитуда волн базального ритма может зависеть от кровоснабжения органа, а также от тормозных и стимулирующих влияний со стороны вегетативных нервов и от гуморального статуса органа [13, 14].

Электростимуляция (5 В, 1 Гц, 1 мс) ветвей блуждающего нерва под диафрагмой сопровождалась увеличением частоты следования потенциалов действия в электроэнтеромиограмме (без значительного изменения амплитуды волн основного ритма (рисунок 1).



1 – фон, 2 – стимуляция *n. vagus*, 3 – сразу после прекращения воздействия

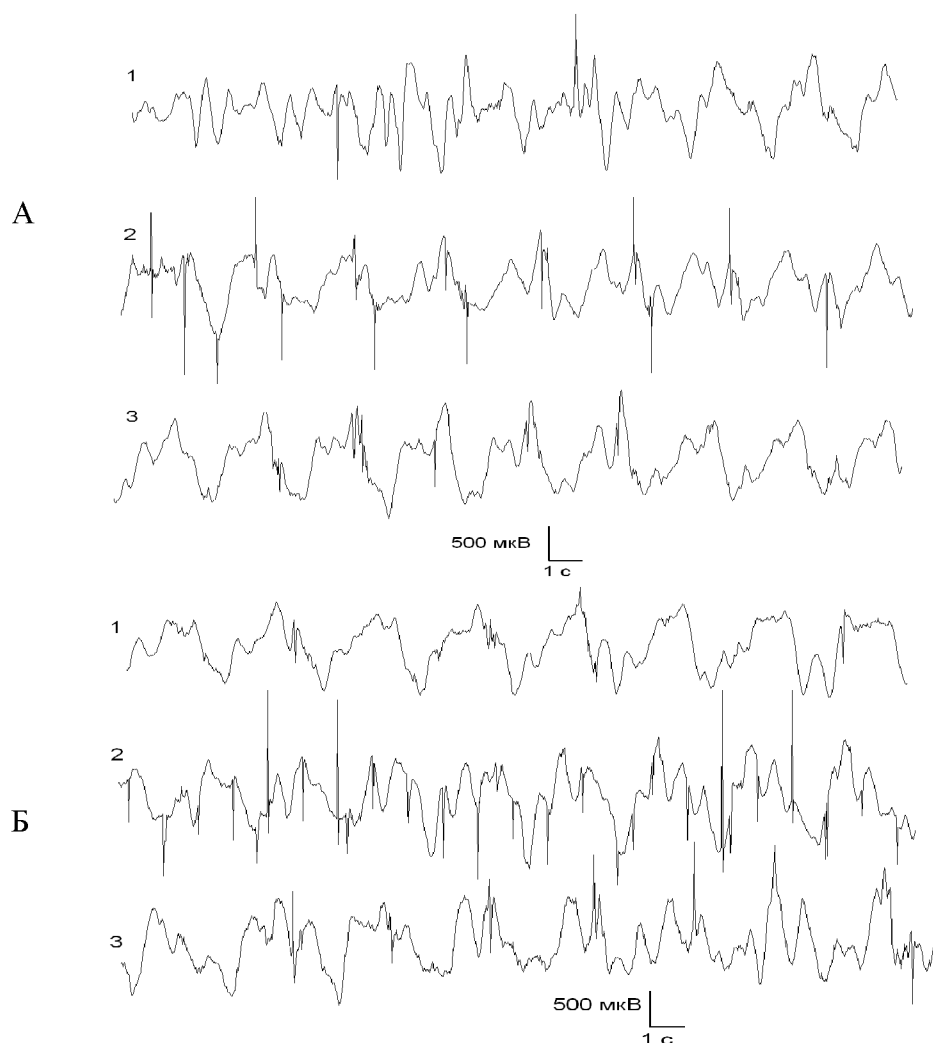
Рисунок 1 – Изменение площади базального ритма (А) и частоты быстрых пиков (Б) электроэнтеромиограммы крысы (n=22) в процессе электростимуляции *n. vagus* (1 мс, 5 В, 1 Гц)

* – различия средних арифметических столбца 2 и 3 по сравнению со столбцом 1 достоверны с уровнем значимости $p < 0,05$

В серии контрольных опытов (n=7) установили, что введение 1 мл дистиллированной воды в полость кишки не отражалось на формировании спонтанной электроэнтеромиограммы и реакции, вызванной стимуляцией блуждающего нерва.

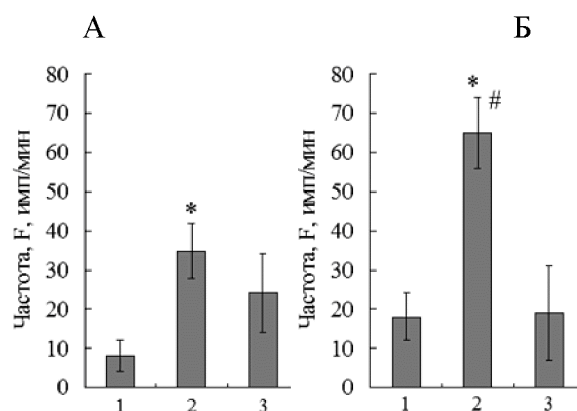
Во всех пробах после введения глицина в дозе 20 мг (n=10) в полость тощей кишки и последующей частотной электростимуляцией (5 В, 1 Гц, 1 мс) блуждающего нерва, электрическая активность кишки усиливалась по сравнению с фоном (рисунок 2).

На электроэнтеромиограмме усиление активности проявлялась, главным образом, в увеличении количества «быстрых» потенциалов (в 2 раза против контроля, $p = 0,03$), регистрируемых в процессе стимуляции ветвей блуждающего нерва (рисунок 3).



1 – фон, 2 – в процессе стимуляции *n. vagus*, 3 – в первую минуту после прекращения воздействия

Рисунок 2 – Электроэнтеромиограммы тощей кишки крысы в процессе электростимуляции *n. vagus* до (А) и через 10 минут после введения 20 мг глицина (Б) в полость тощей кишки



1 – фон, 2 – стимуляция *n. vagus*, 3 – после прекращения воздействия

Рисунок 3 – Изменение частоты «быстрых» пиков электроэнтеромиограммы (n=10) в процессе электростимуляции *n. vagus* (1 мс, 5 В, 1 Гц) в контроле (А) и после введения 20 мг глицина в полость кишки (Б)

* – различия средних арифметических столбца 2 по сравнению со столбцом 1 достоверны с уровнем значимости $p < 0,05$; # – достоверная разница между одноименными столбцами в контроле и после введения аминокислоты ($p < 0,05$)

Возбуждающий эффект после введения аминокислоты начинался через 5–6 минут и длился на протяжении 20 минут. Электростимуляцию ветвей блуждающего нерва под диафрагмой осуществляли на 5–6 минуте после инстилляции. По показателю площади основного ритма также проявлялась тенденция к увеличению (таблица 1), однако различия были не достоверны.

После введения в полость кишки ГАМК в дозе 20 мг (n=10) и последующей электростимуляции (5 В, 1 Гц, 1 мс) ветвей блуждающего нерва, происходило ослабление электрической активности кишки. Ингибирующий эффект начинался с 4–5-ой минуты после инъекции и продолжался в течение 30–40 минут. Площадь медленных волн базального ритма, как спонтанного, так и регистрируемого при электростимуляции блуждающего нерва, снижалась по сравнению с уровнем до введения раствора аминокислоты и по сравнению с контролем в 1,5 раза. Тем не менее, статистический анализ не выявил значимого отличия (таблица 2).

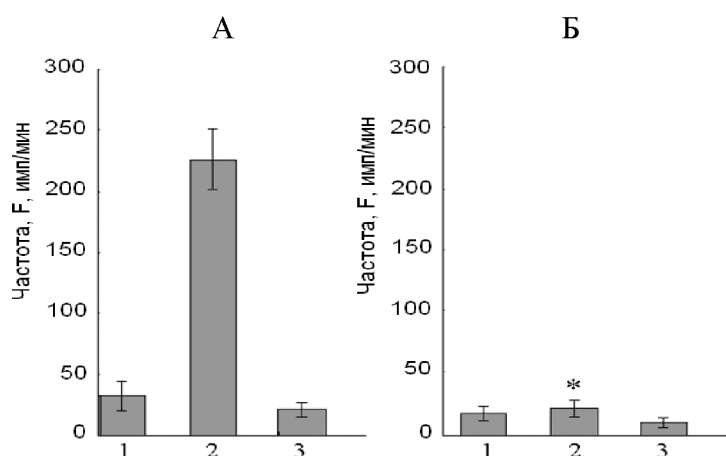
Таблица 1 – Изменение площади базального ритма ($X \pm x$ м.е.) электроэнтеромиограммы тощей кишки в процессе электростимуляции (1 мс, 5 В, 1 Гц) *n. vagus* до и после внутрипросветного введения глицина (n=10)

Условия регистрации	Фон	Стимуляция <i>n. vagus</i>	После стимуляции
До введения растворов	288±56	227±32	330±34
Контроль	287±14	289±20	299±19
Введение глицина (через 10 минут)	331±23	331±9	254±21

Таблица 2 – Изменение площади базального ритма ($X \pm x$, м.е.) электроэнтеромиограммы тощей кишки в процессе электростимуляции (1 мс, 5 В, 1 Гц) *n. vagus* до и после внутрипросветного введения ГАМК (n=10)

Условия регистрации	Фон	Стимуляция <i>n. vagus</i>	После стимуляции
До введения растворов	293±28	297±57	293±31
Контроль	287±14	289±20	299±19
Введение ГАМК (через 10 минут)	185±50	188±28	180±51

Количество потенциалов действия, ассоциированных с сокращениями кишки, после введения ГАМК в полость кишки также уменьшалось (рисунок 4). Спонтанная активность изменялась незначительно, но в процессе стимуляции блуждающего нерва количество «быстрых» потенциалов не превышало уровень спонтанной активности, то есть не связанной с активацией блуждающего нерва.



1 – фон, 2 – стимуляция *n. vagus*, 3 – после прекращения воздействия

Рисунок 4 – Изменение частоты «быстрых» пиков электроэнтеромиограммы в процессе электростимуляции *n. vagus* (1 мс, 5 В, 1 Гц) до введения (А) и после внутрипросветного введения 20 мг ГАМК (Б)

* – различия средних арифметических одноименных столбцов (2) достоверны с уровнем значимости $p < 0,01$ (n=10)

В результате проведенных исследований установлено, что глицин вызывает усиление спонтанной и вызванной электростимуляцией ветвей блуждающего нерва электрической активности тощей кишки. Полученные данные не противоречат сведениям, приведенным в литературе [6, 12]. Согласно этим источникам возбуждающий эффект глицина на нейронные сети кишечного сплетения взрослых животных реализуется благодаря тем же механизмам, с помощью которых возникает тормозный эффект в ЦНС, то есть в результате открытия потенциалчувствительных Cl^- каналов. В этих же источниках приводятся доводы в пользу активирующего влияния этого нейромедиатора в кишке преимущественно на ацетилхолинергические нейроны и клетки, продуцирующие секретин (S-нейроны) [1, 2, 5, 15]. В соответствии с исследованиями некоторых авторов S-нейроны могут являться и мотонейронами и интернейронами [5, 15]. Возбуждающий эффект глицина можно также рассматривать как результат взаимодействия этого лиганда с глициновым сайтом NMDA глутаматных рецепторов, которые также присутствуют в нервных сплетениях кишки и участвуют в регуляции моторной и секреторной функций [6].

Выводы

Выполненные нами исследования с введением ГАМК в полость тощей кишки позволяют сделать заключение о том, что этот медиатор тормозит электрическую и сократительную активность гладких мышц этого отдела пищеварительной трубки. Несмотря на то, что большинство работ указывают на возбуждающее действие ГАМК в кишечных нервных сетях, действие этого лиганда на желудочнокишечную моторику признается комплексным и разнонаправленным [5, 7, 11]. Влияние экзогенной ГАМК на моторику желудочнокишечного тракта авторы приведенных работ связывают со сложным балансом стимулирующих и ингибирующих эффектов, адресованных холинергическим и NO-ергическим нейронам. Через пресинаптические ГАМК_B-рецепторы опосредуется сдерживание, а через ГАМК_A-рецепторы стимуляция моторики, причем эффекты реализуются в результате подавления или усиления выделения ацетилхолина [5, 7, 15]. Подобным образом ГАМК регулирует и выделение монооксида азота NO-ергическими нейронами кишки. С одной стороны, ГАМК_A-рецепторы, обнаруженные на постсинаптической мембране NO-ергических нейронов, обуславливают неадренергическое нехолинергическое расслабление гладких мышц подвздошной кишки собаки и морской свинки [5, 7]. С другой стороны, эти же рецепторы, локализованные на пресинаптической мембране NO-ергических нейронов, ответственны за подавление продукции NO, и могут, вследствие прекращения его выработки, вызывать усиление моторики [15].

Список литературы

1. Effects of excitatory and inhibitory neurotransmission on motor patterns of human sigmoid colon in vitro / M. Aulı [et al.] // *British Journal of Pharmacology*. – 2008. – Vol. 155. – P. 1043–1055.
2. Grider, J.R. Neurotransmitters Mediating the Intestinal Peristaltic Reflex in the Mouse / J.R. Grider // *J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2003. – Vol. 307, № 2. – P. 460–467.
3. Lomax, A.E. Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon / A.E. Lomax, J.B. Furness // *Cell Tissue Res*. – 2000. – Vol. 302, № 1. – P. 59–72.
4. Messenger, J.P. Electrophysiological and morphological classification of myenteric neurons in the proximal colon of the guinea-pig / J.P. Messenger, J.C. Bornstein, J.B. Furness // *Neuroscience*. – 1994. – Vol. 60. – P. 227–244.
5. Hebeiss, K. Cholinergic and GABAergic regulation of nitric oxide synthesis in the guinea pig ileum / K. Hebeiss, K. Heinz // *Am. J. Physiol.* – 2000. – Vol. 276. – P. 862–866.
6. Johnson, J.W. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons / J.W. Johnson, P. Ascher // *Nature*. – 1987. – Vol. 325. – P. 529–531.
7. Krantis, A. GABA in the Mammalian Enteric Nervous System / A. Krantis // *News Physiol. Sci.* – 2000. – Vol. 15. – P. 284 – 290.

8. Glutamatergic enteric neurons / M.T. Liu [et al.] // Journal of Neuroscience. – 1997. – Vol. 17. – P. 4764–4784.
9. Glycine activates myenteric neurones in adult guinea-pigs / M. Neunlist [et al.] // Journal of Physiology. – 2001. – Vol. 536, № 3. – P. 727–739.
10. Солтанов, В.В. Компьютерные программы обработки электрофизиологических данных / В.В. Солтанов, В.Е. Бурко // Новости медико-биологических наук. – 2005. – №1. – С. 90–96.
11. Effects of GABA on circular smooth muscle spontaneous activities of rat distal colon / S. Bayer [et al.] // Life Sci. – 2002. – Vol. 71, № 8. – P. 911–925.
12. Glycine activates myenteric neurones in adult guinea-pigs / M. Neunlist [et al.] // Journal of Physiology. – 2001. – Vol. 536, № 3. – P. 727–739.
13. Солтанов, В.В. Механизмы саморегуляции вегетативных функций в норме и патологии / В.В. Солтанов. – Минск: Наука и техника, 1994. – 335 с.
14. Солтанов, В.В. Нервные и гуморальные механизмы нарушений вегетативных функций при ишемии-реперфузии тонкой кишки / В.В. Солтанов, А.Г. Чумак, В.С. Левковец // Теория и практика медицины: сб. научн. тр. – 2000. – Вып. 2. – С. 239–241.
15. Neal, K.B. Targets of myenteric interneurons in the guinea-pig small intestine / K.B. Neal, J.C. Bornstein // Neurogastroenterol Motil. – 2008. – Vol. 20, № 5. – P. 566–575.

VAGUS INFLUENCES RELAXATION ON INTESTINE MOTILITY AFTER INHIBITORY AMINO ACIDS INJECTION

M.V. Beloborodaya, S.A. Rutkevich, A.G. Chumak

Belarusian State University, Minsk, Belarus

This study explored influences of glycine and GABA (20 mg) on both spontaneous and evoked by *n. vagus* stimulation (1 ms, 5 V, 1 Hz) intestine motor activity. The experiments were performed on 27 anesthetized rats (urethane 500 mg/kg and nembutal 30 mg/kg).

The results of the investigations indicate that glycine injection increased intestine motility and GABA injection led to inhibitory effect in rat's small intestine motor activity.