

# Wpływ tlenu azotu na motorykę żwacza, trawieńca i dwunastnicy u owiec

EWA CEBRAT, TERESA WĘGRZYN, ZBIGNIEW LEROCH, DIONIZY ZIĘBA

Katedra Fizjologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Ceburat E., Węgrzyn T., Leroch Z., Zięba D.

## The influence of nitric oxide on the motor activity of the rumen, abomasum and duodenum in sheep

### Summary

The aim of the study was to elucidate the influence of NO on the regulation of the motor activity of the rumen, pyloric part of abomasum and the proximal duodenum in sheep *in vivo*. Intravenous infusion of N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a blocker of NO synthase, in a dose 7-10 mg·kg<sup>-1</sup>, produced a premature phase III of the migrating motor complex (MMC) whose length was longer by 263% and the motor activity was 333% stronger than the control. L-NAME caused a significant growth of the frequency of MMC phase III on the day of infusion, so their duration time was 117% longer and their motor activity 136% stronger. L-NAME also produced a significant shortening of MMC II phase length by 91%. These changes caused the MMC cycle length to be shorter by 88% and remained significantly shorter until the 2nd day after L-NAME infusion (by 62%). Administration of L-arginine (500 mg·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>) in combination with L-NAME abolished these effects of duodenum mobility induced by L-NAME or considerably restricted them. L-arginine alone delayed the appearance of MMC III phase and inhibited its activity.

The motor activity of the abomasum increased slightly but significantly (by 7%) on the 2nd day after L-NAME infusion. On the day of L-NAME infusion the inhibition of abomasum activity may have resulted from an inhibitory enterogastric reflex induced by the very strong activity of duodenum. L-NAME caused no significant increase of the rumen motor activity on the day of infusion which increased significantly on the 2nd and 3rd day (by 4% and 6% respectively). L-arginine in combination with L-NAME did not change the motor activity of the abomasum on the 1st day and abolished the effect of rumen mobility induced by L-NAME. L-arginine alone decreased the motor activity of the rumen and abomasum on the day of infusion.

We conclude that NO plays a significant role in regulating MMC cycling in the duodenum of sheep by elongating the duration time of this cycle. NO also decreased the motor activity of the MMC III phase. Its inhibition influence on the rumen and abomasum motor activity seems to be less significant.

**Keywords:** nitric oxide, gastrointestinal motility, sheep.

Wpływ tlenu azotu na mięśniówkę różnych odcinków przewodu pokarmowego został dość dobrze poznany w badaniach *in vitro*, lecz jego funkcja w regulacji motoryki przewodu pokarmowego *in vivo* nie jest jeszcze dokładnie ustalona. Z badań *in vivo* wynika, że tlenek azotu jako transmitter hamujący neuronów układu nieadrenergicznego niecholinergicznego (NANC) bierze udział w tak ważnych odruchach jak rozluźnienie części proksymalnej żołądka podczas jedzenia, czyli w tzw. „rozluźnieniu przyjęcia”, czy też w zstępującym odruchu hamującym w odpowiedzi na rozciągnięcie (8-10, 17, 19). Stwierdzono, że tlenek azotu pełni istotną rolę w regulacji perystaltyki przełyku u oposa (2) oraz w zmniejszaniu tonusu dolnego żwacza przełyku u człowieka (7) i odźwiernika u psa (1). W badaniach, w których stosowano inhibitory syntazy NO wykazano, że tlenek azotu hamuje motorykę dwunastnicy (4, 15) i wywiera toniczny rozluźniający wpływ na jelito czcze u szczura (12). Tlenek azotu, zmniejszając aktywność motoryczną żołądka, opóźnia jego opróżnianie u ludzi (6, 19) i u psa (11).

Wyniki badań *in vivo* wskazują również na to, że tlenek azotu odgrywa główną rolę w regulacji czasu trwania migrującego kompleksu motorycznego (MMC) u psa (18) i u szczura (3, 14). Przypuszcza się nawet, że zaburzenia w syntezie tlenu azotu prowadzą do różnego typu zaburzeń w motoryce przewodu pokarmowego (9, 16).

Opublikowane dotychczas wyniki badań dotyczą roli tlenu azotu w regulacji motoryki przewodu pokarmowego u zwierząt o innym wzorcu motorycznym niż przeżuwacze i pochodzą głównie z doświadczeń przeprowadzanych *in vitro* bądź w narkozie ogólnej. Z tych przyczyn podjęto próbę wyjaśnienia funkcji tlenu azotu w regulacji motoryki żwacza, części odźwiernikowej trawieńca i początkowego odcinka dwunastnicy u owiec *in vivo*.

### Materiał i metody

Doświadczenia przeprowadzono na 7 owcach, mieszańcach międzyrasowych obu płci, o masie ciała od 41-50 kg. Zwierzęta były karmione dwa razy dziennie sianem i mie-



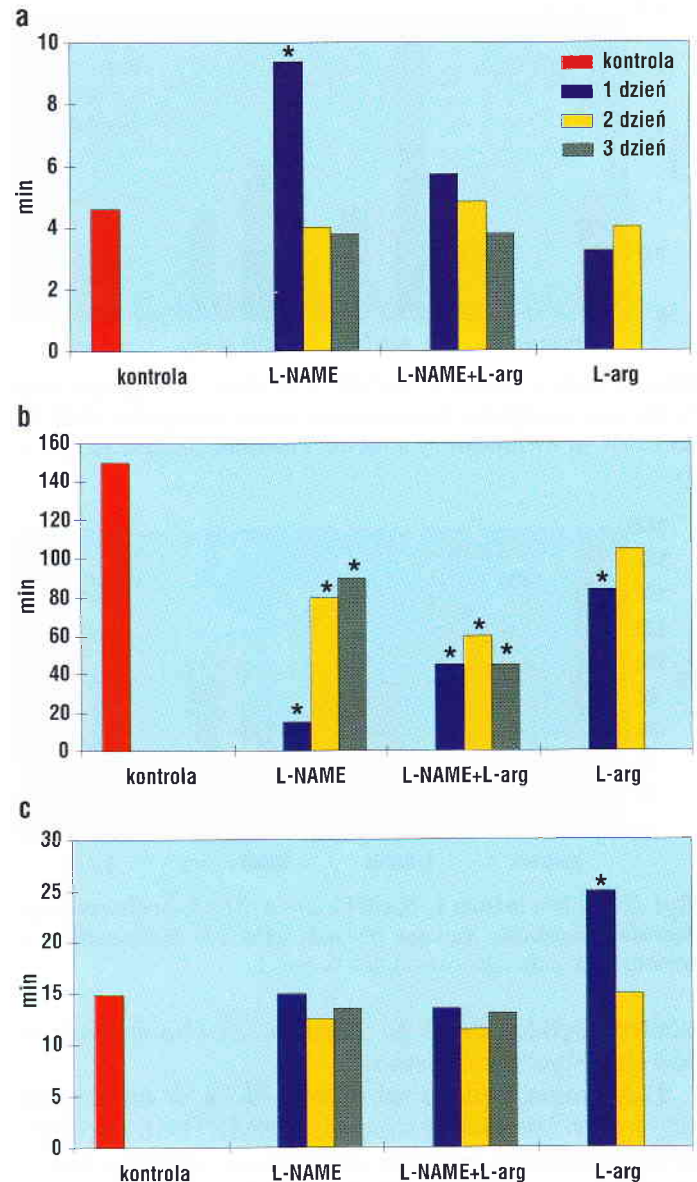
szanką CJ i miały wolny dostęp do wody. Zwierzętom w narkozie ogólnej przyszyto 3 transducery firmy RB Products: jeden do ściany worka dogrzbietowego żwacza, drugi do części odźwiernikowej trawieńca w odległości około 5 cm od odźwiernika oraz trzeci do ściany dwunastnicy, około 10 cm za odźwiernikiem. Wszystkie transducery były tak przyszyte, aby rejestrowały skurcze mięśniówki okrężnej. Motorykę rejestrowano elektroencefalografem Reega Duplex TR XVI, przystosowanym do rejestracji sygnałów elektrycznych z transducerów. Do doświadczeń przystępowano po upływie 7 dni od operacji, rozpoczynając je o jednakowej porze po porannym karmieniu. Przed każdym doświadczeniem umieszczano w żyłę szyjnej zewnętrzną kateter, przez który po 60-minutowym zapisie wstępnym motoryki, który obejmował III fazę MMC w dwunastnicy, podawano następujące środki: ester metyloowy N<sup>G</sup>-nitro-L-argininy (L-NAME, Sigma), inhibitor syntazy tlenu azotu, w dawce jednorazowej wynoszącej od 7-10 mg · kg<sup>-1</sup> lub L-argininą (Sigma), substrat syntazy tlenu azotu, w dawce 500 mg · kg<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>. Środki te rozpuszczano bezpośrednio przed infuzją w płynie izotonicznym. Zapis motoryki kontynuowano po podaniu przez 3 godziny oraz przez kolejne dwa dni o tej samej porze przez 4 godziny. W serii doświadczeń z podawaniem wyłącznie L-argininy zapis motoryki kontynuowano tylko następnego dnia po infuzji.

Przeprowadzono 4 serie doświadczeń: z podaniem wyłącznie L-NAME, z infuzją L-argininy poprzedzoną podaniem L-NAME, z infuzją wyłącznie L-argininy oraz kontrolne z infuzją płynu izotonicznego. Na każdej z owiec wykonano od 2 do 8 doświadczeń z każdej serii.

Wyniki opracowywano mierząc czas trwania wszystkich trzech faz tworzących jeden cykl MMC w dwunastnicy: fazy I charakteryzującej się brakiem skurczów, fazy II, w czasie której występują nieregularne skurcze fazy III, tzw. fazy wzmożonej aktywności motorycznej oraz obliczając aktywność motoryczną żwacza, trawieńca i III fazy MMC. Za aktywność tą przyjęto łączną długość krzywej na zapisach uzyskanych w okresach 2-minutowych. Aby umożliwić porównywanie wyników wprowadzono wartość „względnej aktywności motorycznej” (WAM). Wartość WAM uzyskano przez obliczenie stosunku średniej aktywności motorycznej dla każdego kolejnych 2-minut zapisu danej serii doświadczeń do średniej z zapisu wstępnego, który przyjęto za kontrolę. Stwierdzono, że wartości kolejnych 2-minutowych pomiarów w kolejnych dniach doświadczeń miały rozkład normalny, co upoważniło do analizy wyników testem Studenta. Za istotne uznano te zmiany, dla których  $p < 0,001$ .

### Wyniki i omówienie

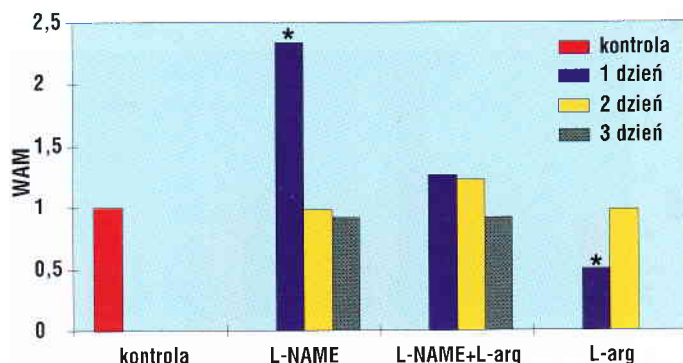
Dożylna infuzja inhibitora syntazy tlenu azotu – L-NAME w dawce 7-10 mg · kg<sup>-1</sup> powodowała prawie natychmiastowe (średnio po 1,6 min od podania) pojawienie się III fazy migrującego kompleksu motorycznego (MMC) w dwunastnicy. Aktywność motoryczna tej przedwczesnej III fazy sięgała średnio ok. 430% wartości kontrolnej, a czas jej trwania wydłużał się średnio do ok. 360% czasu kontrolnego. Przez cały czas po infuzji L-NAME, częstość występowania faz wzmożonej aktywności była czterokrotnie wyższa w



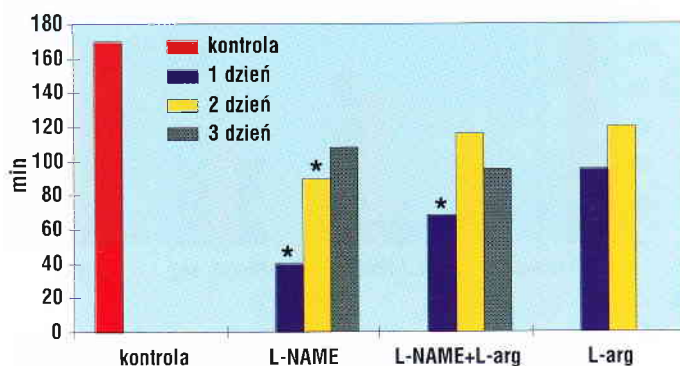
Ryc. 1. Wpływ infuzji L-NAME, L-NAME i L-argininy oraz wyłącznie L-argininy na czas trwania faz MMC w dwunastnicy u owiec. a – faza III, b – faza II, c – faza I, symbol \* oznacza statystyczną istotność różnicy wyniku eksperymentu w porównaniu z kontrolą z poziomem ufności  $p < 0,001$ .

porównaniu z kontrolną. Ich średni czas trwania był wówczas wydłużony do ok. 220% (ryc. 1a), a średnia aktywność motoryczna była ponad dwukrotnie wyższa (ryc. 2). Aktywność ta 2-go i 3-go dnia po infuzji nie odbiegała już od normy, ale częstość pojawiania się III fazy była wciąż prawie dwukrotnie wyższa. Ponad dziesięciokrotnemu skróceniu pod wpływem L-NAME ulegał czas trwania II fazy MMC (ryc. 1b). Zmiana ta pozostawała statystycznie istotna przez następne dwa dni. L-NAME nie zmieniał natomiast w istotny sposób czasu trwania I fazy (ryc. 1c).

W wyniku zmian wywołanych infuzją L-NAME czas trwania cykli MMC w dwunastnicy ulegał skróceniu o 88%, a drugiego dnia pozostawał jeszcze skrócony o 62% w porównaniu z czasem trwania cykli rejestrowanych w 4-godzinnych doświadczeniach kontrolnych. Czas trwania cykli MMC był krótszy od



Ryc. 2. Wpływ infuzji L-NAME, L-NAME i L-argininy oraz wyłącznie L-argininy na aktywność motoryczną (WAM) II fazy MMC w dwunastnicy u owiec. Pozostałe oznaczenia, jak w ryc. 1.

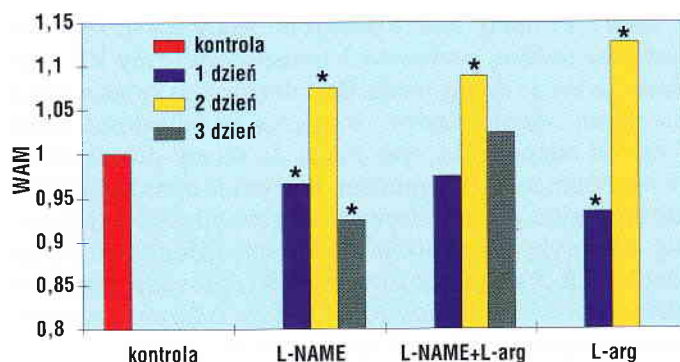


Ryc. 3. Wpływ infuzji L-NAME, L-NAME+L-argininy i wyłącznie L-argininy na czas trwania MMC w dwunastnicy u owiec. Pozostałe oznaczenia, jak w ryc. 1.

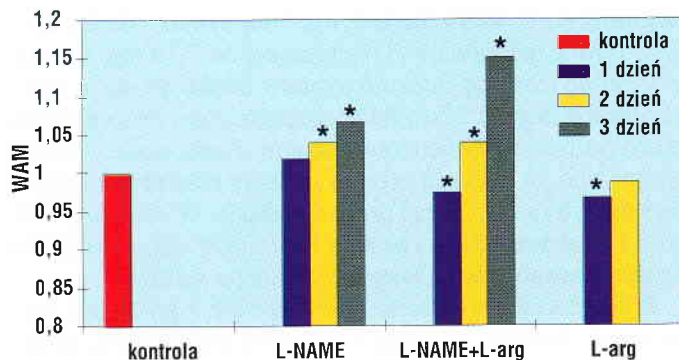
kontrolnego jeszcze 3-go dnia (ryc. 3), chociaż w sposób statystycznie nieistotny.

L-Arginina, będąca substratem NOS, w dawce  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  podana łącznie z L-NAME ( $7\text{-}10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) przeciwdziałała zmianie aktywności motorycznej i zmianie czasu trwania III fazy MMC wywołanym przez sam inhibitor (ryc. 2 i ryc. 1a) oraz ograniczała wpływ inhibitora na czas trwania II fazy w dniu infuzji (ryc. 1b). Zmniejszała również wpływ L-NAME na długość trwania cykli w dniu infuzji, a drugiego dnia całkowicie go znosiła (ryc. 3). Dożylna infuzja wyłącznie L-argininy opóźniała występowanie III fazy MMC i hamowała jej aktywność motoryczną w dniu infuzji o 47% (ryc. 2), nie zmieniając czasu jej trwania oraz wydłużała I fazę MMC o 75% (ryc. 1c) i skracła II fazę o 45% (ryc. 1b). Średnia długość trwania cykli MMC nie ulegała pod wpływem L-argininy statystycznie istotnej zmianie (ryc. 3).

Uzyskane wyniki wskazują, że hamowanie NOS powoduje istotne zmiany aktywności motorycznej początkowego odcinka dwunastnicy u owiec *in vivo*. Natychmiastowe pojawianie się przedwczesnej III fazy MMC wywołane dożylnym podaniem L-NAME sugeruje, że NO w istotny sposób hamuje wyzwalać wędrującego kompleksu motorycznego. Na taką funkcję tlenu azotu wskazuje również występowanie przedwczesnej III fazy MMC po infuzji L-NAME u głodnych psów (18) oraz ponowne pojawianie się III



Ryc. 4. Wpływ infuzji L-NAME, L-NAME+L-argininy i wyłącznie L-argininy na aktywność motoryczną (WAM) części odźwiernikowej trawieńca u owiec. Pozostałe oznaczenia, jak w ryc. 1.



Ryc. 5. Wpływ infuzji L-NAME, L-NAME+L-argininy i wyłącznie L-argininy na aktywność motoryczną (WAM) żwacza u owiec. Pozostałe oznaczenia jak w ryc. 1.

fazy MMC w jelicie cienkim u szczurów po nakarmieniu, wywołane podaniem innego inhibitora NOS – L-NNA (3, 14). W naszych doświadczeniach dożylnie podanie L-NAME powodowało nie tylko pojawienie się szczególnie aktywnej i wydłużonej przedwczesnej III fazy, ale podwyższało także częstość występowania następujących III faz MMC, których aktywność i czas trwania były zmienione już w mniejszym stopniu. U głodnych psów aktywność i czas trwania przedwczesnej III fazy, wywołanej podaniem L-NAME nie ulegały zmianom (18). Nasze wyniki natomiast świadczą o hamującym wpływie tlenu azotu również na aktywność motoryczną początkowego odcinka dwunastnicy podczas III fazy MMC. Następstwem stwierdzonego przez nas wzrostu częstości występowania III fazy po podaniu L-NAME było znaczne skrócenie czasu trwania II fazy MMC i całych cykli, utrzymujące się jeszcze następnego dnia. Skrócenie czasu trwania cykli MMC, nawet kilka dni po podaniu L-NAME stwierdzono również u psów (18) oraz u szczurów po L-NNA (3). Substrat NOS – L-arginina, podana łącznie z L-NAME przeciwdziałała większości stwierdzonych przez nas zmian w dwunastnicy wywołanych samym L-NAME lub je ograniczała. Sama L-arginina opóźniała występowanie III fazy MMC i hamowała jej aktywność oraz doprowadzała nawet w dniu infuzji do atonii dwunastnicy. U psów (18) i szczurów (14) nie stwierdzono istotnego hamującego działania L-argini-



ny na MMC, natomiast nitroprusydek sodu jako donor NO blokował indukcję III fazy u szczurów (14). Wyniki doświadczeń, w których stosowaliśmy L-NAME łącznie z L-argininą lub wyłącznie L-argininę potwierdzają naszą sugestię, że NO wpływa hamująco na aktywność III fazy migrującego kompleksu motorycznego oraz na jej występowanie, a tym samym na częstość występowania cykli MMC w początkowym odcinku dwunastnicy u owiec.

L-NAME wywoływał niewielki, chociaż statystycznie istotny spadek aktywności motorycznej trawieńca (ryc. 4). Spadek ten był jednak istotny tylko przez pierwsze dwie godziny, natomiast w trzeciej godzinie po podaniu zmiana ta była już nieistotna. Drugiego dnia po podaniu L-NAME występował statystycznie istotny wzrost aktywności motorycznej trawieńca. L-arginina podana łącznie z L-NAME nie wpływała na jego aktywność w dniu infuzji i nie przeciwdziałała zmianom wywołanym przez inhibitor NOS drugiego dnia. L-arginina hamowała motorykę trawieńca w sposób statystycznie istotny tylko w dniu infuzji (ryc. 4).

Hamowanie syntazy NO spowodowało w naszych doświadczeniach spodziewany wzrost aktywności motorycznej części odźwiernikowej trawieńca dopiero następnego dnia. Wyniki te możemy porównać jedynie z otrzymanymi przez innych autorów (11, 18) w doświadczeniach na psach, które wskazują na różny stopień pobudzenia motoryki części odźwiernikowej żołądka jednokomorowego po podaniu inhibitorów NOS. I tak u głodnych psów, L-NAME wywoływał w dniu infuzji niemal ciągłe serie skurczów tej części żołądka utrzymujące się przez kilka dni. U zwierząt tych po karmieniu obserwowano natomiast nieistotny wzrost częstości skurczów części odźwiernikowej żołądka.

Interpretacja naszych wyników mogłaby być następująca: bardzo gwałtowny i silny wzrost aktywności motorycznej dwunastnicy pod wpływem zahamowania syntazy NO powoduje prawdopodobnie drogą hamującego odruchu jelitowo-żołądkowego zniesienie pobudzenia motoryki trawieńca bezpośrednio po podaniu L-NAME. Za takim tłumaczeniem przemawia obserwowane u owiec w warunkach fizjologicznych hamowanie motoryki części odźwiernikowej trawieńca towarzyszące III fazie MMC w dwunastnicy (13) oraz fakt, że drugiego dnia doświadczenia, gdy aktywność motoryczna III fazy wraca do normy (ryc. 2), uwidacznia się statystycznie istotny wzrost aktywności motorycznej trawieńca. Na hamujący wpływ NO na motorykę trawieńca wskazuje jedynie zmniejszenie jego aktywności pod wpływem L-argininy (ryc. 4). Taki wpływ L-argininy na motorykę części odźwiernikowej żołądka obserwowano również u ludzi (6). Fakt, że L-arginina podana łącznie z L-NAME następnego dnia po infuzji nie przeciwdziałała wzrostowi motoryki, mógłby świadczyć o ewentualnym uwalnianiu się neurotransmiterów pobudzających, na co wskazują wyniki niektórych badań *in vitro* (5).

L-NAME powodował statystycznie nieistotny wzrost aktywności motorycznej żwacza w dniu podania.

Wzrost ten był statystycznie istotny dopiero w następnych dwóch dniach doświadczenia (ryc. 5). L-arginina podana łącznie z L-NAME znosiła pobudzające działanie L-NAME na motorykę żwacza tylko w dniu infuzji. Sama L-arginina zmniejszała aktywność motoryczną żwacza w sposób statystycznie istotny w dniu infuzji. Wyniki te wskazują na hamujący wpływ NO na motorykę żwacza co potwierdzają jedynie badania przeprowadzone na wycinkach z czepca i żwacza bydła (20). Obserwowany przez nas brak przeciwdziałania L-argininy podanej łącznie z L-NAME wzrostowi aktywności żwacza drugiego i trzeciego dnia doświadczenia można by podobnie, jak w przypadku trawieńca, tłumaczyć ewentualnym uwalnianiem neurotransmiterów pobudzających.

### Podsumowanie

Tlenek azotu, jako neuromediator włókien NANC, odgrywa istotną rolę w regulacji migrującego kompleksu motorycznego (MMC) w dwunastnicy u owiec. Wpływa hamująco na częstość występowania III fazy tego kompleksu i wydłuża czas trwania II fazy, a tym samym wydłuża cały MMC. Zmniejsza również aktywność motoryczną dwunastnicy podczas III fazy, głównie poprzez skracanie czasu jej trwania. Tlenek azotu wpływa również hamująco na aktywność motoryczną żwacza i części odźwiernikowej trawieńca, ale jego funkcja w regulacji motoryki tych odcinków przewodu pokarmowego wydaje się mniej istotna.

### Piśmiennictwo

1. Allescher H. D., Tougas G., Vergara P., Lu S., Daniel E. E.: Am. J. Physiol. 262, G695, 1992.
2. Anand N., Paterson W. G.: Am. J. Physiol. 266, G123, 1994.
3. Ceranowicz P., Warzecha Z., Dembiński A., Thor P., Niemiec J., Konturek S. J.: Gastroenterol. Pol. 5, 115, 1998.
4. Hällgren A., Flemström G., Sababi M., Nylander O.: Am. J. Physiol. 269, G246, 1995.
5. Holzer P., Lippe I. Th., Lotfi Tabrizi A., Lénárd L., Jr., Barthó L.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 280, 154, 1997.
6. Konturek J. W., Thor P., Domschke W.: Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 7, 97, 1995.
7. Konturek J. W., Thor P., Lukaszek A., Gabryelewicz A., Konturek S. J., Domschke W.: J. Physiol. Pharmacol. 48, 201, 1997.
8. Konturek S. K., Konturek P. Ch.: Digestion, 56, 1, 1995.
9. De Laet M. H., Vanderwinden J. M., Wanderhaeghen J. J.: Arch. Pédiatr. 3, 287, 1996.
10. Meulemans A. L., Eelen J. G. M. G., Schuurkes J. A. J.: Am. J. Physiol. 269, G255, 1995.
11. Orihata M., Sarna S. K.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 271, 660, 1994.
12. Pawlik W. W., Gustaw P., Thor P., Sendur R., Czarnobilski K., Hottenstein O. D., Konturek S. J.: J. Physiol. Pharmacol. 44, 139, 1993.
13. Plaza M. A., Arruebo M. P., Sopena J., Bonafonte J. I., Murillo M. D.: Res. in Vet. Sci. 60, 55, 1996.
14. Rodriguez-Membrilla A., Martinez V., Jiménez M., Gonalons E., Vergara P.: Am. J. Physiol. 268, G207, 1995.
15. Sababi M., Hällgren A., Nylander O.: Am. J. Physiol. 271, G582, 1996.
16. Salzman A. L.: New Horizons 3, 352, 1995.
17. Sanders K. M., Ward S. M.: Am. J. Physiol. 262, G379, 1992.
18. Sarna S. K., Otterson M. F., Ryan R. P., Cowles V. E.: Am. J. Physiol. 265, G759, 1993.
19. Sarna S. K.: Current Opinion in Gastroenterology 12, 512, 1996.
20. Schneider D. A., Eades S. C.: J. Dairy Sci. 81, 2588, 1998.