Praca oryginalna *Original paper*

Rola ośrodkowego receptora μ-opioidergicznego w aktywności mioelektrycznej żołądka owcy

BOGDAN F. KANIA, MAŁGORZATA WIELGOSZ

Katedra Nauk Fizjologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

Kania B. F., Wielgosz M.

Role of central μ-opioid receptors in the wall of gastric myoelectrical spike burst activity in sheep

Summary

The present study examined the participation of central μ-opioidergic receptors in the modulatory/inhibitory effect of D-Ala^2, N-Me-Phe^4, Gly^5-ol enkephalin (DAGO), a selective mu-opioid receptor agonist, on the spike burst activity of the rumen, reticulum and antrum prior to and 10 min after the intracerbroventriculary (*i.c.v*) – during 1 min – infusion of naloxonazine, a competitive mu-opioid receptor antagonist in sheep. DAGO was infused *i.c.v*. at a doses 0.02, 0.05, 0.1 and 1.0 μg × kg^{-1}, naloxonazine at doses 5 times higher.

All the doses of DAGO administered *i.c.v*. significantly inhibited myoelectrical activity of the wall of the rumen, reticulum and abomasum. The effects of DAGO were prevented by naloxonazine previously infused at doses of 0.1, 0.5, 1.0 and 5.0 μg × kg^{-1} (i.e. at a doses 5 times higher in comparison to doses of DAGO).

The results of this present study indicate that central μ-opioid receptors participated in the inhibitory action of a specific opioid (DAGO) on myoelectrical activity of the forestomaches and antrum in sheep. Furthermore, this result suggests that it is a specific mu-receptor stimulation, because naloxonazine, a competitive μ-receptor antagonist, prevented the modulatory action of DAGO on the reticular, ruminal and antral motility in sheep.

Keywords: μ-agonist, DAGO, μ-antagonist, gastric activity, sheep

Endogenne peptydy opioidowe (EOP, analgetyki endogenne) nazywane endorfinami, enkefalinami i dynorfinami są substancjami wewnątrzustrojowymi wiążącymi się ze specyficznymi receptorami opioidergicznymi klasy mi (μ), delta (δ) i kappa (κ) syntetyzowane są w różnych strukturach ośrodkowego układu nerwowego (OUN) i działają agonistycznie na te specyficzne dla nich receptory po ich wysyceniu. Obecność miejsc wiązania opioidów w OUN została w pełni udowodniona. Po stwierdzeniu reakcji farmakologicznych na opioidy endo- oraz egzogenne, które imitują działanie opioidów endogennych, przyjmuje się istnienie trzech typów receptora opioidowego: μ (μ_1, μ_2), δ (δ_1, δ_2), κ (κ_1, κ_2, κ_3). Receptory te egzystują samodzielnie lub jako kompleksy receptorowe zawierające receptory μ, δ i/lub κ. Rozmieszczenie opioidergicznych receptorów jest szeroko rozpowszechnione w OUN oraz w obwodowym układzie nerwowym (ObUN). Potwierdzono również ich obecność w przewodzie pokarmowym, głównie w splotach śródściennych, macicy, powrózku nasiennym, sercu, płucach, wątrobie, trzustce, nadnerczach oraz nerkach.

Znaczenie opioidów w ośrodkowej regulacji motoryki przewodu pokarmowego jest faktem obserwowanym u wielu gatunków zwierząt. Układ opioidergiczny moduluje aktywność przewodu pokarmowego zarówno na poziomie mózgu, jak i rdzenia kręgowego.

Poprzednie publikacje własne wskazują na hamujący wpływ ośrodkowych agonistów receptorów opioidergicznych typu μ oraz δ na motorykę przewodu pokarmowego u zwierząt mono- i poligastrycznych (3, 5-8). To samo działanie stwierdzono po infuzji intratekalnej (1). Prace wskazujące na hamujący wpływ mózgowego receptora klasy μ oraz rdzeniowego receptora klasy δ (7, 8) wykazywały hamowanie motoryki przedżołądków u owiec po *i.c.v*. infuzji β-endorfiny, morfiny, jak również δ-opioidowego agonisty Leu-enkefaliny. Efekty te znosił nalokson (multipotencjalny antagonista receptorów opioidergicznych) (2). Stosowane wówczas substancje nie były zbyt selektywne dla testowanych receptorów opioidergicznych. Dopiero otrzymanie D-Ala^2, N-Me-Phe^4 i Gly^5-ol-enkefaliny (DAGO), substancji, która jest najbardziej wybiórczym związkiem pobudzającym receptory μ-opioidergiczne, pozwoliło stwierdzić jej ośrodkowe działanie antymotoryczne, znoszone przez nalokson (antagonistę receptorów μ, δ i κ-opioidergicznych).

Kania i van Miert (6) stwierdzili udział podwzgórza w hamującym działaniu β-endorfiny u owcy po jej *i.c.v*. infuzji. Opisano również udział ośrodkowego

układu adrenergicznego w modulacyjnym działaniu opioidów (4).

Zastosowanie bardziej specyficznych agonistów (DAGO) i równie selektywnych antagonistów (naloksonazyna) receptorów μ-opioidergicznych pozwoli na dokładne określenie roli tych receptorów w motoryce przedżołądków oraz na potwierdzenie specyficzności tych działań.

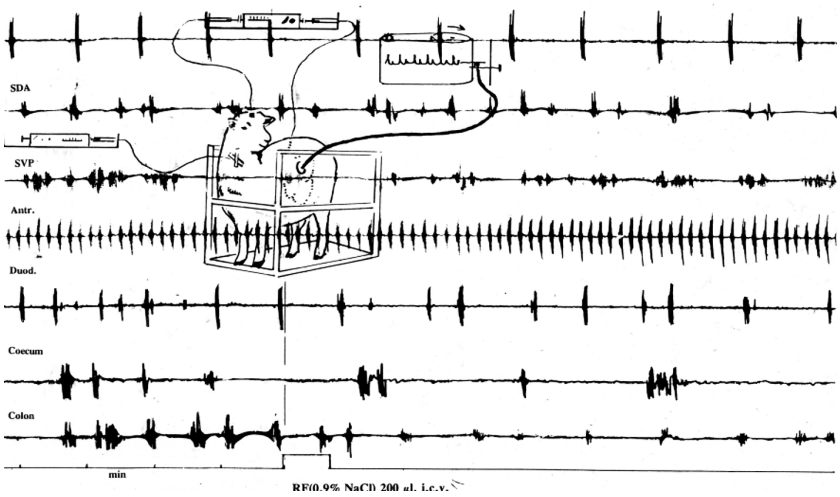
Celem badań było określenie roli ośrodkowego układu opioidergicznego oraz receptorów klasy μ- w aktywności motorycznej przedżołądków (żwacz, czepiec) oraz trawieńca owiec.

Materiał i metody

Zwierzęta. Badania przeprowadzono na 8 dorosłych owcach, mieszańcach, samicach w okresie bezrujowym (*anoestrus*) o masie ciała 40-45 kg. W 48 h po odjęciu karmy zwierzęta znieczulano tiopentalenem (Nesdonal 20 mg/kg^{-1} m.c., Rhone-Merieux, Lyon) i dwie pary niechromowanych elektrod (170 cm długości i 80 mm średnicy), z 3 cm odizolowaną końcówką implantowano w ściany mięśniówki czepca, dogrzbietowego i doogonowego worka żwacza oraz antrum (4 cm od odźwiernika) wg metody opisanej poprzednio (12). Wolne końcówki elektrod wyprowadzono na zewnątrz przez powłoki brzuszne na prawym boku ściany brzusznej zwierzęcia. W czasie tego samego znieczulenia ogólnego implantowano na stałe stalowe kaniule nierdzewne o długości 29 mm i o średnicy 2 mm do bocznej komory mózgu (prawej lub/i lewej) 10 mm poniżej bregmy i 5 mm bocznie od szwu pośrodkowego wg metody opisanej wcześniej (14). Bezpośrednio po zakończonych zabiegach zwierzęta otrzymywały *i.m.* ketaminę (20 mg · kg^{-1}) oraz zestaw z benzylprokainowej penicyliny (30000 I.U. · kg^{-1}) + dihydrostreptomycyny siarczanu (10 μg · kg^{-1}) + prednizolonu octan (1,2 mg · kg^{-1} m.c.) *i.m.* przez 5 kolejnych dni. Po ustąpieniu znieczulenia ogólnego każde zwierzę umieszczono w klatce metabolicznej, indywidualnie, na okres 10 dni, po którym przystępowano do wykonywania doświadczeń. Temperatura pomieszczenia wynosiła 18--22°C.

Elektromiografia. Mioelektryczną czynność żołądka rozpoczynano w 10 dni po rozpoczęciu eksperymentu, a rejestrowano ją każdorazowo przez 360 min. na papierze EEG (Rega XII, Alvar, Montereuille) przy stałym czasie (0,3 s) i szybkości przesuwu papieru 2,23 cm · min^{-1}. Częstotliwość wyładowań (w odcinkach liczonych na 5 lub 15 min.) odpowiadających skurczom czepca, żwacza i trawieńca – obliczano bezpośrednio z zarejestrowanych wyładowań na papierze w przeciągu 120 min. przed i przez 240 min. po infuzji substancji.

Odczynniki. DAGO (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) rozpuszczano w 0,9% NaCl i wstrzykiwano *i.c.v.* w dawkach 0,02, 0,05, 0,1 oraz 1,0 μg · kg m.c. w objętości 100 μl 0,9% NaCl w ciągu 1 min. Naloksonazynę rozpuszczano w 0,9% NaCl i wstrzykiwano *i.c.v.* w dawkach 5-krotnie większych od dawek DAGO w objętości 100 μl wody też w ciągu 1 min.



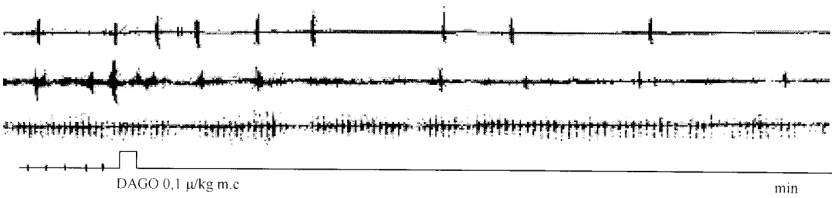
Ryc. 1. Schemat prowadzenia eksperymentów z zaznaczonym wpływem infundowanego do komór bocznych mózgu (*i.c.v.*) 200 μl 0,9% NaCl na kolejne ruminogramy (od góry): czepca, dogrzbietowego i dobrzusznego worka żwacza, antrum, dwunastnicy, jelita ślepego i okrężnicy. Czas – 1 min.

Przeprowadzenie doświadczeń. Pracę wykonano w oparciu o pozwolenie III Lokalnej Komisji Etycznej (Nr 154/04). Każde zwierzę było przyzwyczajane do przebywania w klatce metabolicznej przez 14 dni poprzedzających początek eksperymentów. Antagonistę stosowano 10 min. przed infuzją agonisty. Każdy eksperyment wykonywano 4 razy na każdym zwierzęciu w odstępach 1-tygodniowych. Ta sama substancja była stosowana ośmiokrotnie. Pierwsze doświadczenie obejmowało infuzję 100 μl 0,9 NaCl, rozcieńczalnika stosowanych substancji; drugie infuzję μ-agonisty, trzecie infuzję μ-antagonisty (naloksonazyny) oraz czwarte, infuzję μ-antagonisty (naloksonazyny) na 10 min. przed infuzją μ-agonisty (DAGO). W tym celu najpierw stosowano do komory bocznej mózgu owcy (*i.c.v.*) antagonistę receptora μ-opioidergicznego, a po 10 min. kompetycyjnego jego agonistę i oceniano ich wpływ na mioelektryczną aktywność czepca, żwacza i trawieńca rejestrowaną przy użyciu EEG wielokanałowego (ryc. 1).

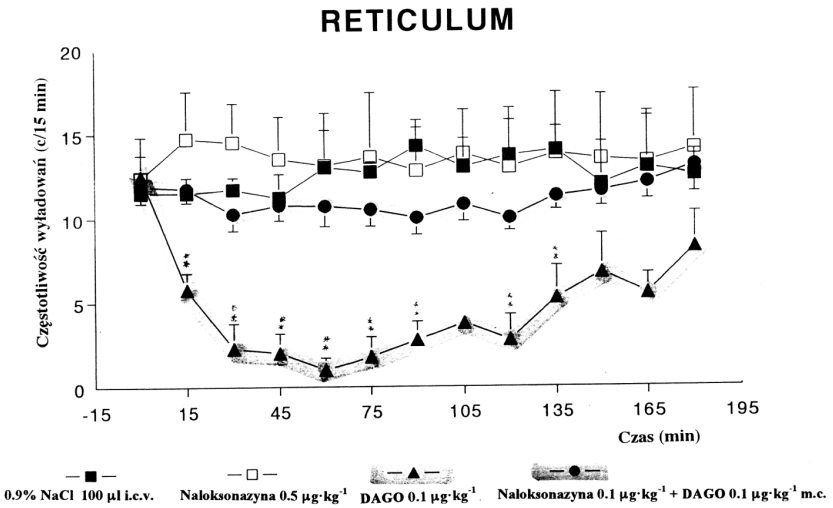
Analiza statystyczna. Dla porównania średnich wyników w grupach doświadczalnych i kontrolnych zastosowano dwuczynnikową analizę wariacji (ANOVA) i porównano testem Tukeya. Różnice pomiędzy grupami badanymi i kontrolnymi uznawano za istotne przy poziomie $p \leq 0,05$.

Wyniki i omówienie

DAGO stosowane *i.c.v.* w dawkach 0,02-1,0 μg · kg m.c. powodowało statystycznie istotne hamowanie aktywności mioelektrycznej przedżołądków (czepiec, żwacz) oraz trawieńca w 5 min. po zakończeniu infuzji, średnio o około 60%. U niektórych owiec działanie hamujące całkowicie znosiło aktywność mioelektryczną (wynosiło 100%). W dawkach niższych (0,1 μg · kg) DAGO nie wpływało na wyładowanie mioelektryczne ściany trawieńca (ryc. 2). W dawkach wyższych (1,0 μg · kg m.c.) hamowało amplitudę wyładowań, nie wpływając na ich częstotliwość przez 180 min. po zakończeniu *i.c.v.* infuzji. Znamienne statystycznie działania hamujące DAGO utrzymywały się przez około 160 min. w czepcu oraz około 140 min.



Ryc. 2. Elektromiogram czepca, żwacza i trawieńca wskazujący na hamowanie częstotliwości wyładowań mioelektrycznych czepca, żwacza i trawieńca owcy (czas – 1 min.)



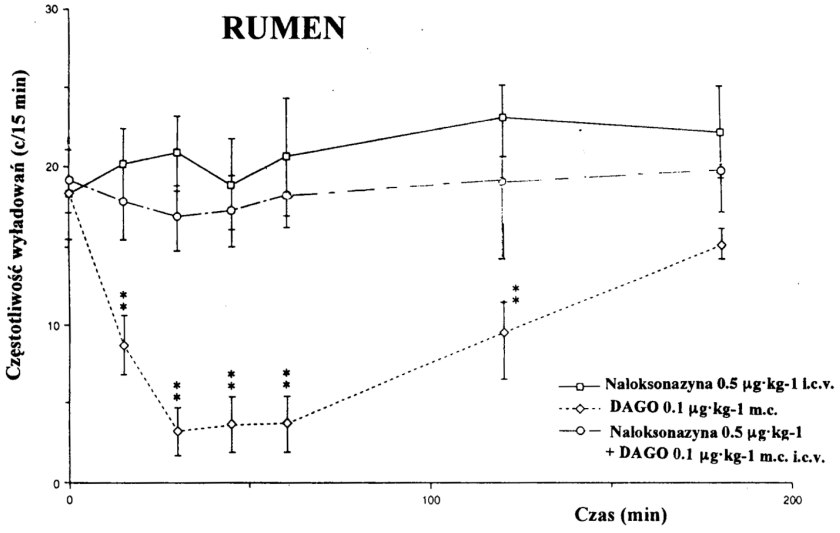
Ryc. 3. Działanie porównawcze *i.c.v.* infuzji rozpuszczalnika (100 µl 0,9% NaCl), DAGO (0,1 µg · kg^{-1}), naloksonazyny 0,5 µg · kg^{-1} m.c.) 10 min. przed *i.c.v.* infuzją DAGO na skurcze czepca u owcy (średnie ± SE, n = 8) w ciągu 180 min. obserwacji (* – p ≤ 0,05, ** – p ≤ 0,01). Na osi pionowej: częstotliwość wyładowań (liczba/15 min.). Na osi poziomej: czas (min.)

w żwaczu. W tym czasie średnie ogólne hamowanie aktywności mioelektrycznej czepca wynosiło około 70% (ryc. 3), a żwacza około 65% (ryc. 4).

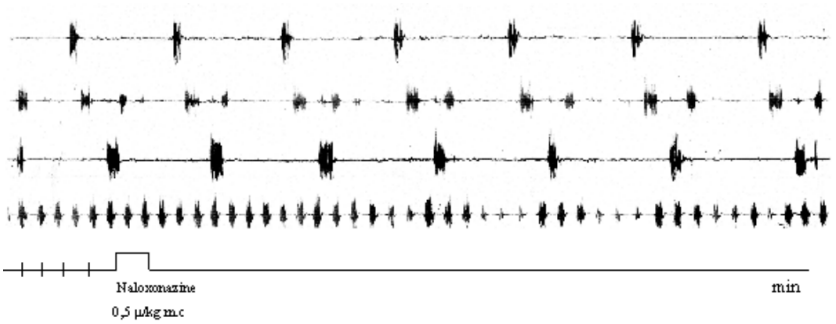
Dokomorowe infuzje samej naloksonazyny (antagonisty kompetycyjnego receptorów typu µ) w dawkach od 1,0 do 5,0 µg · kg m.c. (w ciągu 1 min.) nie powodowały zmian w aktywności mioelektrycznej badanych przedżołądków i trawieńca (ryc. 5).

Infuzje *i.c.v.* DAGO w dawkach 0,1-1,0 µg · kg m.c. w 10 min. po *i.c.v.* infuzji naloksonazyny w dawkach 5-krotnie wyższych od dawek DAGO powodowała nieznaczne zmniejszenie liczby wyładowań mioelektrycznych czepca (z 0,8 ± 0,07 w kontroli do 0,65 ± 0,05 c · min^{-1}) i żwacza (z 1,27 ± 0,13 do 1,0 ± 0,16 c · min^{-1}) przez 2 h od zakończenia *i.c.v.* infuzji. Średnie hamowanie ogólne aktywności mioelektrycznej DAGO w odniesieniu do czepca, po uprzedniej infuzji naloksonazyny, wynosiło około 10% w ciągu 180 min. obserwacji i 15% w odniesieniu do żwacza w ciągu 3 h obserwacji (ryc. 6). Tak więc uprzednia infuzja *i.c.v.* naloksonazyny zmniejszyła hamujące działania tą samą drogą infundowanego DAGO na aktywność motoryczną czepca i żwacza odpowiednio o 60% i 50%. Takie traktowanie nie zmniejszyło częstotliwości wyładowań mioelektrycznych trawieńca (6,44 ± 1,1 c · min^{-1} w kontroli i 6,44 ± 1,1 c · min^{-1} po traktowaniu) w ciągu 2 h obserwacji, natomiast zmniejszało amplitudę wyładowań mioelektrycznych jego ściany przez około 3 h od czasu jej infuzji.

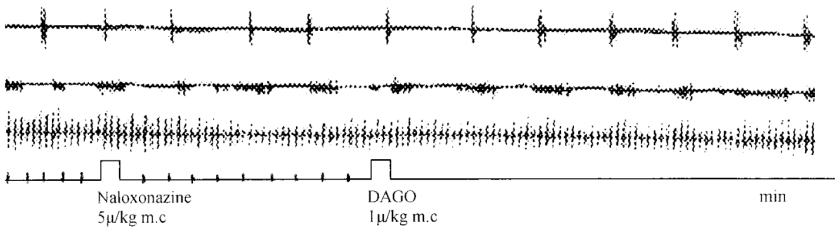
Stwierdzono hamujący wpływ infundowanego *i.c.v.* DAGO (µ-agonisty) w dawkach 0,02, 0,05, 0,1 i 1,0 µg · kg m.c. na motorykę żołądka wielokomorowego owcy. Hamujący wpływ ośrodkowego układu receptorów µ-opioidergicznych na motorykę żołądka i jelita grubego stwierdzono wcześniej po stosowaniu takich substancji, jak morfina, β-endorfiny (9, 13). Gwałtowność hamowania motoryki żołądka owcy po *i.c.v.* infuzji DAGO i intensywność tego działania wskazują raczej na jej bezpośredni wpływ. Wydaje się, że 5 min. do rozpoczęcia hamującego działania agonisty to czas wystarczający do osiągnięcia i objęcia działaniem neuronów centrów motorycznych żołądka w następstwie infuzji testowanej substancji z płynu mózgowo-rdzeniowego. Hamowanie aktywności mioelektrycznej badanych przedżołądków i czepca rozpoczyna się też tuż po *i.c.v.* infuzji β-endorfiny – silnego agonisty receptora µ-opioidergicznego (3). Dotychczasowe badania wskazują, że w tym hamowaniu DAGO uczestniczyć mogą inne układy wewnątrzmózgowe, takie jak noradrenergiczny (8), gdyż uprzedzające zniszczenie ośrodkowych neuronów adrenergicznych stosowaną 6-OHDA zapo-



Ryc. 4. Działanie porównawcze naloksonazyny (0,5 µg · kg^{-1} m.c.), DAGO (0,1 µg · kg^{-1} m.c.), naloksonazyny (0,5 µg · kg^{-1} m.c.) 10 min. przed DAGO (0,1 µg · kg^{-1} m.c.) stosowanych *i.c.v.* na skurcze żwacza u owcy (średnie ± SE, n = 8) w ciągu 180 min. (* – p ≤ 0,05, ** – p ≤ 0,01). Na osi pionowej: częstotliwość wyładowań (liczba/15 min.). Na osi poziomej: czas (min.)



Ryc. 5. Elektromiogram czepco-żwacza oraz trawieńca po *i.c.v.* infuzji naloksonazyny w dawce 0,5 µg · kg^{-1} m.c. (czas – 1 min.)



Ryc. 6. Zapobieganie hamowaniu DAGO na częstotliwość wyładowań mioelektrycznych komór żołądka przez premedykację naloksonazyną stosowaną *i.c.v.* w ww. dawkach (czas – 1 min.)

biegało tym hamującym działaniom β-endorfiny. Wykluczono wcześniej udział układu dopaminergicznego w tym mechanizmie, gdyż domperidon (anatgonista dopaminy) nie zapobiegał hamującemu działaniu normorfiny – innego µ-agonisty (9, 10). Naloksonazyna okazała się kompetycyjnym antagonistą ośrodkowego receptora µ-opioidergicznego, gdyż zapobiegała hamującemu działaniu µ-agonisty na mioelektryczną aktywność ścian czepca i żwacza oraz trawieńca owcy. W pełni skuteczne zapobieganie efektom hamującym µ-agonisty uzyskano dopiero po stosowaniu 5-krotnie wyższej dawki µ-antagonisty (naloksonazyny).

Poprzednie prace (1, 5) dowiodły pośredniego udziału układu CCK-ergicznego w działaniu hamującym DAGO na motorykę przedżołądków i trawieńca, gdyż wcześniejsze stosowanie antagonistów receptorów CCK_1 zapobiegało działaniom DAGO (5). Działanie DAGO na czynności motoryczne żołądka owcy są specyficzne i odwracalne. Wpływ DAGO jako wysoce specyficznego agonisty receptora µ-opioidergicznego na przewód pokarmowy „małych przeżuwaczy" zaznacza się przy udziale ośrodkowego układu opioidergicznego, gdyż zarówno *i.v.* infuzja agonisty i antagonisty w tych samych dawkach nie wpływała na częstotliwość ani amplitudę wyładowań mioelektrycznych ścian żołądka (5).

Wnioski

Na podstawie uzyskanych wynikówn można stwierdzić że:

1. DAGO jako specyficzny agonista receptora µ(mi)-opioidergicznego infundowane do bocznych komór mózgu (*i.c.v.*) w dawkach 0,02, 0,05, 0,1 i 1,0 µg · kg^{-1} m.c. powoduje istotne hamowanie motoryki czepca i żwacza, nie wpływając zdecydowanie na aktywność skurczową trawieńca u owiec.

2. Wyłączne infuzje dokomorowe naloksonazyny – specyficznego antagonisty receptora opiodergicznego klasy µ(mi) – zastosowanej w dawkach 1,0-5,0 µg · kg^{-1} m.c. nie powodują zmian w motoryce czepca, żwacza i trawieńca u owiec.

3. Premedykacja dokomorowa (*i.c.v.*) naloksonazyną w dawce 5,0 µg · kg^{-1} m.c. na 10 min. przed dokomorową infuzją DAGO zapobiega w pełni jej działaniu hamującemu tego swoistego agonisty na motorykę przedżołądków oraz trawieńca u owcy; świadczy to o ośrodkowym udziale hamującym receptora µ(mi)-opioidergicznego w motoryce przedżołądków i trawieńca; działania te są zarówno specyficzne, jak i długotrwałe.

Piśmiennictwo

1. *Buéno L., Fioramonti J.*: CNS peptidergic regulation of gut motility, [w:] Wingate J. (red.): Brain Gut Interaction. CRC Press, New York 1991, 231--243.
2. *Buéno L., Fioramonti J.*: Enkephalins, other endogenous opioids and colonic motility in dog and man. Gastroenterol. Clin. Biol. 1987, 11, 69B-76B.
3. *Kania B. F.*: Opioids and hypothalamus modullatory effects on the reticulo--ruminal motility in sheep. Warsaw Agricultural Uniwersity Press (pol.) 1992, s. 78.
4. *Kania B. F., Domański E.*: Central adrenergic pathway participation in the inhibitory effect of endorphins on forestomach motility in sheep. Small Res. Comm. 1986, 19, 247-254.
5. *Kania B. F., Brikas P., Buéno L., Fioramonti J., Zaremba-Rutkowska M.*: The evaluation of the role of CCK in the opioid modulation of the motility of the gastrointestinal tract in sheep. J. Vet. Pharmacol. Therap. 1999, 22, 153--160.
6. *Kania B. F., van Miert A. S. J. P. A. M.*: Beta-endorphin-induced inhibition of rumen constraction in sheep. The effect of hypothalamic de-efferentiation. J. Vet. Pharmacol. Therap. 1992b, 15, 379-385.
7. *Kania B. F., van Miert A. S. J. P. A. M.*: Inhibition of reticulo-rumen motility by i.c.v. administered endorfins in conscious sheep. Acta Vet. Scand. 1991, 87, 178-180.
8. *Kania B. F., van Miert A. S. J. P. A. M.*: Modification by 6-OHDA of the infibition of extrintic rumen constractions in sheep produced by β-endorphin. J. Vet. Pharmacol. Therap. 1992a, 15, 36-44.
9. *Maas C. L.*: Independence of opioid and dopaminergic actions on cyclical ruminal motility in conscious goats. Pharmacol. Weekblad Sci. Ed., Amsterdam 1982, 4, 162.
10. *Maas C. L., van Duin C. T. M., Woutersen-van Nijanten F. M. A.*: Similar action of proposed mu, kappa and delta opioid receptor agonists on cyclical ruminal motility in conscious goats, [w:] Maas C. L. (red.): Modulation of forestomach motility in small ruminants. PhD thetis, Utrecht Univ., The Netherlands 1884, pp 25-34.
11. *Porreca F., Filla A., Burks T. F.*: Spinal cord- mediated opiate effects on gastrointestinal transit in mice. Europ. J. Pharmacol. 1986, 3, 104-107.
12. *Ruckebusch J.*: The electrical activity of the digestive tract of the sheep as an indication of the mechanical events in the various regions. J. Physiol. 1970, 210, 857-882.
13. *Ruckebusch J., Bardon T., Pairet M.*: Opioid control of the ruminant stomach motility: Functional importance of µ, κ and δ receptors. Life Sci. 1984, 35, 1731-1738.
14. *Sorraing J. M., Fioramonti J., Buéno L., Eno J.*: Central and peripheral serotoninegic control of forestomach motility in sheep. J. Vet. Pharmacol.Therap. 1985, 8, 312-319.

Adres autora: prof. dr hab. Bogdan F. Kania, ul. Nowoursynowska 159, 02-766 Warszawa; e-mail: bogdan_kania@sggw.pl