

# НИЗХОДЯЩ РЕФЛЕКСЕН МОТИЛИТЕТ НА КОЛОН ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ

## COLONIC DESCENDING REFLEX MOTILITY IN EXPERIMENTAL MODEL

Аргашева Р.<sup>1</sup> Г., Н. Присагова<sup>1</sup>, Р. Радомиров<sup>2</sup> / Ardasheva R.<sup>1</sup>, G., N. Prisadova<sup>1</sup>, R. Radomirov<sup>2</sup>

### Резюме

Експериментални проучвания и клинични наблюдения проследяват ролята на невромедиаторните системи във възходящи и низходящи рефлексни обуславящи чревния мотилитет в норма и патология.

**Цел:** Определяне на не-адренергични не-холинергични компоненти в низходящ рефлексен мотилитет на колон при експериментални условия. **Методи:** Изолирани сегмент-препарати от колон на плъх са монтирани в секторна органна вана и подлагани на електрическа стимулация при въздействие с рецептор-блокиращи субстанции. **Резултати:** Електрическа стимулация приложена на проксималната или средната част на препаратите предизвиква различни по характер честотно-зависими низходящи моторни отговори на лонгитудиналния и циркуларния мускули. Лонгитудиналният мускул отговаря със съкращения. Отговорите на циркуларния мускул се състоят от начална релаксация, последвана от съкращение. Отговори на двата мускула не се проявяват при въздействие с тетродотоксин, което показва невrogenен произход. Низходящият мотилитет на двата мускула е проследен със субстанции блокиращи холинергични и адренергични рецептори. При въздействие с атропин, както и при комбинирано третиране с пропранолол и празозин, отговорите на лонгитудиналния и циркуларния мускули се състоят от релаксация последвана от съкращение, по-отчетливо изразени при циркуларния мускул. **Заключение:** Това изследване показва доминиращо участие на не-адренергични не-холинергични невромедиаторни механизми обслужващи циркуларния мускул в низходящия рефлексен мотилитет на колон.

**Ключови думи:** колон на плъх, низходящ рефлексен мотилитет

### Summary

Experimental studies and clinical observations indicate the role of neurotransmitter systems in the ascending and descending reflexes underlying the intestinal motility in normal and pathologic conditions. **Aim:** To determine non-adrenergic non-cholinergic components in the descending motility of colon in experimental conditions. **Methods:** Isolated segment-preparations of rat colon were mounted in partitioned organ bath and subjected to electrical stimulation under treatment with receptor-blocking substances. **Results:** The electrical stimulation applied to proximal or middle part of the preparations induces different by manner frequency-dependent descending motor responses of the longitudinal and circular muscles. The longitudinal muscle responded with contractions. The responses of circular muscle consisted of initial relaxation followed by contraction. The responses of both muscles did not appear under treatment with tetrodotoxin, thus indicating their neurogenic nature. The descending motility of both muscles was evaluated by substances blocking cholinergic and adrenergic receptors. Under treatment with atropine and with additionally added propranolol and prazosin the responses of both longitudinal and circular muscles consisted of an initial relaxation followed by contraction, more expressed in the circular muscle. **Conclusion:** This study presented the domination of non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter mechanisms serving the circular muscle in the descending reflex motility of colon.

**Key words:** rat colon, descending reflex motility

<sup>1</sup>Катедра Медицинска физика и биофизика, Медицински университет – Пловдив

<sup>1</sup>Department Medical physics and Biophysics, Medical University – Plovdiv

<sup>2</sup>Институт по невробиология, Българска академия на науките – София

<sup>2</sup>Institute of Neurobiology, Bulgarian Academy of Sciences

## Въведение

Здравната и социална значимост на заболяванията на стомашно-чревната система са обект на неотслабващ експериментален и клинично-терапевтичен интерес. Въпреки че е приета важната роля на възходящите и низходящи нервно-мускулни рефлексии за функционалните възможности на отделните части на тънките и дебелите черва, механизмите обуславящи перисталтичните рефлексии на колон не са достатъчно изяснени [1]. Описани са възходящи възбуждащи нервни пътища, които модулират съкращенията в колон на човек [2], както и механизми обуславящи генерирането и разпространението на високо-амплитудни разпространяващи се съкращения при *in vivo* и *in vitro* условия [3, 4]. Налице са и данни за функционална координация между съкратителната и релаксационна активност на лонгитудиналния и циркуларния мускули [5] *in vivo* и на колон [6, 7], което поставя въпрос за охарактеризиране на участието на различни невромедиаторни системи във възходящите и низходящи нервни пътища обуславящи мотилитета на колон.

## Цел на изследването

В представеното проучване, моторната активност е проследявана върху изолирани сегменти от колон на плъх, използван като експериментален модел. Интерес представляват съкратително/релаксационната дейност и функционалната координация на моторната активност на лонгитудиналния и циркуларния мускули в резултат на провеждане на възбуждане по нисходящи не-адренергични не-холинергични рефлексни пътища.

## Материали и Методи

Експерименталната програма по настоящото проучване е осъществена в Лаборатория „Периферни синапси“, на Институт по Невробиология на Българската Академия на Науките в съответствие с „Правилата за провеждане на експериментални изследвания“, на Етичния Комитет на Институт по Невробиология. Експерименталната дейност е одобрена от БАБХ (Прот. № 17/2016).

Експериментален протокол. За експериментите са използвани мъжки бели плъхове, порода Wistar с тегло 250-280 г, пожертвани чрез декапитация. След отваряне на абдоминалната кухина с хирургически способ, сегмент от колона с дължина 50-52 мм се изолира и запазвайки анатомичната цялост на нервно-гладкомускулната структура се монтира като експериментален препарат в трикамерна органна вана. Нервните структури на изолираните сегмент-препарати си въздействат чрез полева електрическа стимулация прилагана върху проксимална-

та или средна част на препаратите. Регистрирана е моторната активност на лонгитудиналния и циркуларния мускули принадлежащи на дисталната част на изолирания сегмент от колон.

В експериментите е използвана хоризонтална органна вана, разделена на три камери [5]. Сегментът от колон се монтира във ваната, при което проксималната, средната и дисталната част на препарата са разположени в съответните проксимална, средна и дисталната камери на ваната. Моторната активност на лонгитудиналния и циркуларния мускули, принадлежащи на дисталната част на изолираните сегменти се предизвиква с полева електрическа стимулация приложена върху проксималната или средна част на изолирания препарат, разположени в съответните камери на органната вана. Съкратителните и/или релаксационни промени на моторната активност на лонгитудиналния и циркуларния мускули се регистрират едновременно посредством механо-електрически преобразуватели при начално натоварване на двата мускула еквивалентно на 10 mN. За възбуждане на нервните структури на препаратите от колон се прилага полева електрическа стимулация [8] с характеристики – продължителност на импулса - 0.8 ms, напрежение от 40 V, честота на прилаганите импулси 2-5-10 Hz и продължителност от 20 sec. Стимулацията се прилага чрез два платинени електрода разположени един срещу друг на разстояние от 14 мм във проксималната или средната камери на ваната. Регистрацията на моторната активност на лонгитудиналния и циркуларния мускули се осъществява чрез двуканална механо-графична регистрираща техника, включваща тензо-преобразуватели на моторната активност в електрически сигнали и усилватели (Microtechna, Prague, Czech Republic), стимулатор за генериране на електрически импулси (Experimetria, Budapest, Hungary) и записващо двуканално устройство (Laboratorní přístroje, Prague, Czech Republic).

Сегментите от колон се промиват с хранителен разтвор на Кребс във ваната и адаптират за минимален период от 30 мин преди започване на регистрацията на спонтанната или електрически-предизвикана моторна активност на лонгитудиналния и циркуларния мускули в отсъствие или присъствие на лекарствени тест-субстанции.

Прилагането на електрическа стимулация в средната камера на органната вана извлича моторни отговори на лонгитудиналния и циркуларен мускули от дисталната част на препарата на разстояние от 10 мм от мястото на приложените електрически импулси. Прилагането на стимулация

В проксималната камера на ваната води до моторни отговори на гвата мускула на препаратите разположени в дисталната камера на ваната на разстояние от 20 мм. Тези моторни отговори са преценени като нисходящи моторни отговори дължащи се на разпространение на нервното възбуждение по анално насочени рефлексни пътища инервиращи лонгитудиналния и циркуларния мускули на дисталната част на изолираните препарати. Електрически-предизвикана моторна активност на гвата мускула е регистрирана при стимулация прилагана с честота от 2, 5, или 10 Hz. Моторните отговори спрямо стимулация с честота от 5 Hz наподобяват по характер и амплитуда на спонтанната моторна активност на колон, поради което е преценена за подходяща за оценка на въздействието на лекарствени субстанции използвани за отгиференциране на не-адренергична не-холинергична невротрансмисия.

В експерименталната програма са използвани лекарствени субстанции с време на въздействие както следва: atropine sulfate (0.3  $\mu\text{M}$ , 5 мин), propranolol (0.1  $\mu\text{M}$ , 10 мин) и prazosin (0.1  $\mu\text{M}$ , 10 мин), производство на Merck, Darmstadt, Germany и tetrodotoxin (TTX, 0.1  $\mu\text{M}$ , 10 мин), производство на Sankyo, Zurich, Switzerland. Субстанциите първоначално са разреждани в дестилирана вода след което довеждани до използваната концентрация с разтвор на Кребс. Химическият състав на разтвора използван в експерименталната програма (8 mM) е: NaCl 120, KCl 5.9,  $\text{NaHCO}_3$  15.4,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{MgCl}_2$  1.2,  $\text{CaCl}_2$  2.5, glucose 11.5. Разтворът се аерира постоянно с 95%  $\text{O}_2$  и 5%  $\text{CO}_2$ , pH 7.2 при 36.5° C.

Статистическият анализ представя средна аритметична стойност по ANOVA с ниво на достоверност от  $p < 0.05$ . Всички анализи са извършени с използване на Stat graphics Plus 4.1 for Windows, SPSS 14 statistical software.

## Резултати

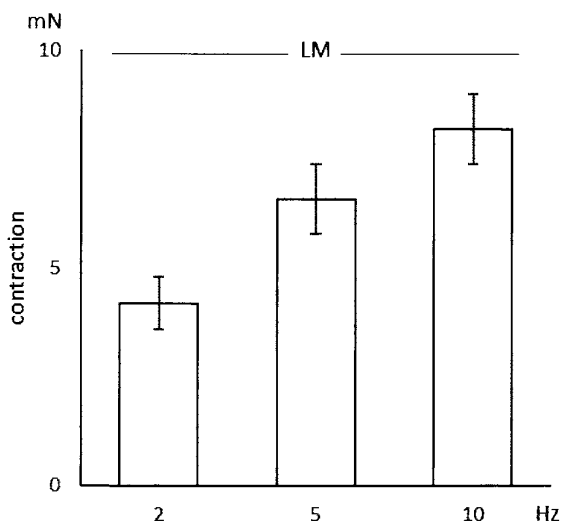
Подобно на представените в литературата наблюдения [6, 9] нерегулярни високо-амплитудни съкращения, разпространяващи се в дистална посока характеризират спонтанната моторна дейност на изолираните сегменти от колон на плъх използвани в настоящата експериментална програма.

Електрическа полева стимулация приложена с честота от 2, 5 или 10 Hz на проксималната или средна част от изолираните препарати от колон извлича нисходящи моторни отговори на лонгитудиналния и циркуларния мускули от дисталната част на сегмента, съответно на разстояние от 20 мм или 10 мм от мястото на прилагане на стимулацията. От разстояние 10 мм електрическата

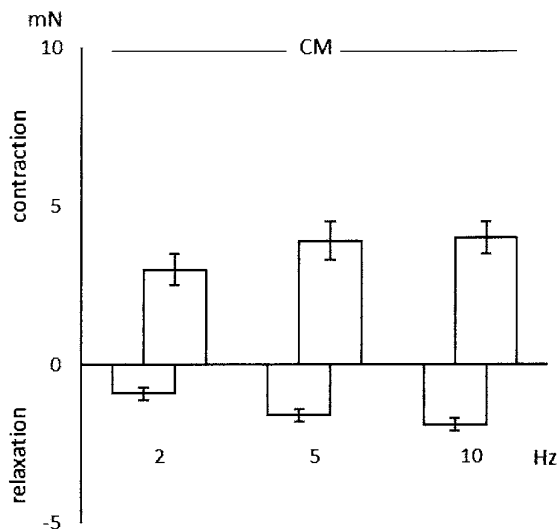
стимулация предизвиква различни по характер, пропорционално зависими от честотата на приложените стимули отговори на лонгитудиналния и циркуларния мускули. Лонгитудиналният мускул отговаря със съкращения (Фиг. 1). Отговорите на циркуларния мускул се състоят от начална релаксация последвана от съкращение (Фиг. 2). Амплитудите на съкратителните отговори на лонгитудиналния мускул (Фиг. 1) са със значително по-високи стойности в сравнение с амплитудата на съкратителната компонента в отговорите на циркуларния мускул (Фиг. 2) ( $n=10$ ,  $p < 0.05$ ). Прилагането на електрическа стимулация на проксималната част на препаратите предизвиква нисходящи моторни отговори на гвата мускула от дисталната част на изолираните сегменти на разстояние от 20 мм от прилагането на електрическото гравене. Отговорите на гвата мускула не се отличават по характер в сравнение отговорите спрямо електрическа стимулация приложена на разстояние от 10 мм, но са със значително намалена амплитуда.

За определяне на холинергична и адренергична компоненти в нисходящите моторни отговори на лонгитудиналния и циркуларен мускули на колон предизвикани от електрическа стимулация с честота от 5 Hz, изолираните препарати бяха третирани с лекарствени субстанции оказващи въздействие върху холинергичните и адренергични рецептори. На фона на действие на атропин (0.3  $\mu\text{M}$ ) отговорите на лонгитудиналния (Фиг. 3) и циркуларния (Фиг. 4) мускули се уеднаквяват по характер и се състоят от начална релаксация последвана от съкращение. На фона на едновременно действие на атропин, пропранолол (0.1  $\mu\text{M}$ ) и празозин (0.1  $\mu\text{M}$ ) моторните отговори на лонгитудиналния и циркуларния мускули на разстояние от 10 мм от прилагането на електрическите стимули са подобни по характер на въздействието с атропин. Двата мускула отговарят с начална релаксация, последвана от съкращение. В циркуларния мускул гвата компонента на отговора са по-силно изразени спрямо лонгитудиналния мускул (Фиг. 3 и Фиг. 4;  $n=10$ ,  $p < 0.05$ ). Електрическата стимулация приложена на разстояние от 20 мм предизвиква подобни по характер, понижени по амплитуда, двукомпонентни отговори в лонгитудиналния и циркуларния мускули състоящи се от релаксация последвана от съкращение.

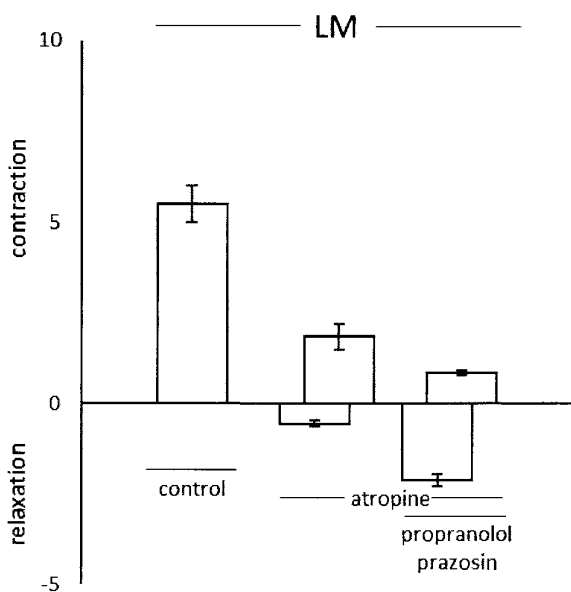
Ефект на TTX. Наличието на TTX (0.1  $\mu\text{M}$ ) в камерите на органната вана предотвратява появата на нисходящи моторни отговори на лонгитудиналния и циркуларния мускули предизвикани с полева електрическа стимулация.



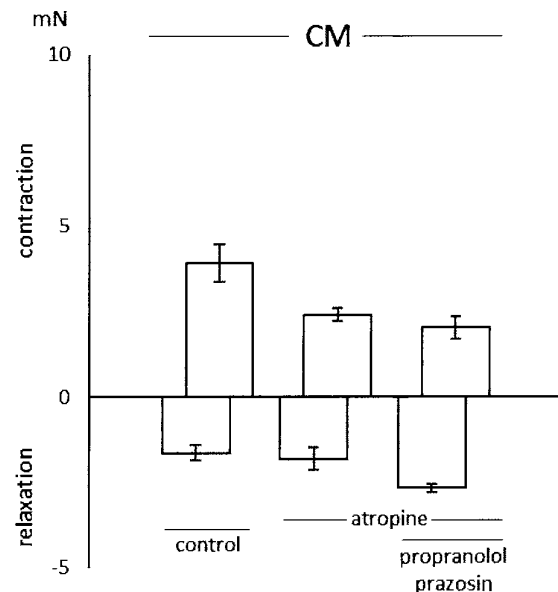
**Фиг. 1.** Електрически-предизвикани (0.8 ms, 40 V, 2, 5 or 10 Hz, 20 s) съкратителни низходящи отговори на лонгитудинален мускул (LM) от дисталната част на изолиран сегмент от колон на плъх.



**Фиг. 2.** Електрически-предизвикани (0.8 ms, 40 V, 2, 5 or 10 Hz, 20 s) двукомпонентни (релаксация-съкращение) низходящи отговори на циркуларен мускул (CM) от дисталната част на изолиран сегмент от колон на плъх.



**Фиг. 3.** Електрически-предизвикани (0.8 ms, 40 V, 5 Hz, 20 s) съкратителни и двукомпонентни (релаксация-съкращение) низходящи отговори на лонгитудинален мускул (LM) от дисталната част на изолиран сегмент от колон на плъх при въздействие на лекарствени субстанции.



**Фиг. 4.** Електрически-предизвикани (0.8 ms, 40 V, 5 Hz, 20 s) двукомпонентни (релаксация-съкращение) низходящи отговори на циркуларен мускул (CM) от дисталната част на изолиран сегмент от колон на плъх при въздействие на лекарствени субстанции.

### Обсъждане

Настоящото проучване проследява низходяща моторна активност на колон. Сегмент-препаратите изолирани от плъх, със запазен нервно-мускулен интегритет, представляват подходящ модел за из-

следване на мотилитета на колон [10]. Електрическа полева стимулация приложена на проксималната или средна част на изолираните препарати предизвиква низходящи моторни отговори на лонгитудиналния и циркуларния мускули от дисталната част на препа-

ратите което показва, че локално предизвиканото нервно възбуждане се разпространява по низходящите нервни пътища. Електрическата полева стимулация предизвиква освобождаване на възбуждащи и/или потискащи невромедиатори в изолирани гладкомускулни препарати [8]. Тези моторни отговори на лонгитудиналния и циркуларния мускули се предотвратяват при въздействие с блокера на невроналното провеждане тетродотоксин, което показва невrogenния им произход [11].

Електрически-предизвиканите нисходящи моторни отговори се проявяват синхронно в лонгитудиналния и циркуларния мускули. Нарастването на честотата на електрическите стимули увеличава амплитудата на отговорите, но не променя характера им, което доказва честотно-зависимо освобождаване на едни и същи невромедиатори определящи моториката на лонгитудиналния и циркуларния мускули на колон, подобно на описаното в други отдели на интестиналната система [12].

Участието на не-адренергична не-холинергична невротрансмисия в нисходящите рефлексни пътища на колон е проследявано на фона на действие на агенти блокиращи холинергични и адренергични рецептори. Блокерът на холинергичните рецептори атропин оказва потискащо действие върху съкратителната компонента на низходящите отговори на лонгитудиналния и циркуларния мускули, по-силно изразено при съкратителната компонента в отговора на лонгитудиналния мускул (Фиг. 3 и Фиг. 4). На фона на действие на атропин и на блокерите на адренергичните рецептори пропранолол и празозин се проявяват не-адренергични не-холинергични нисходящи електрически-предизвикани рефлексни отговори на лонгитудиналния и циркуларния мускули. И в двата мускула отговорите са двукомпонентни и се състоят от начална релаксация последвана от съкращение (Фиг. 3 и Фиг. 4). Както релаксационната, така и съкратителната компоненти на отговорите са по-силно изразени по амплитуда в циркуларния мускул. Увеличаване на разстоянието от прилагането на електрическата стимулация на 20 мм не променя характера на отговорите на двата мускула – налице е намаляване по амплудата на началната релаксация и последващото съкращение.

Следва да се отбележи, че съкратителните компоненти на не-адренергичните не-холинергични нисходящи отговори на двата мускула са значително намалени, но не са елиминирани в присъствие на атропин. Това наблюдение предполага участието на повече от една възбуждаща невротрансмисия във нисходящите рефлексни пътища на колон. Низходящи серотонинергични интерневрони са предложени да участват в мигриращите моторни комплекси на миши изолирани дебели черва [13].

Тези експерименти показват, че както в лонгитудиналния, така и в циркуларния мускул релаксационните компоненти на не-адренергичните не-холинергични електрически-предизвикани моторни отговори са по-високо амплитудни в сравнение със съкратителните компоненти. Възможно обяснение би могло да бъде по-отчетливото участие в регулацията на релаксационните компоненти на интестиналния мотилитет на редица потискащи невротрансмитери като пурины [1], АТФ и азотен оксиг [14, 15], но детайлното изясняване на участието на невротрансмитери в низходящия рефлексен мотилитет на колон изисква допълнителни изследвания.

### Заклучение

Настоящото проучване представя данни за роля на потискащи и стимулиращи не-адренергични не-холинергични невротрансмитерни пътища участващи в реализацията на моторната активност на лонгитудиналния и циркуларен мускули в низходящия рефлексен мотилитет на колон.

### Библиография:

1. Zhang, Y., W. G. Paterson. Characterization of the peristaltic reflex in murine distal colon. *Can J Physiol Pharmacol.* 94, 2, 2016, 190-198.
2. Carbone, S. E. et al. Ascending excitatory neural pathways modulate slow phasic myogenic contractions in the isolated human colon. *Neurogastroenterol. Motil.* 25, 2013, 670-676.
3. Smith, T. K., K. J. Park, G. W. Henning. Colonic migrating motor complexes, high amplitude propagating contractions, neural reflexes and the importance of neuronal and mucosal serotonin. *J Neurogastroenterol Motil.*, 4, 2014, 423-446.
4. Spencer, N. J., M. Kyloh, D. A. Wattoo et al. Characterization of motor patterns in isolated human colon: are there differences in patients with slow-transit constipation? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 302, 1, 2012, G34-43.
5. Ivancheva, C., R. Radomirov. Excitatory ascending and descending motor responses in the guinea pig small intestine: a comparative study of longitudinal and circular muscle by a triple bath method. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.*, 23, 2001, 223-229.
6. Brading, A. F., C. Ivancheva, R. Radomirov. Functional coordination of motor activity in colonic and recto-anal smooth muscles in rat experimental model. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.*, 30, 2008, 201-207.
7. Nedialkova, N. et al. Functional coordination of motor activity in colonic smooth muscles in rat experimental model. *Physiol Res.*, 60, 2011, 659-666.
8. Paton, W. D., E. S. Vizi. The inhibitory action of nor-adrenaline and adrenaline on acetylcholine output by guinea

---

ea pig ileum longitudinal muscle strip. Br J Pharmacol., 35, 1069, 10-28.

9. Присагова, Н. А., Р. Г. Аргашева, Р. Г. Рагомиров. Възходящ рефлексен мотилитет на колон при експериментален модел. Здраве и Наука, 2022 /пог печат/.

10. Dalziel, J. E., N. J. Spencer, K. E. Dunstan et al. An in vitro rat model of colonic motility to determine the effect of  $\mu$ -casomorphin-5 on propagating contractions. Food Funct., 5, 11, 2014, 2768-2774.

11. Gershon, M. D. Effect of tetrodotoxin on innervated smooth muscle preparation. Br J Pharmac Chemother., 29, 3, 1967, 259-279.

12. Kadlec, O., J. Schuurkes, I. Seferna. The topographical basis and frequency-dependence in the effect of different compounds on neurogenic contractions of guinea pig ileum. Gen Physiol Biophys., 12, 1, 1993, 69-83.

13. Okamoto, T., P. O. Bayguinov, M. J. Broadhead et al., Ca-2+ transients in submucous neurons during the cil-

inic migrating motor complex in isolated murine large intestine. Neurogastroenterol Motil., 24, 8, 2012, 769-778.

14. Rand, M. J., C. G. Li. Nitric oxide as neurotransmitter in peripheral nerves: nature of neurotransmitter and mechanism of transmission. Ann Rev Physiol. 57, 1995, 659-682.

15. Nishyama, K., Y. T. Azuma, K. Ahintaku et al. Evidence that nitric oxide is non-adrenergic non-cholinergic inhibitory neurotransmitter in the circular muscle of the mouse distal colon: A study on the mechanisms of nitric-induced relaxation. Pharmacology, 94, 3-4, 2014, 99-108.

**Адрес за кореспонденция:**

Гл. ас. Райна Аргашева, гб  
e-mail: raina.ardasheva@gmail.com