

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН  
ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА  
КАТЕДРА „ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА И КЛИНИЧНА  
ФАРМАКОЛОГИЯ, ДЕРМАТОЛОГИЯ И ВЕНЕРОЛОГИЯ”

---

Гл. ас. д-р Галя Цветанова Ставрева-Маринова

**ФАРМАКОЛОГИЧНИ АСПЕКТИ НА  
МОДУЛАРНИ И НИЗХОДЯЩИ  
МОТОРНИ ОТГОВОРИ В  
РЕКТОАНАЛНА ОБЛАСТ**

за придобиване на образователната и научната степен  
«Доктор» по научна специалност „Фармакология,  
*професионално направление „7.1. Медицина”*  
*област на висше образование „7. Здравеопазване и спорт”*

Научен ръководител: чл.-кор. проф. д-р  
Радомир Георгиев Радомиров, дмн

Плевен • 2012

## **СЪДЪРЖАНИЕ**

	<b>ВЪВЕДЕНИЕ</b>	7
<b>ГЛАВА I.</b>	<b>ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР – СЪСТОЯНИЕ НА ПРОБЛЕМА</b>	
1.	Гладка мускулатура в стомашно-чревния тракт	9
1.1.	Структура и организация на гладките мускули	10
1.2.	Електрическа активност на гладката мускулатура	11
1.3.	Механизъм на гладкомускулното съкращение	12
2.	Инервация на стомашно-чревния тракт	14
2.1	Йерархия на нервната регулация	14
2.2.	Парасимпатикова инервация	15
2.3.	Симпатикова инервация	16
2.4.	Ентерална нервна система	18
2.4.1.	Типове ентерални неврони	19
2.4.2.	Функционална организация на ентералната нервна система	20
3.	Моторни рефлексии	24
4.	Невротрансмитери в стомашно-чревния тракт	27
4.1.	Холинергична невротрансмисия	27
4.2.	Нитрергична невротрансмисия	31
4.3.	Пуринергична невротрансмисия	36
4.4.	Тахикининергична невротрансмисия	40
5.	Двигателна активност и невротрансмисия в ректоанална област	44
5.1.	Анатомия на ректоаналната област	44
5.2.	Ректо-анален рефлекс и фекална континенция/инконтиненция	46
5.3.	Двигателна активност в ректоанална област	48
5.4.	Възходящи и низходящи рефлексии в ректоанална област	51
5.5.	Функционална активност на ректума: транзитен или резорвоарен орган, или и двете?	53
6.	<b>Заклучение</b>	54
<b>ГЛАВА II</b>	<b>ЦЕЛ, ЗАДАЧИ И МЕТОДИЧНИ ПОДХОДИ</b>	
1.	<b>Цел</b>	56
2.	<b>Задачи</b>	56
3.	<b>Материали и методични подходи</b>	57
3.1.	Експериментални животни	57

3.2.	Изследване на модуларни моторни отговори	57
3.2.1.	Изолирани препарати за изследване на модуларни отговори	57
3.2.2.	Електрическа полева стимулация на изолирани гладкомускулни препарати	60
3.3.	Изследване на рефлексни отговори в цялостен аноректум	59
3.3.1.	Изолиран цялостен аноректум	59
3.3.2.	Метод на двукамерна органна вана	59
3.3.3.	Електрическа полева стимулация в цялостен аноректум	60
3.3.4.	Разтягане на стената на ректума чрез раздуване с балон	61
3.4.	Техническо оборудване	61
3.5.	Експериментален протокол	62
3.6.	Имунохистохимични и хистохимично изследвания	63
3.7.	Статистически методи	66
<b>ГЛАВА III РЕЗУЛТАТИ ОТ ПРОУЧВАНЕТО</b>		
1.	Модуларни моторни отговори	67
1.1.	Спонтанна моторна активност	67
1.2.	Електрически-предизвикани модуларни моторни отговори	68
1.3.	Модуларни моторни отговори на изолирани ринг-препарати в зависимост от локализацията им по дължината на аноректума	73
1.4.	Модуларни моторни отговори при въздействие на субстанции, повлияващи холинергичната и нитрергичната невромедиация	77
1.4.1.	Модуларни моторни отговори при електрическа полева стимулация с честота 2 Hz	77
1.4.2.	Модуларни моторни отговори при електрическа полева стимулация с честота 5 Hz	82
1.4.3.	Модуларни моторни отговори електрическа полева стимулация с честота 10 Hz	87
2.	Моторни отговори на ивици лонгитудинална мускулатура	92
3.	Моторни отговори в цялостен аноректум	95
3.1.	Спонтанна моторна активност	95
3.2.	Локални моторни отговори	95
3.2.1	Електрически-предизвикани локални моторни отговори	96
3.2.2.	Неадренергични-нехолинергични локални моторни отговори	96
3.2.3.	Локален моторен отговор на анален канал при въздействие с atropine,	98

	spantide, L-NNA и L-Arginine	
3.3	Низходящи моторни отговори	99
3.3.1.	Електрически-предизвикани и неадренергични-нехолинергични низходящи моторни отговори	99
3.3.2.	Низходящи моторни отговори при въздействие с антагонисти на P2- пуринергичните рецептори	101
3.3.3.	Низходящи моторни отговори на анален канал при въздействие с вещества, повлияващи холинергичната, нитрергичната и тахикининергичната медиация	102
3.4.	Низходящи моторни отговори на анален канал при разтягането на стената на ректума чрез раздуване с балон и въздействие с вещества, повлияващи холинергичната, нитрергичната и тахикининергичната медиация	103
4.	Ефект на тетродотоксин върху моторните отговори	104
5.	Морфологични резултати	105
5.1.	Имунохистохимичното изследване за холинацетилтрансфераза	105
5.2.	Имунохистохимичното изследване субстанция Р	105
5.3.	Хистохимично изследване за NADPH-диафороза	108
5.4.	Имунохистохимичното изследване за АТР-синтаза	108
<b>6.</b>	<b>ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ</b>	
6.1.	Експериментални животни и експериментален модел	111
6.2.	Спонтанна моторна активност	112
6.3.	Модуларни моторни отговори	114
6.4.	Моторни отговори на ивици лонгитудинална мускулатура	126
6.5.	Моторни отговори в цялостен аноректум	127
6.5.1.	Локални моторни отговори	128
6.5.2.	Низходящи моторни отговори	136
6.6.	Морфологични изследвания	146
	<b>ИЗВОДИ</b>	149
	<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	151
	<b>Приноси на дисертационния труд</b>	154
	<b>Библиография</b>	155

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

AC	Adenylate cyclase ( <i>аденилатциклаза</i> )
ADP	Adenosine diphosphate ( <i>аденозиндифосфат</i> )
AHPs	Afterhyperpolarization potentials ( <i>следхиперполяризационни потенциали</i> )
ATP	Adenosine-5'-triphosphate ( <i>аденозин-трифосфат</i> )
CaCM	Ca/calmodulin ( <i>комплекс калций/калмодулин</i> )
cAMP	Cyclic adenosine-monophosphate ( <i>циклическ аденозин монофосфат</i> )
cGMP	Cyclic guanosine-monophosphate ( <i>циклическ гуанозин монофосфат</i> )
ChAT	Cholinacetyl transferase ( <i>холинацетил трансфераза</i> )
Cd	<i>Ринг-препарат от циркуларна мускулатура от дистален ректум</i>
Cm	<i>Ринг-препарат от циркуларна мускулатура от медиален ректум</i>
Cp	<i>Ринг-препарат от циркуларна мускулатура от проксимален ректум</i>
DG	Diacylglycerol ( <i>диацилглицерол</i> )
CNS	Central nervous system ( <i>централна нервна система – ЦНС</i> )
EAS	External anal sphincter ( <i>външен анален сфинктер</i> )
EFS	Electrical field stimulation ( <i>електрическа полева стимулация</i> )
ENS	Enteric nervous system ( <i>ентерална нервна система</i> )
EPAN	Extrinsic primary afferent neurons ( <i>външни първични аферентни неврони</i> )
EPSP	Excitatory postsynaptic potential ( <i>възбуждащ постсинаптичен потенциал</i> )
GRP	Gastrin-releasing peptide ( <i>гастрин-освобождаващ пептид</i> )
5-HT	5-hydroxytryptamine ( <i>серотонин</i> )
IAS	Internal anal sphincter ( <i>вътрешен анален сфинктер</i> )
ICC	Interstitial cells of Cajal ( <i>интерстициални клетки на Кахал</i> )
IP3	Inositoltriphosphate ( <i>инозитол-1,4,5-трифосфат</i> )
IPAN	<i>Intrinsic primary afferent neurons (вътрешни първични аферентни неврони)</i>
IPSP	<i>Inhibitory postsynaptic potentials (задържащи постсинаптични потенциали)</i>
L-NAME	L-NG-Nitroarginine methyl ester
L-NNA	NG-nitro-L-Arginine ( <i>NG-нитро-L-аргинин</i> )
LM	<i>Ивици от лонгитудинална гладка мускулатура</i>
mACh	Muscarinic cholinergic ( <i>мускаринови холинергични</i> )
MLC <sub>20</sub>	Myosin light-chain ( <i>20-kDa миозинова лековерижна субединица</i> )
MLCK	Myosin light-chain kinase ( <i>леко-верижна миозин киназа</i> )
MLCP	Myosin light-chain phosphatase ( <i>миозинова лековерижна фосфатазата</i> )
nACh	Nicotinic cholinergic ( <i>никотинови холинергични</i> )

NADPH-d	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase ( <i>нукотинамид аденин динуклеотид фосфат-диафораза</i> )
NA	Noradrenalin ( <i>норадреналин</i> )
NANC	Nonadrenergic noncholinergic ( <i>неадренергична нехолиергична</i> )
NK	Neurokinin ( <i>неврокинин</i> )
NO	Nitric oxide ( <i>азотен оксид</i> )
NOS	Nitric oxide synthase ( <i>азотноокидна синтаза</i> )
NPY	Neuropeptide Y ( <i>невропептид Y</i> )
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide ( <i>хипофизен пептид, активиращ аденилатциклазата</i> )
PKC	Protein kinase C ( <i>протеин киназа C</i> )
PLC	Phospholipase C ( <i>фосфолипаза C</i> )
PS	<i>Парасимпатиков дял на автономната нервна система</i>
СЧТ	<i>Стомашно-чревен тракт</i>
SP	Substance P ( <i>субстанция P</i> )
Sie	<i>Анален канал</i>
Sym	<i>Симпатиков дял на автономната нервна система</i>
VIP	Vasoactive intestinal peptide ( <i>вазоактивен интестинален пептид</i> )
MMC	Migrating myoelectric complex ( <i>мигриращ миоелектричен комплекс</i> )
TTX	Tetrodotoxin ( <i>тетродотоксин</i> )

**Забележка:** Фигурите в глава “Резултати от проучването” са представени, както са публикувани в статиите, свързани с дисертационния труд.

Ректоанална област и аноректум са използвани като синоними. Когато се отнася за цялостен препарат е използван терминът аноректум.

## ВЪВЕДЕНИЕ

Нормалната двигателна активност в дисталните отдели на стомашно-чревния тракт е от изключително значение за качеството на живот. Усилията в научните изследвания и клиничната практика за овладяване на нарушенията в процесите на континенция и евакуация все още имат ограничен успех.

Крайните отдели на дебелите черва са обект на интензивни експериментални и клинични изследвания, поради това, че са предилекционно място за развитие на туморни новообразувания, възпалителни заболявания, травми и нервно-дегенеративни процеси. Патогенезата на моторните нарушения в червата включва структурни или функционални промени в ентералната нервна система, интерстициалните клетки на Cajal, невротрансмитерите, сигналните пътища, или други компоненти на ентералните рефлексии.

Преди повече от 130 години Gowers (1877) е установил и описал фундаменталните аспекти на рефлексната активност в ректоаналната област. Той определя релаксацията на тонично контрахираната гладка мускулатура на вътрешния анален сфинктер, предизвикана от раздуване на балон в ректума на куче като основен механизъм улесняващ евакуацията на ректалното съдържимо. Последващи изследвания и наблюдения са допринесли за обогатяване и изясняване на невромускулните механизми, които медируют ректо-аналните функции. През последните 20 години, след доказване на неадренергичната-нехолиергична невротрансмисия се уточнява значението на ентералната нервна система в регулацията на функциите на стомашно-чревния тракт в норма и патология. Въпреки натрупаните данни, все още моториката, моторните дисфункции и потенциалните терапевтични подходи не са достатъчно проучени и изяснени. Поради ограничените познания на основните механизми, обуславящи двигателното поведение в ректоаналната област е трудна адекватната оценка на моторните дисфункции, респективно на подходящите специфични терапевтични въздействия.

Нарушения в двигателната активност на дисталния отдел на стомашно-чревния тракт се срещат при един на всеки десет човека. Фекалната инконтиненция е психологически и социално инвалидизиращо състояние при иначе здрави хора и може да доведе до изолация, загуба на самочувствие, увереност в себе си и депресия. Честотата на инконтиненция варира

значително, най-вероятно поради факта, че пациентите се притесняват да говорят за оплакванията си. Среща се 1.4% в активното население, увеличава се до 6-7% сред възрастните хора, а сред старите хора в домове е над 10% [Bartolo a. Paterson, 2009; Bliss a. Norton, 2010].

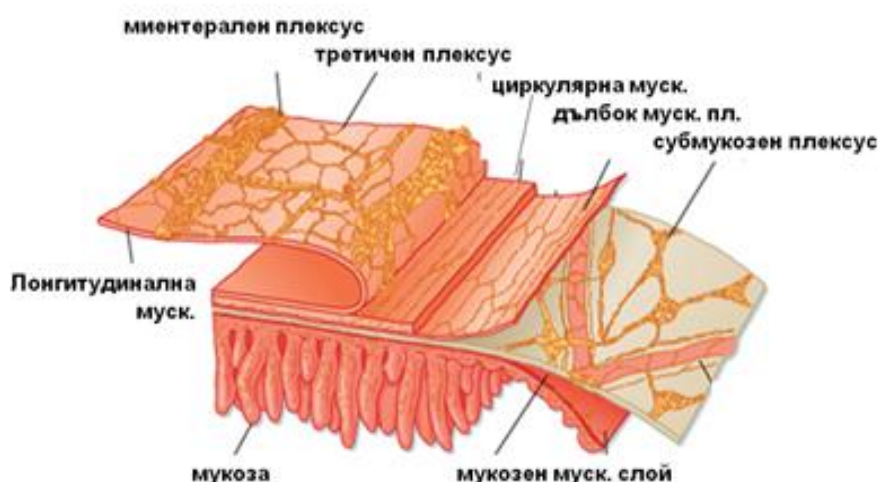
За да се постигне напредък в решаване на проблема в здравен и социален аспект, основна роля имат механизмите на ректоаналната двигателна активност и участието и/или неучастието на невромедиаторните системи, обуславящи моториката на интестиналната мускулатура. Изучаването на отделна невромедиаторна система в интегративния процес на координация в дейността на лонгитудиналната и циркуларна мускулатура е от значение за изясняване на дезорганизацията на моторната дейност, а фармакологичните способности имат съществено място за оптимизиране на транзиторно-евакуаторната функция на крайните отдели на интестиналната система. Фармакологични аспекти на ролята на отделни невромедиаторни системи в моториката на ректоаналната област са предмет на изследване в настоящия дисертационен труд.

# ГЛАВА I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР – СЪСТОЯНИЕ НА ПРОБЛЕМА

Фекалната континенция и ректо-аналният евакуаторен механизъм са комплексни процеси, зависещи от много фактори: интегритета на вътрешния (IAS) и външен анален сфинктер (EAS); на мускулите на тазовото дъно; кълмплайнса и капацитивността на ректума; ано-ректалните сензорни механизми; обема и консистенцията на изпражненията; двигателната активност на ректума и аналния канал [Whitehead et al., 2009; Радомиров, 2011]. Преди представяне на спецификата на ректоаналната област, в обзора са разгледани съвременните схващания за интестиналната гладка мускулатура, инервацията и невротрансмисията в интестиналния тракт, тъй като това подпомага излагането и интерпретирането на експерименталните резултати. Много от понятията са навлезли в нашата литература със съкращенията си от английски език, затова всички използвани съкращения в настоящата работа са дадени на латиница.

## 1. ГЛАДКА МУСКУЛАТУРА В СТОМАШНО-ЧРЕВНИЯ ТРАКТ

Гладката мускулатура на стомашно-чревния тракт (СЧТ) е организирана в два отделни слоя – напречен (циркуларен) и надлъжен (лонгитудинален), отговорни за двигателната активност. Двата слоя формират интестиналната мускулна обвивка (*tunica muscularis externa*) (Фиг. 1.1).



**Фигура 1.1.** Структура на стената на органите на храносмилателната система [от Physiology of Gastrointestinal Tract. In: Johnson LR editor, 4-th ed. 2006]

## 1.1. Структура и организация на гладката мускулатура

Функциите на кухинните органи на храносмилателната система до голяма степен се определят от свойствата на гладката им мускулатура.

В структурно отношение гладките мускули се различават значително от скелетните. Клетки им са с по-малки размери (20-100  $\mu\text{m}$  дължина и диаметър 5-10  $\mu\text{m}$ ), вретеновидна форма с едно централно ядро, вгвания по сарколемата (кавеоли) и обикновено са организирани в малки групи от клетки [Cooke et al., 1987]. Гладкомускулните клетки са свързани помежду си с „gap junctions” (синаптични ценнатини или ямки), които са специализирани места за комуникация между клетките. Саркомплазменият ретикулум не е добре развит. Гладките мускули съдържат актин, миозин и тропомиозин, но нямат тропонин. Съотношението актин/миозин е в полза на актина (12:1 до 50:1). Регулаторните белтъци са калдезмон и калмодулин. Поради различно ориентираните нишки на съкратителните белтъци към плътните зони на сарколемата и формирания специфичен скелет на миофибриите, силата на съкращение се предава във всички посоки. Това ги прави уникални за изграждане на стените на вътрешните органи [Makhlouf et al., 2006]. Гладките мускули притежават свойството пластичност – това е възможността за бавна промяна на размерите при поддържане на една и съща сила на съкращаване. Това свойство е много важно за органите с резервоарна функция, тъй като позволява промяна на обема в определени граници, без промяна в налягането.

Гладките мускули са два типа. Единият тип има свойства на функционален синцитиум: структура, изградена от клетки, клетъчните мембрани на които притежават електрични синапси, така че, ако една от клетките се възбуди, ще се възбудят и всички съседно разположени на нея клетки [Cooke et al., 1987]. Мускулите на стомаха и червата са *единен тип* гладка мускулатура, известни като *висцерален тип*. Характерно за електрофизиологията на тези мускули е, че проявяват автоматизъм и извършват ритмични съкращения. Тези мускули се съкращават спонтанно без нервно или ендокринно влияние в отговор на разтягане. Нервната система участва предимно в модулиране на тяхната дейност. Инервиращото нервно влакно образува своеобразни разширения, от които се отделя съответния медиатор, няма структурирани невромускулни синапси. Невротрансмитерите свободно дифузират на сравнително големи разстояние в екстрацелуларното пространство и се свързват със съответните рецептори по мембраните и повлияват относително голям брой мускулни

влакна [Makhlouf et al., 2006; Sanders et al., 2006]. Типично за висцералния тип гладки мускули е генерирането на акционни потенциали, при периодичните промени в мембранныя потенциал и достигане на критичния праг. Това стои в основата на наблюдаваната ритмична активност при редица висцерални мускули.

Другият тип гладки мускули са т. нар. *дискретни*: отделните клетки са електрически изолирани една от друга и до всяка миофибрила достига нервно влакно. Тази структурна организация позволява да се повлиява активността на всяка клетка и по-прецизна регулация. Типичен пример за дискретен тип мускули са тези на вас деференс и ириса, също и сфинктерите в СЧТ.

## **1.2. Електрическа активност на гладката мускулатура**

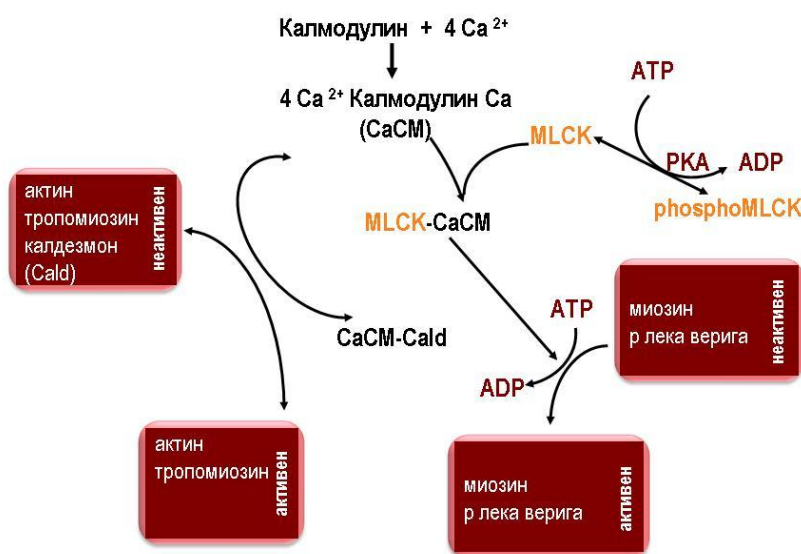
Висцералните гладкомускулни клетки са възбудими структури и техните електровъзбудими свойства зависят по-скоро от високата им проницаемост за извънклетъчен калций, отколкото за натрий [Стоименова, 2008]. Те имат разнообразна биоелектрична активност, но основните форми на електрическа активност са две: бавна и бърза (акционни потенциали). Бавните вълни на деполяризация (наричани бавни потенциали) причиняват периодични промени в потенциала на покой, като се приема, че те създават условия за възникване на акционен потенциал в някои региони, докато в други (например, стомашния антрум и циркуларната мускулатура на дебелото черво) те представляват единствената форма на електрическата активност. Генератори на бавните вълни в гладките мускули са интерстициалните клетки на Кахал (ICC), които се свързват помежду си с електрични синапси и образуват мрежа, широко разпространена в субмукозата и между мускулните слоеве на чревната стена от хранопровода до вътрешния анален сфинктер [Sanders et al., 2006]. Вътреклетъчният  $\text{Ca}^{2+}$  има критична роля в пейсмейкърната активност на ICC, въпреки, че  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азата на саркоплазмения ретикулум, инозитол трифосфат (IP3) рецепторите, рианодиновите рецептори и мембранните йонните канали може би играят различна роля в циклите на  $\text{Ca}^{2+}$  освобождаване и презареждане в сравнение с другите клетки с автоматизъм [Takaki 2003; Sanders et al., 2006]. Друга важна функция на ICC е проводната, те посредничат между ентералната нервна система и гладкомускулните клетки [Sanders 1996]. Група от ICC действат като сензори за разтягане [Takaki et al., 2010]. Пейсмейкърните мрежи на ICC са разположени около циркуларния мускулен слой на границата с надлъжния и бавните вълни, генерирани от ICC

се разпространяват пасивно и към лонгитудиталната и към циркуларната мускулатура, а вълните генерирани от ICC на границата със субмукозата – към циркуларната.

Когато силата на дразнене е голяма, абсолютната стойност на мембрания потенциал достига до критично ниво (-35 mV) и се получава лавинообразно увеличаване на пропускливостта на мембраната и бърза деполяризация, която се дължи на инфлукс на калциеви йони през L-тип канали. С генериране на акционните потенциали в клетките навлизат голямо количество  $\text{Ca}^{2+}$ , които предизвикват фазични съкращения на мускулните клетки.

### 1.3. Механизъм на гладкомускулното съкращение

Съкращението на гладката мускулатура се регулира основно чрез рецепторно и механично (при разтягане) активиране на каскада от вътреклетъчни механизми, водещи до приплъзване на актиновите нишки спрямо миозиновите (Фиг. 1.2) [Webb, 2003].



Фигура 1.2. Механизъм на гладкомускулното съкращение (по Webb RC 2003)

Съкращенията на гладката мускулатура се дължи на  $\text{Ca}^{2+}$ -медиран промени в миозин II, докато в набраздената мускулатура  $\text{Ca}^{2+}$  медира промени в актиновите нишки [Ebashi et al., 1968]. Друга разлика между гладката и напречно набраздена мускулна тъкан е, че гладката съдържа уникална 20-kDa миозинова лековерижна субединица ( $\text{MLC}_{20}$ ). Повишените нива на комплекса

калций/калмодулин (CaCM) активира леко-верижната миозинкиназа (MLCK), което води до фосфорилиране на сериновия остатък на 19 място в MLC<sub>20</sub>, [Nakano et al., 2004]. Конформационните промени в миозиновите глави и взаимодействието между актина и миозина водят до мускулно съкращение. През последното десетилетие се изясни, че степента на MLC<sub>20</sub> фосфорилация се дължи на баланса между активността на Ca<sup>2+</sup>-зависима MLCK и MLC фосфатазата (MLCP), която премахва високоенергийния фосфат от леката верига на миозина [Uehata et al., 1997; Somlyo et al., 2003; Makhlouf et al., 2006]. Дефосфорилирането на MLC<sub>20</sub> чрез cATP- и cGMP-зависими протеинкинази допринася за релаксацията на контрахираните мускули [Makhlouf et al., 2006].

Ендогенни лигандите, участващи в контрактилната активност на гладкомускулните клетки на червата, са десетки: произхождащи от ентералните възбуждащи неврони (основно ацетилхолин и субстанция P), от гладкомускулните клетки (сфингозин 1-фосфат, ендоканабиноиди, продукти на арахидоновата киселина и пуриновия или пиримидинов метаболизъм), от ентерохромафинните клетки, клетките на адвентицията и циркулиращата кръв [Bornstein et al., 2004; Makhlouf et al., 2006].

Рецепторите, свързани с началното фосфорилиране на MLC<sub>20</sub> и *началната фаза на мускулна контракция на циркуларната мускулатура* са свързани с G<sub>q</sub> или G<sub>i</sub> протеина, или двата. Агонисти на G<sub>q</sub>-протеин рецепторите, стимулират активността на фосфолипаза C-β<sub>1</sub> (PLC-β<sub>1</sub>) чрез Gα<sub>q</sub>, докато G<sub>i</sub> рецепторите активират PLC-β<sub>3</sub> чрез Gβγ<sub>i</sub>. Тези ензими имат за специфичен субстрат мембранния липид фосфатидилинозитол 4,5-дифосфат (PIP<sub>2</sub>) и катализират образуването на два втори посредника: инозитол-1,4,5-трифосфат (IP<sub>3</sub>) и диацилглицерол (DG). Свързването на IP<sub>3</sub> към IP<sub>3</sub> рецепторните калциеви канали на саркоплазмения ретикулум води до освобождаването на Ca<sup>2+</sup> в цитозола [Cook et al., 1999; Wray et al., 2005]. В отговор на специфични стимули се увеличава вътреклетъчната концентрация на Ca<sup>2+</sup> йони над 10<sup>-5</sup>М в гладкомускулните клетки и той се свързва с киселия протеин калмодулин (CaCM). Този комплекс активира леко-верижната миозинкиназа (MLCK) да фосфорилира MLC<sub>20</sub>. DG, заедно с Ca<sup>2+</sup> йони активират протеинкиназа C (PKC), която фосфорилира целеви специфични протеини или L-тип Ca<sup>2+</sup> канали [Somlyo et al., 1988]. MLC<sub>20</sub> фосфорилирането по време на началното преходно съкращение, индуцирано от агонист се дължи на CaCM-зависима MLCK, докато последващата продължителна контракция се медира от Ca<sup>2+</sup>-независима

MLCK и от инхибиране на MLC фосфатазата (MLCP).

В гладкомускулните клетки на *лонгитудиналния слой*, за разлика от тези в циркуларния, началното съкращение се дължи на инфлукс на  $\text{Ca}^{2+}$  йони, като образуването на  $\text{IP}_3$  е минимално и саркоплазмените  $\text{Ca}^{2+}$  канали са нечувствителни към  $\text{IP}_3$ . Инфлуксът на  $\text{Ca}^{2+}$  йони в лонгитудиналната мускулна клетка се контролира от арахидоновата киселина [Murthy et al., 1995; Cook et al., 1999]. Увеличаване на тригерния интрацелуларен калций води до  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцирано освобождаване на  $\text{Ca}^{2+}$  йони от саркоплазмения ретикулум чрез рианодин-рецепторни  $\text{Ca}^{2+}$  канали [Wray et al., 2005].

Продължителното фосфорилиране на  $\text{MLC}_{20}$  и съответната *продължителна фаза на мускулна контракция* се медира от същите рецептори, но от различни G-протеин зависими пътища.  $G_q$  куплираните рецептори водят до активация на  $G\alpha_q$  и RhoA. RhoA е малък G-протеин, който активира Rho киназата (серин/треонин киназа) и фосфолипаза D, която води до образуване на DG, участващ в продължителната активация на протеинкиназа C (PKC) изоензими. Rho киназата и PKC инхибират MLC фосфатазата, леката верига на миозина остава фосфорилирана и по този начин се спомага съкращението [Trybus et al., 1994].

В някои гладкомускулни клетки, фосфорилирането на леката верига на миозина се поддържа на ниско ниво при отсъствие на външни стимули (т.е., при липса на рецепторно или механично активирание). Тази дейност резултира в това, което е известно като гладкомускулен тонус. Наблюдава се в сфинктерите и кръвоносните съдове, за които е характерно поддържане на тонично съкращение. Някои кинази като Rho киназа, Zip киназа и протеинкиназа C участват в поддържане на тоничната съкращение [Somlyo et al., 2003; Patel et al., 2007; De Godoy et al., 2011].

Понижението на  $\text{Ca}^{2+}$  концентрация в цитозола, чрез обратно навлизане в саркоплазматичния ретикулум, или чрез трансмембранен йонен обмен и стимулиране на активността на MLC фосфатазата инициират процеса на релаксация на контрахираната гладката мускулатура [Morgan, 1990; Somlyo et al., 2003]. Главните потискащи невротрансмитери са азотен оксид (NO), вазоактивен интестинален пептид (VIP) и неговите аналози, хипофизен пептид, активиращ аденилатциклазата (PACAP), аденозин и др.

## **2. ИНЕРВАЦИЯ НА СТОМАШНО-ЧРЕВНИЯ ТРАКТ**

Редица процеси в храносмилателната система са относително независими от ЦНС. Процеси като смилане, секреция, абсорбция и мотилитет са по същество автономни. Ентералната нервна система (ENS) е разположена изцяло в рамките на стената на храносмилателния тракт и осъществява неговата вътрешната инервация. Тя контролира двигателните функции, локалния кръвен ток, транспорта през стомашно-чревната лигавица, ендокринната и имунна функции, както и развитието на стомашно-чревния тракт.

### **2.1. Йерархия на нервната регулация**

Инервацията на храносмилателната система има йерархичен характер с пет основни нива на интегративна организация [Wood, 1981]. Ниво 1 е ENS, чиято организация и функция дават основание да бъде наречена “minibrain” в червата. Ниво 2 са вегетативните ганглии. Симпатиковите и парасимпатикови сигнали към гастроинтестиналния тракт произхождат от нива 3 и 4 (централни симпатиков и парасимпатиков центрове) в продълговатия мозък. Ниво 5 включва по-високи мозъчни центрове, които предоставят информация за интегративните функции на нива 3 и 4.

Сигналите от мозъка и гръбначния мозък към червата се пренасят от симпатикови и парасимпатикови нервни пътища, които представляват *външния компонент на инервацията*. Невроните на ENS образуват локални интрамурални мрежи, които образуват *вътрешен компонент на автономната инервация*.

### **2.2. Парасимпатикова инервация**

Преганглионарните неврони на парасимпатикуса (PS) са локализиращи в мозъчния ствол (ядра на 3, 7, 9 и 10 черепномозъчни нерви) и сакралната част (S2-S4) на гръбначния мозък. Правят синаптичен контакт с някои от невроните на ENS, които се явяват постганглионарни парасимпатикови неврони. PS инервация на храносмилателната система от фаринкса до горната част на низходящото дебело черво се осъществява от двата вагуса (колонът се инервира от целиачните клонове), ректумът се инервира от сакралните нерви [Altschulet et al., 1993]. PS оказва силно влияние върху невроните на миентералния и субмукозния сплит, локализиращи в проксималната (хранопровод и стомах) и дисталната (сигмоидно ободно черво и ректум) част на стомашно-чревния тракт и по слабо върху тънкото черво на плъх [Powey et

al., 1983; Berthoud et al., 1991].

PS неврони, които носят сетивна информация от храносмилателната система до ЦНС се наричат *външни първични аферентни неврони*, а *вагалните еферентни нервни влакна* носят информация към ENS. Само 10% от влакната са еферентни, другите 90% са сензорни. Schemann и Grundy (1992), регистрирайки електрофизиологичния отговор на миентералните неврони при електрическа вагусова стимулация на *in vitro* препарат от миентеричен плексус от стомах, заключават, че регистрираните постсинаптични, предимно бързи възбуждащи отговори, се предизвикват от малък брой еферентни вагусови влакна. Телата на спланхникусовите външни първични аферентни неврони се намират в гръбначномозъчните ганглии, а техните периферни влакна са включени в nn. splanchnici pelvici. Тези неврони са ноцицептивни и възбудата им води до усещане за болка в СЧТ.

Холинергичната невротрансмисия е описана в детайли в 4.1.

### **2.3. Симпатиковата инервация**

Симпатиковата (Sym) инервация на червата води началото си от гръдния и лумбалния региони на гръбначния стълб (T<sub>1</sub>-L<sub>3</sub>), като телата на нервните клетки са в интермедиолатералните колони. Еферентни симпатикови влакна напускат гръбначния мозък в състава на вентралните корени, за да направят първите си синаптичните връзки с неврони в превертебралните симпатикови ганглии (gang. celiacus, mesentericus superior и mesentericus inferior). Тези неврони образуват синапси с невроните на ENS и участват в инервацията на кръвоносните съдове, лигавица, и специализираните региони на мускулатурата (циркуларната сфинктерна мускулатура). Използването на хистохимични техники за локализация на ензимите тирозинхидроксилаза и допамин-β-хидроксилаза, разработени през 60-те години на миналия век води до изясняване на организацията на симпатиковите нервни пътища и комуникациите на постганглионарните влакна в стомашно-чревния тракт. Въпреки, че норадреналинът (NA) е медиатор на постганглионарните симпатикови неврони, ко-трансмиситери като АТР и невропептид Y (NPY) също участват в трансмисията. Превалирането на ко-трансмиситерите е различно в различните неврони, но NA се счита за медиатор в моторните инхибиторни неврони, докато АТР е основният трансмитер на вазоконстрикторните неврони, а невропептид Y, освободен от нервните окончания на гастроинтестиналните вазоконстрикторни неврони, оказва пре- и пост-синаптичен модулиращ ефект чрез Y<sub>1</sub> и Y<sub>2</sub>

рецепторите [Neild et al., 1990]. Според цитираните автори в морско свинче вазомоторните неврони съдържат NA и невропептид Y (NA/NPY неврони), инхибиращите секрецията неврони съдържат и соматостатин (NA/SOM неврони). При плъхове и мишки кодирането на тези неврони е различно: NA/NPY и при двата вида [Mongardi et al., 2009].

Наблюдението, че Sym неврони комуницират в ентералните ганглии, а рядко достигат директно до несфинктерната мускулатура, предполага, че инхибирането е предимно косвено, чрез ефекти в рамките на ганглиите. Поредица от елегантни експерименти, проведени *in vivo* при котки, от Kewenter и съавт. дават подкрепящи физиологични доказателства, че активирането на симпатиковите нерви инхибира нервномедианния възбуден отговор на червата, но не и предизвиканото от ацетилхолин пряко възбуждане [Kewenter et al., 1965]. *In vitro* експерименти на Vizi и съавт. върху илеум на заек са доказали, че екзогенно въведеният норадреналин, както и симпатикова нервна стимулация редуцират освобождаването на ацетилхолин [Vizi et al., 1971]. Чрез използване на клетъчни микроелектроди е потвърдено, че симпатиковите влакна в миентералните ганглии предизвикват инхибиране на холинергичното предаване на пресинаптично ниво [Hirst et al., 1974], като този ефект се опосредства от  $\alpha_2$ -рецептори [Stebbing et al., 2001]. Има доказателства за пуринергичен компонент в инхибирането на мотилитета от Sym [Venkova et al., 1993; Kadowaki et al., 2003]. За разлика от симпатиковите неврони, достигащи до миентералните ганглии, в субмукозните неврони симпатиковите ефекти са преки, постсинаптични, потискащи секретомоторната активност.

Симпатиковата активация контрахира сфинктерите, като този ефект се предизвиква и от екзогенно приложени норадреналин и адреналин [Furness, 2006]. NA действа директно върху сфинктерните мускули, като увеличава тонуса и задържа сфинктерите затворени. Така че, Sym неврони повлияват мотилитета по два начина, чрез инхибиране на активирането на ентералните неврони и съкращение на сфинктерите, което води до забавяне на транзита на чревното съдържимо. Очевидната липса на Sym активност към несфинктерната гладка мускулатура, наблюдавана при експериментални животни и хора по време на покой, контрастира с тонична активност на интестиналните секретомоторни инхибиторни пътища и симпатиковите вазоконстрикторни неврони [Furness, 2006].

Основната функция на Sym е да преразпределя кръвта от сплахникуса към

системната циркулация по време на физически натоварвания и при промени в околната среда, което води до депресия на храносмилателните функции, включително мотилитета и секрецията. Невроните са много по-чувствителни от гладкомускулните клетки към неадекватно кръвоснабдяване, така че не само се инхибира мускулната активност, но се намалява и активността на ентэралните неврони [Lindeström et al., 2004].

#### *Адренергични рецептори в стомашно-чревния тракт*

Ефектът върху мотилитета се обуславя в значителна степен чрез активиране на пресинаптичните  $\alpha_2$ -рецептори [Furness, 2006]. Директният релаксиращ ефект върху несфинктерната гладка мускулатура се медира от  $\beta_2$ -рецептори. В сфинктерните мускули има преобладаващо възбудни  $\alpha_1$ -рецептори и малко инхибиторни  $\beta_2$ -рецептори. На  $\alpha_1$ -рецепторен ефект се дължи потискането на секрецията и вазоконстрикцията при симпатикова активация на секретомоторните и вазомоторните неврони [Vanner, 1996].

В последните години чрез имунохистохимични техники значително се изясни локализацията на  $\beta_1$ -рецепторите в невроните и нервните окончания в миентэралния и субмукозния плексус на различни видове експериментални животни [Lin et al., 2003; Nasser, 2006]. Доказани са  $\beta_2$ -рецептори в невроните на субмукозния плексус на гризачи, в миентэралния плексус на мишки и  $\beta_3$ -рецептори, локализирани в миентэралните холинергични неврони на човешки колон [Cellek et al., 2007] и в нервните окончания на миентэралния и дълбокия мускулен плексус и ICC при мишки [Vasina et al., 2008], а в ентэралните глиалните клетки са описани  $\alpha_{2A}$ -рецептори [Gulbransen et al., 2010]. Въпреки, че ролята на тези рецептори не е напълно изяснена, изброените нови данни дават основание да се предположи, че ефектите на катехоламините в ENS са много по-широки и повлияват пре- и постсинаптичните процеси в ентэралните неврони и глия.

## **2.4. Ентэрална нервна система**

Ентэралната нервна система (ENS) осъществява вътрешната инервация на храносмилателната система. ENS е изградена от неврони и глиални клетки, организирани в ганглии, свързани помежду си и разположени в стените на всички органи на СЧТ. Независимата интегративна функция на ENS е подчертана от Langley в забележителния му труд за автономната нервна система, публикуван през 1923 год. [Langley, 1923]. Според него невроните в червата не могат да бъдат нито симпатикови, нито парасимпатикови, защото

не получават директно информация от CNS. Той назовава вътрешната нервна микроверига на СЧТ “ентералната нервна система” и я обособява като *трети отдел на автономната нервна система*, която изпълнява интегративна функция, относително независимо от симпатиковия и парасимпатиковия дял. По-късно ENS е наречена “*minibrain*” [Wood, 1981] и “*second brain in gut*” [Gershon, 1999]. Проявата на сложни реакции на всеки от специализираните органи в храносмилателната система е основно свойство на невроналната мрежа на “мозъка в червата”.

Невроните и глиалните клетки на ENS произхождат от нервния гребен [Gershon et al., 2006]. Недовършената миграция на клетки на нервния гребен до дебелия черва води до развитието на болестта на Hirschsprung (аганглионарен мегаколон) [Skinner, 1996; Gershon et al., 2006].

#### **2.4.1. Типове ентерални неврони**

Множество физиологични изследвания водят логично до идеята, че има много различни класове ентерални неврони, които попадат в различни функционални групи [Brookes 2001; Bornstein et al., 2004]. Доказани са най-малко 20 невротрансмитерно и функционално различни класове на ентерални неврони, като техният действителен брой е значително по-голям [Furness, 2006]. Най-обширни изследвания има в илеума на морско свинче [Brookes, 2001]. Невроните се различават в различните участъци на интестиналния тракт и различните животински видове [Furness et al., 2004; Cobine et al., 2007].

Множество неврохимични, фармакологични и функционални изследвания дават различни класове ентерални неврони, но електрофизиологичните изследвания ги разделят в две различни популации [Bornstein et al., 1994]. Едната група неврони се характеризират с следхиперполяризационни потенциали (AHPs), които следват акционните потенциали и морфология на големи овални клетки с няколко аксона. Тези неврони се наричат АН/Dogiel тип II. Другият клас неврони имат бързи възбуждащи синаптичните потенциали, почти винаги имат само един аксон и се наричат S неврони или S/Dogiel I тип [Hirst et al., 1974]. АН/Dogiel II невроните имат основна ролята на първични аферентни неврони, докато S невроните са интерневрони, моторни неврони и секретомоторни неврони [Bornstein et al., 2002]. Въпреки удобството на тази класификация, трябва да се уточни, че при някои условия АН/Dogiel II невроните получават възбуждащи синаптични сигнали и могат да действат като интерневрони [Thomas et al., 2004]. Четири различни типа синаптични

потенциали са идентифицирани в ентералните неврони: три типа възбуждащи постсинаптични потенциали (EPSP) – бърз EPSP с продължителност 30-50 ms, бавен EPSP, с продължителност 5-10 s до минути и междинен EPSP плюс задържащ постсинаптичен потенциал (IPSP).

#### **2.4.2. Функционална организация на ентералната нервна система**

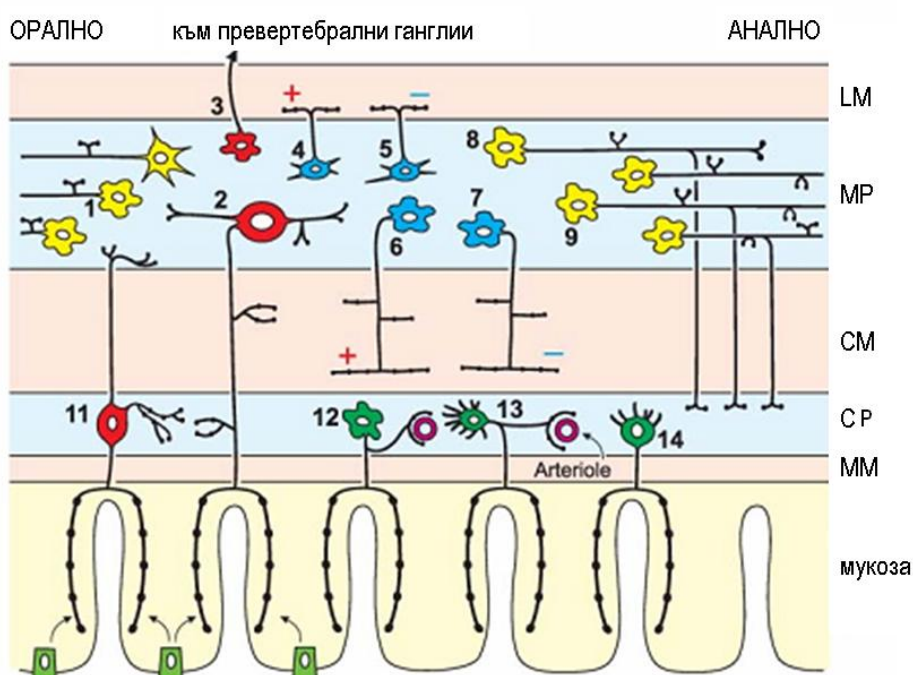
Клетъчните тела на невроните на ENS, съставляващи невронните мрежи са групирани в ганглии, които са свързани помежду си чрез нервни окончания и формират плексуси. *ENS има два ганглийни сплита: миентерален на Ауербах (Auerbach) и субмукозен на Майснер (Meissner)*, както и други плексуси без ганглии (Фиг. 1.1 и Фиг. 1.3). Миентералният плексус е разположен между циркуларния и надлъжния слой на мускулната обвивка на СЧТ от хранопровода до правото черво. Субмукозният плексус е разположен в субмукозата, между мукозата и циркуларния мускулен слой. Той е силно развит в тънкото черво и контролира интестиналната секреция, ентероендокринните клетки и субмукозните кръвоносни съдове. В по-едрите бозайници (напр. прасета, хора) субмукозният плексус се състои от вътрешна субмукозна невронна мрежа (плексус на Майснер), разположена от серозната част на мукозната мускулатура и външен плексус (плексус на Schabadasch), разположен откъм луменната страна на циркуларния мускулен слой. В човешкото тънко и дебело черво има трети междинен плексус между гореспоменатите два [Timmermans et al., 1997].

Независимата активност на ENS се дължи на присъствието на припокриващи се локални нервни мрежи (модули), които се състоят от първични аферентни неврони, междинни неврони и два вида мотоневрони – възбуждащи и задържащи, които действат на различни ефекторни клетки. Този начин на организация позволява на ENS да управлява двигателната и секреторна активност на стомашно-чревния тракт по координиран във времето и пространството начин и лежи в основата на богатия репертоар от двигателни модели [Costa a. Brookes, 1994; Costa et al., 2000].

##### *Сензорна инервация на стомашно-чревния тракт*

ENS съдържа външни първични аферентни неврони (EPAN), телата на които се намират във вегетативните ганглии, както и вътрешни първични аферентни неврони (IPAN), телата на които са в ентералните плексуси. IPAN има в субмукозния и миентералния плексус.

Първите директни доказателства за естеството на IPAN са дадени от Kirchgessner и колектив, базирани на експресията на fos гена (от семейството на незабавните ранни гени на транскрипционните фактори) в невроните на субмукозния слой на морско свинче при дразнене на мукозата с мехурчета азот или холерен токсин [Kirchgessner et al., 1992]. Активираните клетки са показали имунореактивност за субстанция P и калций-свързващия протеин калбиндин. IPAN имат морфология на Dogiel тип II и АН електрофизиология, свързват се един с друг със синапси, където се предава бавен EPSP.



**Фигура 1.3.** Типове неврони в колон на морско свинче, според функцията, морфологията, химията и проекции на окончанията. LM – лонгитудинален мускулен слой, MP – миентерален плексус, CM – циркуларен мускулен слой, SP – субмукозен плексус, MM – мукозен мускулен слой 1 – асцендентен неврон, 2 – миентерален IPAN, 3 – инестинофунгален неврон, 4 – възбуждащ към LM, 5 – потискащ мотоневрон към LM, 6 – възбуждащ мотоневрон към CM, 7 – потискащ мотоневрон към CM, 8, 9 – десцендентен интерневрон, 11 – субмукозен IPAN, 12 – нехолинергичен секретомоторен/вазомоторен неврон, 13, 14 – холинергичен секретомоторен неврон (по Furness et al., 2004)

IPAN се свързват и с интерневрони и мотоневрони чрез бавен или бърз EPSP и са имунореактивни за холинацетил трансферазата [Furness et al., 1989]. Сензорните неврони се активират от химически стимули, приложени върху мукозата; от серотонин или пурины, освободени от ентероендокринните клетки, както и от разтягане на чревната стена [Kunze et al., 1999].

#### *Ентерални моторни неврони*

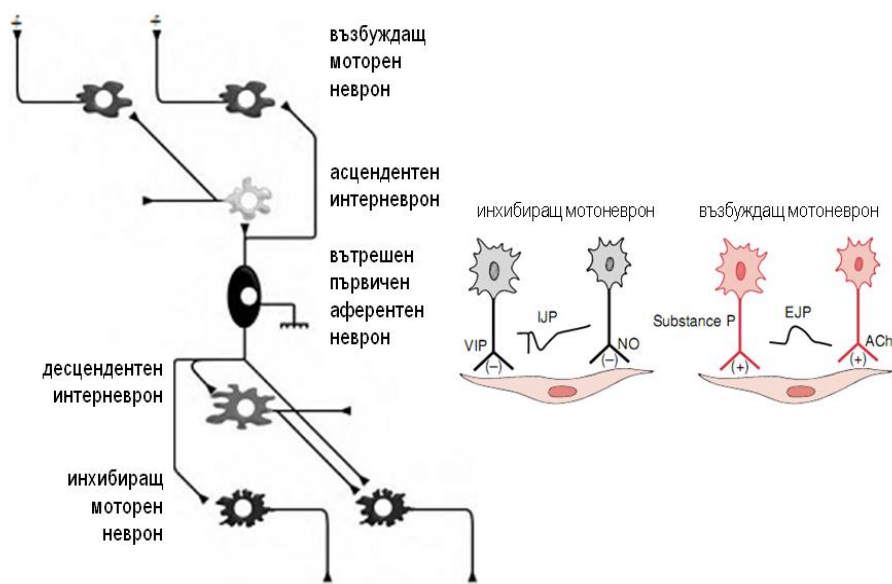
Още първите проучвания върху изолирани или денервирани препарати от тънко и дебело черва [Bayliss a. Starling, 1899; Cannon, 1912] доказват категорично наличието на моторни неврони в чревната стена, в състава на ENS. Мотоневроните имат разклоняващи се варикозни аксони към мускулните фибри на лонгитудиналния или циркуларния слой и мукозната мускулатура. Доказано е, че освобождаването на медиатори от мотоневроните се опосредства от ICC. При мутантни животни с дефицит на ICC се нарушава възбуждащата и инхибиращата невромедиация [Ward et al., 2004; Cobine et al., 2011]. В тънкото черво на морско свинче телата на мотоневроните са в миентералните ганглии, тъй като всички окончания на моторните неврони към циркуларния слой изчезват след отстраняване на миентералния плексус [Wilson et al., 1987]. При прасета [Hens et al., 2002], човек [Porter et al., 1999] и други видове значителен брой мотоневрони към циркуларните мускули са локализирани във външния субмукозен плексус на Schabadasch.

Моторните неврони са възбуждащи и задържащи. Аксоните на възбуждащите мотоневрони се разпространяват локално или проксимално (орално), а тези на задръжните мотоневрони се насочват дистално (аборално) (Фиг. 1.3 и 1.4). Разликите в проекциите на възбуждащите и задържащите моторни неврони лежат в основата на описаните от Bayliss и Starling рефлекси: „Възбуждата на червата във всяка точка предизвиква съкращение нагоре, и релаксация надолу. Това е законът на червата” (1899). Възбуждащите моторни неврони представляват повече от половината мотоневрони в *циркуларната мускулатура* в тънкото [Brookes et al., 1992] и дебелото черво [Neunlist et al., 2001]. Те са имунореактивни за възбуждащи медиатори като ацетилхолин и тахикинини.

Окончанията на потискащите мотоневрони в циркуларния слой са по-дълги (около 25 mm) от тези на възбуждащите, възходящи (8 mm) при морско свинче [Neunlist et al., 2001], докато при човек почти няма разлика в тяхната дължина [Porter et al., 1997]. Низходящите мотоневроните съдържат разнообразни невротрансмитери: дългите низходящи неврони в илеум на морско свинче са имунореактивни за VIP, NOS и гастрин-освобождаващ пептид (GRP); късите инхибиращи – за VIP, NOS, енкефалин (ENK) и неuropeпид Y (NPY) [Brookes et al., 1992],  $\gamma$ -аминомаслена киселина [Porter et al., 1997].

Телата на мотоневроните към *лонгитудиналния мускулен слой* са разположени предимно в миентералния плексус, някои и в субмукозните

ганглии, но образуват различна популация от тези в циркуларния [Hens et al., 2002]. Това лежи в основата на независимото активиране на двата мускулни слоя при физиологичния контрол на двигателната активност.



Фиг. 1.4. Мотоневрони и моторен рефлекс (по Wood JD, 2004)

В тънкото черво на морско свинче повече от 97% от мотоневроните в лонгитудиналните мускули са холинергични, т.е. възбуждащи [Brookes et al., 1992]. Малък е процентът на NOS [Costa et al., 1992] и VIP имунопозитивните мотоневрони [Costa a. Furness, 1983].

#### *Ентерални интерневрони*

В интестиналния тракт съществуват разнообразни типове двигателна активност. Това предполага наличие на междинни неврони, които се разполагат между аферентните неврони и моторните и/или секретомоторните неврони. Те принципно са два вида: възходящи и низходящи и участват във формирането на различни нервни мрежи. Асцендентните интерневрони са имунореактивни за ChAT (холинацетил трансфераза), тахикинини, енкефалин, динорфин, калретинин и представляват около 5% от всички миентерални неврони [Holzer et Maggi, 1994]. Те правят синапси с други асцендентни интерневрони, с възбуждащи мотоневрони към циркуларната и лонгитудиналната мускулатура и други ентерални неврони. Холинергичните рецептори са никотинови и се потискат от ганглиоблокери. Тахикининергични холинергични асцендентни неврони са описани също и при плъх, мишки [Sang a. Young 1998] и хора [Porter et al., 2002]. Функционалната роля на възходящите интерневрони е да разпространяват възбуждението от локални стимули към други клетки, и по-специално към възбуждащите мотоневрони и по тази начин да се координира

двигателната активност на разстояние по протежението на червата.

Низходящите интерневрони са три класа. Единият са холинергични соматостатин-имунореактивни неврони в субмукозния плексус, където медираат адренергичните инхибиторни синаптични потенциали. Соматостатин-съдържащите интерневрони правят синапси с други интерневрони, съдържащи азотен оксид и инхибиращи моторни неврони [Portbury et al., 1995]. Вторият клас аборадно насочени холинергични интерневрони, имунореактивни за серотонин, вероятно участват в бързата синаптична трансмисия чрез 5-HT<sub>3</sub> рецептори. Те заедно с първия клас най-вероятно са въввлечени в инициирането и разпространяването на мигриращия миоелектричен комплекс (MMC) [Dickson et al., 2010]. Третият клас низходящи междинни неврони са хетерогенна група от клетки, имунореактивни за комбинации от NOS, GRP, NPY, VIP, ATP и др. [Bian et al., 2004]. Наличието на три вида низходящи интерневрони е субстрат за различните видове координирана двигателна активност. Най-малко те участват в разпространението на низходящите инхибиторни рефлексии, а също така в пренастройване на мотилитета при хранене и постпрандиално, в координиране на MMC, в координиране на функцията на мукозата и мускулатурата.

### **3. МОТОРНИ РЕФЛЕКСИ**

Преди повече от един век Bayliss и Starling (1899) са доказали, че при прекъснати връзки към ЦНС, два рефлекса са в основата на нормалното двигателно поведение на червата: възходящ възбуждащ рефлекс, при който се наблюдава съкращение на циркуларната мускулатура орално от точката на стимулиране, и низходящ инхибиращ рефлекс, при който циркуларната мускулатура анално се релаксира. Те са формулирали т. нар. "закон на червата", според който всички стимули, предизвикващи един от тези рефлексии ще провокират и другия. Моделите на двигателна активност на червата при наличие и липса на храна *in vivo* са по-сложни от тези на двигателните отговори към приложен стимул *in vitro*. С използването на рентгенологични методи, Cannon определя няколко различни вида двигателна активност в присъствието на храна *in vivo* [Cannon, 1912], които той описва като сегментиращи движения и перисталтични движения, както и придвижване в орално посока (антиперисталтика). Hasler описва и друг тип двигателна активност, известна като мигриращ миоелектричен комплекс, разпространяващ се по протежение на червата от стомаха до сляпото черво [Hasler, 1999].

Описаните възходящ възбуждащ и низходящ инхибиращ рефлекс са в основата на почти всички модели на двигателна активност [Bornstein et al., 2004; Roberts et al., 2010]. Елементите на съответните невронни вериги са подробно описани в илеум на морско свинче [Bornstein et al., 2002]. Както възходящият възбуждащ път, така и низходящият инхибиращ път са мрежи, с участието на сетивни неврони, интерневрони с възходящ ход, контактуващи с възбуждащи моторни неврони и низходящи, свързващи се с инхибиращи моторни неврони [Smith et al., 1992].

Предаването на информация от IPAN, чувствителен към разтягане на чревната стена (AH/Dogiel тип II неврони) към възходящия интерневрон се медира от ACh, който действа основно на никотинови (nACh), но и на мускаринови рецептори и от тахикинини, действащи върху NK<sub>3</sub> рецептори [Johnson et al., 1998]. Трансмисията между възходящите интерневрони е чрез nACh рецептори [Johnson et al., 1998], докато предаване между възходящите интерневрони и възбуждащите мотоневрони е чрез nACh рецептори и NK<sub>3</sub> тахикининови рецептори [Tonini a. Costa 1990; Holzer a. Maggi, 1994]. Бързият EPSP, медиран от nACh рецептори играе роля във всеки функционално определен синапс в рамките на възходящия възбуждащ път [Gwynne a. Bornstein, 2007].

Низходящият инхибиращ рефлексен път е значително по-сложен по няколко причини. Първо, има три различни класа на низходящи интерневрони, а има само един възходящ клас [Brookes, 2001; Brookes et al., 2002]. Второ, докато електрическата стимулация предизвиква бърз EPSP, медиран от nACh рецептори във всички S/едноаксонални низходящи инхибиращи интерневрони, то много от тези неврони също проявяват бърз EPSP медиран от P2X или 5-HT<sub>3</sub> рецепторите [Zhou et al., 1999]. Трето, някои сетивни неврони имат дълъг аксон с анална проекция, както и в циркуларна посока [Brookes, 2001], което усложнява тълкуването на данните, произтичащи от фармакологичните изследвания. Първоначалните проучвания на низходящите потискащи пътища в илеума на морско свинче, са показали, че nACh рецепторите имат по-малко участие тук, за разлика от възходящите пътища [Johnson et al., 1998]. По-късно е показано, че в предаването от низходящите интерневрони към инхибиращите мотоневрони участват P2X рецептори [Bian et al., 2000]. Инхибиращите мотоневрони са имунореактивните за NOS [Brookes et al., 1992] и по-голямата част от NOS неврони са имунореактивните за P2X<sub>2</sub> рецептори [Castelucci et al.,

2002]. Въпреки че тахикининовите NK<sub>3</sub> рецептори са компонент на трансмисията на информация при дразнене на мукозата, това предаване не се потиска значително при прилагане на NK<sub>3</sub> рецепторен антагонист [Johnson et al., 1998]. Така, че ролята на ACh, ATP, 5-HT, тахикинините и глутамата като медиатори в тези синапси не е основна [Gwynne a. Bornstein, 2007]. Предполага се участието на калцитонин генно-свързан пептид в този процес [Grider, 1994].

#### *Низходящ възбуждащ рефлекс*

Относително наскоро, във физиологични експерименти е описан друг рефлексен път, който регулира мотилитета в тънкото черво на морско свинче [Spencer et al., 1999]. Това е низходящ възбуждащ рефлекс: разтягането на чревната стена и дразнене на чревната лигавица могат да предизвикат съкращения на циркуларния и лонгитудиналния мускулни слоеве анално от мястото на стимулация. Проучванията върху медиаторното предаване в низходящия възбуден път са ограничени. Въпреки това, наличните данни показват ключова роля на пуринаргичното предаване между низходящи интерневрони, може би чрез P2X рецептори, също така и чрез 5HT<sub>3</sub> рецептори [Spencer et al., 2000; Monro et al., 2002]. Блокирането на P2 рецепторите с PPADS (относително специфичен P2X рецепторен антагонист) инхибира низходящото възбуждане на лонгитудиналните и циркуларните мускули, а блокирането на 5-HT<sub>3</sub> рецепторите депресира рефлексния отговор на циркуларния мускул, но няма ефект върху лонгитудиналния [Spencer et al., 2000; Monro et al., 2002].

В последните години се доказва, че пропульсивната активност на дебелото черво се различава от тази на тънкото и се обуславя от взаимодействието на перисталтичния и т. нар. „окултен рефлекс”. Dickson и съавт. са показали, че в колона на морско свинче се активира окултен рефлекс: при разтягане в надлъжна посока се инхибират синаптичните потенциали [Dickson et al., 2007]. Това се получава, защото разтягането в надлъжна посока активира интерневрони, освобождаващи NO като медиатор на IPSP, потиска се нервната мрежа, въввлечена в перисталтиката, което забавя пропульсивната активност.

## **4. НЕВРОТРАНСМИТЕРИ В СТОМАШНО-ЧРЕВНИЯ ТРАКТ**

Ентералните неврони съдържат множество нервноактивни субстанции, които могат да бъдат съвместно съхранявани и освобождавани при подходящ стимул [Costa et al., 1996]. Те включват ацетилхолин (ACh), тахикинини и

опиоидни пептиди (главно енкефалин) във възходящите пътища и серотонин (5-HT), соматостатин, вазоактивен интестинален пептид (VIP), азотен оксид (NO) и динорфин в низходящите интерневрони. Низходящите мотоневрони съдържат VIP, NO, хипофизен пептид, активиращ аденилатциклазата (PACAP), динорфин/енкафалин и АТР. В този раздел са разгледани холинергичната, субстанция Р-ергичната, нитрергичната и АТР-ергичната невротрансмисия, съобразно поставените цел и задачи на този труд.

Имунохистохимичните изследвания на невропептидите и ензимите, отговорни за синтеза за невротрансмитерите в ENS са довели до създаване на хипотезата за *химическото кодиране*, която гласи, че всеки клас неврони може да се идентифицира чрез съдържанието на уникална комбинация от химични маркери [Gibbins et al., 1987, Furness et al., 1989]. Веществата, които са основни невротрансмитери се намират във всички неврони с равностойни роли в различни видове и региони на интестиналния тракт. Напр. задълбочени проучвания в много животински видове показват, че всички неврони инхибиращи мускулните съкращения в интестиналния тракт съдържат азотноксидна синтаза NO и VIP. Обаче, химическото кодиране на инхибиращите неврони с късо окончание в тънкото черво на морско свинче е NOS/VIP/ENK/GABA/NPY/PACAP, а NOS/VIP/BN/DYN/NFP/PACAP на тези с дълго [Williamson et al., 1996]. Някои от тези вещества може да нямат медиаторна функция (те биха могли да се считат за еволюционни остатъци) или може да имат роля, различна от участие в синаптичното предаване.

#### **4.1. Холинергична невротрансмисия**

Холинергичната медиация в ENS е отчетливо изразена и участва в реализирането на моторните, секреторните, вътрешните сетивни и съдовите рефлексии [Harrington et al., 2010]. Ach, освободен от вътрешните холинергични неврони и вагусовите окончания [Schemann et al., 1993; Porter et al., 1996] е основният възбуждащ медиатор, регулиращ мотилитета и мукозната функция [Galligan a. North, 2004] в храносмилателната система. Потискане на перисталтиката е описано от Tonini и съавт. при блокиране на мускуриновите (mACh) рецептори с хиосцин [Tonini et al., 1981], макар че се наблюдава слаба хиосцин- или атропин-резистентна перисталтика [Tonini et al., 1981; Schwörer a. Kilbinger, 1988]. В 1968 год. Paton и Zar са установили освобождаване на ACh, спонтанно и при електрическа стимулация в препарат от лонгитудинална мускулатура от илеум на морско свинче със съхранен миентерален плексус

[Paton et Zar, 1968].

ACh е първият трансмитер, открит в периферната нервна система от Dale през 1914 год. Той се синтезира вътреклетъчно, но неговата наличност в клетките е едва 9% [Мицов и съавт., 1989]. Синтезата му се катализира от ензима холинацетилтрансфераза (ChAT) [Tucek, 1975], който пренася ацетилния остатък от коензим А (ацетил коензим А се образува в митохондриите) върху холина (постъпващ в нервните окончания с помощта на специфична високоафинитетна транспортна система). ACh е лиганд на никотиновите (nACh) и мускариновите (mACh) рецептори.

#### *Холинергични рецептори*

Понастоящем са описани пет типа *мускаринови рецептори* –  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_4$  и  $M_5$  [Cauffield a. Birdsall, 1998; Egler, 2006]. Клонирани са гените, кодиращи mACh рецепторите в различни животински видове и са установени високо хомоложни последователности при различните проучвани видове [Hulme, 1990]. mACh рецепторите са от семейството на G-протеин-куплираните рецептори [Hulme, 1990]. G-протеините са хетеротримерни гуанин-нуклеотид-свързващи протеини, които регулират втори посредници и йонни канали [Lanzafame et al., 2003]. Съдържат по една  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  субединица и на базата на  $\alpha$  субединицата се подразделят на  $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha i/o}$ ,  $G_{\alpha q}$  и  $G_{\alpha q12}$  [Lanzafame et al., 2003]. При активиране на рецепторите G-протеина се разцепва на  $\beta/\gamma$  и  $\alpha$ -субединици, като  $G_{\alpha}$  регулира вътреклетъчния отговор.  $M_2$  и  $M_4$  рецепторите са свързани с  $G_{\alpha i/o}$ , инхибиране на аденилатциклазната (AC) активност, отваряне на калиеви и други неселективни катионни канали.  $M_1$ ,  $M_3$  и  $M_5$  са куплирани с  $G_{\alpha q12}$ , активиране на фосфолипаза C $\beta$ , продукция на DAG и IP3, и на GTP-азата RhoA, инхибираща миозинфосфатазата [Zholos et al., 2004].

При нормални условия пресинаптичните mACh рецептори имат потискащ ефект върху освобождаването на ACh от пресинаптичното окончание, благодарение на баланс между инхибиращите  $M_2/M_4$  и стимулиращите освобождаването  $M_1$ -рецептори. Тези рецептори повлияват алтернативно калиевия ток през пресинаптичната мембрана и вътреклетъчната концентрация на калций [Lambrecht et al., 1999; Santafe et al., 2006].

Типът mACh рецептори, отговорни за съкратителния отговор на интестиналната мускулатура е проучен и на ниво протеини и mRNA [Moro et al., 2005]. Приема се, че постсинаптичните  $M_3$ -рецептори имат основно значение за регулация на съкращенията и секрецията в храносмилателната система, но  $M_2$ -

рецепторите също участват в регулацията на тези процеси, обикновено съвместно локализирани с  $M_3$  [Eglen, 2001]. Проучвания в различни видове експериментални животни и хора, показват синергичен ефект на  $M_2$ - и  $M_3$ -рецепторите в контрола на гладкомускулното съкращение [Takeuchi et al., 2007]. Те активират RhoA и повлияват вътреклетъчната калциева концентрация не само по инозитол 3-фосфатния път, но и чрез повишаване на концентрацията на сфингозин-1-фосфата [Sakamoto et al., 2007]. Освен това при мишки с липса на  $M_3$ -рецептори е установено, че чрез  $M_1$ -рецептори се регистрира релаксация на стомашната гладка мускулатура, по механизъм, медиран от NO [Moro et al., 2005]. Използвайки разрешения за употреба при уринна инконтиненция селективен  $M_3$  рецепторен антагонист darifenacin, Bharucha и колеги са установили стимулиращ ефект на тези рецептори върху транзита в тънкото и дебело черво, без да се повлиява изпразването на стомаха при хора [Bharucha et al., 2010].  $M_3$ - и мотилиновите рецептори са свързани с продължителна  $MLC_{20}$  фосфорилация и съкращение.

Детайлно е проучена ролята на ICC в неврогенния контрол на мотилитета, вкл. M-холинергичния [Ward et al., 2004], както и наличието на  $M_2$ -рецептор подобна имунореактивност в ICC в интестиналния тракт [Lino et Nojyo, 2006]. Ward и съавт. са демонстрирали категорично отпадането на холинергичния контрол при  $W/W^V$  мишки с липса на ICC в стомашната стена [Ward et al., 2000].

nACh рецепторите имат важна роля в редица процеси, поради хетерогенността на рецепторните популации в различните органи на храносмилателната система: от неврогенния контрол на мотилитета, секрецията, кръвоснабдяването, до процесите на възпаление и пролиферация [Tobin et al., 2009].

*Никотиновите рецептори* са лиганд-зависими йонни канали, предизвикващи бърза мембранна деполяризация (бърз EPSP), водеща до бърза комуникация между невроните. Повечето от невроните в миентералния плексус развиват бърз EPSP чрез nACh рецептори [Browning et al., 1996], които напълно или частично се блокират от nACh рецепторни антагонисти [Bian et al., 2003]. Бързият EPSP в S-невроните на субмукозния плексус се блокират напълно от nACh рецепторни антагонисти, докато AN-невроните не получават EPSP, въпреки че притежават nACh рецептори [Schneider a. Galligan, 2000]. Никотиновите рецептори са хетеромерни или хомомерни катионни канали, които се състоят от пет субединици, различни комбинации

от  $\alpha$ - и не- $\alpha$  субединици [Dani a. Bertrand 2007]. Имунохистохимични изследвания при морско свинче за характеризиране на nACh рецепторите в ENS са доказали, че болшинството рецептори са хетеромери, съдържащи  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 2$ , и  $\beta 4$  субединици [Glushakov et al., 2004], докато при плъх доминиращите субединици са  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  и  $\beta 4$ , а в рецепторите на невроните на миентералния слой има и  $\alpha 7$  и  $\beta 2$  субединици [Garza A et al., 2009].

Стимулацията на тези рецептори в ентералните неврони води до освобождаване на различни медиатори вкл. ACh [Yau et al., 1989], NO, соматостатин и L-глутамат [Jin a. Grider, 1992]. В циркуларната мускулатура на илеум на морско свинче, полисинаптичната верига на холинергичните асцендентни интерневрони участва във възходящия възбуден рефлекс, провокиран от разтягане на стената. Освободеният ACh действа върху nACh рецептори в интерневроните и моторните неврони. Хексаметоният, прибавен в средната или аналната част на трикомпонентна органна вана, намалява амплитудата на съкращенията, предизвикани от възходящия рефлексен път [Tonini a. Costa, 1990]. Това показва, че бързата никотинергична трансмисия играе важна роля в този отговор. Обратно, поради това, че ACh не е есенциален трансмитер в низходящия инхибиторен интерневрон, то десцендентният инхибиторен рефлекс е по-малко чувствителен към N-рецепторна блокада [Smith et al., 1992; Smith a. Robertson, 1998]. За разлика от илеума, в колона на морско свинче трансмисията между възходящите или низходящи неврони и между сензорните и десцендентните интерневрони се осъществява предимно чрез nACh, но трансмисията към мотоневроните и от сензорните към асцендентните интерневрони зависи не само от nACh . Тези изводи се дават от Bian и съавт. на базата на резултати от електрофизиологичен експеримент, използвайки трикомпонентна органна вана и механичен стимул [Bian et al., 2004]. Никотиновата ганглийна медиация е важна за нормалната перисталтика, защото хексаметаният блокира пропульсията в илеум и колон [Wade a. Gershon, 1996; Tonini et al., 1996]. Описани са и пресинаптични никотинови рецептори в миентералния плексус на илеум на морско свинче, които регулират освобождаването на възбуждащи нехолинергични (тахикининергични) медиатори [Schneider a. Galligan, 2000; Schneider et al., 2000].

## **4.2 Нитрергична невротрансмисия**

Неадренергичната-нехолинергичната (NANC) потискаща невротрансмисия

в интестиналния тракт е позната отдавна [Abrahansson, 1986]. Основният механизъм остава неясен до 1990, въпреки че релаксацията и IPJP, отчасти се медира от пептиди [Shuttleworth a. Keef, 1995] и ATP [Burnstock, 1972]. Физиологичната роля на азотния оксид (NO) върху кръвоносните съдове е установена през 1980, когато Robert Furchgott доказва, че вазодилатиращият ефект на ацетилхолина не се дължи на директен ефект на ацетилхолина върху холинергични гладкомускулни рецептори. В края на 1980-те се описва, че ендотел-продуцираният релаксиращ фактор е NO [Palmer et al., 1987]. Moncada и съавт. (1989) съобщават, че NO се образува от ензим, наречен NO синтаза (NOS).

Li et Rand (1989), Vult и съавт. (1990), Toda и съавт.(1990) за първи път предоставят доказателства, че NO действа като инхибиращ NANC медиатор в изолиран препарат от фундус на стомах от плъх, илеоколонен препарат от куче и дуоденална лонгитудинална ивица от куче. Съгласно Vult и съавт. (1990) при електрическа стимулация на изолиран илеоколонен препарат от куче се отделя вазорелаксираща субстанция. Предизвиканата релаксация се премахва от инхибитор на NOS – N<sup>w</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA), а L-arginine (L-arg) обръща този ефект. Toda и съавт. и Li и Rand доказват, че електрически-индуцираната релаксацията на лонгитудинален препарат от дуоденум на куче и стомах на плъх, се потиска от L-NG-Nitroarginine methyl ester (L-NAME), но не от D-NAME, и релаксацията се възстановява от L-arg, но не от D-arg. Чрез NO/луминал-индуцирана хемилуминесценция е визуализирано освобождаване на NO от миентералния плексус, предизвикано от електрическа стимулация на препарат от илеум от морско свинче [Wiklund et al., 1997].

NO е медиатор в централната и автономната нервна система, където имунохистохимично е доказано наличие на синтезиращия го ензим [Bredt et al., 1990; Sanders a. Keef, 2000; Garthwaite, 2008]. NO се синтезира от L-arg, за да се получи цитролин от конститутивна Ca<sup>2+</sup>/калмодулин зависима невронална NOS (nNOS) [Forstermann et al., 1994]. Проучване на Van Geldre и съавт. (2004) върху хомогенат от тънко черва на плъх е доказало, че 50% от имунореактивната nNOS, е свързана със субклетъчни структури. Съществуват още два вида NOS – индуцируема (iNOS), участваща в имунния отговор и ендотелната NOS (eNOS).

„Рецептор“ за NO е водноразтворимата форма на гуанилатциклазата (GC) [Vincent a. Hope, 1992]. Свързващото място за NO е хем група, подобно на тази

в хемоглобина, но инкорпорирана в рецепторния протеин тя има 10000 пъти по-висок афинитет към NO, отколкото към O<sub>2</sub> [Martin et al., 2006]. Белтъчният компонент е  $\alpha\beta$ -хетеродимер, като  $\alpha_1\beta_1$  изоформата е свързващото място, а  $\alpha_2\beta_1$  е каталитичната единица, където GTP се превръща в cGMP [Garthwaite, 2008]. Frack et al., използвайки ODQ (инхибитор на GC) показват, че ефектите на ендо- и екзогенния NO в колон на куче се дължат на синтеза на cGMP [Franck et al., 1997]. Макар, че се обсъжда и cGMP-независима фармакодинамика, засега ролята на cGMP като втори посредник е единственият доказан физиологичен механизъм за предаване на сигналите на ендогенния NO [Krumenacker et al., 2004]. Много убедително доказателство за това е пълната загуба на NO-медирана вазодилатация след генетично отстраняване на NO-активираната GC [Friebe et al., 2007]. В гладката мускулатура на стомах от морско свинче [Desai et al., 1991]; тънко черво от плъх [Olgart a. Iversen, 1999] и колон от човек е доказано участието на cGMP в NO-индуцираната релаксация, чрез използване на инхибитори на разтворимата GC метиленово синьо и ODQ, както и фосфодиестеразния инхибитор zaprinast в илеоцекален препарат от куче [Ward et al., 1992].

Директният ефект на cGMP се проявява чрез свързване с регулаторното място на йонни канали, свързани с цикличните нуклеотиди; йонни канали, активиращи се от хиперполяризацията и модулирани от цикличните нуклеотиди [Craven a. Zagotta, 2006]; или чрез активиране на протеинкинази (PKG), основно PKG1 $\alpha$ , PKG1 $\beta$  или PKGII, участващи във фосфорилирането на ефекторни протеини [Schlossmann a. Hofmann, 2005].

#### *Електрофизиологични ефекти на NO*

NO предизвиква преходна мембранна хиперполяризация и релаксация в циркуларната мускулатура на иеюну от куче [Stark et al., 1991]. При повторно прилагане на NO, първоначалната хиперполяризация намалява, макар, че спонтанните фазични съкращения не са инхибирани. Това най-вероятно се дължи на това, че NO предизвиква релаксация по два механизма: чрез хиперполяризация и по независим от потенциала начин. Електрическата стимулация на илеум от морско свинче в присъствие на atropine и aramine провокира бърз и бавен IPJP в циркуларната мускулатура [Niel et al., 1983]. Бързият IPJP е апамин-зависим, докато бавният е апамин-резистентен. L-NNA няма ефект върху бързия IPJP, но блокира бавния IPJP. Бавният IPJP се блокира и от VIP10-28 [Crist et al., 1992]. L-NNA инхибира бавния IPJP,

предизвикан от VIP в циркуларната мускулатура, което предполага, че NO опосредства отговора към VIP и освобождаването му от интер- или мотоневроните, а VIP може да стимулира синтеза на NO в инхибиращите мотоневрони.

Tamura и съавт. (1993) са наблюдавали, че натриевият нитропроеид, като донор на NO, потиска бавния EPSP в някои неврони на миентералния плексус от илиеум на морско свинче. Доказателство, че NO може да действа като ретрограден трансмитер дават Yuan и съавт. (1995) в експеримент върху тънко черво на морско свинче използвайки трикомпонентна органична вана. При добавяне на натриев нитропроеид в камерата, където се прилага стимулацията се намалява както възходящия възбуждащ рефлекс, обусловен от EPSP, така и низходящия потискащ рефлекс. Описания на скоро окултен рефлекс [Dickson et al., 2007] се обяснява с медиаторната роля на NO в IPSP и авторите развиват хипотезата, че забавения транзит се дължи на освобождаване на NO от низходящите nNOS-позитивни интерневрони, активирани при елонгация на колона. Интересни са резултатите, представени от Burnstein et al., че NO увеличава IPJP и намалява бавния EPSP в субмукозните неврони в тънкото черво на морско свинче, но увеличава възбудимостта на VIP невроните, понижавайки прага им на възбудимост [Burnstein et al., 2010].

#### *Ефекти на NO върху енттералните гладкомускулни препарати и органи*

Понастоящем NO се приема като основен потискащ NANC трансмитер в различни региони на стомашно-чревния тракт в различни животински видове. nNOS се намира в низходящите интерневрони и потискащите моторни неврони, инервиращи интестиналната гладка мускулатура [Lecci et al., 2002]. NO също така участва в реализиране на комплексните двигателни реакции, регулирани от енттералните нервни вериги при норма [Lyster et al., 1995; Spencer et al., 1998] в процеса на израстване и развитие [Roberts et al., 2007], при патологични състояния [Takahashi, 2003], като болест на Hirschprung с дефицит на нитрегична инервация [Wester, 1998; Roberts et al., 2008], захарен диабет, където повишената NO медиация може да обясни забавения транзит [Adeghate, 2003].

Доказателство за ролята на ICC в нитрегичната трансмисия дават проучвания, показващи, че NO инхибиторни отговори не се наблюдават при мутантни плъхове с липса на c-Kit-позитивни ICC в стомаха и пилорния сфинктер [Ward et al., 2004].

NOS имунореактивни и NADPH диафораза- (маркер за NOS-позитивни неврони) позитивни нервни окончания са доказани в миентералния плексус на плъх [Bredt et al., 1990] и в миентералния и субмукозния плексус на бозайници [Rodrigo et al., 1998]. Имунохистохимичното изследване на NOS е доказало ко-локализация на NO с VIP в низходящите инхибиращи мотоневрони и низходящите интерневрони към други неврони в миентералните и субмукозни ганглии [Costa et al., 1992; 1996]. Ко-локализация NOS/VIP е описана в цялата храносмилателна система от стомаха до вътрешния анален сфинктер [Tonini et al., 2000]. Клетки от циркуларна мускулатура на колон на плъх и фундус на морско свинче синтезират NO в присъствие на VIP [Grider a. Makhlouf, 1992]. L-NNA блокира VIP-индуцираната релаксация и продукцията на NO. В колон на куче VIP и NO са отговорни за релаксацията. Huizinga и съавт.(1992) са доказали, че предизвиканата от VIP релаксация на циркуларна мускулатура се блокира частично от TTX (тетродотоксин) и от L-NNA (NG-nitro-L-Arginine) в еднаква степен, което показва, че NO е отговорен за нервномедираната VIP релаксация.

Електрически предизвиканата NANC релаксация на циркуларната мускулатура от илеум на морско свинче, се потиска 50% от апамин, а апамин-резистентната релаксация се блокира от L-NAME (L-N<sup>G</sup>-Nitroarginine methyl ester). L-NAME, приложен самостоятелно потиска релаксацията с 71% и този ефект се обръща при прилагане на L-arg. Тези резултати показват, че NO-индуцираната релаксация се дължи отчасти на апамин-чувствителен и отчасти на апамин-резистентен механизъм [Osthaus a. Galligan, 1992]. В литературата има убедителни доказателства, че NO, ATP и някои пептиди като VIP [Bayguinov et al., 1999; Tonini et al., 2000], невропептид Y [Nichols et al., 1994; Wu et al., 2003], хипофизен пептид, активиращ аденилат-циклазата [Mc-Conalogue et al., 1995] са котрансмитери в nNOS-позитивни неврони в миентералния плексус [Sanders a. Keef, 2000]. Тяхното освобождаване е функционално свързано, тъй като NO, образуван в нервните терминали регулира освобождаването на VIP и PACAP, и обратно VIP и PACAP стимулират активността на eNOS и продукцията на NO в гладкомускулните клетки [Jin et al., 1996; Teng et al., 2001]. Според Gil и съавтори ATP и NO невромускулната трансмисия имат допълващи се функции в регулацията на мотилитета в стомашно-чревния тракт. Чрез регистриране на постсинаптичните потенциали в препарат от колон, разтегнат в надлъжна и напречна посока, е установено, че NO предизвиква постоянна

гладкомускулна хиперполяризация, отговорна за инхибиране на спонтанната двигателна активност [Gil et al., 2010]. В предварително инкубиран с <sup>3</sup>H-NA фундус от стомах на морско свинче е доказано, че ендогенния NO увеличава освобождаването на норадреналин от адренергичните неврони [Sotirov a. Parasova, 2000]. Резултатите от експеримент, регистриращ електрическата активност на циркуларни мускулни клетки от проксимален колон на хамстер показват, че невроналният NO модулира пресинаптично пуринаргичната трансмисия [Matsuyama et al., 2003]. Според Van Crombruggen и Lefebvre (2004) NO увеличава чувствителността на мускулни ивици от колон на плъх към АТР, а АТР увеличава освобождаването на NO, докато мет-енкафелинът модулира на пресинаптично ниво предизвиканата от NO релаксация на лонгитудинална мускулатура [Ivancheva a. Radomirov, 1996].

NO участва и като модулатор на възбудната медиация. В илуем на морско свинче, стомах на зайци и хора е описано пресинаптично потискане на холинергичната трансмисия [Knudsen a. Tüttrup, 1992; Hryhoreko et al., 1994 Tonini et al., 2000], докато доказателства за постсинаптичен механизъм на потискане са представени във фундус от стомах на морско свинче [Milenov a. Kalfin, 1996] и прасе [Leclere a. Lefebvre, 2001].

В гладкомускулни органи на интестиналния тракт NANC инхибиращи неврони са отговорни за рецептивната релаксация – отговор, чрез който органа се адаптира към съдържимото, чрез постепенна промяна в напрежението на стената и малко повишение на вътрелуменното налягане [Abrahamsson, 1983; Desai et al., 1991]. Всъщност, NO е основният потискащ трансмитер в поддържането на тоничната инхибиция и комплайнса на циркуларната мускулатура чрез директно действие и чрез потискане върху холинергичната инервация [Tonini et al., 2000].

Нитрергичната инервация има основно значение и за регулация на гладкомускулния тонус на вътрешния анален сфинктер [Stebbing et al., 1996; Rattan a. Chakder, 1997; Stebbing, 1998]. NANC инервация с основно участие на NO, както и на СО и СО-освобождаващи молекули предизвикват релаксация на вътрешния анален сфинктер чрез активиране на GC/cGMP-зависима протеин киназа [Rattan et al., 2004], което подкрепя участието на NO в ректо-аналния инхибиращ рефлекс.

#### **4.2. Пуринаргична невротрансмисия**

Многобройни са доказателствата за сигналната роля на пуриновите

съединения в регулиране на двигателната активност на червата в почти всяка точка на пътищата, регулиращи мотилитета, от сензорна трансдукция до нервно-мускулното предаване [Galligan, 2008].

Пуринергичната хипотеза е предложена от Burnstock в 1972 г. след поредица от експерименти, показващи, че аденизин 5<sup>1</sup>-трифосфатът (АТР) е NANC медиатор в надлъжната мускулатура на дебелото черво и стомах на морско свинче [Burnstock et al., 1970] и в гладката мускулатура на червата и пикочния мехур [Burnstock et al., 1972]. Освобождаването на АТР от интестинални лонгитудинални препарати е калций-зависимо, което показва, че АТР е по-скоро трансмитер, отколкото метаболитен продукт [White a. Leslie, 1982]. Освобождаването на АТР от тения коли на морско свинче при електрическа стимулация е ТТХ-зависимо [McConalogue et al., 1996], което е доказателство за неговия невронален произход. Утвърждаването на пуринергичната невротрансмисия се подкрепя и от факта, че е описано наличието на екто-АТР-ази, индикация за екстрацелуларно действие на АТР, а не само като вътреклетъчен енергиен източник [Burnstock a. Kennedy, 1985]. Концепцията за ко-трансмисията допринася за разбирането на пуринергичната медиация [Burnstock, 1976; Казаков и Власковска, 1989]. Множество проучвания са доказали, че АТР и NA са ко-трансмитери в симпатикови неврони [Su et al., 1971] и понастоящем тя е добре установена, въпреки, че съотношението на медиаторите варира в различните структури и животински видове, през периода на развитие и остаряване и при различни патофизиологични състояния [Burnstock, 1995]. АТР и АСh са котрансмитери в PS неврони, инервиращи пикочния мехур, с VIP и NO в NANC неврони в различни участъци от червата [Burnstock, 2004].

#### *Пуринергични рецептори*

Burnstock дефинира пуринергичните рецептори през 1976 г., през 1978 г. ги разделя на P1 (аденозин) и P2 (АТР и АДР) рецептори, а по-късно въз основа на фармакологично повлияване, P2-рецептори са подразделени на P2X и P2Y подтипове [Burnstock a. Kennedy, 1985]. След клонирането на P2-рецепторите и проучване на механизмите за трансдукция понастоящем са познати седем подтипа P2X-рецептори и осем подтипа P2Y-рецептори [Ralevic et Burnstock, 1998; North, 2002; Abbracchio et al., 2006].

P1 и P2Y-рецептори са членове на семейството на G-протеин свързаните рецептори. Клонирани са четири подтипа на P1-рецептори (A1, A2A, A2B и A3),

като за всички подтипове има специфични антагонисти [Alexander et al., 2006]. Ендогенният аденозин, действайки основно върху  $A_1$  и  $A_2$ -рецепторите има ролята по-скоро на модулатор на пресинаптичната инхибиция и потиска освобождаването на ACh от моторните неврони, инервиращи интестиналната мускулатура и на тахикинин от ентэралните синаптозоми [Broad et al., 1992]. Доказано е, че чрез  $A_1$ -рецепторите се инхибира чревната двигателна активност при патологични състояния, като постоперативен илеус и исхемия [Michael et al., 2010].

До този момент са клонирани осем подвида на P2Y-рецептори при бозайници (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub>) [Abbracchio et al., 2006], но специфични антагонисти има за около половината от тези рецептори [Alexander et al., 2006], което затруднява детайлното изучаване на функциите им. P2Y рецепторите се различават по чувствителността си към различни нуклеотиди, напр. P2Y<sub>1</sub> рецептори са по-чувствителни към ADP, отколкото към ATP, а ATP е или неефективен или антагонист на други P2Y рецептори (напр. P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>14</sub>) [Abbracchio et al., 2006].

P2X-рецептори са лиганд-зависими катионни канали, които се активират от ATP [Ralevic a. Burnstock, 1998]. Клонирани са седем типа P2X-рецептори (P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, ..., P2X<sub>7</sub>) [Ralevic a. Burnstock, 1998; North, 2002]. P2X-рецепторите са тримери, имат обща структура: два трансмембранни домена, голяма екстрацелуларна бримка и интрацелуларни N и C-терминали. Има специфични антагонисти само за три от тези рецептори [Alexander et al., 2006], така че те обикновено се проучват чрез относително неспецифични антагонисти suramin и pyridoxal phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonic acid (PPADS), които взаимодействат и с някои P2Y-рецептори и ектонуклеотидази [Ralevic a. Burnstock, 1998].

#### *Роля на ATP в мотилитета на стомашно-чревния тракт*

Значителен е броят на изследванията дали ATP и другите пуринови нуклеотиди медиират потискащата нервно-мускулна трансмисия в червата [Kuriyama et al., 1998], както и за ролята на P2-рецепторите в трансмисията между ентэралните неврони [North, 2002, Galligan et al., 2000; Galligan a. North, 2004]. Макар, че имунохистохимични изследвания са показали P2-рецептори в различни участъци на червата, ролята им в регулацията на двигателната активност е все още предмет на научни дискусии. ATP деполяризира S невроните, имитирайки бавен EPSP, и хиперполяризира AN невроните,

предизвиквайки IPSP, като тези ефекти се медираат от бавни калций-зависими калиеви канали (SK) [Katayama a. Morita, 1989].

АТР участва в трансмисията от ентералните инхибиторни мотоневрони към циркуларната гладка мускулатура на колон [Kuriyama et al., 1998, Bornstein et al., 2004; Hoyle et al., 2002] и вътрешен анален сфинктер [Rae a. Muir, 1996] на морско свинче. Доказателство, че АТР медира инхибиторни постсинаптични потенциали (IPJP) са наблюденията, че предизвиква хиперполяризация на интестиналната гладка мускулатура [Tomita a. Watanabe, 1973]. Този ефект се блокира от апамин [Den Hertog et al., 1985] и от неселективния P2-рецепторен антагонист сурамин [Den Hertog et al., 1989; Hoyle et al., 1990]. Ефектът на АТР върху гладките мускули се медира от P2Y рецептори, свързани с апамин-чувствителните Ca<sup>2+</sup>-активирани K<sup>+</sup> канали [Kong, et al., 2000]. Прилагането на широкоспектърния пуринов антагонист PPADS се оказва не много ефективно в блокирането на електрически предизвикания IPJP в циркуларен мускул от колон на морско свинче [Bian et al., 2000]. Данни, получени чрез използване на специфични антагонисти за структурната локализация на P2Y-рецепторите изясняват по-детайлно ролята им [Wood, 2006a]. Доказано е, че единични електрически стимули водят до освобождаване на АТР от ентералните мотоневрони от препарат от човешки [Gallego et al., 2008; Lecea et al., 2011] и колон на плъх [Grasa et al., 2009], което води до бърз IPJP и преходна мускулна релаксация. Повтарящи се, високочестотни стимули освобождават NO и предизвикват продължителна хиперполяризация и релаксация. Тези различия може би са причината за допълващ се механизъм на релаксация – фазична (АТР) и тонична (NO) [Gallego et al., 2008]. Според Gil и колектив P2Y<sub>1</sub>-рецепторите са отговорни за IPJP, предизвикан от разтягане и деформация на мукозата и имат малък ефект върху регулацията на мембранния потенциал, а освобождаването на NO регулира тоничната мускулна инхибиция. Потискането на нитрергичната трансмисия, а не P2Y<sub>1</sub>-рецепторна блокада увеличава спонтанната двигателна активност *in vitro* и *in vivo* [Gil et al., 2010]. В регулиране на спонтанната нервна активност на колон от плъх пуринергичната и нитрергичната невромускулна медиации са взаимно допълващи се системи. Заедно с познанието, че при стимулацията на ентералните нерви се освобождават АТР и негови метаболити, тези данни насочват, че АТР, чрез P2Y<sub>1</sub> рецепторите медира IPJP посредством активиране на инхибиращ моторен неврон. В препарати от човешки и миши черва IPJP и предизвиканата

релаксация се блокира от P2Y<sub>1</sub>-рецепторен антагонист MRS 2179 [Gallego et al., 2006; De Man et al., 2003] и е установена имунореактивност към P2Y<sub>1</sub>-рецепторен протеин [Gallego et al., 2006; Giaroni et al., 2002]. P2Y<sub>1</sub> рецепторно медиран е апамин-зависимият и независимият IPJP в циркуларната мускулатура от колон на мишки [Zhang et al., 2010]. Проучванията обаче на пуринергичния компонент на инхибиторното нервно-мускулно предаване и регулиране на двигателната активност на червата са двусмислени. Пуринергичната невротрансмисия в илеума по-скоро лимитира възбудането, произтичащо от EPJP [Tonini et al., 1982], а не предизвиква релаксация, както в дебелото черво. Според Иванчева и съавт. АТР предизвиква апамин-зависими съкращения в илеум на морско свинче, P2-рецепторно медиранни [Ivancheva et al., 2001].

P2X<sub>2</sub> и P2X<sub>5</sub>-рецептори са идентифицирани имунохистохимично в интерстициалните клетки на Кахал (ICC) от мишки и морско свинче [Burnstock и Lavin, 2002; Sanders et al., 2006]. Интестиналните гладкомускулни клетки се възбудят чрез активиране на P2X рецепторите [Giaroni et al., 2002]. ICC са пейсмейкъри за гладкомускулните клетки, генерирайки бавни вълни, обуславящи ритъма на двигателната активност. Така че, P2X-рецепторната активация може да регулира интерстициалните пейсмейкъри [Furuzono et al., 2005]. Стимулацията на P2X-рецепторите в гладкомускулните клетки на колон на куче и мишка води до тяхното съкращение [Giaroni et al., 2002; Lee et al., 2005]. Възбуждащи постсинаптични потенциали, медиранни от P2X-рецепторите са открити в миентералните и субмукозните неврони [Galligan a. Bertrand, 1994]. Експериментални данни показват, че АТР, заедно с АСh, предизвикват бърз синаптичен отговор чрез P2X рецептори в миентералните неврони [Galligan et Bertand, 1994], като този ефект се антагонизира от PPADS и се среща предимно между десцендентните интерневрони и инхибиращите мотоневрони в низходящия потискащ рефлексен път [Bian et al., 2000]. Експерименти върху илеум от морско свинче в трикомпонентна органна вана показват, че P2X-рецепторите медираат трансмисията от десцендентните интерневрони към инхибиращите моторни неврони, но не и предаването между интерневроните и от вътрешния сензорен неврон към интерневроните [Poole et al., 2002; Hu H-Z et al., 2007].

Последни експерименти подчертават ролята на нови интестинални „фибробласто-подобни” клетки, които са възбудими, свързани с SK каналите и

участват в медиацията на ентeралните потискащи отговори към пурините в стомашно-чревния тракт [Kurahashi et al., 2011].

Пуриновите нуклеозиди и нуклеотиди са важни невротрансмитери в стомашно-чревния тракт. Чрез P2X- и P2Y-рецептори в невроните на миентералните и субмукозни ганглии на ENS ATP-ергичната медиация участва в регулацията на моторната активност и секрецията в червата. Пуринергичните интерневронни и нервно-мускулни сигнали са важен компонент в механизмите, контролиращи пропульсивната двигателна активност, координирайки съкращението и релаксацията в мускулните слоеве.

#### **4.4. Тахикининергична невротрансмисия**

Субстанция P (SP), най-известният представител на семейството на пептидите тахикинини (TK), е екстрахирана в 1931 от von Euler и Gaddum от мозък и черва на коне [von Euler a. Gaddum, 1931]. Същите автори са наблюдавали, че изолираното вещество проявява миотропна активност върху изолирани препарати от черва и са предположили, че SP (P идва от прах, формата на екстракта) се освобождава от интестиналния тракт и има участие в мотилитета. Тази хипотеза се потвърждава 50 години по-късно, когато се доказва, че TK, заедно с ацетилхолина, са главните възбуждащи медиатори в интестинални гладки мускули [Bartho et Holzer, 1985]. Описани и характеризирани са пептиди с подобна на SP биологична активност, които са наречени тахикинини – вещества, които предизвикват бърза релаксация на съдовата гладка мускулатура. Семейството на тахикините се обогатява и понастоящем наброява повече от 10 пептида, с общ компонент Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> (където X е аминокиселина). Те се разделят на: неврокинин А (NKA), неврокинин В (NKB) и по-дълги аналози на NKA – невропептид-капа и гама [Pennefather et al., 2004].

TK участват в много звена в регулация на функциите на СЧТ: от предаване на аферентната информация и регулация на мотилитета, секрецията, кръвоснабдяването [Patton et al., 2005], чревната бариерна функция, имунитета до процесите на възпаление и карциногенеза [Sanger et al., 2006; Poole et al., 2002].

##### *Тахикининови рецептори*

Идентифицирани са три вида TK рецептори: NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> и NK<sub>3</sub>, с агонисти съответно SP, NKA и NKB [Maggi, 1995; Stratowa et al., 1995; Kurtz et al., 2002]. TK рецептори са G<sub>q</sub>-куплирани, водещи до активиране на фосфолипаза C

[Sculptoreanu a. De Groat, 2003]. ТК могат да проявяват биологичните си ефекти и по механизъм, различен от G-протеин медиран (напр. митоген-активирани кинази) [Lecci a. Maggi, 2008]. SP и NKA са ко-локализирани с ACh, докато NKВ не се открива в интестиналния тракт, а SP и NKA са агонисти на NK<sub>3</sub> рецепторите там [Maggi, 1995; Lippi et al., 1998].

Разположението на SP и NKA в интестиналния тракт са проучени в детайли в лабораторни животни [Grady et al., 1996; Holzer et al., 2001]. Тахикининовите NK<sub>1</sub> рецептори в илеум на морско свинче се намират в: IPAN, съдържащи AhCT и калбиндин, инервиращи циркуларната мускулатура и мукозата; асцентентните миентерални интерневрони, съдържащи AhCT и калретинин; асцентентните възбуждащи мотоневрони към циркуларната мускулатура, съдържащи AhCT и енкефалин; асцентентните възбуждащи мотоневрони към лонгитудиналната мускулатура, съдържащи AhCT и калретинин и външните сензорни неврони [Harrington et al., 2005]. Върху гладкомускулните клетки и ентероцитите рецепторите са NK<sub>1</sub> и NK<sub>2</sub>, а в кръвоносните съдове и ICC рецепторите са само NK<sub>1</sub> [Jenkinson et al., 1999; Bian et al., 2000; Faussonne-Pellegrini, 2006]. Освен в гореизброените структури, NK<sub>1</sub> и NK<sub>2</sub> рецептори в морско свинче са описани в низходящите интерневрони имунопозитивни за NOS и гастрин-освобождаващ пептид [Portbury et al., 1995; Lecci et al., 1999].

NK<sub>1</sub> и NK<sub>2</sub> подтиповете рецептори предизвикват съкратителен отговор в циркуларните гладкомускулните клетки, а NK<sub>2</sub> рецепторите – в лонгитудиналните [Maggi et al., 1994; Costa et al., 1996]. Деполяризационен потенциал се предизвиква в интестинална мускулатура чрез стимулация на мотоневроните на фона на блокирана с atropine холинергична трансмисия [Zagorodnyuk et al., 1993, Zagorodnyuk a. Maggi, 1995]. Бавният EPJP се блокира от антагонисти на NK<sub>1</sub> и NK<sub>2</sub>-рецепторите, а бързият от сурамин и PPADS, което насочва за тахикининергична и пуринергична компонента в NANC във възбуждащия потенциал. В циркуларен гладкомускулен препарат от илеум на морско свинче, контракциите, предизвикани от SP чрез NK<sub>1</sub>-рецептори са атропин-резистентни, но се блокират от TTX [Maggi et al., 1990; Bian et al., 2000], което показва, че от невроните се освобождава не-холинергичен възбуждащ медиатор.

Блокиране на NK<sub>1</sub> при интактна холинергична медиация води до намаление на контрактилния отговор при стимулация [Bartho a. Holzer 1985] и

намаляване на възбуждащия постсинаптичен потенциал в колон на морско свинче [Zagorodnyuk et al., 1993], което е потвърждение за основната роля на ACh. Електрически предизвиканите, нервно-медириани, нехолинергични съкращения на циркуларната мускулатура се намаляват по амплитуда от антагонисти на NK<sub>1</sub> и NK<sub>2</sub>-подтиповете рецептори [Costa et al., 1985; Bartho a. Lefebvre, 1995]. Това показва, че този отговор се дължи на SP и NKA, които се отделят заедно при електрическа стимулация [Lippi et al., 1998]. Възходящите рефлексни съкращения на циркуларната мускулатура, провокирани от разтягане в радиална посока в препарат от тънко черво на морско свинче се потискат от хиосцин, но при увеличаване на обема на предизвикващия разтягане стимул, холинолитикът ги блокира частично. Този отговор обаче се потиска от NK<sub>1</sub> и NK<sub>2</sub>-рецепторни антагонисти, приложени заедно [Costa et al., 1992; Holzer a. Maggi, 1994] и частично от NK<sub>2</sub>, антагонист [Maggi et al., 1994]. Това показва, че съкратителният отговор на циркуларната мускулатура към тахикинините се медира от NK<sub>1</sub> и NK<sub>2</sub>, като NK<sub>2</sub>-рецепторният ефект превалява. В колон на морско свинче при повишаване на разтягането на стената, в присъствие на блокер на мускариновите рецептори, също се наблюдават ефективни възбуждащи рефлексни, които се антагонизират от блокери на тахикининовите рецептори [Maggi et al., 1994].

В литературата съществуват убедителни данни за участие на тахикинините в перисталтичния рефлекс. Тахикининовите рецептори, разположени върху ефекторните гладкомускулни клетки (главно възбуждащи NK<sub>1</sub> и NK<sub>2</sub>) и тези, разположени в невроните на миентералния плексус (интерневрони и мотоневрони) участват в регулацията на пропульсивната активност. SP се отделя в отговор на разтягане на стената на илеума, като това се блокира от TTX и се увеличава от агониста на никотиновите рецептори dimethylphenylpiperazine [Donnerer et al., 1984]. Bartho и Holzer са показали, че атропин-резистентната перисталтика се инхибира от антагонисти на NK<sub>1</sub>-рецепторите DPDTSP и spantide [Bartho a. Holzer, 1985]. В изолиран колон на морско свинче NK<sub>1</sub> и NK<sub>2</sub>-рецепторите показват синергичен ефект с ацетилхолина, както и в илеума [Holzer a. Maggi, 1994]. В друго проучване едновременната блокада на трите типа тахикининови рецептори потиска скоростта на пропульсията с 50%, което показва, че еднородните тахикинини играят важна роля в перисталтичния рефлекс [Tonini et al., 2001].

Има данни, че SP участва в регулацията на двигателна активност,

повлиявайки *низходящите мотоневрони*. Прилагането на селективния агонист на NK<sub>1</sub>-рецепторите GR-73632B в илеум на морско свинче предизвиква ТТХ-чувствително намаляване на спонтанните съкращения, което се дължи на освобождаване на NO от инхибиращия мотоневрон [Lecci et al., 1999]. NK<sub>1</sub> рецепторна ТТХ-чувствителна релаксация е описана и в препарат от СМ на колон [Bian et al., 2000]. В морско свинче са описани невронни NK<sub>2</sub> рецептори, участващи в низходящия инхибиращ път [Zagorodnyuk a. Maggi, 1995]. В циркуларен гладкомускулен препарат от колон NKA и синтетичния селективен NK<sub>2</sub>-рецепторен агонист [ $\beta$ -Ala8]-NKA предизвикат релаксация, поради действие върху NANC моторен неврон с последващо освобождаване на NO и апамин-чувствителен инхибиращ медиатор [Zagorodnyuk a. Maggi, 1995].

Намерени са NK<sub>1</sub> *пресинаптични рецептори*, участващи в регулацията на екзоцитозата на ACh в лонгитудинален мускулен препарат [Loeffler et al., 1994]. Няма убедителни данни, че NK<sub>2</sub> могат да предизвикат освобождаване на ацетилхолин. В илеум на морско свинче и в колон на морско свинче и зайци инхибиращият ефект на холиновите антагонисти, прилагани в субефективни концентрации, върху перисталтиката се увеличава при добавяне на NK<sub>2</sub>-антагонисти [Tonini et al., 2001; Onori et al., 2000]. В *in vivo* експеримент, NK<sub>2</sub>-антагонисти намаляват гигантските съкращения, предизвикани от дразнене в лумена, предизвикано от възпаление на колона, докато atropine ги блокира напълно, което е индикатор, че тахикинините увеличават ефекта на ацетилхолина върху мотилитета [Carini et al., 2001].

NK<sub>3</sub> са предимно невронни във вътрешния сензорен неврон, в асцентентните и десцендентни пътища [Maggi et al., 1994]. NK<sub>3</sub> в асцентентните пътища увеличават освобождаването на тахикинини и ACh от миентералния плексус на илеум от морско свинче [Yau et al., 1992], а тези локализиращи в десцендентните – на NO и водят до релаксация на циркуларната мускулатура на илеум и колон [Maggi et al., 1994]. Има доказателства за наличие на NK<sub>3</sub> в гладкомускулните клетки и ICC (в клетъчни култури от колон на морско свинче и човек), но тяхната функция не е изяснена [Jenkinson et al., 1999; Bian et al., 2000; Lecci et al., 2002; 2006].

В скорошно изследване на Valero et al., върху изолирани циркуларни и лонгитудинални препарати от различни части на тънко черво на заек е установено, че и трите типа тахикининови рецептори са въввлечени в

контактилният отговор и че съкращенията, предизвикани от субстанция P се редуцират от верапамил, атропин и инхибитора на фосфолипаза C – U73122 [Valero et al., 2011].

## **5. ДВИГАТЕЛНА АКТИВНОСТ И НЕВРОТРАНСМИСИЯ В РЕКТОАНАЛНА ОБЛАСТ**

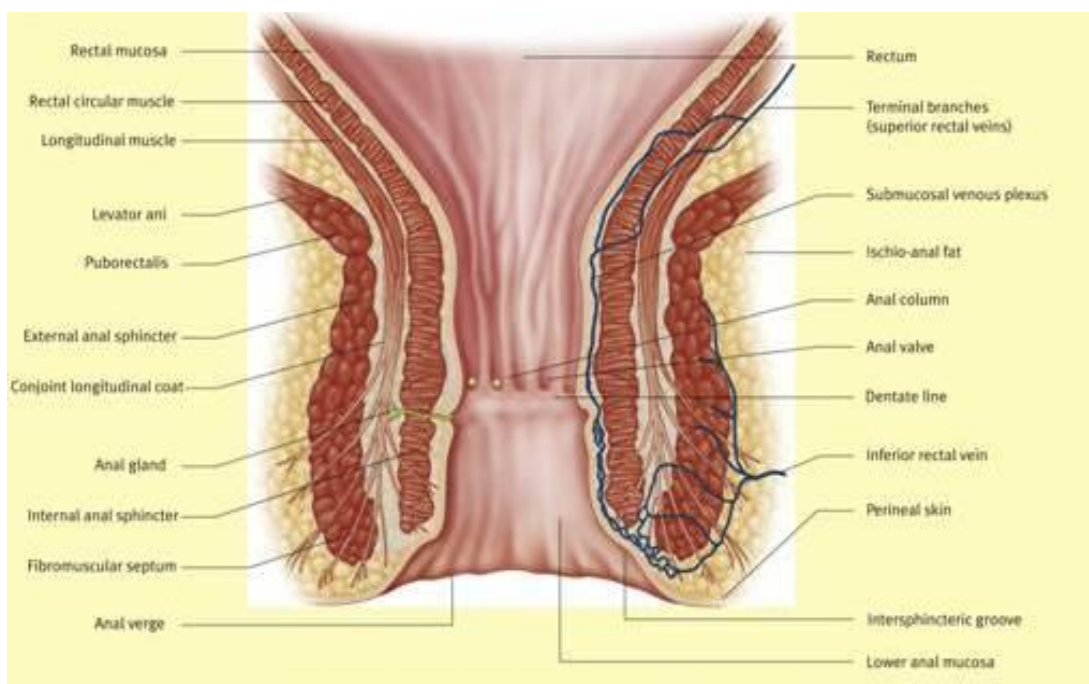
Ректо-аналната област е крайният отдел на интестиналния тракт, ангажирана предимно в транспорта, съхранението и евакуация на чревното съдържимо. Поддържане на континенцията и контрола на евакуацията се дължи на взаимодействие между аналните сфинктери, ректума и мускулите на зовото дъно, както и от функционирането на йерархичната система на нервен контрол в тази област [Bharucha, 2008].

### **5.1. Анатомия на ректоаналната област**

В ректоаналната област освен правото черво с неговите две части – тазова и анален канал се включват и мускулите, образуващи тазовото дъно. Анатомията на крайния отдел на GIT е представена във фиг. 1.5.

Напречнонабраздените мускули на тазовото дъно levator ani, състоящ се от pubococcygeus, ileo-coccygeus, coccygeus и puborectalis и външен анален сфинктер (EAS) се съкращават и отпускат синхронно, като функционална единица за поддържане на фекалната континенция и нормалната дефекация [Bharucha, 2006]. Тези мускули се инервират от сомато-моторни холинергични влакна в състава на n. pudendus с начало от S2-S4 на гръбначния мозък (ядро на Onuf) [Vodusek, 2004] и са под волеви контрол. Вътрешният анален сфинктер (IAS) се състои от концентрични кръгове циркуларна гладка мускулатура и е под неволеви контрол. Външната инервация на този мускул започва от лумбо-сакралния отдел на гръбначния мозък, а вътрешната от ENS [Vodusek, 2004; Furness, 2006]. Двата сфинктера образуват аналния канал, дисталната част на гастро-интестиналния тракт. Между двата сфинктера има лонгитудинален мускулен слой, който се формира от лонгитудиналния слой на ректума, разсейвайки се в пуборекталните мускули и фиброеластичен компонент [Lunniss a. Phillips, 1992]. Ректумът при човек има дължина 15-20 cm и се намира на нивото на третия сакрален прешлен. Той обикновено е празен, освен в процеса на дефекация [Bajwa a. Emmanuel, 2009; Barleben a. Mills, 2010]. Инервиращите го парасимпатикови нерви произхождат от S2-S4 като nn.

splanchnici pelvic и през pl. hypogastricus и навлизат в дисталния колон. Част от тези сакрални нерви инервират ректума и IAS. Електрическата стимулация на тези нерви имитира спонтанната дефекация (ректална релаксация, последвана от съкращение и релаксация на IAS) [Hirabayashi et al., 2003].



**Фигура 1.5.** Анатомия на аноректалната област [по Mahadevan, 2011]

Симпатиковите нерви произхождат от L2-L5, образуват синапси в долния мезентериален ганглий и постсинаптичните влакна достигат до ентералните ганглии на ректума, а хипогастричните клонове през pl. pelvicius към IAS [Malcom et Camilleri, 2000]. В проучване на Tong и съавт. от 2010 год. за автономната инервация на ректоаналната област на плъх е установено, че n. vagus инервира целия колон, докато пелвичните нерви – ректума, десцендентния и трансверзален колон, като предизвикват съкращение, опосредствано от M рецептори. Симпатиковата инервация на ректума се осъществява чрез хипогастричните нерви, чрез бета-рецепторна релаксация [Tong et al., 2010].

*Сензорното предаване* в ректоаналната област има някои особености. Сензорните рецептори в ректума се различават от тази на тънките и дебелия черва, където разтягането обикновено причинява болка, а в ректума те са по-чувствителни към промяна в налягането и бързо разтягане на стената [Lynn et al., 2003], тъй като аферентните в мезентериалния ганглий, образуващи вътреганглийните ламинарни окончания са по-чувствителни от тези в колона. Тези механорецептори отговарят и на промяна в налягането и в дължината на

мускулните влакна, което е в съответствие с наблюдението, че усещането за ректално пълнене съвпада с периода на повишено ректално налягане при разтягане на ректума. Така, че сензорната компонента на ано-ректалната активност зависи от обема в кухината и от комплайанса на ректума. Той има способност да се акомодира към промени в обема с малки промени в налягането. Тази феномен на комплайанс е по-изразен при малък обем и представлява активна релаксация за поемане на ректалното съдържимо [Fox et al., 2006]. Така, че механорецепторите в ректума изпращат кодираната информация към нервната мрежа на ENS и гръбначния мозък. Соматосензорните нерви на аналния канал и перинеалната кожа транслират сигнали от сензорните рецептори (за допир, болка и температура) към сакралните сегменти на гръбначния мозък и главния мозък, което дава възможност на индивида да разграничи наличието на газ, течност или твърди маси в аналния канал. Механорецепторите в мускулите на тазовото дъно са чувствителни на промяна в ориентацията на аноректума при навлизане на фецес и изпращат информация към CNS, като това е първото съзнателно предупреждение за постъпване на фекални маси [Fox et al., 2006].

## **5.2. Ректо-анален рефлекс и фекална континенция/инконтиненция**

В двигателната активност на ректума, както и в целия GIT участват различни типове клетки: гладкомускулни, нервни и интерстициални, които са разгледани по-горе. Ректумът обикновено е празен, а IAS е контрахиран и има основна роля в поддържане на континенцията [Penninckx et al., 1992; Sangwan a. Solla, 1998]. IAS и ректумът са анатомично свързани, но имат различна физиологична функция, което е свързано със значителни различия в тяхната двигателна активност и механизмите, които я контролират. В човешки ректум честотата на електрическата и контрактилна активност е подобна на тази в колона и е 3-4 цикъла за минута [Diamant et al., 1999], докато в IAS честотата на бавните вълни е 20 цикъла за минута [Ustach et al., 1970]. За контрола за континенцията е важно аналното налягане да е по-високо от това в ректума, което се обуславя от контрактилитета на двата сфинктера: IAS и EAS. При хора аналното налягане е 55-64 mmHg, много по-високо от ректалното (<10 mmHg) [Diamant et al., 1999]. Различно е участието на IAS и скелетните мускули (EAS и puborectalis) в поддържането на аналното налягане. Приема се, че делът на IAS

в поддържане на базалното анално налягане е 80-85% [Lestar et al., 1989]. Другите 15-20% се дължат на волевата контракция на EAS и m. puborectalis, докато при раздуване на ректума външният анален сфинктер допринася до 50% в поддържане на аналното налягане [Bishop, 1959; Bharucha, 2006]. При нарушения в инервацията, дължащи се на увреда на пудендалните нерви, се установяват малки промени в аналното налягане [Súilleabháin et al., 2001]. Това показва, че докато EAS има важна роля във волевия контрол на дефекацията, то при условия на покой неговата роля е по-малка от тази на IAS.

Експеримент, проведен върху кучета за регистриране на двигателната активност с тензодатчици е показал, че големи контрактилни вълни (наречени гигантски мигриращи съкращения), произхождащи от колона, пропагират към ректума при придвижване на фекални маси по време на дефекация [Kraus et Sarna, 1987]. Gower още в 1877 пръв е съобщил, че при разтягане на ректума IAS отговаря с релаксация [Gower, 1877], което 100 г. по-късно е наречено ректо-анален инхибиращ рефлекс (RAIR) от DeGroat и Krier (1978).

При малък интралуменен обем на ректума, тоничните съкращения на IAS и на пуборекталните скелетни мускули блокират пасажа на фекални маси в аналния канал и поддържат континенцията. Бързото навлизане на фецес и последващото раздуване на ректума, активира RAIR, който води до релаксация на IAS [Stebbling et al., 1996; Matsufuji et al., 1998; de Lorijn et al., 2005]. Както другите ентерални рефлексии, ректо-аналният рефлекс включва стимулация на рецепторите от раздуване и разтягане на ректалната стена и обработване на сензорната информация в ENS и гръбначния мозък. Следва рефлексна възбуда на инхибиторните мотоневрони за намаляване на напрежението в гладката мускулатура на IAS. Обработката на сигналите в гръбначния мозък води до активиране на спиналните сомато-моторни неврони, водещи до контракция на EAS. Осъзнаването на усещането за ректално пълнене се дължи на обработката в CNS на информацията от механорецепторите в мускулите на тазовото дъно. Релаксацията на IAS позволява контакт на ректалното съдържимо с лигавицата на аналния канал. Сензорните сигнали от аналния канал към мозъка са първо предупреждение за поддържане или не на континенцията. Поддържането на континенцията става чрез волева контаркция и неволева рефлекторна контаркция на ENS и пуборекталния мускул. Съкращението на EAS затваря аналния канал, и контракцията на пуборекталния мускул намалява аноректалния ъгъл като механична бариера.

Следва релаксация на циркуларната мускулатура на ректума и тази форма на адаптивна релаксация се съпровожда от увеличаване на обема на ректума. При намаляване на напрежението в стената на ректума, стимулите от механорецепторите намаляват и дефекацията се отлага. Рецептивната релаксация на ректума се съпровожда с възвръщане на контрактилното напрежение в IAS и съкращение на напречнообраздената мускулатура в ано-ректалната област, фекалните маси остават в ректума до следващо навлизане на фекални маси.

При волево решение за дефекация (сомато-висцерален рефлекс), командите от мозъка към гръбначния мозък изключват възбуждащите сигнали към EAS и мускулите на тазовото дъно и отваряне на аналния канал и ануса, заедно със съкращение на коремната мускулатура и диафрагмата. Програмираното поведение на гладката мускулатура включва скъсяване на дължината на лонгитудиналната гладката мускулатура и силно съкращение на циркуларната [Kamm et al., 1992]. Това поведение е в съответствие с основния стереотипен модел на перисталтична пропулсия. Това е крайната точка на интестинална перисталтика, където циркуларната мускулатура на дисталния колон и ректума са последния пропулсивен сегмент.

Фекалната инконтиненция е невъзможност за контролирано задържане на ректалното съдържимо и представлява многофакторно страдание. Освен намаляване на аналното налягане в резултат на структурни и функционални нарушения в интегритета на аналните сфинктери, пуборекталната мускулатура, ентералните и неентерални нервни структури, значение имат и ректоанална сензомоторна дисфункция, комплайанса на ректума, като и адекватната когнитивна дисфункция [Ranganath a. Strohbehn, 2012].

### **5.3. Двигателна активност в ректоанална област**

Подобно на горните отдели на интестиналния тракт, за ректоаналната област е характерна периодична двигателна активност: фазични съкращения, тонични съкращения и повтарящи се групи от фазични съкращения. Последните при хора са описани от Kumar et al., като периодични съкращения с честота 4-6 в минута, продължаващи около две минути в периодите между хранене, които те оприличават на фаза III от мигриращия моторен комплекс (MMC) в тънкото черво [Kumar, 1989]. Orkin и съавт. ги наричат ректален моторен комплекс и предполагат, че те имат значение за запазване на ректума празен, като намаляват чувството за ректално пълнене [Orkin et al., 1989].

Съкращенията са нерегулярни, по-скоро сегментни, отколкото пропагиращи, за разлика от тези при MMC [Prior et al., 1991]. При хора и кучета са описани два типа фазични съкращения: продължителни (продължаващи 3-10 минути) и кратки (10-20 секунди) [Sarna, 1986; Kumar et al., 1989]. Фазичните съкращения са пропагиращи и непропагиращи, но не водят до низходяща релаксация [Sethi a. Sarna, 1995]. В противен случай при тяхното спонтанно появяване би имало релаксация на IAS.

В основата на появата на *фазичните съкращения* в ректума е фармако-механичното куплиране:  $Ca^{2+}$  инфлукс, индуциран от бавните вълни на деполяризация води до начално фосфорилирана на  $MLC_{20}$ , което след това се засилва от лиганд-индуцирано фармако-механичното куплиране. Поддържането на *тоничните съкращения* се дължи на фосфорилирането на леката верига на миозина, което се поддържа на ниско ниво при отсъствие на външни стимули.

Основният възбуждащ медиатор е ACh, също и SP, ко-локализирана с ChAT в моторните неврони [Costa et al., 1990]. Въпреки, че в гладкомускулните клетки на интестиналния тракт, съотношението на  $M_2$  към  $M_3$ -рецепторите е 4:1, съкращенията се опосредстват преимуществено от  $M_3$  [Eglen, 2001]. При изследване на възбудната моторна инервация в ректоанална област на куче Tichenor и съавт. са показали, че ACh и NK-A са основните възбуждащи медиатори в ректума, като в проксималната част контрактилният отговор се реализира почти в еднакъв дял от  $M_3$  и  $NK_2$ -рецептори. Чрез радиолигандно изследване на гладкомускулните клетъчни мембрани е установен градиент в плътността на мускаринови и тахикининови рецептори от IAS към ректума при кучета [Tichenor et al., 2002].

*Куплирането на възбудане-инхибиране* в гладкомускулните клетки се медира от cAMP и cGMP. Според Murthy и Makhlouf, NO и VIP стимулират продукцията на cGMP, а хипофизният пептид, активиращ AC – на cAMP [Murthy a. Makhlouf, 1995]. Информацията за сигналните пътища в инхибирането на гладкомускулните съкращения на дебелото черво и ректума е малко. Kato и съавт. са провели експеримент с електрическа стимулация на изолирани снопчета от циркуларна мускулатура от ректум на заек в среда с високо съдържание на калий. Установили са, че инхибиращата инервация е неадренергична, нехолинергична, ненитрергична. Инхибиращата модулация на съкращенията е описана като ТТХ и сурамин зависима [Kato et al., 2007].

Особено внимание заслужава *двигателната активност на IAS*. Функционалните разлики между IAS и ректума се дължат на разлики в тяхното контрактилно поведение, IAS е предимно „тоничен“ мускул, докато ректалните мускули показват предимно фазична активност [Mutafova-Yambolieva et al., 2003; Patel a. Rattan, 2006]. Възбудната моторна инервация на IAS и ректума също се различава: в IAS е главно симпатикова, а в ректума е холинергична и тахикининергична [Tichenor et al., 2002; Brading и Ramalingam, 2006], а потискащата – нитрергична и в двете области [Stebbing et al., 1996; Stebbing, 1998]. Тонуса на IAS е в основата си миогенен и се дължи на активирането на протеини, въввлечени в оскуствяване на миофиламентите, повлиявайки RhoA/Rho киназната активност [Patel a. Rattan, 2006]. Този мускул е организиран в дискретни миниснопчета в контакт с пейсмейкърните клетки ICC [Cobine et al., 2010], участващи в процеса на електро-механично куплиране. В EAS и IAS на човек имунохистохимично са идентифицирани ICC-подобни клетки, отговорни за генериране на бавни вълни в аналните сфинктери [Shafik et al., 2006].

Много проучвания показват изразена възбуждаща симпатикова инервация на IAS [Tichenor et al., 2002; Brading a. Ramalingam, 2006], докато според други симпатовите нерви играят невромодулираща роля [Yamato a. Rattan, 1990; Spencer et al., 1999]. Поради комплексния и противоположен ефект на постсинаптичните  $\alpha_1$  (водещи до съкращение на сфинктера) и  $\alpha_2$ -пресинаптичните рецепторите (авторегулаторни, намалящи освобождаването на NA и на NANC потискащи медиатори) [Rattan a. Thatikunta, 1993]) симпатовата стимулация може да предизвика различен отговор. Това се усложнява и от описаните  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  и  $\beta_3$ -рецептори в IAS на опосум, които дилатират сфинктера [Rathi et al., 2003]. Според Rattan, изразеният възбуден или потискащ ефект на адренергичните агонисти върху IAS не кореспондира с убеждението, че симпатукусуът е отговорен за базалния тонус. Обратно, липсата на значителен ефект върху тонуса на антагонистите на съответните рецептори, показва по-скоро модулиращ ефект [Rattan, 2005]. Вероятно важни възбуждащи трансмитери в регулиране на тонуса на IAS са простагландин  $F_{2\alpha}$  [Cao et al., 2002] и ангиотензин II [Fan et al., 2002]. Използвайки експериментални модели в различни експериментални животни, вкл. хора *in vivo* и *in vitro* е доказано, че NO е основният потискащ медиатор в IAS [Penninckx et al., 1992; Rattan a. Chakder; 1992; Rattan, 2005; Kato et al., 2007]. Terauchi et al., са показали, че базалният тонус се контролира от синтез на NO,

опосредстван от eNOS, а RAIR – от nNOS, използвайки див щам и W/W<sup>y</sup> мутантни мишки [Terauchi et al., 2005]. Въпреки, че NO играе основна роля, потискащата невротрансмиция включва VIP [Chakder a. Rattan, 1996], PACAP [Chakder a. Rattan, 1998] и CO [Rattan a. Chakder, 1993], или взаимодействието между тях. Опазо и съавт., при скорошно проучване върху ефекта на NO, VIP и ATP върху спонтанния мембранен потенциал и електрически-предизвикания отговор на IAS от плъх са установили функционална ко-трансмиция за NO и пурины със специфична и допълваща се роля в инхибиторните моторни пътища. Базалният тонус и потенциала на покой се контролират основно от NO, докато пурините медиат бавния инхибиращ потенциал чрез P2Y<sub>1</sub>-рецептори, така че ATP основно е отговорен за фазичната релаксация, а NO – за тоничната релаксация на IAS [Opazo et al., 2011].

EAS има важна роля в процеса на фекална континенция, в допълнение към добре изяснената роля на IAS. EAS се състои от тонично (“slow twitch”) и фазични (“fast twitch”) контрахиращи се фибри. В *in vivo* и *in vitro* експеримент върху EAS на заек, е доказано, че мускулите на EAS, подобно на сърдечната мускулатура функционират в „субоптимална дължина” на саркомера [Rajasekaran et al., 2008]. Така че, съгласно закона на Frank Starling удължаване на саркомерите би подобрило силата на мускулното съкращение. Върху същия експериментален обект те правят относително удължаване на саркомера, чрез EAS нагъване, при което се намалява радиуса на аналния канал [Rajasekaran et al., 2011] и се повишава аналното налягане. Това може да има клинично приложение за подобряване на континенцията при пациенти след сфинктеропластика и засягане на пудендалните нерви, при интактен EAS.

#### **5.4. Възходящи и низходящи рефлексни в ректоанална област**

ENS интегрира сензорната информация от различни области на интестиналния тракт и я транслира като подходящ сигнал към същите или други области и по-висши центрове в резултат на което се развива специфичен моторен отговор. Гастро-ректалният рефлекс е пример за междуорганен рефлекс, състои се в повишаване на тонуса на ректума бързо след нахранване. Рефлексите на по-къси разстояния се медиат чрез интерневроните, докато тези между отдалечени органи – от външни неврони, като възбуждащи и потискащи сигнали могат да се предават в орална и аборална посока. Освен

описания RAIR, са описани коло-анален и ректо-анален възбуждащи, коло-анален потискащи, коло-анален възбуждащи, както и коло-ректален стимулиращи рефлексни пътища.

Malcolm и Camilleri при хора са описали релаксация на IAS при започване на гигантските пропагиращи съкращения в дисталния колон като *коло-анален рефлекс*, които улеснява дефекацията при придвижване на фекалните маси, независимо от RAIR (2000). При болни с фекална инконтиненция при пудендална невропатия е установен абнормен дистален *ректо-анален* възбуждащ рефлекс, в резултат на денервация на външния анален сфинктер [Sangwan et al., 1995]. В цялостен аноректум на плъх Радомиров и съавт. са описали холинергичен възбуждащ възходящ и низходящ рефлексен път и такъв, който е NO-зависим, потискащ и асцендентната медиация към ректалната циркуларна мускулатура и десцендентната към вътрешния анален сфинктер и аналния канал [Radomirov et al., 2009]. Shafik и колектив са установили, че при разтягане на стената на сигмоидното черво се наблюдава анална дилатация, и при намаляване на аналното налягане се предизвиква съкращение на сигмата, наречени *сигмо-анален инхибиращ* и *ректо-сигмоидален възбуждащ* рефлекс [Shafik et al., 2001]. Острото раздуване на ректума инхибира моторната активност на колона и този *ректо-колонен инхибиторен* рефлекс е описан като висцеровисцерален, дължащ се на активиране на външни аференти [Law et al., 2002; van der Veek et al., 2004]. При хора е описан *ано-ректален* възбуждащ рефлекс, който води до контракция на ректума при стимулация на чувствителни на разтягане анални рецептори [Shafik et al., 2003]. Най-вероятно той има роля в процеса на дефекация, като ректо-аналния инхибиращ рефлекс има водещо значение в този процес. Установен е и *коло-ректален стимулиращ* рефлекс [van der Veek et al., 2004]. Chen и колектив (2010), изследвайки *коло-ректалните* и *ректо-колонни* рефлексии в модел на куче са описали дълъг инхибиращ рефлекс между проксималния колон и ректума със симпатиково участие и по-голяма чувствителност на вътрешния аналния сфинктер към разтягане на ректума, отколкото на проксималния колон.

## **5.5. Функционална активност на ректума: транзитен или резервоарен орган, или и двете?**

Двигателната активност в ректоаналната област е до голяма степен

неизяснена [Shafik et al., 2003] и ролята на ректума като транзитен или резервоарен орган е все още предмет на дебати (Shafik et al., 2006). Ректумът обичайно е празен, но неговата роля като транзитен орган е дискуссионна. Neil и Rampton са описали, че при хора без заболявания на интестналния тракт в 31% има наличие на фекални маси в ректума [Neil et Rampton, 1981]. Заглавието на тази точка е заглавието на едно ключово проучване на Ахмед Шафик и колектив относно физиологичната функция на ректума при неговото бързо обемно и бавно постепенно раздуване при 12 здрави доброволци [Shafik et al., 2006]. Според авторите бързото обемно раздуване води до повишаване на ректалното и намаляване на аналното налягане и в този случай ректумът е проведен орган, осигурявайки провеждането на масите директно от колона към външната среда. Бавното постепенно ректално пълнене не предизвиква ректални съкращения, докато ректалното пълнене не достигне по-голям обем и дразненето на механорецепторите провокира дефекация. При условие, че фекалните маси могат да останат натрупани в ректума за продължителен период, то тогава той функционира като резервоарен орган. Резервоарната функция се дължи на адаптивността на гладката мускулатура към разтягане, предизвикано от малък обем, т. нар. рецептивна релаксация. Така че, ректумът е резервоар за фекални маси при малък обем, а функционира като проведен орган, когато голям обем съдържимо постъпи бързо от сигмата [Shafik et al., 2006]. Ректумът има способността да се приспособява към увеличаване на обема с малко повишаване на налягането. Това свойство, респ. комплайнс е изразено при малък обем на ректално пълнене, представляващо активна релаксация за адаптиране към обема [Wajwa a. Emmanuel, 2009]. Когато се достигне максимално поносимия обем, дори малко повишение в обема се съпътства с увеличаване на ректалното налягане. Така сензорната перцепция в аноректалната активност зависи от съдържанието в лумена, както и от степента на разтегливост или комплайнс на ректалната стена.

## 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поради здравното и социално значение на заболяванията, свързани с нарушения в евакуаторната функция, се наблюдава повишен интерес и нарастващ брой експериментални и клинични проучвания върху фармакофизиологичните и патофизиологичните процеси в ректоаналната област. С обогатяването на данните за многообразието на невротрансмисията в стомашно-чревния тракт все повече се уточнява значението на ентералната инервация в регулацията на неговите функции.

Малки пръстени от циркуларна мускулатура, заедно с прилежащите ентерални неврони могат да се съкращават независимо и се разглеждат като функционални модули [Costa et al., 2000]. Пространство-времевата координация на модулите е фактор за генериране на богат репертоар от моторни модели в стомашно-чревния тракт. Въпреки големия брой експериментални данни за рефлексорната двигателна активност на дебелото черво, все още ролята на локалните нервни модули в мотилитета по циркуларната ос в ректоаналната област не е определена. В достъпната литература не съществуват данни, показващи корелация и функционална координация между двигателната активност, зависеща от модулните нервни мрежи в различните области на аноректума.

Ролята на локалните нервни мрежи, лежащи в основата на съкратителната и/или релаксиращата активност на лонгитудиналния и циркуларния мускулен слой в дебелото черво и аноректума изисква по-нататъшно изясняване. В литературата са описани разнопосочни данни относно двигателното поведение на гладкомускулните слоеве в осъществяване на перисталтичния рефлекс: от синхронна моторна активност на лонгитудиналния и циркуларния слоеве в дебелото черво на морско свинче [Smith et Robertson, 1998] до реципрочна дейност в колон на плъх [Grider, 2003]. Взаимодействието и координацията между лонгитудиналния и циркуларен мускулен слой в двигателното поведение на аноректума все още са обект на дискусия.

Голяма част от познанието за механизмите, лежащи в основата на перисталтиката и пропульсията, се базират на проучвания върху дебелото черво на морско свинче, започнали преди близо 40 г. Единични са изследванията на

рефлексната двигателна активност в аноректум на плъх. Механизмите на моториката и функционалната роля на рефлексните пътища в ректоаналната област, лежащи в основата на континенцията и евакуацията остават неясни. Въпреки че основните елементи на двигателните рефлексни вериги са до голяма степен охарактеризирани електрофизиологично и анатомично (Costa и съавт., 1992; Furness и съавт., 1994), фармакологичните механизми на предаването в специализираните невромедиаторни пътища остават неизяснени. Влиянието на ректалните рефлeksi върху двигателната активност на аналния канал, със съхранен анатомичен и функционален интегритет на ректума, вътрешния и външен анален сфинктер, както и фармакологията на основните невромедиатори в ректоаналната област са недостатъчно проучени.

Ацетилхолинът и субстанция Р са основните възбуждащи невромедиатори в моторната активност на интестиналния тракт. Систематични проучвания върху природата на инхибиторната невротрансмисия в различни животински видове и хора са идентифицирали азотния оксид като основен потискащ медиатор в стомашно-чревния тракт, а вазоактивният интестинален пептид, аденозин трифосфатът и въглероденият оксид имат известна видовоспецифична роля, особено в релаксацията на вътрешния анален сфинктер. Наличието, локализация и плътността на ацетилхолин-, азотен оксид-, субстанция Р- и аденозинтрифосфат-съдържащи нервни структури в миентералния плексус на аноректум на плъх изискват допълнително изясняване.

## **ГЛАВА II. ЦЕЛ, ЗАДАЧИ И МЕТОДИЧНИ ПОДХОДИ**

### **1. ЦЕЛ**

Цел на настоящото изследване е да се характеризират основните невромедиаторни системи на модулаторни и низходящи моторни отговори в ректоанална област на плъх.

### **2. ЗАДАЧИ**

1. Изследване на спонтанната двигателна активност на изолирани ринг-препарати, ивици лонгитудинална мускулатура и цялостен аноректум на плъх.

2. Изследване на модулаторни моторни отговори на ринг-препарати, изолирани по циркуларна ос от аноректум на плъх.

3. Изследване на въздействието на субстанции, повлияващи холинергичната и нитрергичната системи върху модулаторните моторни отговори в ринг-препарати от аноректум на плъх.

4. Изследване на моторните отговори на ивици лонгитудинална мускулатура и въздействието на субстанции, повлияващи холинергичната и нитрергичната системи върху тях.

5. Изследване на функционалната координация между активността на лонгитудиналната и циркуларната мускулатура чрез локалните моторни отговори в цялостен аноректум на плъх.

6. Характеризиране на низходящите моторни отговори, предизвикани от електрическа полева стимулация и разтягане на стената на ректума чрез раздуване на балон.

7. Изследване на участието на холинергичната, нитрергичната, тахикининергичната и пуринергичната системи в низходящите моторни отговори в цялостен аноректум на плъх.

8. Морфологични изследвания за наличие, разпределение и плътност на холинацетилтрансфераза-, никотинамид аденин динуклеотид фосфат-диафороза-, субстанция Р- и АТР-синтаза-съдържащи нервни структури в ректоаналната област на плъх.

### **3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИЧНИ ПОДХОДИ**

За реализиране на поставените цел и задачи са използвани следните *методични подходи*: електрическа полева стимулация, раздуване на ректума с балон, органни вани – единична и двукамерна и морфологични изследвания. Експериментите са проведени в Лаборатория „Периферни синапси” на Институт по невробиология на БАН. Експерименталните програми са провеждани в съответствие с изискванията на Комисия по етика на научно-изследователската дейност на Институт по невробиология при БАН.

#### **3.1. Експериментални животни**

Използвани са 120 мъжки имбредни нормотензивни бели мъжки плъхове порода Wistar с тегло 250-280 g (възраст 10-12 седмици), доставени от развъдна база Сливница. Животните са отглеждани във вивариума на Институт по невробиология на БАН, при температура  $22.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ , 12:12 часа светъл-тъмен цикъл и свободен достъп до храна и вода. Животните са оставяни на глад през нощта преди експеримента и са убивани чрез гилотиниране или зашеметяване чрез удар по тила и обезкръвяване след прерязване на каротидните артерии. Коремната кухина е отваряна, симфизата е отстранявана за осигуряване на добър достъп до ректума. Перинеалната кожа внимателно е изрязвана и аналният канал, заедно с дисталната част на дебелото черво са отстранявани бързо и поставяни в оксигениран модифициран разтвор на Кребс на стайна температура. Препаратите са промивани внимателно с разтвор на Кребс, прилаган със спринцовка в проксималния край на препарата. Отстранявани са внимателно кръвоносните съдове, нерви и серозата по мезентериалната страна на препарата в среда на оксигениран разтвор на Кребс.

#### **3.2. Изследване на модуларни моторни отговори**

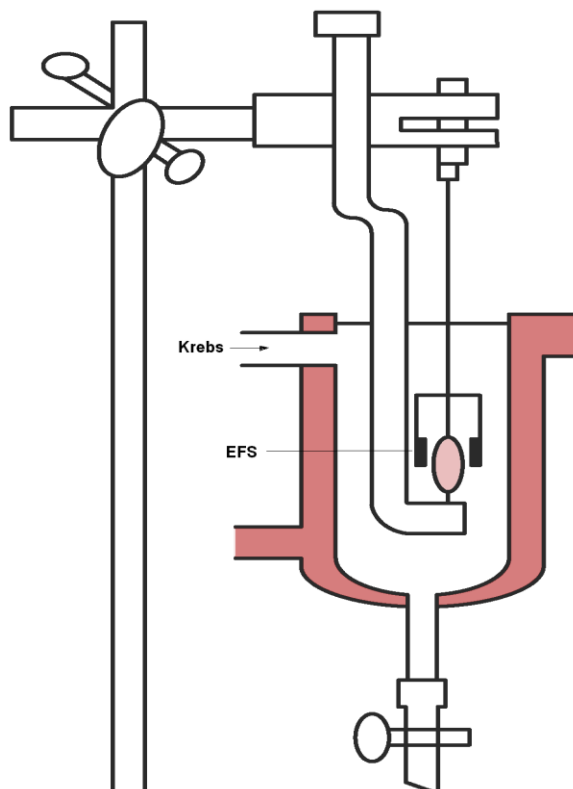
##### **3.2.1. Изолирани препарати за изследване на модуларни отговори**

От всяко животно е изолиран сегмент с дължина 22-25 mm, състоящ се от ректум и анален канал, с интактни нервни плексуси и гладкомускулни слоеве, без отстраняване на мукозата.

За проучване на модуларните отговори са изолирани следните ринг-препарати: анален канал (Sie; съдържащ ISA и EAS, с ширина 3-4 mm) или

вътрешния анален сфинктер и циркуларни гладкомускулни ринг-препарати с ширина 2 mm от дисталната (Cd; на 3-4 mm от аналния край на препарата), медиалната (Cm; на 10 mm от аналния край на препарата) и проксималната част на препарата (Cp; на 20 mm). Изолира се вътрешният анален сфинктер (IAS), представляващ пръстен от удебелена циркуларна мускулатура, около 2.0 mm, намиращ се директно под кожно-лигавичния слой в дисталния край на мускулния слой. Изолирани са и препарати с дебелина от 2-3 mm и дължина 18-20 mm по надлъжна посока на ректума, за изследване на контрактилния отговор на лонгитудиналната мускулатура (LM).

Препаратите, фиксирани в две противоположни точки, се монтират в органични вани с обем 10 ml, в постоянно оксигениран разтвор на Кребс с температура 36,5 °C (Фигура 3.1.). На всички препарати се прилага натоварване, равностойно на 10 mN чрез обтягане на тензосистемата [Ivancheva а. Radomirov, 2001]. За периода на адаптация от около 45 min разтворът на Кребс се сменя два пъти, а тонусът и спонтанната контрактилна активност на препаратите се стабилизират. Компютъризирана механографска on-line техника се използва за регистриране на моторната активност на изолираните препарати.



**Фигура 2.1.** Схема на органична вана за изследване на електрически-предизвикани моторни отговори

### **3.2.2. Електрическа полева стимулация на изолирани гладкомускулни препарати**

За предизвикване на възбуждане на нервните структури е използвана електрическа полева стимулация (EFS) [Paton a. Vizi, 1969]. Стимулацията е прилагана чрез два платинени електрода (с 0.45 mm дебелина), фиксирани на държач, един срещу друг, на разстояние 14 mm. Правоъгълни импулси с продължителност от 0.8 ms и електрическо напрежение от 40 V са прилагани с честота от 2, 5 и 10 Hz за 20 s през интервал не по-малък 5 min [Radomirov a. Venkova, 1988; Ivancheva a. Radomirov, 2001].

Електрически-предизвиканите моторни отговори на ринг-препаратите от циркуларна мускулатура от ректума, вътрешния анален сфинктер и аналния канал са описани като „модуларни моторни отговори“, дължащи се на възбуждане на локалните модули от нервната мрежа, лежащи в полето на електрическа стимулация.

### **3.3. Изследване на рефлексни отговори в цялостен аноректум**

#### **3.3.1. Изолиран цялостен аноректум**

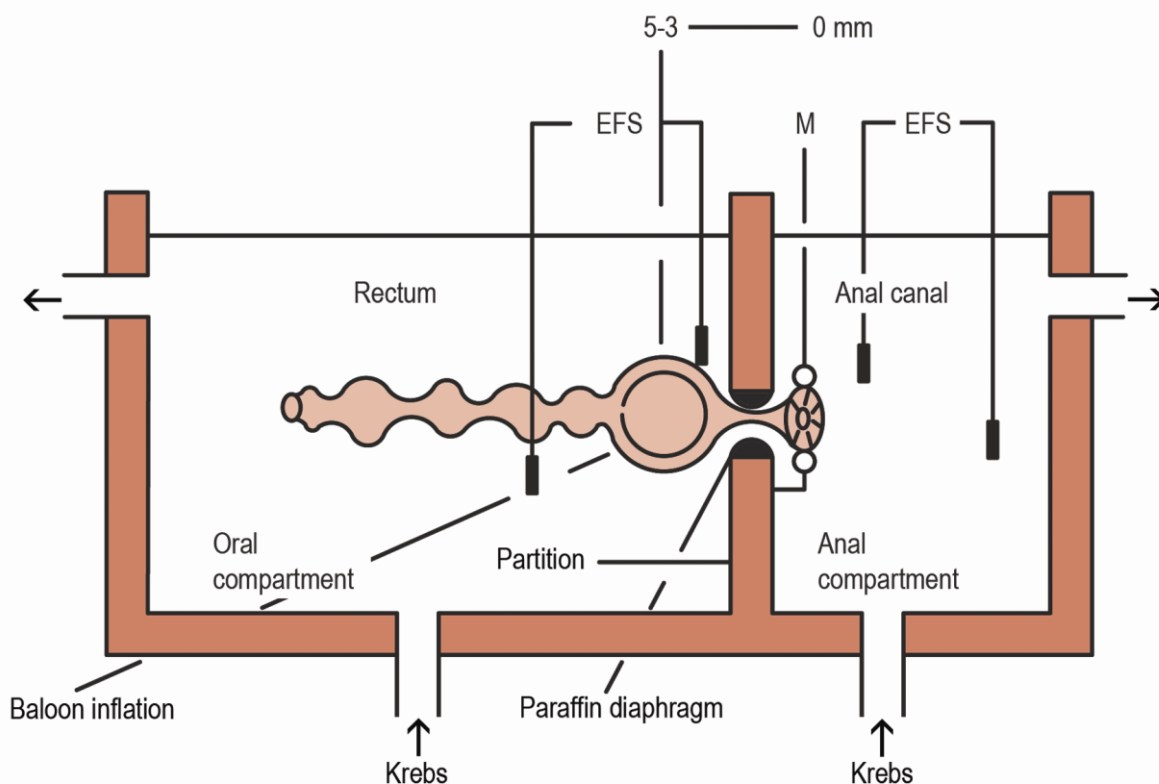
Цялостен препарат (аноректум), състоящ се от ректум и анален канал с интактни нервни плексуси, гладка мускулатура, без отстраняване на мукозата с дължина 21-25 mm се монтира в двукамерна органна вана [Brading et al., 2008]. Използван е и препарат с отстранен външен анален сфинктер и запазена анатомична цялостност на ректума и вътрешния анален сфинктер.

#### **3.3.2. Метод на двукамерна органна вана**

За изучаване на моторните рефлексни отговори на изолирания цялостен аноректум е използвана модификация на метода на многокамерна органна вана [Фигура 2.2.; Ivancheva et Radomirov, 2001].

Плоска органна вана с хоризонтално разположение се разделя на две части от преграда с цепка, която се запълва с парафинова диафрагма (Фиг. 3.2). Ваната се състои от орална и анална част, всяка с обем 10 ml и със система за независима доставка и оттичане на оскигениран разтвор на Кребс. Изолираният препарат внимателно се промушва през отвор в парафиновата диафрагма с диаметър от 2 mm. Ректумът (с дължина 12-15 mm) се поставя в оралната част на ваната, а дисталната област (анален канал с дължина 4-5

mm, или вътрешен анален сфинктер 3-4 mm) в аналната част. Инертна силиконова маз се поставя по циркумференцията на препарата в областта на парафиновата диафрагма, за да се избегне смесване на разтворите от двете вани [Radomirov et al., 2009]. Към тензодатчик се връзва конец, обхващащ надлъжно мускулно снопче, за да се измерва контарктилният отговор на лонгитудиналната мускулатура. Моторната активност на циркуларната мускулатура се регистрира чрез тензодатчик, свързан с конец обхващащ напречно мускулно снопче в проксималния край на препарата. Моторната активност на двата мускула се регистрира едновременно [Brading et al., 2008]. По същия начин се фиксират вътрешния анален сфинктер или аналния канал. Лонгитудиналните, циркуларните мускули, както и вътрешния сфинктер или аналния канал се натоварват с начален еквивалент от 10 mN.



**Фигура 2.2.** Схема на двукамерна органна вана за изследване на електрически- и балон-предизвикани моторни отговори в изолиран цялостен аноректум

### **3.3.3. Електрическа полева стимулация в цялостен аноректум**

За предизвикване на възбуждане на нервните структури в цялостен аноректум е използвана електрическа полева стимулация (EFS) [Paton et Vizi, 1969]. EFS е прилагана чрез два платинени електрода (с 0.45 mm дебелина), фиксирани на държач, един срещу друг на разстояние 14 mm (Фиг. 3.2).

Правоъгълни импулси с продължителност от 0.8 ms и електрическо напрежение от 40 V са прилагани с честота от 2 Hz, 5 Hz и 10 Hz за 20 s през интервал не по-малък 5 min [Radomirov et Venkova, 1988; Ivancheva et Radomirov, 2001]. Прилагането на EFS в оралната или аналната част на ваната предизвиква моторен отговор в съответния сегмент на аноректума, монтиран в същия раздел на ваната. Тези отговори са локални, предизвикани от стимулиране на нервните структури, лежащи в полето на електрическа стимулация. В същото време EFS провокира моторен отговор в нестимулираната част на препарата, в контралатералния отдел на ваната, извън полето на стимулация. При стимулация на оралната част на сегмента се наблюдава отговор на аналната част. Тези отговори са низходящи, дължащи се на разпространение на възбудането по дистално насочени ентерални пътища.

#### **3.3.4. Разтягане на стената на ректума чрез раздуване с балон**

Раздуването на дисталния ректум се постига чрез полиетиленов балон, завършващ с пластмасова тръбичка, свързана с микроспринцовка с обем 1 ml. Размерът на балона, напълнен с разтвор на Кребс имитира размера на фекална пелета (2.5-3.0 mm в диаметър). Празният балон се поставя внимателно в лумена на ректума, от проксималния край на препарата след периода на адаптация (Фиг. 3.2). Балонът се надува постепенно (обемно контролирано раздуване с 0.04-0.40 ml разтвор на Кребс с температура 36.5°C) за 30 s, на разстояние 5 mm от аналния канал [Radomirov et al., 2009].

Моторният отговор на аналния канал, предизвикан от разтягане на стената на дисталния ректум е описан като низходящ моторен отговор на аналния канал, който се дължи на разпространение на възбудането по дистално насочен ректо-анален рефлексен път.

#### **3.4. Техническо оборудване**

Моторните отговори са измервани чрез изометрични тензодатчици (Microtechna, Prague, Czech Republic), свързани със усилвател (Microtechna, Prague, Czech Republic) и се дигитализират чрез компютърна програма Силомер 4. Използван е стимулатор (Experimetria, Budapest, Hungary), 6-канално записващо устройство (Watanabe, Tokyo, Japan) и двуканално записващо устройство TZ 4620 (Laboratorni pristroje, Prague, Czech Republic).

### 3.5. Експериментален протокол

Изолираните препарати, след поставяне в органните вани и натоварване с 10 mN са оставяни да се адаптират за 45 min. Препаратите проявяват спонтанна активност, която се регистрира за период от 5 min. Електрически-предизвиканите или балон-предизвиканите моторни отговори са регистрирани преди и в присъствието на субстанции. Субстанциите са прилагани като разтвори, в обем не надвишаващ 0.5-1% от обема на органната вана. Контактното време (от прибавяне на разтвора, до регистриране на отговорите) за tetrodotoxin е 10 min, а за всички останали субстанции – 15 min. Когато субстанциите са прибавяни последователно (atropine плюс NG-nitro-L-arginine, или atropine плюс L-arginine и т.н.), времето на действие на субстанциите е 30 min [Radomirov et al., 2009a]. В табл. 2.1 са дадени използваните субстанции, фирмите-производители и концентрациите на използваните разтвори.

Таблица 2.1. Използвани субстанции при изследване на електрически-предизвиканите моторни отговори на изолирани препарати

	Субстанция	Фирма	Концентрация
1.	Atropine sulfate	Merck, Darmstadt, Germany	0.3 $\mu$ M ( $3 \times 10^{-7}$ M)
2.	Cibacron blue	Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA	0.01 mM ( $10^{-5}$ M)
3.	[D-Arg, D-trp, Leu]-Substance P (Spantide)	Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA	0.1 $\mu$ M ( $10^{-7}$ M)
4.	L-arginine	Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA	0.5 mM ( $5 \times 10^{-4}$ M)
5.	NG-nitro-L-arginine (L-NNA)	Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA	0.5 mM ( $5 \times 10^{-4}$ M)
6.	Prazosin hydrochloride	Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA	0.1 $\mu$ M ( $10^{-7}$ M)
7.	Propranolol hydrochloride	Merck, Darmstadt, Germany	0.1 $\mu$ M ( $10^{-7}$ M)
8.	Suramin sodium salt	Merck, Darmstadt, Germany	1.0 mM ( $10^{-3}$ M)
9.	Tetrodotoxin TTX	Sankyo, Zurich, Switzerland	0.1 $\mu$ M ( $10^{-7}$ M)

Съставът на разтвора на Кребс в mM е: NaCl 120, KCl 5.9, NaHCO<sub>3</sub> 15.4, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgCl<sub>2</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 2.5 и глюкоза 11.5. Разтворът се аерира постоянно с 95 % O<sub>2</sub> и 5 % CO<sub>2</sub> (pH 7.2) при 36.5 C°.

Субстанциите са разтваряни в дестилирана вода и разреждани с разтвор на Кребс до финалната концентрация преди употреба, с изключение на prazosin и NG-nitro-L-arginine (L-NNA). Prazosin hydrochloride до концентрация  $10^{-5}$  M е разтварян в двойно дестилирана вода и 96° етилов алкохол в съотношение 1:1, L-NNA, който е с умерена разтворимост във вода (50mg/ml) е разтварян в нагрята до 60°C бидестилирана вода. Основният разтвор на ТТХ е съхраняван при -20 °C.

Холинергичните въздействия са изследвани чрез прилагане на неселективния М-холинолитик atropine sulfate, нитрергичните – на донора на азотен оксид L-arginine и инхибитора на азотнооксидната синтаза NG-nitro-L-arginine, тахикининергичните – на блокера на NK1-рецепторите Spantide, а пуринаергичните – на блокера на P2Y-рецепторите Cibacron blue и неселективния P2-рецепторен антагонист Suramin sodium salt. Неадренергичните-нехолинергични (NANC) моторни отговори са изследвани на фона на М-холинолитика atropine sulfate, неселективния бета-блокатор propranolol hydrochloride и  $\alpha_1$ -селективния блокатор prazosin hydrochloride. Неврогенната или миогенна природа на моторните отговори е тествана чрез претретиране с тетродотоксин (ТТХ) – селективен блокатор на бързия натриев канал.

### **3.6. Имунохистохимични и хистохимично изследвания**

Наличието и локализацията на ACh-, SP-, ATP- и NO-съдържащи нервни структури в миентералния плексус в ректоаналната област на плъх са проучени чрез имунохистохимични методи за доказване на холинацетилтрансфераза (ChAT), SP и ATP-синтаза и хистохимичен метод – за NADPH-диафороза. Изследвания са извършени в лаборатория „Функционална невроанатомия” при Институт по невробиология, БАН.

Морфологичните експерименти са извършени върху 10 мъжки плъха, порода Wistar с тегло между 280-320 g. Животните под дълбока наркоза с thiopental (50 mg/kg, i.p.), са перфузирани транскардиално с 0.05 M PBS (фосфатно-буфериран разтвор на натриев хлорид) за 5 минути, последвано от фиксатора 4% параформалдехид в 0.1 M фосфатен буфер (pH 7.3) за 20 минути. Ректоаналната област е дисецирана и постфиксирана в същия фиксиращ разтвор за 24 h при 4°C. Ректумът и аналният канал са нарязани серийно на замразяващ микротом (Reichert Jung, Austria) на надлъжни тъканни срезове с дебелина 30  $\mu$ m и са разпределени в четири групи.

Имунохистохимичното оцветяване на първите три групи, за изследване на ChAT-, SP- и ATP-синтазна реактивност, е извършено върху свободно-плуващи срезове по ABC (avidin-biotin-horseradish peroxidase) метода [Hsu et al., 1981], а хистохимичното – за доказване на NADPH-диафораза по метода на Scherger-Singler et al., 1983. Препаратите за имунохистохимично изследване са улавяни и промивани трикратно с PBS/0.5% Triton X-100. Ендогенната пероксидаза е блокирана с 1.2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в абсолютен метанол за 30 min, след което препаратите са инкубирани в 5% нормален кози серум за 30 min с цел редуциране на неспецифичното фоново оцветяване.

#### *Имунохистохимично изследване*

След трикратно промиване с PBS/0.5% Triton X-100, препаратите за позитивиране на ChAT имунореактивност са инкубирани за 24 h в първичен антисерум – поликлонално ChAT антитяло, произведено в заек, в разреждане 1:200; за изследване на SP – в заешки поликлонални SP антитела в работно разреждане 1:6000; а тези за изследване на ATP-синтазна активност – в миши моноклонални антитела в разреждане 1:10000. Второто антитяло, използвано за първите две групи срезове е кози анти-заешки биотинилиран IgG в работно разреждане 1:250 за 90 min, а третата – с вторичен кози анти-миши IgG (Biotin) в концентрация 1:250. Срезове са инкубирани с вторичните антитела за 90 min на стайна температура, след което препаратите са третирани на стайна температура за 120 min с ABC complex (62.6 ml A + 62.6 ml B/10 ml 0.01M PBS) приготвен 30 min преди употреба.

Проявяване на пероксидазната активност е извършено с никел-интензифициран с 3,3'-DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Контролните реакции са проведени върху срезове, инкубирани без първично антитяло, или с PBS и резултатите са отрицателни и в двата случая.

#### *Хистохимично изследване за NADPH-диафораза*

Редуцираната нукотинамид аденин динуклеотид фосфат-диафораза (NADPH-d) и Ca<sup>2+</sup>/калмодулин-зависимият ензим NOS участват в образуването на NO чрез превръщането на L-arginine в цитролин. В тази реакция NADPH е ко-субстрат. Така че, NOS-съдържащите структури могат морфологично да се визуализират чрез хистохимична техника за оцветяване на NADPH-d.

Препаратите за изследване на NADPH-диафораза са промивани за 30 min в 0.1 M Tris-HCl буфер с pH 7.4 и 0.8% Triton X-100, след което са инкубирани за 120 min при температура 37°C в 10 ml 0.1 M Tris-HCl буфер с pH 7.4, съдържащ

4 mg редуциран  $\beta$ -NADP и 10 mg nitroblue tetrazolium. Контролните препарати са инкубирани без субстрат или електронен акцептор, при което не се визуализира диафоразната реакция.

В табл. 2.2 са дадени използваните субстанции, фирмите-производители и концентрациите на използваните разтвори за хистохимичната и имунохистохимичните процедури.

**Таблица 2.2.** Използвани субстанции при имунохистохимичните и хистохимичната процедури.

	Субстанция	Фирма	Концентрация
1.	Фосфатен буфер /физиологичен разтвор (PBS)	Fluka AGBuch, Switzerland	5x10 <sup>-5</sup> M с pH 7.3 10 <sup>-4</sup> M с pH 7.3
2.	Tris-HCl буфер 56	Fluka AGBuch, Switzerland	50 mM с pH 7.4 и 7.56
3.	Triton X-100	Fluka AGBuch, Switzerland	0.5% и 0.8%
4.	Hydrogen peroxyde	Fluka AGBuch, Switzerland	1.2 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> p-p в абсолютен метанол
5.	Paraformaldehyde	Merck, Darmstadt, Germany	4% p-p в 0.1 M фосфатен буфер
6.	EntellanMethanol	Merck, Darmstadt, Germany	
7.	Normagoat serum	Sigma Chemicals, StLouis, MO, USA	5% p-p
8.	Reduced $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ( $\beta$ -NADPH)	Sigma Chemicals, StLouis, MO, USA	4 mg/10 ml 0.1 M Tris-HCl буфер
9.	Nitroblue tetrazolium chloride (NBt)	Sigma Chemicals, StLouis, MO, USA	10 ml /10 ml 0.1 M Tris-HCl буфер с pH 7.4
10.	3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (3,3'-DAB)	Sigma Chemicals, StLouis, MO, USA	15 mg DAB/30 ml 0.05 M Tris/HCl, pH 7.54; преинкубация с 10 ml 20 ml DAB + 200 $\mu$ l 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; проявяване от 2 до 10 min
11.	Rabbit polyclonal anti-choline acetyltransferase antibody	Chemicon Inc., BillericaMA, USA	Разреждане 1:200
12.	Goat anti-rabbit IgG-Biotin	Chemicon Inc., BillericaMA, USA	Разреждане 1:250
13.	Rabbit polyclonal anti-substance P	Abcam, Cambridge, UK	Разреждане 1:6000
14.	ATP Synthase, beta Mouse anti-rat monoclonal Antibody	Vector Laboratories Inc.Burlingame, USA	Разреждане 1:10000
15.	Mouse IgG Goat anti-Mouse Polyclonal (Biotin) Antibody	Vector Laboratories Inc.Burlingame, USA	Разреждане 1:250
16.	Avidin-botin complex (Vectastain ABC kit)	Vector Laboratories Inc.Burlingame, USA	(62.6 ml A + 62.6 ml B/10 ml 0.01M PBS)

След края на реакциите срезове се промивани в PBS, монтирани върху хром-желатинирани предметни стъкла, изсушени на въздух за 24 h, дехидрирани чрез възходяща редица алкохоли, просветлени с ксилол покривани с покривни стъкла с Entellan.

За микроскопските изследвания е използвано следното оборудване: светлинен микроскоп Jenaval (Germany) и светлинен микроскоп Nikon и дигитална камера Cool pix 4.500, Nikon (Japan). Фотодокументацията е съхранена в TIF формат и оптимизирана за контраст и яркост със софтуерна програма Adobe PhotoShop CS3.

### **3.7. Статистически методи**

Данните са представени в таблици и графики. Установеното след 45-минутна адаптация ниво на тонуса се приема за изходна точка или ниво за измерване на амплитудата на моторните отговори. Амплитудите на моторните отговори са представена в милиньютони (milliNewton, mN). Newton е мярка за сила по International System of Units (SI units). Един mN е равен на 0.101971621298 g. Тестове на Kolmogorov-Smirnov и Shapiro-Wilk са използвани за проверка на нормалността на разпределение на изследваните променливи. Амплитудите на регистрираните моторни отговори са съпоставяни чрез параметрични тестове за проверка на хипотези при две независими извадки – Student *t*-теста, а еднофакторен ANOVA, *post hoc* LSD (least significant difference procedure), Bonferroni и Duncan са използвани за сравняване на амплитудите на моторните отговори между повече от две групи данни. Данните са представени като средни стойности и стандартна грешка ( $m \pm SEM$ ); статистическа значима разлика между групите се приема при  $p < 0.05$ ;  $n$  е броят на изследваните препарати. Статистическата обработка на данните е извършена със статистически програми STATGRAPHICS Plus 4.1 for Windows, SPSS 14 (Statistical Package for the Social Sciences) и Excel (Office 2007). За прецизно представяне на механографските записи и пресмятане на данни в графичен вид е използван програмен продукт Origin 7.5 Pro.

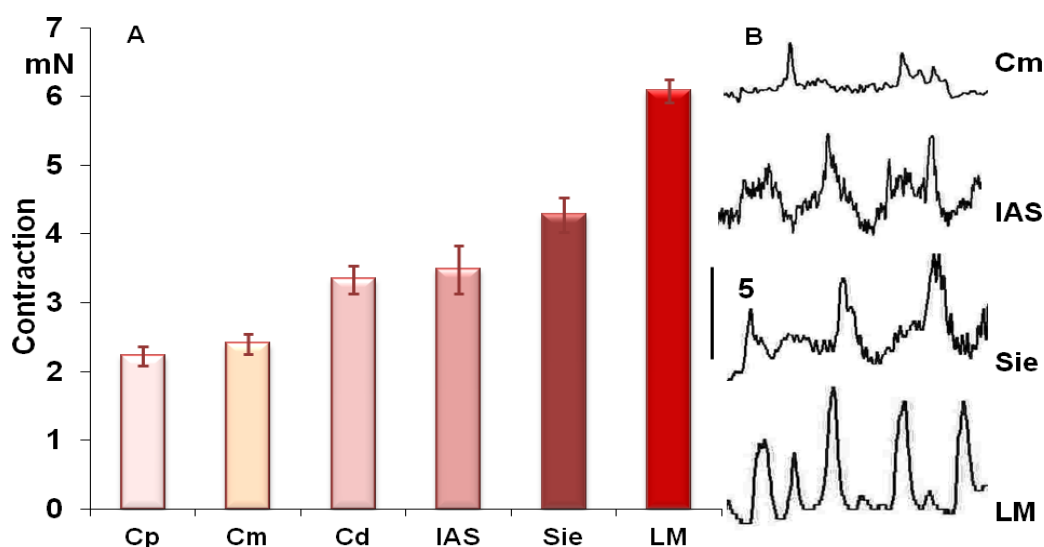
## ГЛАВА III. РЕЗУЛТАТИ ОТ ПРОУЧВАНЕТО

При представяне и интерпретиране на получените резултати са използвани следните означения: СМ – циркуларна мускулатура; Ср – ринг-препарат от циркуларна мускулатура от проксимален ректум; Ст – ринг-препарат от циркуларна мускулатура от медиален ректум; Сd – ринг-препарат от циркуларна мускулатура от дистален ректум; IAS – вътрешен анален сфинктер; EAS – външен анален сфинктер; Sie – анален канал; LM – ивица лонгитудинална мускулатура.

### 1. Модуларни моторни отговори

#### 1.1. Спонтанна моторна активност

През периода на адаптация се наблюдава развитие на спонтанна двигателна активност в изолираните гладкомускулни ринг-препарати от ректум, анален канал и вътрешен анален сфинктер.



**Фигура 3.1.** Спонтанна двигателна активност на изолирани препарати от ректоанална област. А – хистограми на амплитудите на фазичните съкращения; В – типични механографски записи. Амплитудите са представени като средна стойност $\pm$ SEM от най-малко 12 препарата. Post hoc ANOVA LSD тестът показва статистически достоверни разлики между амплитудите на фазичните съкращения с изключение на Ср към Ст и Cd към IAS ( $p < 0.05$ ).

Неритмични по честота и различни по амплитуда съкращения характеризират спонтанната моторна активност на циркуларните ринг-препарати, изолирани от ректум: високочестотни съкращения с малка амплитуда и насложени съкращения с ниска честота и висока амплитуда.

Препаратите от вътрешен анален сфинктер развиват устойчив спонтанен тонус с насложени фазични съкращения.

Амплитудата на фазичните контракции нараства в анална посока: Ср –  $2.23 \pm 0.15$  mN (n=18); Cm –  $2.40 \pm 0.15$  mN (n=14); Cd –  $3.34 \pm 0.21$  mN (n=16); IAS –  $3.43 \pm 0.35$  mN (n=12) и Sie –  $4.28 \pm 0.25$  mN (n=13). Най-висока е в изолирания препарат от анален канал в сравнение с другите препарати от циркуларна мускулатура от различните участъци на ректума ( $p < 0.05$ ; табл. 3.1 и фиг. 3.1). Амплитудата на фазичните съкращения на ивиците от лонгитудиналната мускулатура е най-висока (LM  $6.08 \pm 0.17$  mN; n=19) в сравнение с всички ринг-препарати, съдържащи циркуларна мускулатура ( $p < 0.05$ ).

Не е наблюдавана релаксация в спонтанната двигателна активност във всички изолирани препарати. В присъствие на TTX, в концентрация  $0.1 \mu\text{M}$  за 10 min не се регистрира намаление на спонтанно развилия се мускулен тонус. Изолираните препарати от аноректум не показват значителна промяна в тонуса за период по-дълъг от 120 min.

## **1.2. Електрически-предизвикани модуларни моторни отговори**

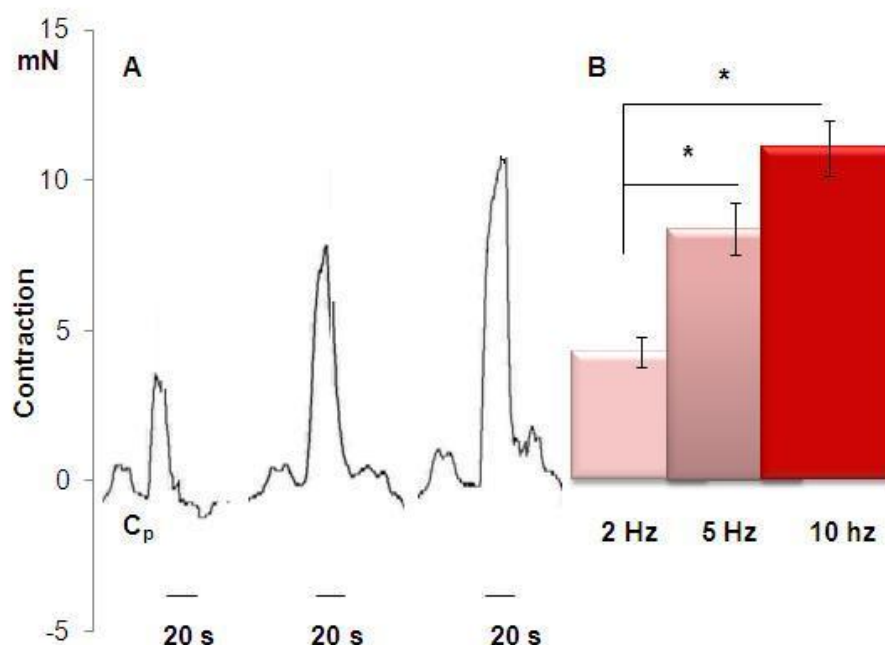
Електрическа полева стимулация (EFS, 0.8 ms, 40 V, 20 s) приложена с различна честота (2, 5 и 10 Hz) върху изолираните ринг-препарати от различни области на ректума предизвиква моторни отговори, характеризиращи се с бързоразвиващи се тип „пик” съкращения.

EFS предизвиква подобни по характер съкратителни отговори в ринг-препаратите от циркуларна мускулатура от проксимален ректум, като амплитудите на отговорите се увеличават с повишаването на честотата на електрическите стимули. Амплитудите на моторните отговори на Ср при честота на стимулацията 2 Hz ( $4.28 \pm 0.49$  mN) са статистически значимо по-ниски от тази при 5 Hz ( $8.38 \pm 0.23$  mN) и 10 Hz ( $10.33 \pm 0.91$  mN; n=18;  $p < 0.05$ ) (фиг. 3.2 и табл. 3.1).

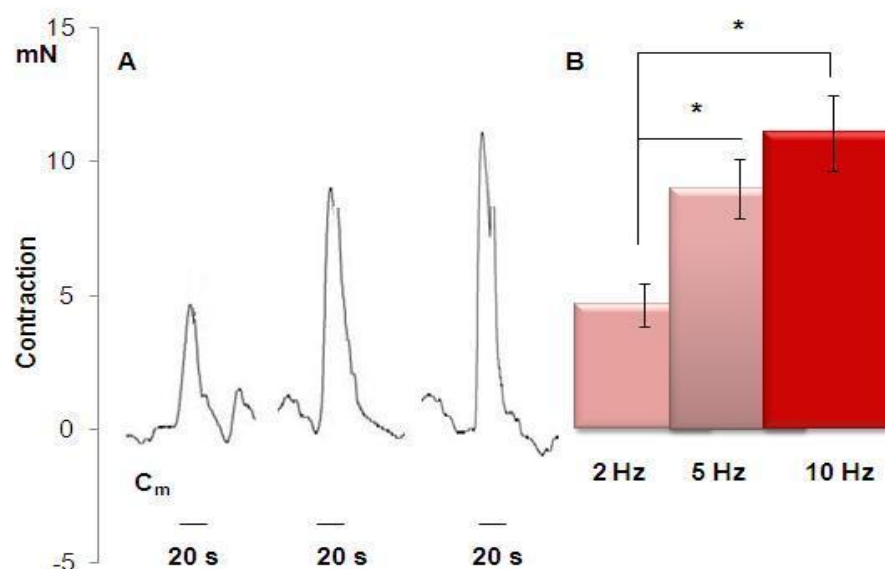
Отговорите на циркуларна мускулатура, изолирана от медиалния ректум, са тип „пик” съкращения, продължаващи през периода на стимулация, като амплитудата им нараства пропорционално с повишаване на честотата на електрическите стимули, със статистически значима разлика между 2 и 5 Hz и между 2 и 10 Hz (фиг. 3.3 и табл. 3.1).

Амплитудите на електрически предизвиканите еднотипни контрактилни отговори на циркуларните гладкомускулни ринг-препарати от дистален ректум са честотно-зависими, със статистически достоверни разлики между тези при 2

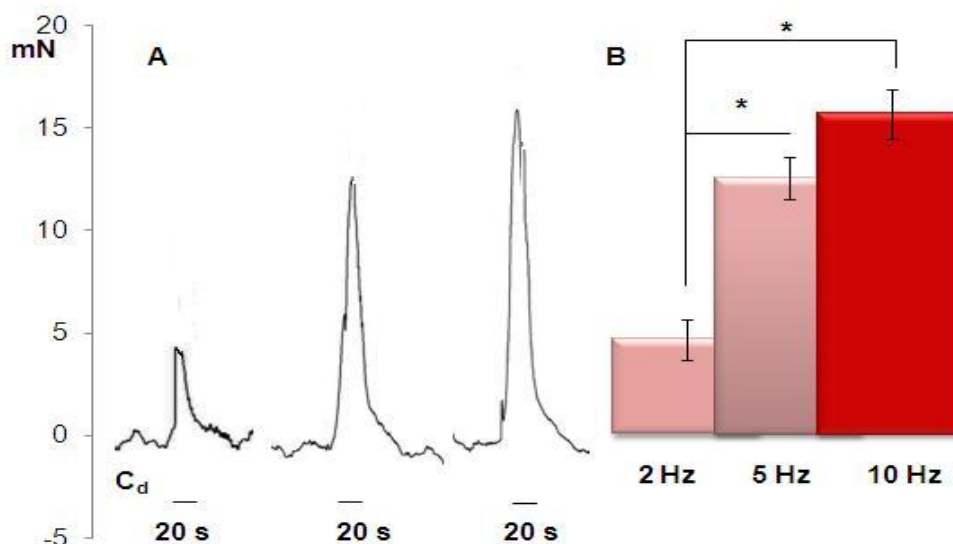
Hz и 5 Hz (съответно  $4.85 \pm 0.48$  mN и  $12.55 \pm 0.66$  mN;  $n=16$ ;  $p<0.05$ ) и 2 Hz и 10 Hz (съответно  $4.85 \pm 0.48$  mN и  $15.27 \pm 1.22$  mN;  $p<0.05$ ) (фиг. 3.4 и табл. 3.1).



**Фигура 3.2.** Типични механографски записи (A) и хистограми (B), показващи електрически-предизвиканите (0.8 ms, 40 V, 20 s, 2, 5 и 10 Hz) моторни отговори на ринг-препарати от проксимална част на ректум (Cp). Амплитудите са представени като средна стойност $\pm$ SEM от 18 препаратата. (\*) показва статистически значима разлика в регистрираните амплитуди ( $p<0.05$ )



**Фигура 3.3.** Типични механографски записи (A) и хистограми (B), показващи електрически-предизвиканите (0.8 ms, 40 V, 20 s, 2, 5 и 10 Hz) моторни отговори на на ринг-препарати от медиална част на ректум (Cm). Амплитудите са представени като средна стойност $\pm$ SEM от 14 препаратата. (\*) показва статистически значима разлика в регистрираните амплитуди ( $p<0.05$ ).



**Фигура 3.4.** Типични механографски записи (A) и хистограми (B), показващи електрически-предизвиканите (0.8 ms, 40 V, 20 s, 2, 5 и 10 Hz) моторни отговори на на ринг-препарати от дистална част на ректум (Cd). Амплитудите са представени като средна стойност±SEM от 16 препаратата. (\*) показва статистически значима разлика в регистрираните амплитуди ( $p < 0.05$ )

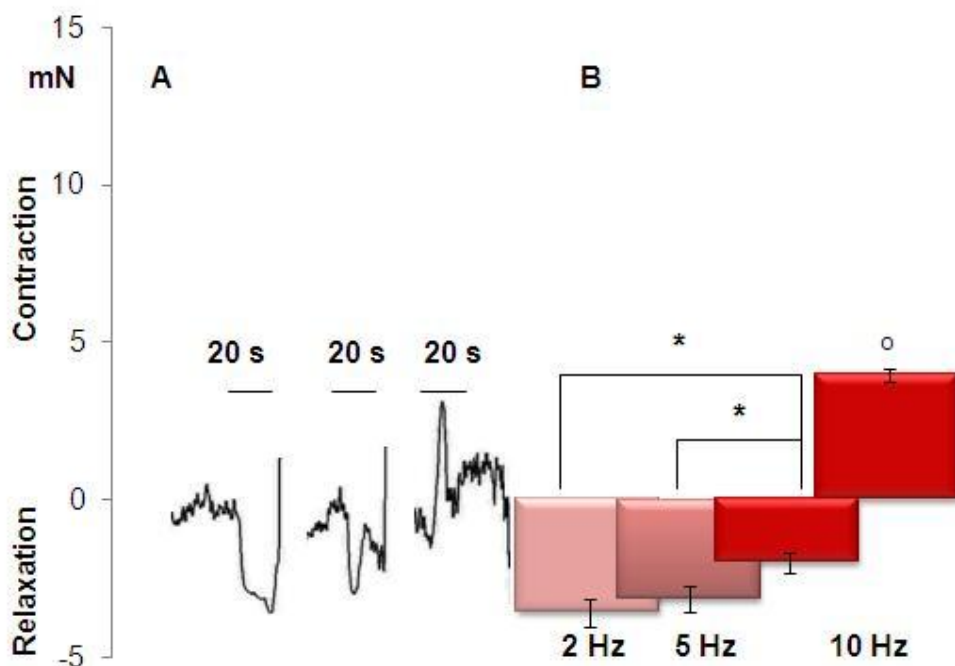
Моторните отговори на вътрешния анален сфинктер се различават по структура при прилагане на електрическа стимулация с различна честота. При EFS с честота 2 Hz IAS реагира с дълбока релаксация, с амплитуда  $-3.57 \pm 0.43$  mN;  $n=12$ , продължаващи през целия период на стимулация. Моторният отговор на IAS, предизвикан от EFS с честота 5 Hz е кратка релаксация, която намалява по време на прилагането на електрическите стимули. При честота на EFS 10 Hz отговорът на IAS е двуфазен: релаксацията е по-кратка и нискоамплитудна ( $-2.00 \pm 0.31$  mN), последвана от съкращение с амплитуда  $3.95 \pm 0.28$  mN. Статистическият анализ показва статистически значима разлика в амплитудите на EFS-предизвиканата релаксация както между 2 Hz и 10 Hz, така и между 5 Hz и 10 Hz ( $n=12$ ;  $p < 0.05$ ) (фиг. 3.5 и табл. 3.1).

Модуларните съкращения на аналния канал, състоящ се от вътрешен (гладкомускулен) и външен (напречнообразен) анален сфинктери са подобни по характер. Средните амплитуди се увеличават с нарастване на честотата на електрическите стимули на 5 и 10 Hz, като стойностите им значително надвишават стойностите, предизвикани от 2-Hz електрическа стимулация ( $4.64 \pm 0.51/2$  Hz;  $7.84 \pm 0.78/5$  Hz;  $9.27 \pm 0.93/10$  Hz;  $n=13$ ;  $p < 0.05$ ) (фиг. 3.6 и табл. 3.1). Съкратителните отговори на препаратите от анален канал продължават краткотрайно след края на стимулацията.

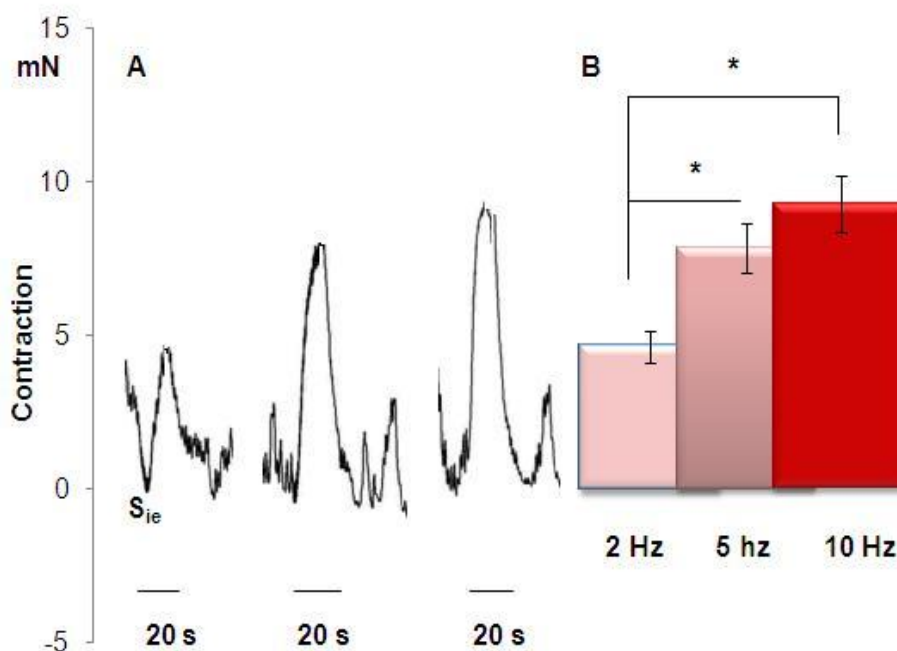
**Таблица 3.1.** Модуларни моторни отговори – амплитуди на спонтанните съкращения и електрически-предизвиканите моторни отговори в изолирани гладкомускулни ринг-препарати от ректум и анални сфинктери

препарат	n	спонтанна активност	2 Hz		5 Hz		10 Hz		Статистически показатели
			релаксация	съкращение	релаксация	съкращение	релаксация	съкращение	
<b>Ср</b>	18	M 2.225 SD 0.508 SE 0.146		M 4.279 SD 1.607 SE 0.490		M 8.380 SD 0.660 SE 0.248		M 10.33 SD 3.500 SE 0.906	t -4,112; p 0,002 (2 vs.5 Hz) t -5,866; p 0,00001 (2 vs. 10Hz) t -1,553; p 0,129 (5 vs. 10 Hz)
<b>См</b>	14	M 2.400 SD 0.534 SE 0.154		M 4.349 SD 2.490 SE 0.750		M 8.878 SD 0.970 SE 0.370		M 11.803 SD 4.449 SE 1.816	t -3,343; p 0,0007 (2 vs.5 Hz) t -3,439; p 0,0025 (2 vs. 10Hz) t -1,137; p 0,267 (5 vs. 10 Hz)
<b>Cd</b>	16	M 3.340 SD 0.750 SE 0.210		M 4.853 SD 1.362 SE 0.481		M 12.55 SD 1.470 SE 0.660		M 15.274 SD 3.400 SE 1.220	t -2,589; p 0,016 (2 vs.5 Hz) t -3,107; p 0,004 (2 vs. 10Hz) t -0,706; p 0,486 (5 vs. 10 Hz)
<b>IAS</b>	12	M 3.425 SD 1.210 SE 0.351	M -3.570 SD 1.290 SE 0.430		M -3,130 SD 1,250 SE 0,410		M -2.00 SD 0.930 SE 0.310	M 3.950 SD 0.750 SE 0.280	t -7,23; p 0,48 (2 vs. 5 Hz) t -2,824; p 0,012 (2 vs. 10 Hz) t -2,18; p 0,044 (5 vs. 10 Hz)
<b>Sie</b>	13	M 4.280 SD 0.883 SE 0.254		M 4.640 SD 1.691 SE 0.509		M 7.840 SD 3.150 SE 0.780		M 9.270 SD 1.830 SE 0.932	t -3,412; p 0,0027 (2 vs.5 Hz) t -4,209; p 0,0004 (2 vs. 10Hz) t -1,139; p 0,3207 (5 vs. 10 Hz)

Означения: Ср – циркуларен пръстен от проксимален ректум; См – циркуларен пръстен от медиален ректум; Cd – циркуларен пръстен от дистален ректум; IAS – вътрешен анален сфинктер; Sie – анален канал (препарат, съдържащ вътрешен и външен анален сфинктер). Стойностите на амплитудите са изрезени в mN.



**Фигура 3.5.** Типични механографски записи (A) и хистограми (B), показващи електрически-предизвиканите (0.8 ms, 40 V, 20 s, 2, 5 и 10 Hz) моторни отговори на вътрешен анален сфинктер (IAS). Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от 12 препаратата. (\*) показва статистически значима разлика в регистрираните амплитуди ( $p < 0.05$ ); (o) обратен отговор.

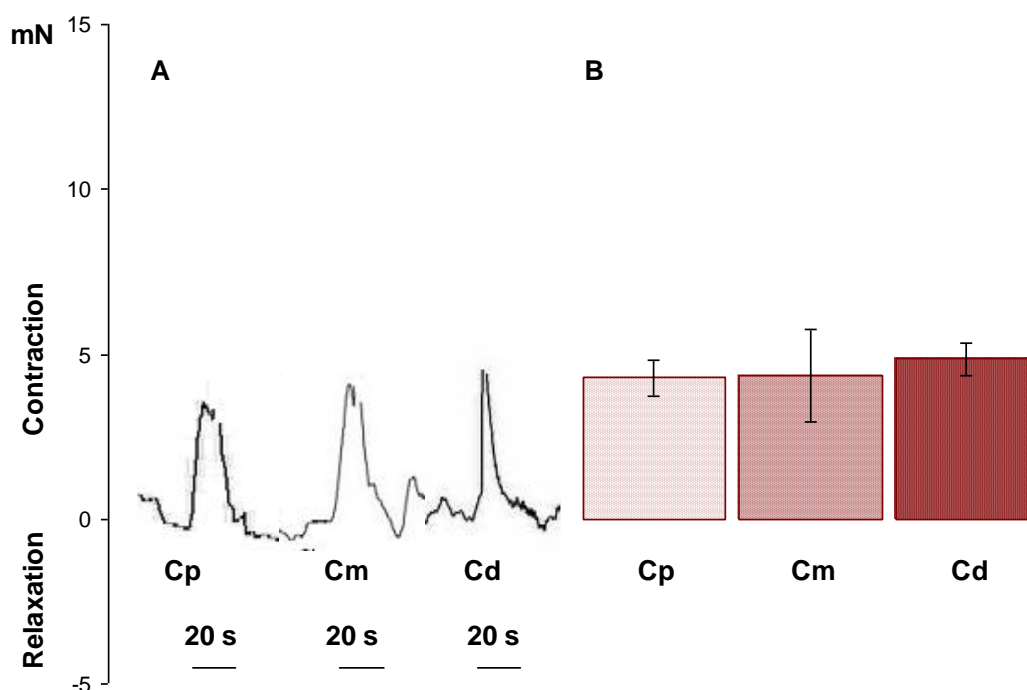


**Фигура 3.6.** Типични механографски записи (A) и хистограми (B), показващи електрически-предизвиканите (0.8 ms, 40 V, 20 s, 2, 5 и 10 Hz) моторни отговори на анален канал (Sie). Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от 13 препаратата. (\*) показва статистически значима разлика в регистрираните амплитуди ( $p < 0.05$ )

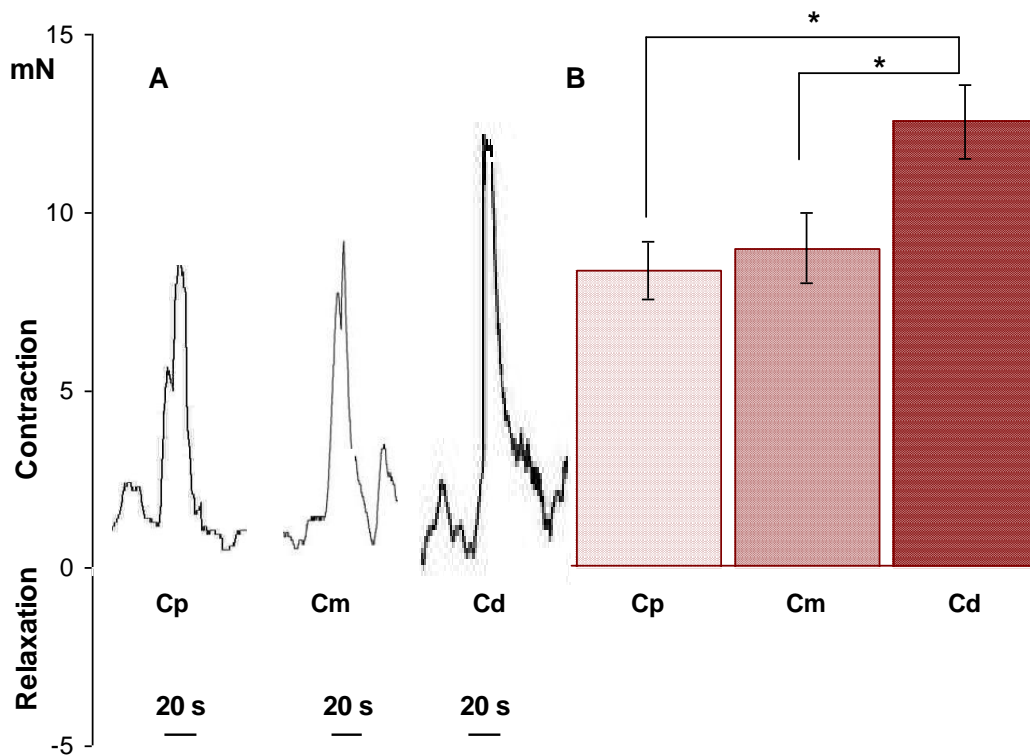
### 1.3. Модуларни моторни отговори на изолирани ринг-препарати в зависимост от локализацията им по дължината на аноректума

Съкращенията на циркуларните ринг-препарати, изолирани от различни части на ректума се увеличават по амплитуда в анална посока.

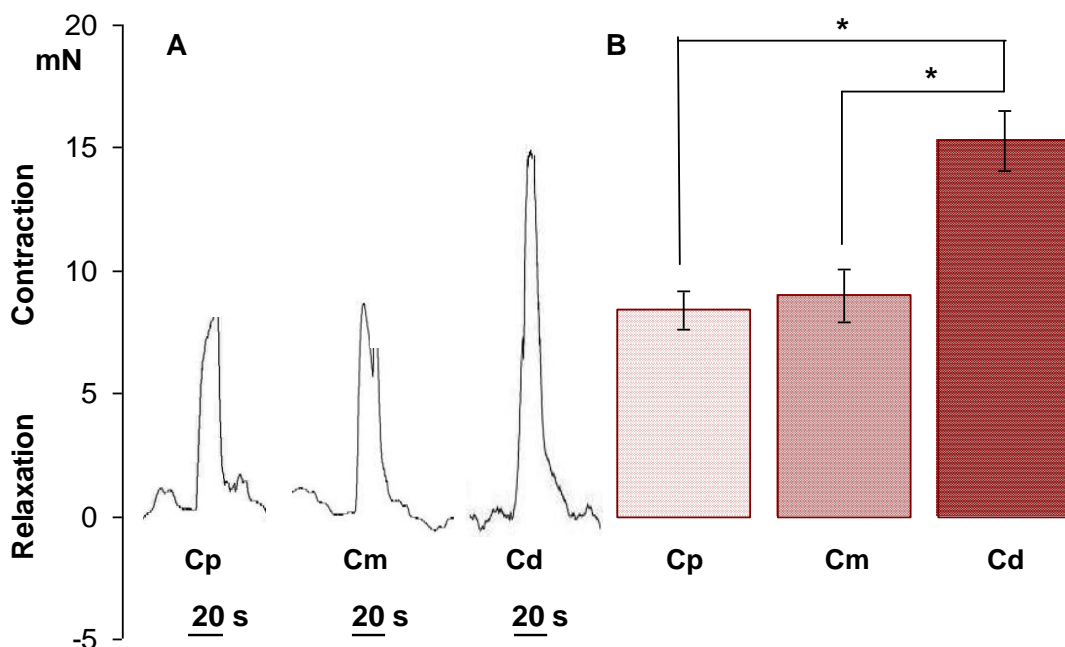
Най-слаб съкратителен отговор се наблюдава в циркуларни гладкомускулни препарати от проксимален ректум (фиг. 3.7; 3.8 и 3.9). Пръстените от циркуларна гладка мускулатура, изолирани от дисталния ректум отговарят на електрическата стимулация с по-висока амплитуда на съкращенията, в сравнение с препаратите, изолирани от проксимален и медиален ректум. Пиковите амплитуди на контрактилните отговори на ринговете циркуларна мускулатура се различават статистически достоверно при EFS с честота от 5 Hz и 10 Hz. Амплитудите на отговорите на Cd към стимули с честота 5 Hz са с 47,37% по-високи от тези на Cp ( $n=18$ ,  $p<0.05$ ) (Фиг. 3.8), а с честота 10 Hz с 48.40% ( $n=18$ ,  $p<0.05$ ), респективно (фиг. 3.9).



**Фигура 3.7.** Типични механографски записи (A) и хистограми (B), показващи електрически-предизвиканите (0.8 ms, 40 V, 20 s, 2 Hz) моторни отговори на на ринг-препарати, изолирани от проксимална (Cp), медиална (Cm) и дистална (Cd) част на ректум. Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 14 препаратата.



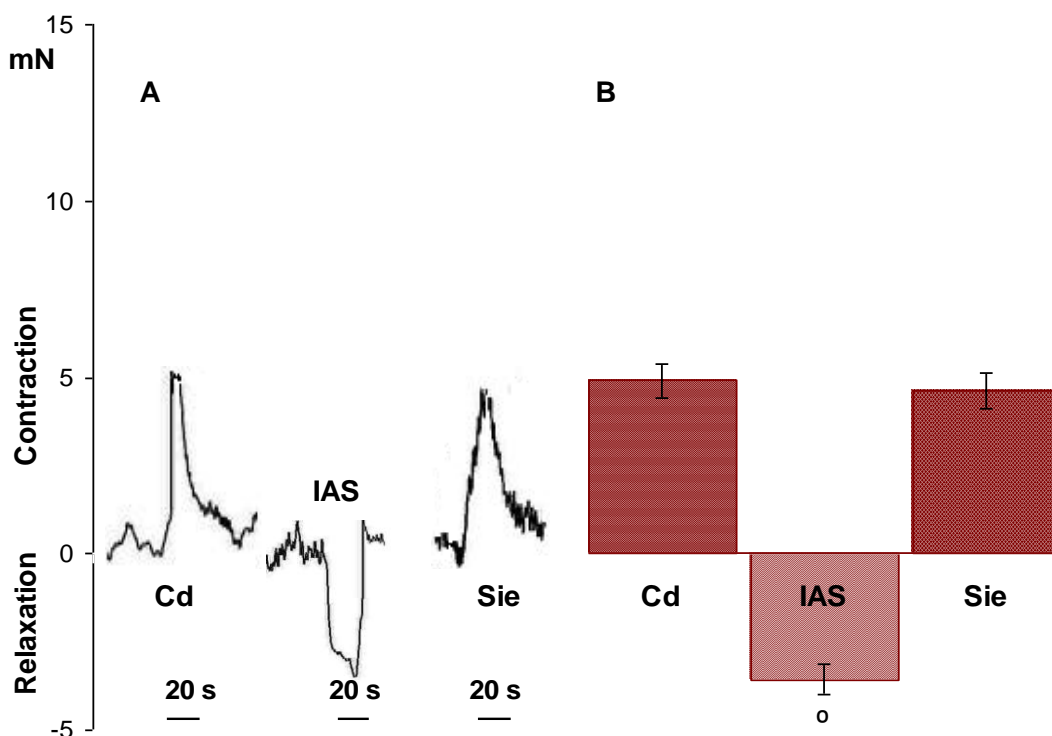
**Фигура 3.8.** Типични механографски записи (A) и хистограми (B), показващи електрически-предизвиканите (0.8 ms, 40 V, 20 s, **5 Hz**) моторни отговори на на ринг-препарати, изолирани от проксимална ( $C_p$ ), медиална ( $C_m$ ) и дистална ( $C_d$ ) част на ректум. Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 14 препаратата. Символът (\*) показва статистически значима разлика в регистрираните амплитуди ( $p < 0.05$ )



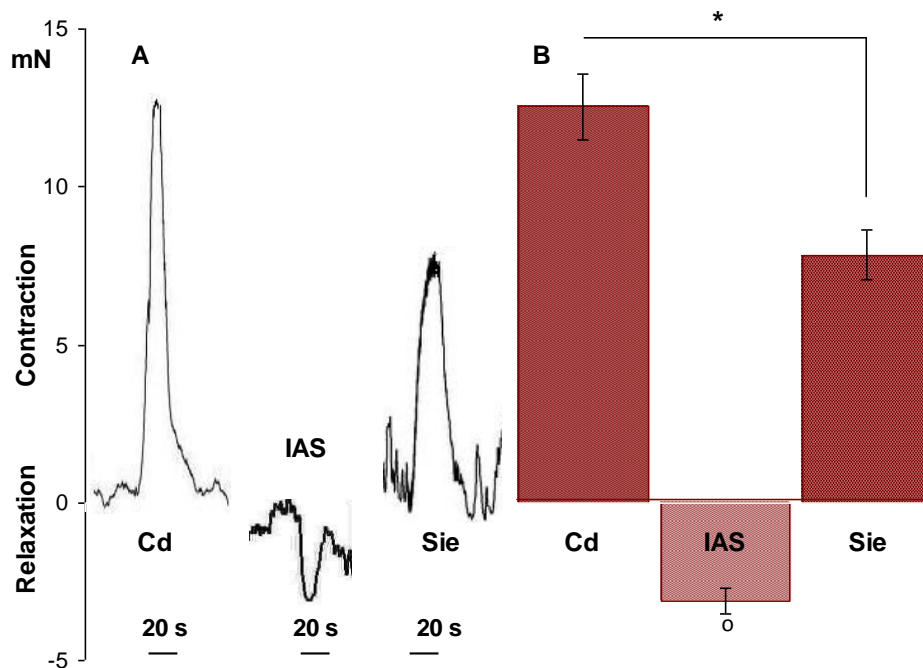
**Фигура 3.9.** Типични механографски записи (A) и хистограми (B), показващи електрически-предизвиканите (0.8 ms, 40 V, 20 s, **10 Hz**) моторни отговори на на ринг-препарати, изолирани от проксимална ( $C_p$ ), медиална ( $C_m$ ) и дистална ( $C_d$ ) част на ректум. Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 14 препаратата. Символът (\*) показва статистически значима разлика в регистрираните амплитуди ( $p < 0.05$ )

EFS, приложена с честота от 2 Hz предизвиква бързи контрактилни отговори в Cd и Sie и релаксация на IAS, продължаваща през целия период на стимулация (20 s) (Фиг. 3.10). Контрактилните отговори на Cd и Sie при електрически стимули с честота 2 Hz са близки по амплитуда  $4.85 \pm 0.48$  mN ( $n=13$ ) и  $4.64 \pm 0.51$  mN ( $n=16$ ,  $p>0.05$ ) респективно, въпреки, че контракциите на ректалните мускулни пръстени са по-изразени (фиг. 3.10).

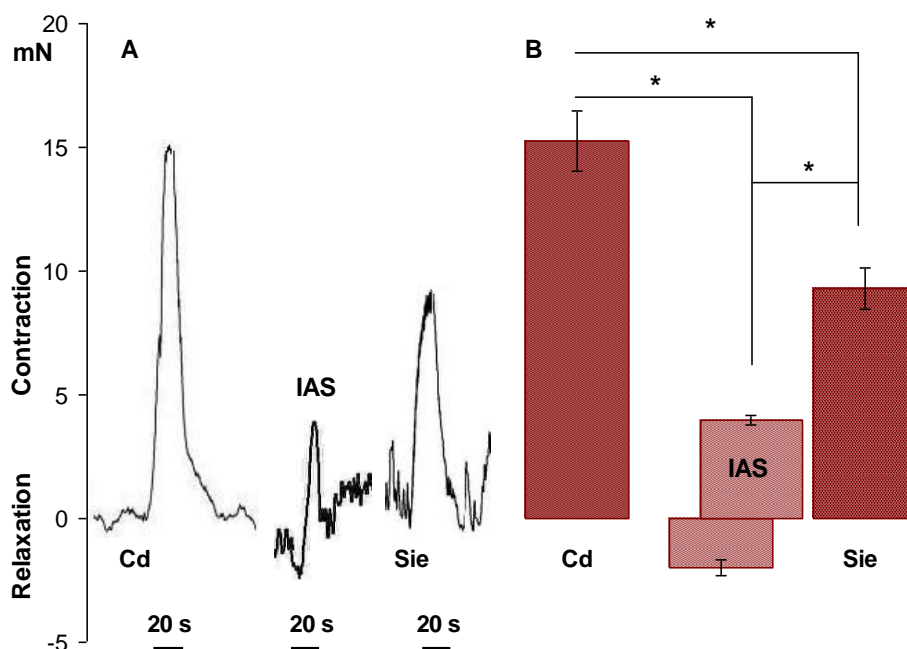
Модуларните съкращения на циркуларната мускулатура от Cd и Sie канал се увеличават при EFS с честота 5 и 10 Hz (фиг. 3.11 и 3.12), като амплитудите значително надишават тези при 2 Hz електрическа стимулация. Контрактилните отговори на циркуларната мускулатура от дистален ректум са значимо по-изразени от тези на аналния канал, като разликата е по-голяма при електрически стимули с честота 10 Hz, с 64.72% ( $p<0.05$ ) (фиг. 3.11 и 3.12). Модуларните моторни отговори на IAS към EFS, приложена с честота 5 и 10 Hz се различават по структура. Релаксацията не продължава през целия период на стимулация с 5 Hz (фиг. 3.11) и е по-слабо изразена в сравнение с тази при EFS с честота 2 Hz EFS.



**Фигура 3.10.** Типични механографски записи (A) и хистограми (B), показващи електрически-предизвиканите (0.8 ms, 40 V, 20 s, 2 Hz) моторни отговори на на ринг-препарати от дистале ректум (Cd), вътрешен анален сфинктер (IAS) и анален канал (Sie). Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 12 препарата. Символът(o) показва обратен отговор



**Фигура 3.11.** Типични механографски записи (A) и хистограми (B), показващи електрически-предизвиканите (0.8 ms, 40 V, 20 s, 5 Hz) моторни отговори на на ринг-препарати, изолирани от дистална част на ректума (Cd), вътрешен анален сфинктер (IAS) и анален канал (Sie). Амплитудите са представени като средна стойност $\pm$ SEM от най-малко 12 препарата. Символите показват (\*)статистически значима разлика в регистрираните амплитуди спрямо Cd ( $p<0.05$ ); o обратен моторен отговор



**Фигура 3.12.** Типични механографски записи (A) и хистограми (B), показващи електрически-предизвиканите (0.8 ms, 40 V, 20 s, 10 Hz) моторни отговори на на ринг-препарати, изолирани от дистална част на ректума (Cd), вътрешен анален сфинктер (IAS) и анален канал (Sie). Амплитудите са представени като средна стойност $\pm$ SEM от най-малко 12 препарата. (\*) показва статистически значима разлика в регистрираните амплитуди спрямо Cd ( $p<0.05$ ).

Електрическите стимули с честота от 10 Hz предизвикват модуларни моторни отговори на IAS, състоящи се от начална релаксация и последващо съкращение с максимална амплитуда  $3.95 \pm 0.28$  mN ( $n=12$ ) (фиг. 3.12). Контрактилният отговор на IAS е достоверно по-слаб от тези на циркуларния пръстен от Cd и Sie и това е единственият препарат, който отговаря с релаксация при електрическа стимулация.

Не е наблюдавана релаксация при циркуларните мускулни пръстени от проксималната, медиалната, дисталната част на ректума и аналния канал при електрически-предизвиканите модуларни моторни отговори.

#### **1.4. Модуларни моторни отговори при въздействие на субстанции, повлияващи холинергичната и нитрергичната невромедиация**

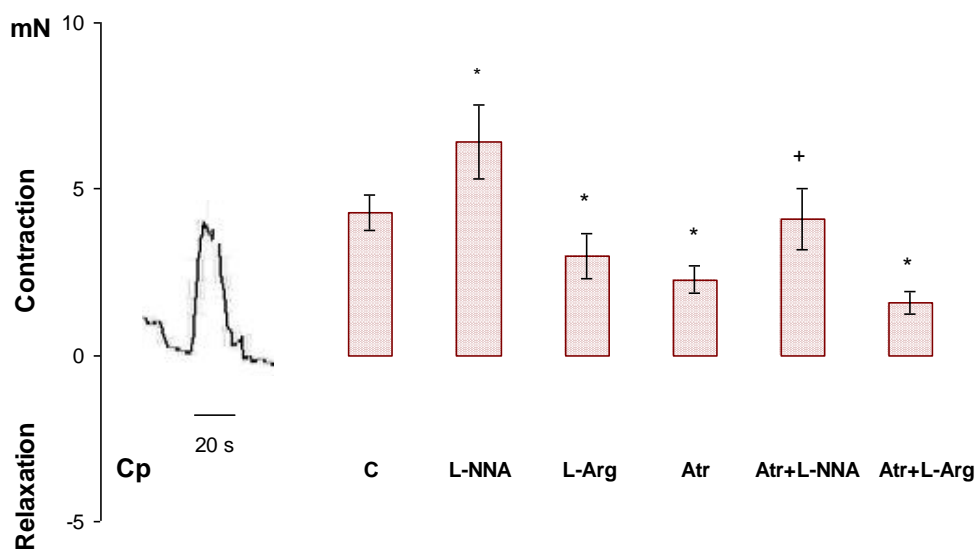
Електрически-предизвиканите модуларни моторни отговори са проучвани при прилагане на холинолитика atropine, донора на азотен оксид – L-arginine (L-arg) и блокера на азотнооксидната синтаза NG-nitro-L-arginine (L-NNA). Като контроли в тези експерименти са използвани модуларните моторни отговори, индуцирани от електрическа полева стимулация.

##### **1.4.1. Модуларни моторни отговори при електрическа полева стимулация с честота 2 Hz**

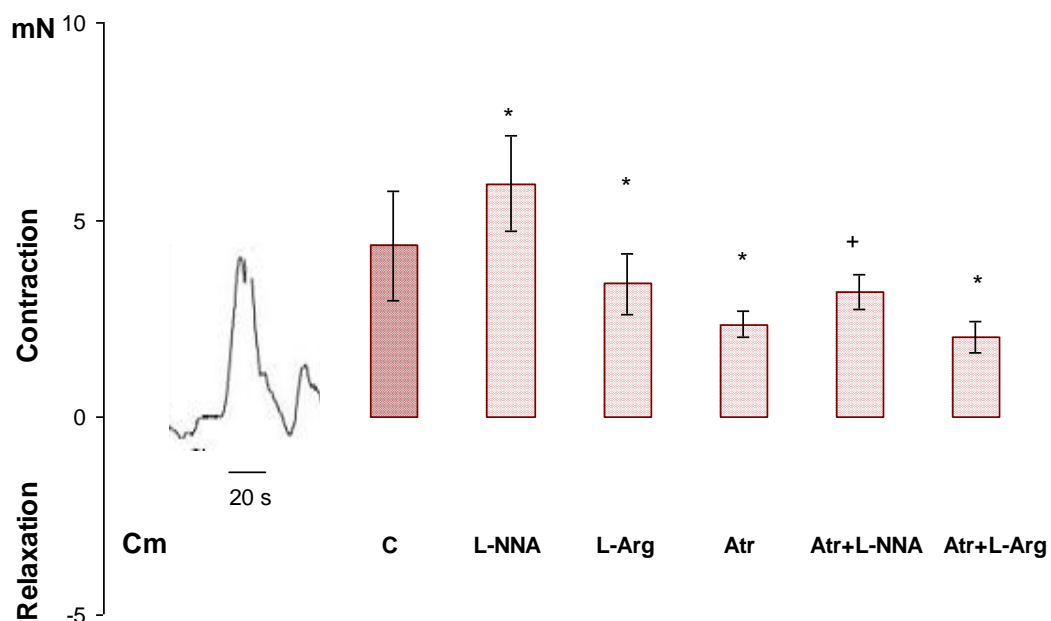
Прибавянето на L-NNA (0.5 mM) в органните вани към разтвора на Кребс увеличава амплитудите на електрически-предизвиканите моторни отговори на Ср, См и Cd ринг-препаратите, докато L-Arg (0.5 mM) ги намалява. Ефектът на субстанциите, повлияващи нитрергичната медиация е по-изразен в препаратите от проксимален ректум (фиг. 3.13, 3.14 и 3.15 и табл. 3.2). При въздействие с L-arginine съкращенията са потиснати максимално в Ср с 35.56%, а в Cd – с 18.56%. Модуларните съкращения на циркуларните гладкомускулни ринг-препарати са потиснати достоверно при прилагане на atropine в концентрация 0.3  $\mu$ M в сравнение с съкращенията, предизвикани от 2 Hz EFS: в Ср ( $2.27 \pm 0.41$  mN,  $n=9$ ,  $p<0.05$ ; Фиг. 3.13); в См ( $2.36 \pm 0.32$  mN,  $n=8$ ,  $p<0.05$ ; Фиг. 3.14) и в Cd ( $2.38 \pm 0.52$  mN,  $n=9$ ,  $p<0.05$ ; фиг. 3.15 и табл. 3.2). Регистрираните амплитуди са намалени повече в дисталната област – 50.93%, в медиалната – 46.73% и в проксималната – 45.97%. В присъствие на L-arginine съкращенията, в отговор на електрическа стимулация се потискат по-малко в сравнение с тези при atropine (табл. 3.2). Инхибираните от atropine съкращения

на препаратите от циркулярна мускулатура се увеличават по амплитуда при прибавяне на блокера на азотнооксидната синтаза L-NNA. Моторните отговори се променят в обратна посока при прибавяне на L-arginine в хранителния разтвор, съдържащ atropine в сравнение с промените на фона на atropine плюс L-NNA. Статистически достоверно се намаляват амплитудите на съкращенията на ринг-препаратите в сравнение с контролите, третираните с L-NNA, с L-NNA плюс atropine, но не и спрямо тези с atropine (фиг. 3.13, 3.14 и 3.15 и табл. 3.2).

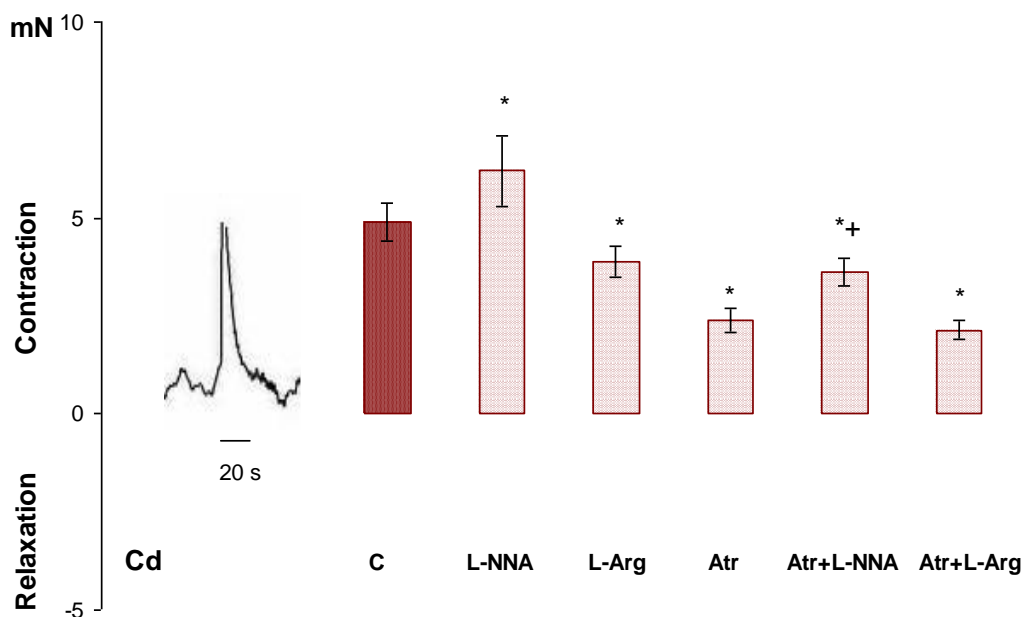
Електрически-предизвиканият отговор на IAS се променя при добавяне на блокера на азотнооксидната синтаза от дълбока релаксация до двуфазен – начална по-краткотрайна релаксация с амплитуда  $-1,33 \pm 0.3$  mN и съкращение от  $2,02 \pm 0.23$  mN, а на фона на L-arginine релаксацията се задълбочава до  $-6.32$  mN с 75.55% (фиг. 3.16 и табл 3.2). Релаксацията на IAS се увеличава в присъствие на atropine с 29,69% до  $-4.62 \pm 0.34$  mN ( $n=8$ ,  $p<0.05$ ). Намаляване на релаксацията и съкращение се регистрира в препаратите от IAS при прибавяне на L-NNA към атропинизирания хранителен разтвор, като съответните стойности са  $-1.68 \pm 0,38$  и  $1,82 \pm 0.28$  mN. L-arginine на фона на atropine, значително увеличава релаксацията на IAS с 88.88% ( $-6.82 \pm 0.42$  mN) в сравнение с контролите и препаратите, третирани с atropine (фиг. 3.16).



**Фигура 3.13.** Модуларни моторни отговори на изолирани ринг-препарати от проксимален ректум (Cp) при EFS (0.8 ms, 40 V, 20 s) с честота 2 Hz. Означения: контролен отговор, EFS (C); в присъствие на: atropine (Atr), L-NNA (L-N) и L-arginine (L-Arg). Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 8 препарата. Символи: статистически значима разлика  $p<0.05$  – (\*) към контролите, (+) към atropine



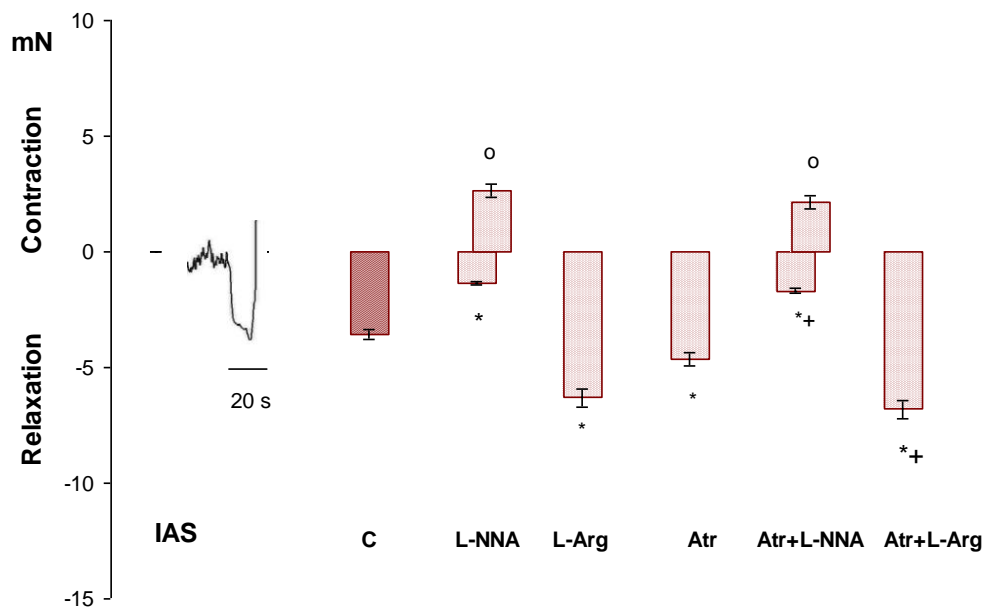
**Фигура 3.14.** Модуларни моторни отговори на ринг-препарати, изолирани от медиален ректум (Cm) при EFS (0.8 ms, 40 V, 20 s) с честота **2 Hz**. Означения: контролен отговор, EFS (C); в присъствие на: atropine (Atr), L-NNA (L-N) и L-arginine (L-Arg). Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 8 препарата. Символите показват статистически значима разлика  $p < 0.05$  – (\*) към контролите, (+) към atropine



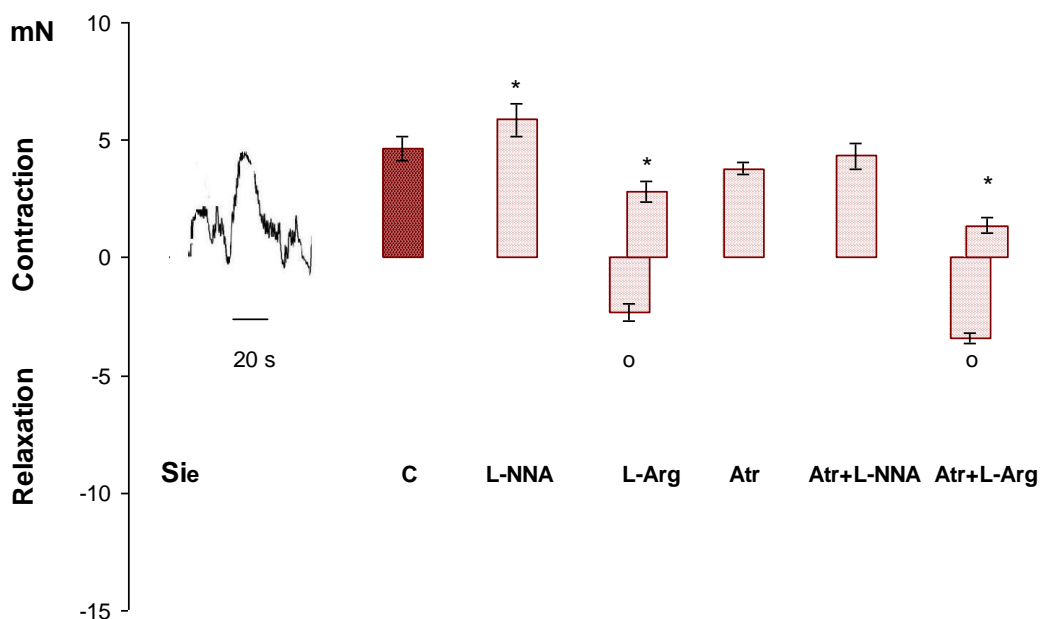
**Фигура 3.15.** Модуларни моторни отговори на ринг-препарати, изолирани от дистален ректум (Cd) при EFS (0.8 ms, 40 V, 20 s) с честота **2 Hz**. Означения: контролен отговор, EFS (C); в присъствие на: atropine (Atr), L-NNA (L-N) и L-arginine (L-Arg). Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 8 препарата. Символите показват статистически значима разлика  $p < 0.05$  – (\*) към контролите, (+) към atropine

Съкращението на аналния канал при електрическата стимулация от 2 Hz се увеличава по амплитуда в присъствие на L-NNA и намалява при atropine.

При прибавяне на L-arginine, atropine плюс L-arginine отговорът се променя по вид, регистрира се релаксация с амплитуди  $-2.34 \pm 0.41$  и  $-3.42 \pm 0.34$  mN респективно, последвана от статистически значимо по-нискоамплитудна контракция, спрямо контролите ( $p < 0.05$ ) (фиг. 3.17 и табл.3.2).



**Фигура 3.16.** Модуларни моторни отговори на вътрешен анален сфинктер (IAS) при EFS (0.8 ms, 40 V, 20 s) с честота 2 Hz. Означения: контролен отговор, EFS (C); в присъствие на: atropine (Atr), L-NNA (L-N) и L-arginine (L-Arg). Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 8 препаратите. Символите показват статистически значима разлика  $p < 0.05$  – (\*) към контролите, (+) към atropine и (o) обратен ефект спрямо контролите.



**Фигура 3.17.** Моторни отговори на анален канал (Sie) при EFS (0.8 ms, 40 V, 20 s) с честота 2 Hz. Означения: контролен отговор, EFS (C); в присъствие на: atropine (Atr), L-NNA (L-N) и L-arginine (L-Arg). Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 8 препаратите. Статистически значима разлика  $p < 0.05$  – (\*) към контролите, (+) към atropine и (o) обратен ефект.

**Таблица 3.2.** Амплитуди на електрически-предизвиканите модулари моторни отговори при въздействие с atropine и/или G-nitro-L-arginine и L-arginine в изолирани гладкомускулни препарати от ректум и анални сфинктери при честота на електрическия стимул от **2 Hz**

препарат	КОНТРОЛИ EFS 2 HZ	L-NNA 5x10 <sup>-5</sup> M	L-ARG 5X10 <sup>-5</sup> M	ATR 3x10 <sup>-7</sup> M	ATR + L-NNA	ATR + L-ARG	ANOVA тест
Проксимален циркулар Ср n=9	M 4.279 SD 1.607 SE 0.536	M 6.432 SD 2.335 SE 1.041	M 2.986 SD 1.688 SE 0.689	M 2.275 SD 1.227 SE 0.409	M 4.124 SD 2.135 SE 0.955	M 1.564 SD 0.682 SE 0.341	L-NNA-EFS*; L-ARG-EFS*; ATR-EFS*; ATR+L-ARG-EFS*; ATR-ATR+L-NNA*; L-NNA-L-ARG*; ATR+L-ARG-ATR+L-NNA*
Медиален циркулар См n=8	M 4.349 SD 2.795 SE 1.410	M 5.932 SD 3.061 SE 1.249	M 3.396 SD 1.735 SE 0.777	M 2.361 SD 0.789 SE 0.322	M 3.196 SD 1.095 SE 0.447	M 2.039 SD 0.847 SE 0.378	L-NNA-EFS*; L-ARG-EFS*; EFS- ATP*; EFS-ATP+L-ARG* ATR-ATR+L-NNA*; L-NNA-LARG*; ATR+L-ARG- ATR+L-NNA*
Дистален циркулар Cd n=9	M 4.853 SD 1.362 SE 0.481	M 6.179 SD 2.019 SE 0.903	M 3.941 SD 0.995 SE 0.406	M 2.381 SD 0.807 SE 0.523	M 3.625 SD 0.906 SE 0.346	M 2.135 SD 0.675 SE 0.234	EFS КЪМ ВСИЧКИ* L-NNA-L-ARG*; L-NNA-ATR+L-NNA* ATR-ATR+L-NNA*; ATR-L-ARG*; L-NNA-LARG*; ATR+L-ARG- ATR+L-NNA*
Вътрешен сфинктер IAS n=8	M -3.573 SD 0.983 SE 0.435	M -1.33/2.02 SD 0.19/0.62 SE 0.03/0.23	M -6.320 SD 2.019 SE 0.803	M -4.620 SD 1.003 SE 0.341	M -1.68/1,82 SD 0.72/0.71 SE 0.38/0.28	M -6.820 SD 0.1290 SE 0.420	EFS КЪМ ВСИЧКИ* L-ARG-ATR* ATR-ATR+L-NNA* ATR-ATR+L-ARG*
Анален канал Sie n=8	M 4.640 SD 1.691 SE 0.513	M 5.893 SD 2.019 SE 0.703	M -2.343/2.82 SD 1.19/0.919 SE 0.41/0.373	M 3.80 SD 0.72 SE 0.28	M 4.323 SD 1.120 SE 0.542	M -3.42/1.36 SD 0.96/0.59 SE 0.34/0.22	EFS-L-NNA*; EFS-L-ARG*; EFS-ATR+L-ARG*

Означения: atropine (ATR); G-nitro-L-arginine (L-NNA); L-arginine; Ср – циркуларен ринг от проксимален ректум; См – циркуларен ринг от медиален ректум; Cd – циркуларен ринг от дистален ректум; IAS – вътрешен анален сфинктер; Sie – анален канал (препарат, съдържащ вътрешен и външен анален сфинктер). Стойностите на амплитудите са изрезени в mN.

### **1.4.2. Модуларни моторни отговори при електрическа полева стимулация с честота 5 Hz**

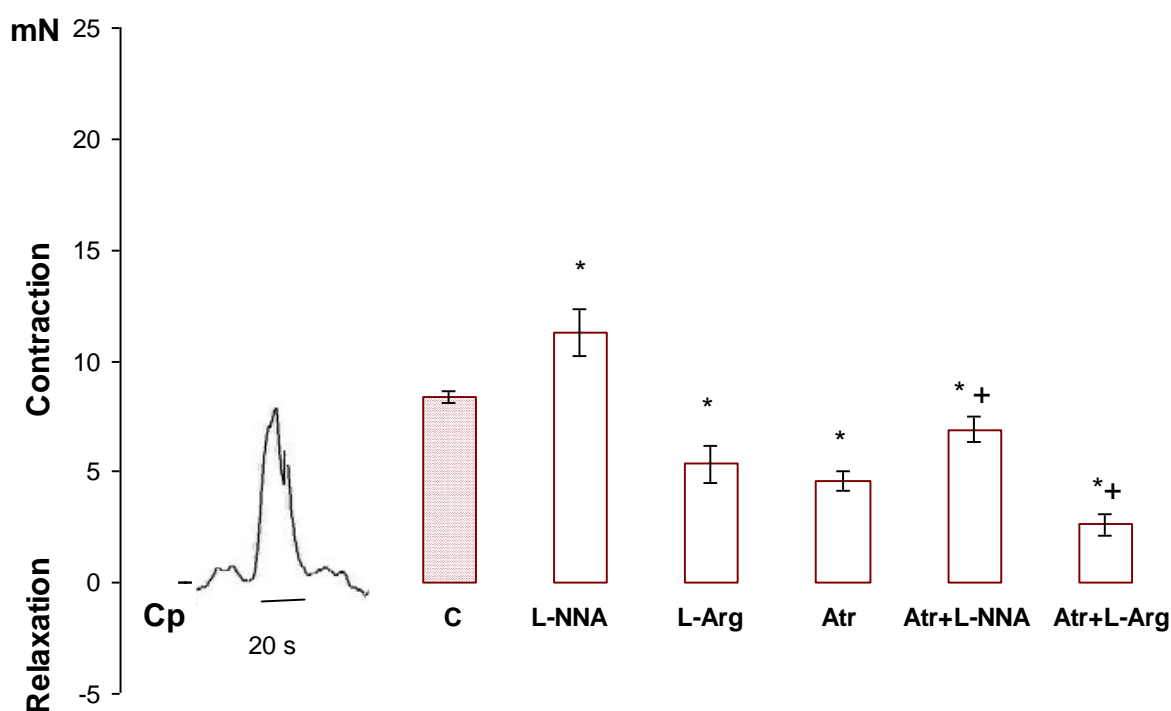
Модуларните съкращения на ринг-препаратите от циркуларна мускулатура от различните области на ректума се увеличават сигнификантно по амплитуда на фона на L-NNA в концентрация 0.5 mM в сравнение с тези, предизвикани от 5-Hz EFS. Максимална амплитуда на модуларните съкращения показват циркуларните пръстени, изолирани от дисталния ректум ( $16.814 \pm 0.82$  mN,  $n=8$ ,  $p<0.05$ ; фиг. 3.20 и табл. 3.3). Електрически-предизвиканите съкращения се повлияват в обратна посока при прибавяне на L-Arginine (0.5 mM) в органните вани, като амплитудите на отговорите в Cp, Cm и Cd се потискат съответно с 34.94%, 30.33% и 27.95% (фиг. 3.18, 3.19 и 3.20 и табл. 3.3).

Потискане на амплитудите на контрактилните отговори се регистрира в присъствие на atropine в хранителния разтвор в концентрация от 0.3  $\mu$ M, като тези промени са статистически достоверни спрямо амплитудите в отговор на 5-Hz EFS (фиг. 3.18, 3.19 и 3.20 и табл. 3.3). Инхибирането на съкращенията в присъствие на atropine е по-изразено (съответно 44.69%, 43.82% и 51.51% в Cp, Cm и Cd спрямо контролите) в сравнение с промените в присъствие на L-Arginine (съответно 34.94%, 30.33% и 27.95% в Cp, Cm и Cd спрямо контролите). L-NNA (0.5 mM), добавен към атропинизирания разтвор повлиява в обратна посока ефекта на холинолитика, увеличавайки амплитудите на контрактилните отговори (табл. 3.3). Значително се потискат амплитудите на съкращения на циркуларните глакомускулни пръстени при добавяне на L-arginine (0.5 mM) към атропинизирания хранителен разтвор, като промените са статистически значими, сравнени с тези, предизвикани от EFS. Амплитудите са редуцирани в сравнение с тези в присъствие на atropine, както следва: до  $2.61 \pm 0.5$  mN,  $n=9$ ,  $p<0.05$  в Cp;  $3.14 \pm 0.81$ ,  $n=8$ ,  $p<0.05$  в Cm, но без отчетлива разлика в Cd –  $5.62 \pm 0.54$ ,  $n=9$ ,  $p>0.05$  (фиг. 3.18, 3.19 и 3.20 и табл. 3.3).

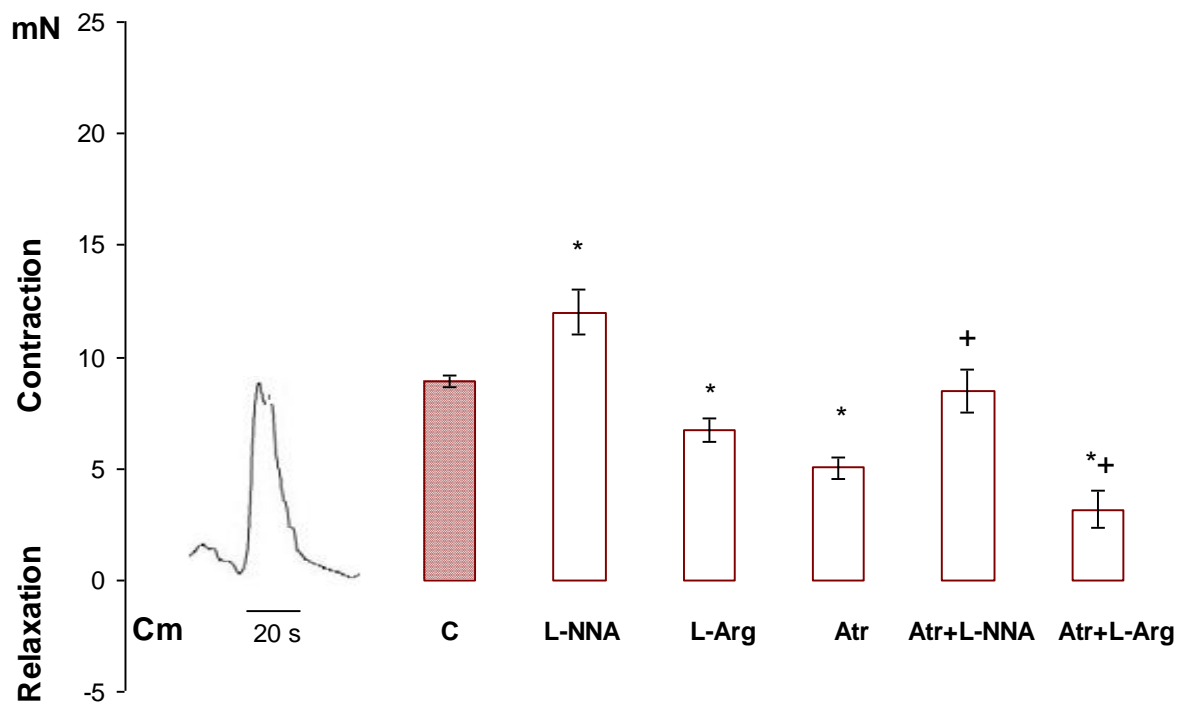
При прибавяне на L-NNA (0.5 mM) модуларният отговор на IAS към EFS с честота 5 Hz, представляващ краткотрайна релаксация с амплитуда  $-3.13 \pm 0.41$  mN ( $n=12$ ) се променя в нискоамплитудна релаксация, последвана от съкратителен отговор ( $-1.13 \pm 0.44$  mN и  $2.87 \pm 0.34$  mN) (фиг. 3.21 и табл. 3.3). L-arginine (0.5 mM) и atropine (0.3  $\mu$ M) увеличават релаксацията до  $-5.52 \pm 0.51$  mN ( $n=8$ ,  $p<0.05$ ) и  $-3.92 \pm 0.36$  mN ( $n=8$ ,  $p>0.05$ ), респективно. В присъствие на atropine и L-NNA се регистрира двуфазен отговор: релаксация ( $-1.42 \pm 0.16$ ) и съкращение ( $2.14 \pm 0.36$ ), докато при прибавяне на L-arginine към

атропинизирания хранителен разтвор се регистрира продължителна релаксация с амплитуда от  $-6.64 \pm 0.18$  (112.14% по-голяма амплитуда от тази при EFS;  $n=8$ ,  $p<0.05$ ) (фиг. 3.21 и табл. 3.3).

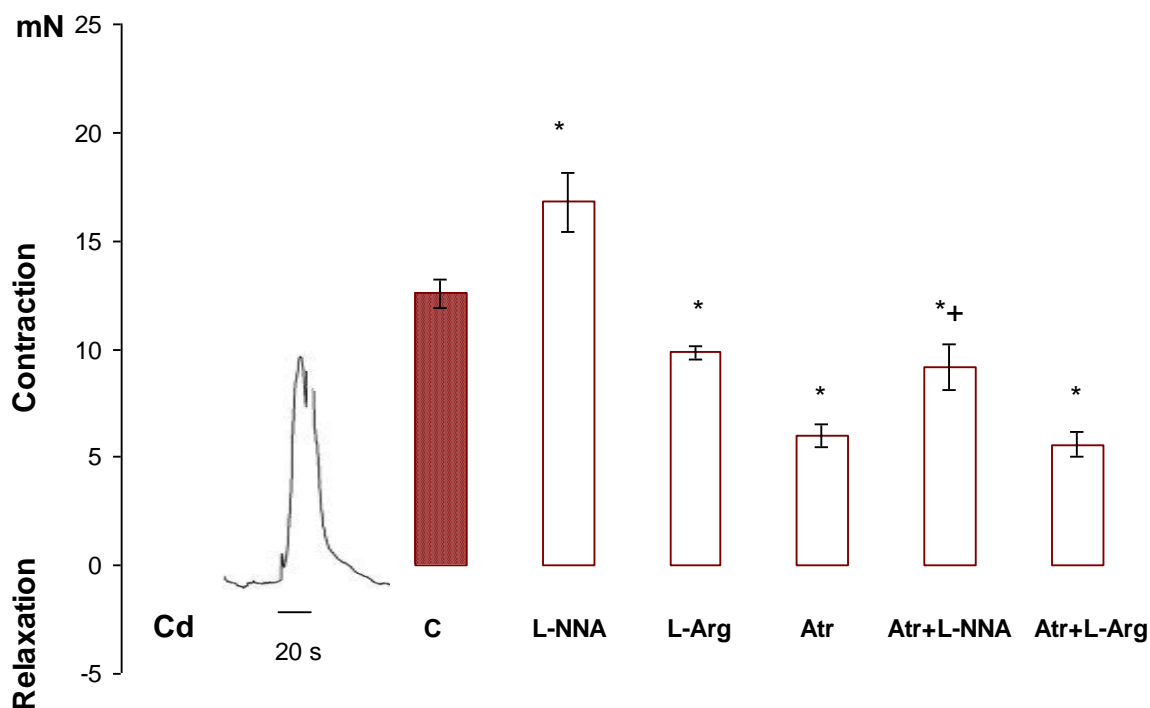
Аналният канал отговаря на EFS с продължително съкращение с амплитуда от  $7.84 \pm 0.78$  mN ( $n=13$ ). Отговорът се увеличава по амплитуда при добавяне на L-NNA (0.5 mM) и се превръща в двуфазен при добавяне на L-arginine (0.5 mM): появява се релаксация  $-1.84 \pm 0.22$  mN, а съкращението се намалява до  $5.52 \pm 0.28$  mN ( $n=8$ ,  $p<0.05$ ) (фиг. 3.22 и табл. 3.3). Atropine (0.3  $\mu$ M) намалява амплитудите на съкращенията на аналния канал, докато прибавянето на L-NNA незначително ги увеличава. На фона на холинолотики и L-arginine съкращенията се потискат и се регистрира релаксация от  $-2.10 \pm 0.22$  mN;  $n=8$  (фиг. 3.22 и табл. 3.3).



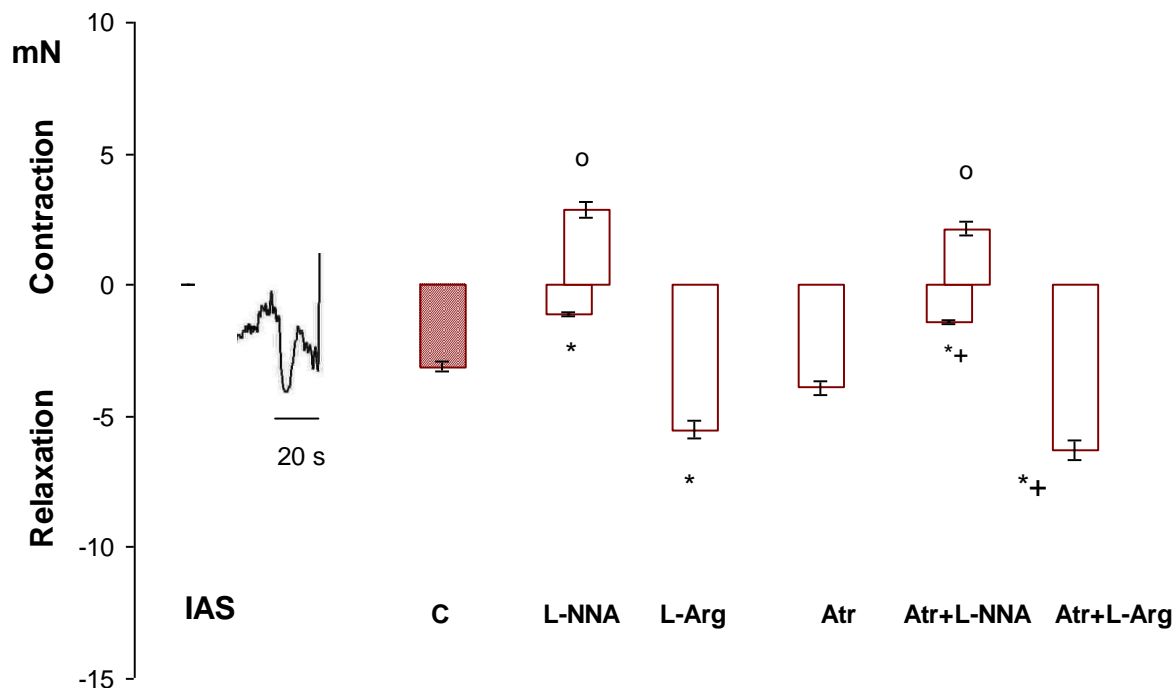
**Фигура 3.18.** Модуларни моторни отговори на ринг-препарат от проксимален ректум (Cr) при EFS (0.8 ms, 40 V, 20 s) с честота 5 Hz. Означения: контролен отговор, EFS (C); в присъствие на: atropine (Atr), L-NNA (L-N) и L-arginine (L-Arg). Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 8 препаратата. Символите показват статистически значима разлика  $p<0.05$  – (\*) към контролите, (+) към atropine.



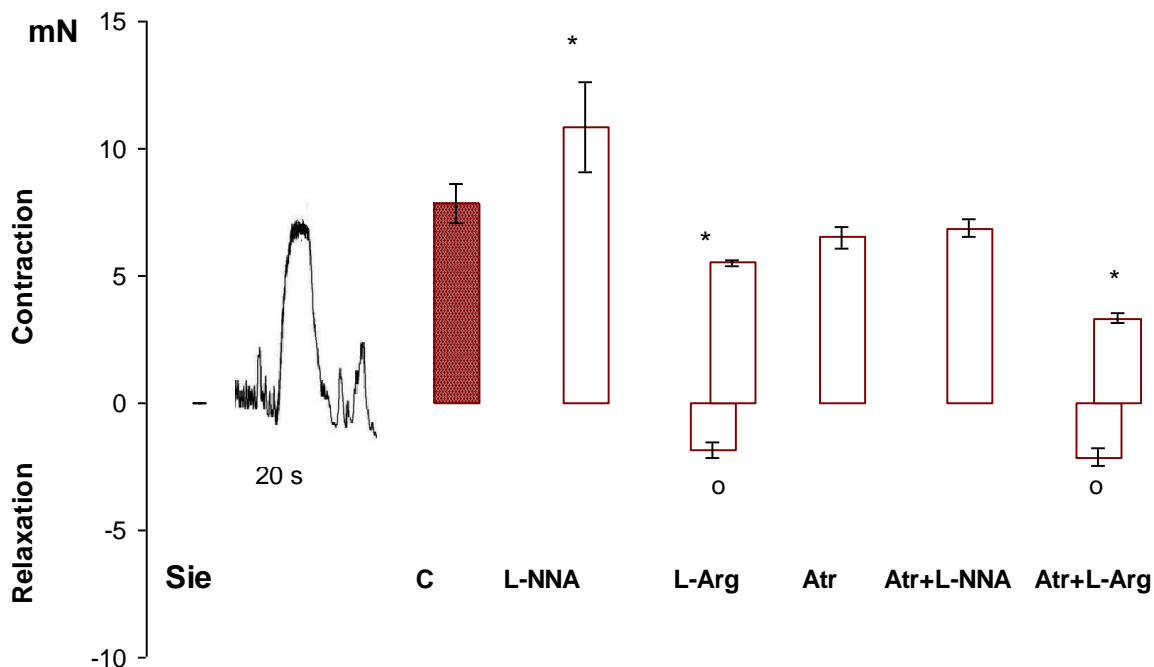
**Фигура 3.19.** Модуларни моторни отговори на ринг-препарат от медиален ректум (Cm) при EFS (0.8 ms, 40 V, 20 s) с честота **5 Hz**. Означения: контролен отговор, EFS (C); в присъствие на: atropine (Atr), L-NNA (L-N) и L-arginine (L-Arg). Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 8 препаратата. Символите показват статистически значима разлика  $p < 0.05$  – (\*) към контролите, (+) към atropine



**Фигура 3.20.** Модуларни моторни отговори на ринг-препарат от дистален ректум (Cd) при EFS (0.8 ms, 40 V, 20 s) с честота **5 Hz**. Означения: контролен отговор, EFS (C); в присъствие на: atropine (Atr), L-NNA (L-N) и L-arginine (L-Arg). Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 8 препаратата. Символите показват статистически значима разлика  $p < 0.05$  – (\*) към контролите, (+) към atropine



**Фигура 3.21.** Модуларни моторни отговори на ринг-препарат от вътрешен анален сфинктер (IAS) при EFS (0.8 ms, 40 V, 20 s) с честота **5 Hz**. Означения: контролен отговор, EFS (C); в присъствие на: atropine (Atr), L-NNA (L-N) и L-arginine (L-Arg). Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 8 препаратата. Символите показват статистически значима разлика  $p < 0.05$  – (\*) към контролите, (+) към atropine, (o) обратен ефект към контроли



**Фигура 3.22.** Моторни отговори на анален канал (Sie) при EFS (0.8 ms, 40 V, 20 s) с честота **5 Hz**. Означения: контролен отговор, EFS (C); в присъствие на: atropine (Atr), L-NNA (L-N) и L-arginine (L-Arg). Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 8 препаратата. Символите показват статистически значима разлика  $p < 0.05$  – (\*) към контролите, (+) към atropine, (o) обратен ефект спрямо контролите

**Таблица 3.3.** Амплитуди на електрически-предизвиканите модулари моторни отговори при въздействие с atropine и/или G-nitro-L-arginine и L-arginine в изолирани гладкомускулни препарати от ректум и анални сфинктери при честота на електрическия стимул от 5 Hz

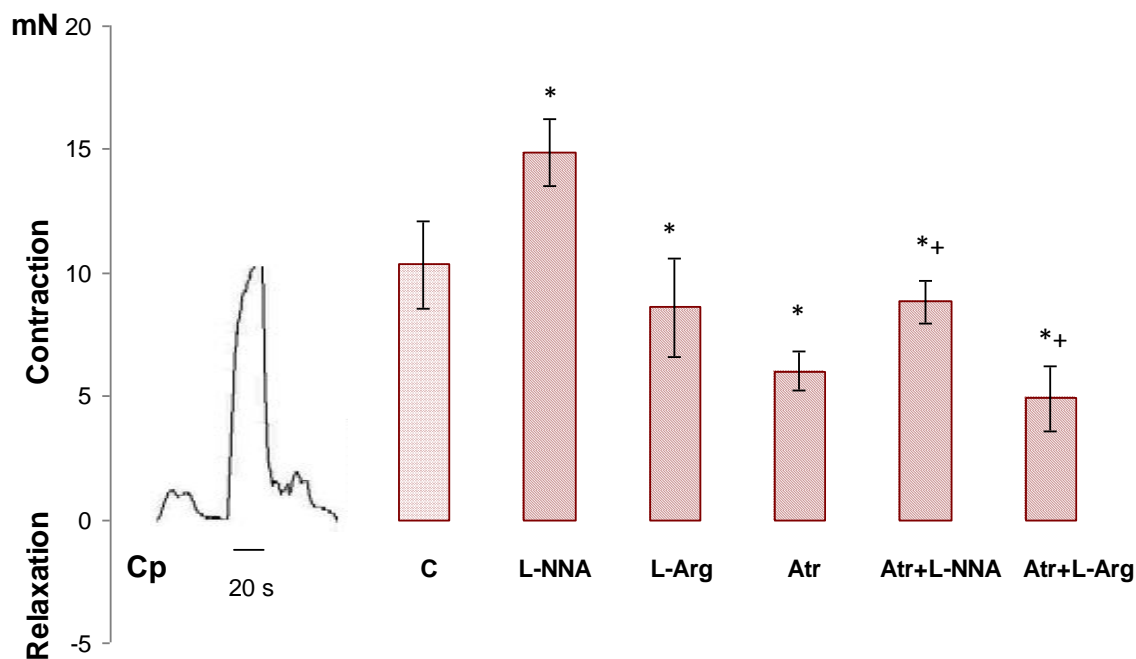
препарат	КОНТРОЛИ EFS 5 HZ	L-NNA 5x10 <sup>-5</sup> M	L-ARG 5X10 <sup>-5</sup> M	ATR 3x10 <sup>-7</sup> M	ATR + L-NNA	ATR + L-ARG	ANOVA тест
Проксимален циркулар Ср n=9	M 8.380 SD 0.660 SE 0.248	M 11.263 SD 2.330 SE 0.8818	M 5.370 SD 1.680 SE 0.838	M 4.590 SD 0,499 SE 0.188	M 6.920 SD 1.280 SE 0.570	M 2.610 SD 0.870 SE 0.500	EFS КЪМ ВСИЧКИ* ATR-ATR+L-NNA* ATR-ATR+L-ARG* L-NNA-L-ARG*; ATR+L-ARG-ATR+L-NNA*
Медиален циркулар См n=8	M 8.878 SD 0.970 SE 0.370	M 12.028 SD 2.240 SE 1.004	M 6.255 SD 1.040 SE 0.520	M 5.016 SD 1.020 SE 0.385	M 8.452 SD 2.163 SE 0.960	M 3.143 SD 1.414 SE 0.815	LNN-EFS* ; L-ARG-EFS*; EFS- ATP*; EFS-ATR+L-ARG* ATR-ATR+L-NNA* ; L-NNA-LARG*; ATR+L-ARG- ATR+L-NNA*
Дистален циркулар Cd n=9	M 12.560 SD 1.470 SE 0.660	M 16.814 SD 2.321 SE 0.821	M 9.050 SD 0.580 SE 0.290	M 6.043 SD 1.116 SE 0.394	M 9.15 SD 2.059 SE 1.029	M 5.623 SD 0.761 SE 0.544	EFS КЪМ ВСИЧКИ* ATR-ATR+L-NNA* ATR-ATR+L-ARG* L-NNA-L-ARG*; ATR+L-ARG-ATR+L-NNA*
Вътрешен сфинктер IAS n=8	M -3.130 SD 1.250 SE 0.410	M -1.13/2.87 SD 0.983/0,72 SE 0.44/0,34	M -5.520 SD 1.500 SE 0.510	M -3.920 SD 0.980 SE 0.360	M -1.42/2.14 SD 0.49/0.96 SE 0.16/0.36	M -6.640 SD 0.521 SE 0.183	EFS-L-NNA* ; EFS-L-ARG* EFS-ATR+L-NNA* EFS-ATR+L-ARG* ATR-ATR+L-NNA* ATR-ATR+L-ARG* L-NNA-L-ARG* ATR+L-ARG-ATR+L-NNA*
Анален канал Sie n=8	M 7.840 SD 3.150 SE 0.780	M 10.840 SD 2.150 SE 1.80	M -1.84/5.52 SD 0.33/0.91 SE 0.22/0.28	M 6.520 SD 1.12 SE 0.42	M 6.880 SD 1.002 SE 0.360	M -2.12/3.34 SD 0.58/0.90 SE 0.22/0.32	EFS-L-NNA* ; EFS-L-ARG* EFS-ATR+L-ARG ATR-ATR+L-ARG*

Означения: atropine (ATR); G-nitro-L-arginine (L-NNA); L-arginine; Ср – циркуларен ринг от проксимален ректум; См – циркуларен ринг от медиален ректум; Cd – циркуларен ринг от дистален ректум; IAS – вътрешен анален сфинктер; Sie – анален канал (препарат, съдържащ вътрешен и външен анален сфинктер). Стойностите на амплитудите са изрезени в mN.

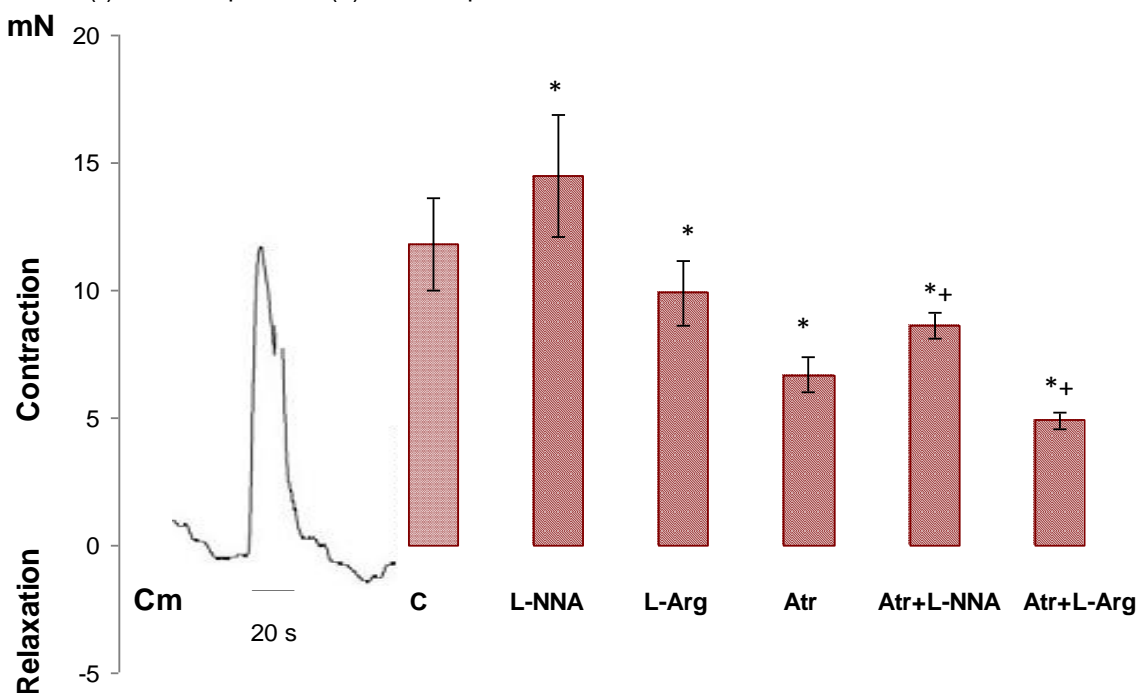
### **1.4.3. Модуларни моторни отговори при електрическа полева стимулация с честота 10 Hz**

Модуларните съкращения на ринг-препаратите от различните области на ректума се увеличават достоверно по амплитуда в присъствие на L-NNA в концентрация 0.5 mM в сравнение с тези, предизвикани от 10-Hz EFS. Повишението на амплитудите на съкратителните отговори в присъствие на L-NNA е по-изразено в Ср – 33.33%, а в Cd – 24.03% (фиг. 3.23, 3.24 и фиг. 3.25 и табл. 3.4). Електрически-предизвиканите съкращения се повлияват в обратна посока при прибавяне на L-Arginine (0.5 mM) в органните вани: контракциите са с 20.39% в Ср и с 13.7% в Cd по-ниски амплитуди в сравнение с контролите (табл. 3.4). Амплитудите се потискат по-слабо в сравнение с инхибирането на контрактилните отговори при 2 и 5 Hz. Намаляване на средните стойности на амплитудите на контрактилните отговори се регистрира в присъствие на atropine в хранителния разтвор в концентрация от 0.3  $\mu$ M, като тези промени са статистически значими спрямо амплитудите в отговор на 10-Hz EFS, съотв. 42.72%, 46.45% и 53.73% в Ср, Cm и Cd. L-NNA (0.5 mM), добавен към атропинизирания разтвор на Кребс повлиява в обратна посока ефекта на холинолитика, увеличавайки амплитудите на контрактилните отговори. Значително се потискат амплитудите на съкращения на циркуларните гладкомускулни пръстени при добавяне на L-arginine (0.5 mM) към атропинизирания хранителен разтвор, като промените са статистически значими в сравнение с тези, предизвикани от EFS. Съпоставени с тези на фона на атропин сигнификатно намаляване се регистрира в Ср до  $4.92 \pm 0.90$  mN,  $n=9$ ,  $p<0.05$  и Cm до  $5.20 \pm 0.31$ ,  $n=8$ ,  $p<0.05$ .

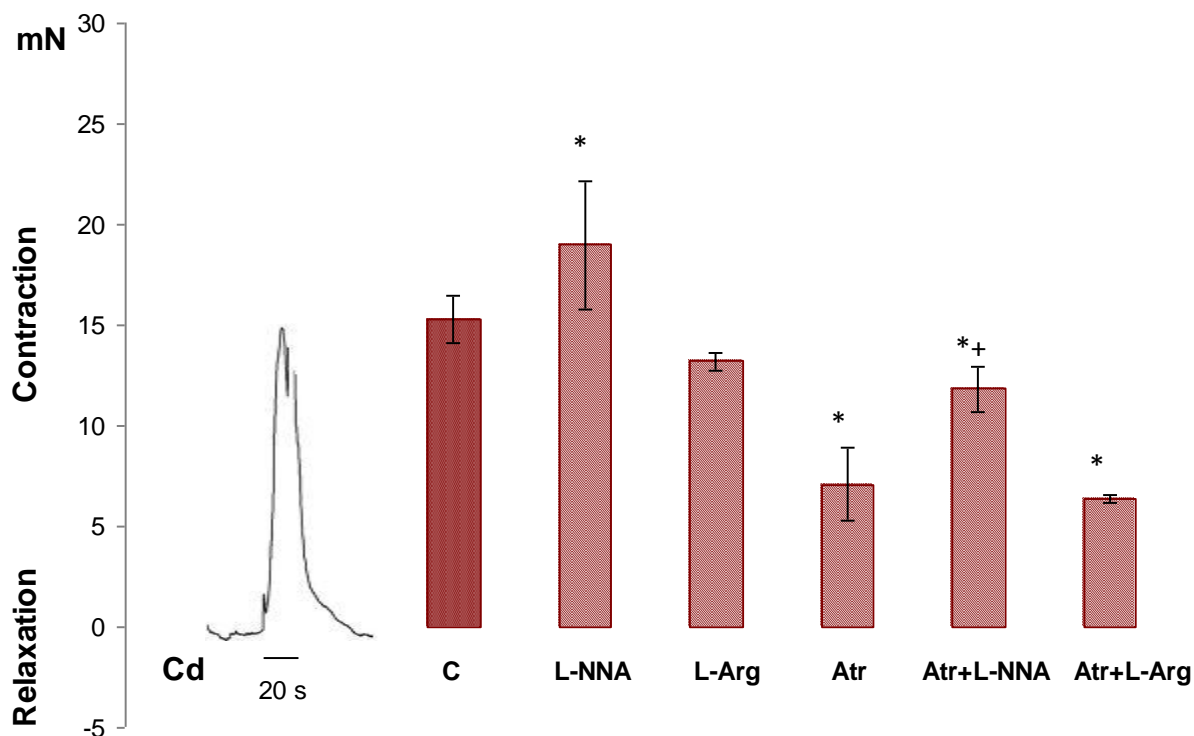
Модуларният отговор на IAS към EFS с честота 10 Hz, представлява краткотрайна релаксация с амплитуда  $-2.00 \pm 3.41$  mN, последвана от съкращение от  $3.95 \pm 0.28$  mN ( $n=12$ ). При прибавяне на L-NNA се запазва двуфазния характер, като амплитудата на релаксацията намалява, а тази на котракцията се увеличава до  $5.22 \pm 0.41$  mN ( $p<0.05$ ; фиг. 3.26 и табл. 3.4). L-arginine (0.5 mM) и atropine (0.3  $\mu$ M) увеличават релаксацията, L-arginine статистически значимо до  $-3.62 \pm 0.029$  mN и намалява котракцията до  $1.64 \pm 0.2$  mN ( $n=8$ ,  $p<0.05$ ). В присъствие на atropine и L-NNA се регистрира двуфазен отговор: релаксация ( $-1.02 \pm 0.08$  mN) и съкращение ( $3.96 \pm 0.20$  mN). При прибавяне на L-arginine към атропинизирания разтвор се задълбочава релаксация ( $-3.44 \pm 0.22$ ) и значимо се потиска съкращението ( $1.32 \pm 0.18$  mN;  $p<0.05$ ).



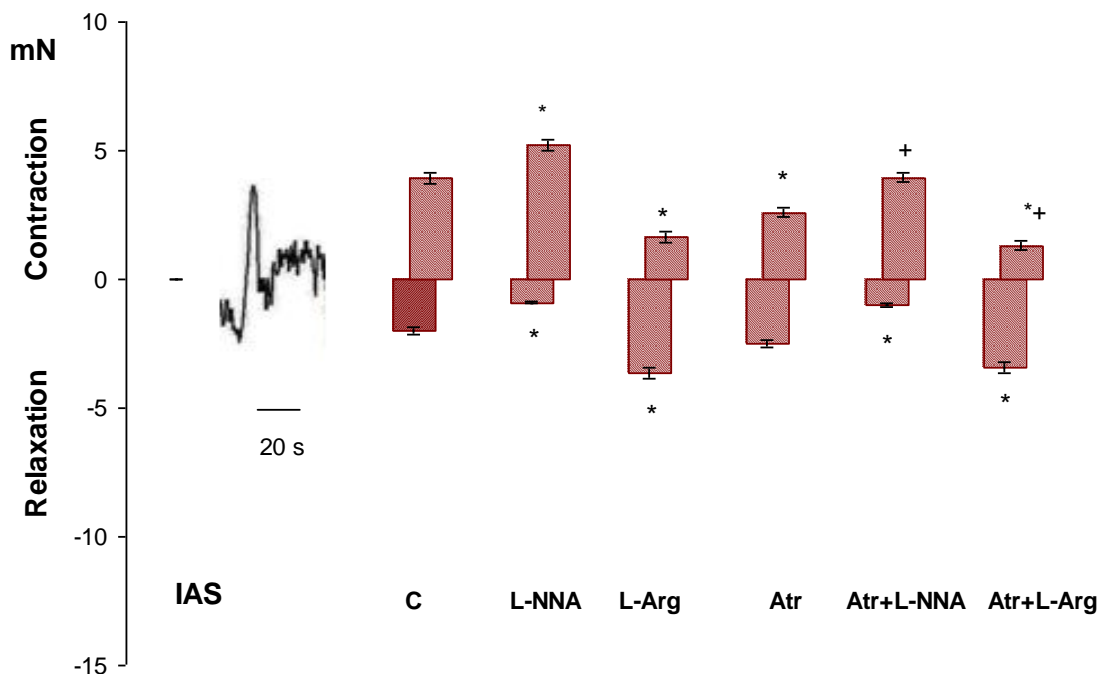
**Фигура 3.23.** Модуларни моторни отговори на изолирани ринг-препарати от проксимален ректум (Cp) при EFS (0.8 ms, 40 V, 20 s) с честота **10 Hz**. Означения: контролен отговор, EFS (C); в присъствие на: atropine (Atr), L-NNA (L-N) и L-arginine (L-Arg). Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 8 препарата. Символи: статистически значима разлика  $p < 0.05$  – (\*) към контролите, (+) към atropine



**Фигура 3.24.** Модуларни моторни отговори на ринг-препарати, изолирани от медиален ректум (Cm) (0.8 ms, 40 V, 20 s) с честота **10 Hz**. Означения: контролен отговор, EFS (C); в присъствие на: atropine (Atr), L-NNA (L-N) и L-arginine (L-Arg). Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 8 препарата. Символите показват статистически значима разлика  $p < 0.05$  – (\*) към контролите, (+) към atropine

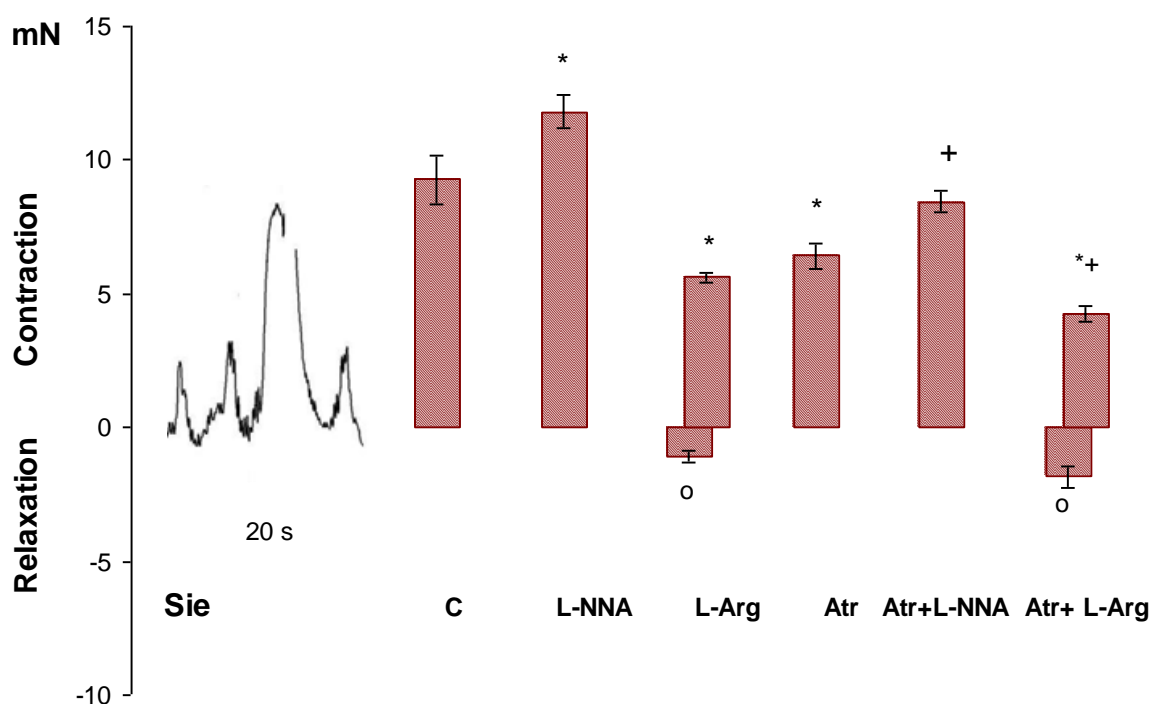


**Фигура 3.25.** Модуларни моторни отговори на ринг-препарати, изолирани от дистален ректум (Cd) при EFS (0.8 ms, 40 V, 20 s) с честота **10 Hz**. Означения: контролен отговор, EFS (C); в присъствие на: atropine (Atr), L-NNA (L-N) и L-arginine (L-Arg). Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 8 препаратата. Символите показват статистически значима разлика  $p < 0.05$  – (\*) към контролите, (+) към atropine



**Фигура 3.26.** Модуларни моторни отговори на вътрешен анален сфинктер (IAS) при EFS (0.8 ms, 40 V, 20 s) с честота **10 Hz**. Означения: контролен отговор, EFS (C); в присъствие на: atropine (Atr), L-NNA (L-N) и L-arginine (L-Arg). Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 8 препаратата. Символите показват статистически значима разлика  $p < 0.05$  – (\*) към контролите, (+) към atropine и (o) обратен ефект спрямо контролите.

Аналният канал отговаря на 10-Hz EFS с продължително съкращение с амплитуда от  $9.27 \pm 0.93$  mN. Отговорът се увеличава по амплитуда при добавяне на L-NNA (0.5 mM) и се превръща в двуфазен при добавяне на L-arginine (0.5 mM): съкращението се намалява до  $5.62 \pm 0.22$  mN ( $n=8$ ,  $p<0.05$ ) и се появява релаксация  $-1.08 \pm 0.21$  mN ( $n=8$ ). Atropine (0.3  $\mu$ M) достоверно намалява съкращенията на аналния канал, докато прибавянето на L-NNA ги увеличава. На фона на холинолотики и L-arginine съкращенията се потискат и се регистрира релаксация с амплитуда  $-1.84 \pm 0.28$  mN (фиг. 3.27 и табл 3.4).



**Фигура 3.27.** Моторни отговори на анален канал (Sie) при EFS (0.8 ms, 40 V, 20 s) с честота 10 Hz. Означения: контролен отговор, EFS (C); в присъствие на: atropine (Atr), L-NNA (L-N) и L-arginine (L-Arg). Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 8 препаратите. Символите показват статистически значима разлика  $p<0.05$  – (\*) към контролите, (+) към atropine и (o) обратен ефект спрямо контролите.

Структурата на ректалните модулаторни моторни отговори, както и посоката на промените им в присъствие на atropine, L-NNA и L-arginine се запазват при приложение на електрическите стимули с честота от 2, 5 или 10 Hz върху циркуларните мускулни пръстени и аналния канал. Въпреки това, се наблюдава тенденция за повишаване на ефекта на atropine с повишаване на честотата на електрическите стимули, докато тези към нитрергичните субстанции са по-изразени при по-ниска честота.

**Таблица 3.4.** Амплитуди на електрически-предизвиканите модулари моторни отговори при въздействие с atropine и/или G-nitro-L-arginine и L-arginine в изолирани гладкомускулни препарати от ректум и анални сфинктери при честота на електрическия стимул от 10 Hz

препарат	КОНТРОЛИ EFS 10 HZ	L-NNA 5x10 <sup>-5</sup> M	L-ARG 5X10 <sup>-5</sup> M	ATR 3x10 <sup>-7</sup> M	ATR + L-NNA	ATR + L-ARG	ANOVA
<b>Проксимален циркулар Ср n=9</b>	M 10.333 SD 3.500 SE 0.906	M 14.866 SD 3.045 SE 1.362	M 8.639 SD 2.023 SE 0.301	M 6.025 SD 2.375 SE 0.791	M 8.818 SD 1.698 SE 0.642	M 4.924 SD 2.389 SE 0.903	EFS КЪМ ВСИЧКИ* ATR-ATR+L-NNA* ATR-ATR+L-ARG* LNN-L-ARG*; ATR-L-ARG* ATR+L-ARG-ATR+L-NNA*
<b>Медиален циркулар См n=8</b>	M 11.803 SD 4.449 SE 1.816	M 14.470 SD 5.890 SE 2.404	M 9.876 SD 3.061 SE 1.299	M 6.690 SD 1.719 SE 0.702	M 8.568 SD 1.405 SE 0.531	M 5.203 SD 0.685 SE 0.307	EFS КЪМ ВСИЧКИ* ATR-ATR+L-NNA* ATR-ATR+L-ARG* LNN-L-ARG*; ATR-L-ARG* ATR+L-ARG-ATR+LNN*
<b>Дистален циркулар Cd n=9</b>	M 15.274 SD 3.400 SE 1.220	M 18.938 SD 9.105 SE 3.219	M 13.181 SD 0.995 SE 0.406	M 7.058 SD 0.807 SE 1.825	M 11.819 SD 4.051 SE 1.109	M 6.396 SD 0.426 SE 0.161	EFS-L-NNA*; EFS-ATR* EFS-ATR+L-NNA* ATR-ATR+L-NNA* EFS-ATR+LARG* L-NNA-L-ARG* ATR+L-ARG-ATR+L-NNA*
<b>Вътрешен сфинктер IAS n=8</b>	M -2.0/3.95 SD 0.93/0,75 SE 0.31/0,28	M -0.86/5.22 SD 0.18/1.34 SE 0.02/0.41	M -3.62/1,64 SD 0.105/0.64 SE 0.029/0.20	M -2.52/2.60 SD 0.81/0.66 SE 0.28/0.22	M -1.02/3.96 SD 0.24/0.58 SE 0.08/0.20	M -3.44/1.32 SD 0.67/0.52 SE 0.22/0.18	EFS КЪМ ВСИЧКИ* ATR-ATR+L-NNA* ATR-ATR+LARG* L-NNA-L-ARG* ATR+L-ARG-ATR+L-NNA*
<b>Анален канал Sie n=8</b>	M 9.273 SD 1.830 SE 0.932	M 11.804 SD 1.905 SE 0.609	M -1.08/5.62 SD 0.51/1.10 SE 0.21/0.22	M 6.420 SD 1.180 SE 0.46	M 8.444 SD 1.230 SE 0.422	M -1.84/4.26 SD 0.71/0.98 SE 0.28/0.42	L-NNA-EFS* ; L-ARG-EFS*; EFS- ATP*; EFS-ATR+L-ARG* ATR-ATR+L-NNA* ATR-ATR+ L-ARG* L-NNA-L-ARG* ATR+L-ARG- ATR+L-NNA*

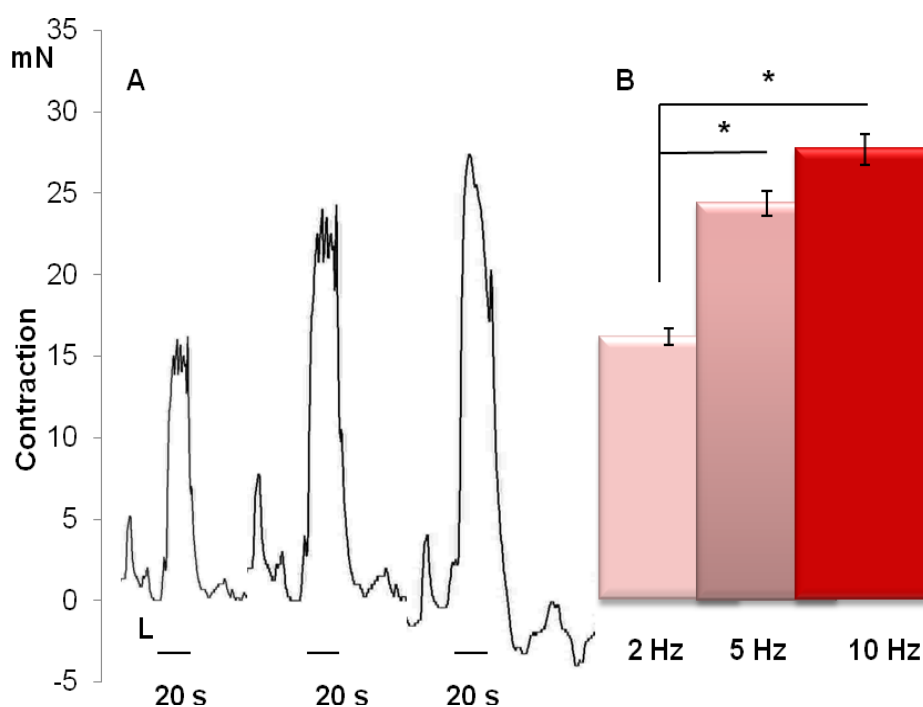
Означения: atropine (ATR); G-nitro-L-arginine (L-NNA); L-arginine; Ср – циркуларен ринг от проксимален ректум; См – циркуларен ринг от медиален ректум; Cd – циркуларен ринг от дистален ректум; IAS – вътрешен анален сфинктер; Sie – анален канал (препарат, съдържащ вътрешен и външен анален сфинктер). Стойностите на амплитудите са изразени в mN.

## 2. Моторни отговори на ивици лонгитудинална мускулатура

През периода на адаптация ивиците лонгитудинална мускулатура проявяват спонтанна моторна активност, като средната стойност на фазичните съкращения е най-висока с сравнение с останалите ринг-препарати (средна стойност 6.080 mN, SD=0.602, SE=0.173).

Ивиците лонгитудинална гладка мускулатура, изолирани по дължината на ректума, се контрахират в отговор на EFS. Електрически-предизвиканите съкращения достигат най-висока амплитуда от  $27.698 \pm 2.04$  mN ( $n=19$ ) при честота на стимулацията 10 Hz, със статистически значима разлика със съкращенията при 2 Hz ( $16.20 \pm 1.52$  mN;  $t=-4.142$ ;  $p=0.0001$ ; фиг. 3.28). Достоверно по-високоамплитудни са и съкращенията при 5-Hz EFS ( $24.660 \pm 1.18$  mN), в сравнение с тези при 2 Hz ( $t=-3.184$ ;  $p=0.0029$ ).

Контрактилните отговори на лонгитудиналната мускулатура достоверно надвишават тези на гладкомускулните циркуларни пръстени и аналните сфинктери при електрическа стимулация при 2 Hz, 5 Hz и 10 Hz ( $p<0.05$ ).

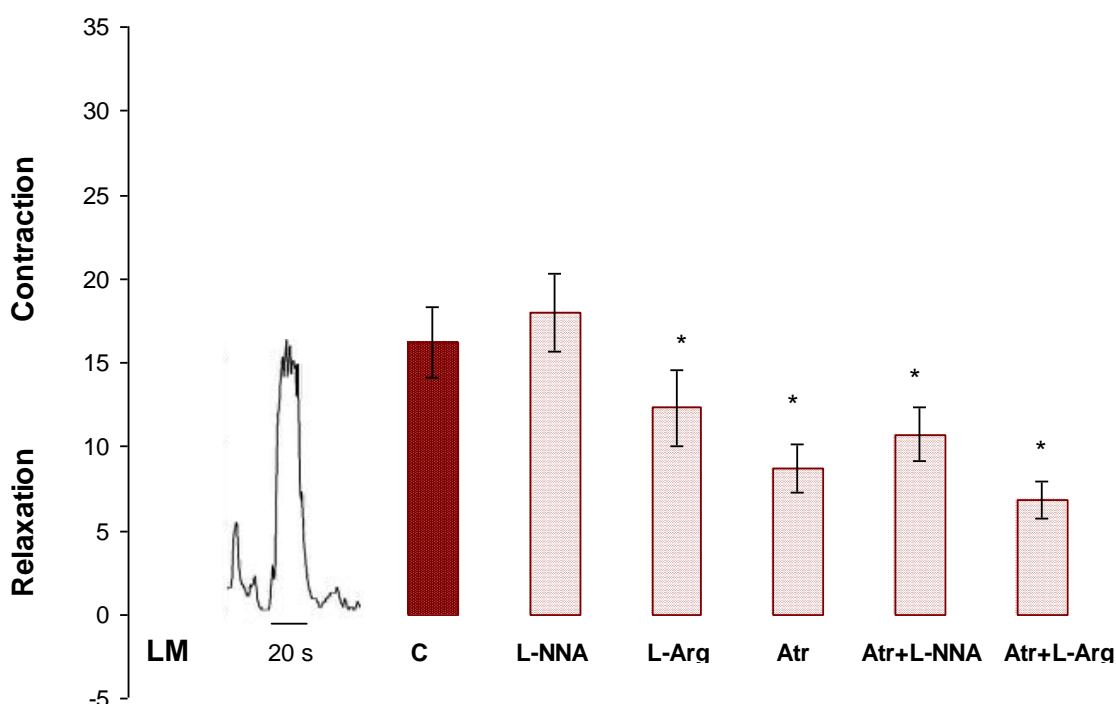


**Фигура 3.28.** Типични механографски записи (A) и хистограми (B), показващи електрически-предизвиканите (0.8 ms, 40 V, 20 s, 2, 5 и 10 Hz) моторни отговори на ивици лонгитудинална мускулатура (L). Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от 19 препаратата. (\*) показва статистически значима разлика в регистрираните амплитуди ( $p<0.05$ )

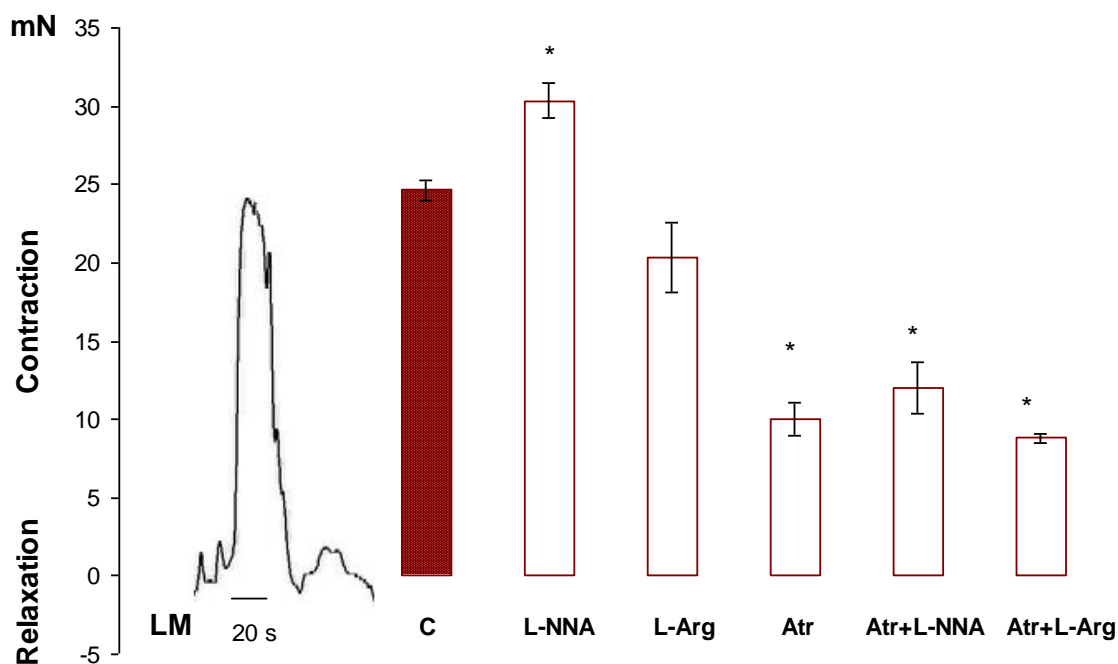
Моторните отговори се увеличават по амплитуда при прилагане на L-NNA

( $18.01 \pm 2.27$  mN/2 Hz;  $30.26 \pm 1.12$  mN/5 Hz и  $33.61 \pm 2.5$  mN/10 Hz) и намаляват при L-arginine ( $12.27 \pm 2.32$  mN/2 Hz;  $20.34 \pm 2.18$  mN/5 Hz и  $21.2 \pm 1.78$  mN/10 Hz), като има статистически значима разлика спрямо контролите при EFS от 5 и 10 Hz ( $n=8$ ,  $p<0.05$ ) (фиг. 3.29, 3.30, 3.31 и табл. 3.5). Процентът на увеличаване на амплитудите на съкратителния отговор при L-NNA е от 11.11% при 2-Hz EFS до 21.29% – при 10-Hz. Потискането на контракциите в присъствие на L-arg се движи между 16.80% и 24.19%, съответно при 2-Hz и 10-Hz стимулация.

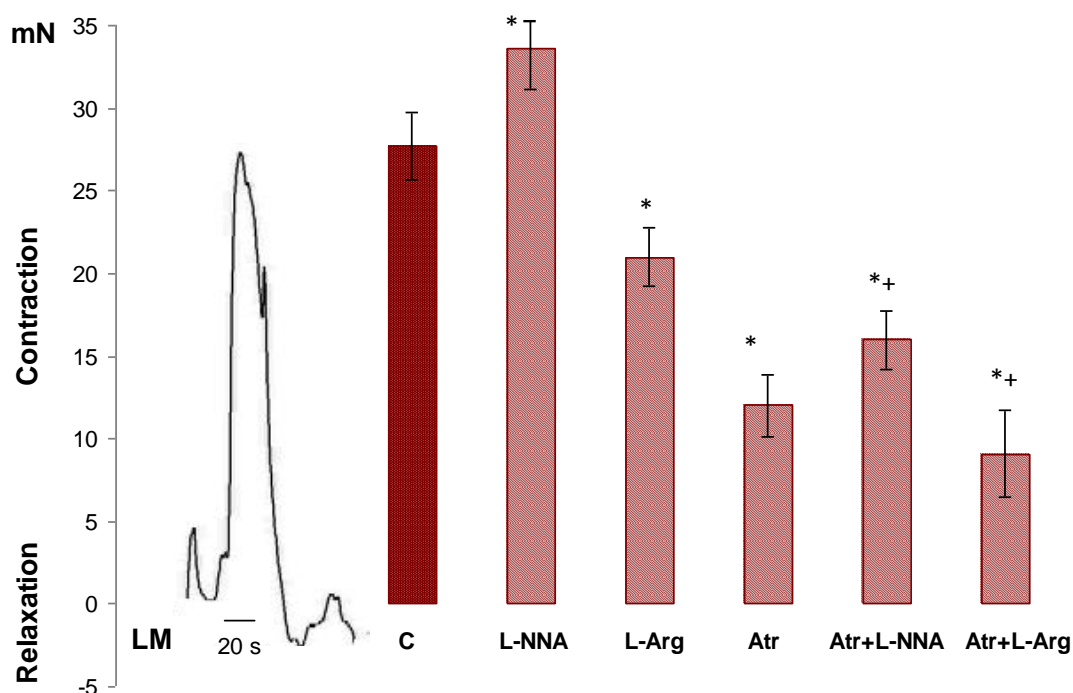
В присъствие на atropine амплитудите на съкращенията се потискат повече от 56% в сравнение с тези при EFS със съответната честота (при 2 Hz –  $8.038 \pm 1.43$  mN; при 5 Hz –  $10.352 \pm 1.08$  mN; при 10 Hz –  $12.03 \pm 1.85$  mN) и промените са статистически значимо по-изразени в сравнение с тези, предизвикани от L-arg. Съкращенията са по-мощни при едновременно въздействие на L-NNA и atropine и по-слаби при L-arg и atropine (при 2 Hz –  $6.81 \pm 1.06$  mN; при 5 Hz –  $8.84 \pm 1.68$  mN; при 10 Hz –  $9.04 \pm 2.6$  mN). Статистически значими разлики се регистрират в амплитудите при съвместното въздействие с холинолитика и нитрергичните субстанции спрямо atropine само при 10-Hz EFS.



**Фигура 3.29.** Моторни отговори на ивици лонгитудинална мускулатура (LM) при EFS (0.8 ms, 40 V, 20 s) с честота 2 Hz. Означения: контролен отговор, EFS (C); в присъствие на: atropine (Atr), L-NNA (L-N) и L-arginine (L-Arg). Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 8 препарата. (\*) показва статистически значима разлика  $p<0.05$  към контролите.



**Фигура 3.30.** Моторни отговори на ивици лонгитудинална мускулатура (LM) при EFS (0.8 ms, 40 V, 20 s) с честота **5 Hz**. Означения: контролен отговор, EFS (C); в присъствие на: atropine (Atr), L-NNA (L-N) и L-arginine (L-Arg). Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 8 препарата. (\*) показва статистически значима разлика  $p < 0.05$  към контролите.



**Фигура 3.31.** Моторни отговори на ивици лонгитудинална мускулатура (LM) при EFS (0.8 ms, 40 V, 20 s) с честота **10 Hz**. Означения: контролен отговор, EFS (C); в присъствие на: atropine (Atr), L-NNA (L-N) и L-arginine (L-Arg). Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 8 препарата. (\*) показва статистически значима разлика  $p < 0.05$  към контролите (+) спрямо atropine.

**Таблица 3.5.** Амплитуди на електрически-предизвиканите моторни отговори на изолирани ивици лонгитудинална мускулатура при въздействие с atropine и/или G-nitro-L-arginine и L-arginine

LM	КОНТРОЛИ EFS	L-NNA 5x10 <sup>-5</sup> M	L-ARG 5X10 <sup>-5</sup> M	ATR 3x10 <sup>-7</sup> M	ATR + L-NNA	ATR + L-ARG	ANOVA тест
2 HZ n=8	M 16.205 SD 5.991 SE 2.117	M 18.015 SD 6.422 SE 2.275	M 12.271 SD 6.143 SE 2.322	M 8.038 SD 4.056 SE 1.434	M 10.734 SD 4.587 SE 1.622	M 6.812 SD 2.994 SE 1.058	EFS КЪМ ВСИЧКИ*
5 HZ n=8	M 24.660 SD 2.890 SE 1.180	M 30.260 SD 2.501 SE 1.118	M 20.340 SD 4.370 SE 2.180	M 10.352 SD 2.432 SE 1.083	M 12.804 SD 2.606 SE 0.683	M 8.844 SD 3.360 SE 1.683	EFS КЪМ ВСИЧКИ* БЕЗ L-ARG*
10 HZ n=8	M 27.698 SD 5.408 SE 2.044	M 33.613 SD 6.127 SE 2.501	M 21.203 SD 3.558 SE 1.779	M 12.026 SD 4.897 SE 1.851	M 16.078 SD 3.936 SE 1.76	M 9.042 SD 4.198 SE 2.599	EFS КЪМ ВСИЧКИ* L-NNA-ARG* L-NNA-ATR* L-NNA-ATR+L-NNA* ARG-ATR-ARG*

Означения: atropine (ATR); G-nitro-L-arginine (L-NNA); L-arginine (L-ARG); ивици лонгитудинална мускулатура (LM). Стойностите на амплитудите са изрезени в mN.

### 3. Моторни отговори в цялостен аноректум

#### 3.1. Спонтанна моторна активност

През периода на адаптация в аноректума се регистрира спонтанна моторна активност, както в лонгитудиналната и циркуларна мускулатура от проксимален ректум, така и в аналния канал и вътрешния анален сфинктер. Спонтанната моторната активност на LM и CM се характеризира с високоамплитудни неритмични съкращения, които възникват обичайно синхронно в двата мускулни слоя. Амплитудите на лонгитудиналния мускулен слой са с по-висока средна стойност –  $6.2 \pm 1.2$  mN (n=12), а на циркуларния –  $5.1 \pm 0.9$  mN (n=12), без статистически значима разлика между тях (p>0.05). Най-мощни са асоциираните с ректалната двигателна активност спонтанни съкращения на аналния канал ( $7.1 \pm 1.6$  mN, n=8).

Не е наблюдавана релаксация в спонтанната двигателна активност във всички области на изолирания аноректум.

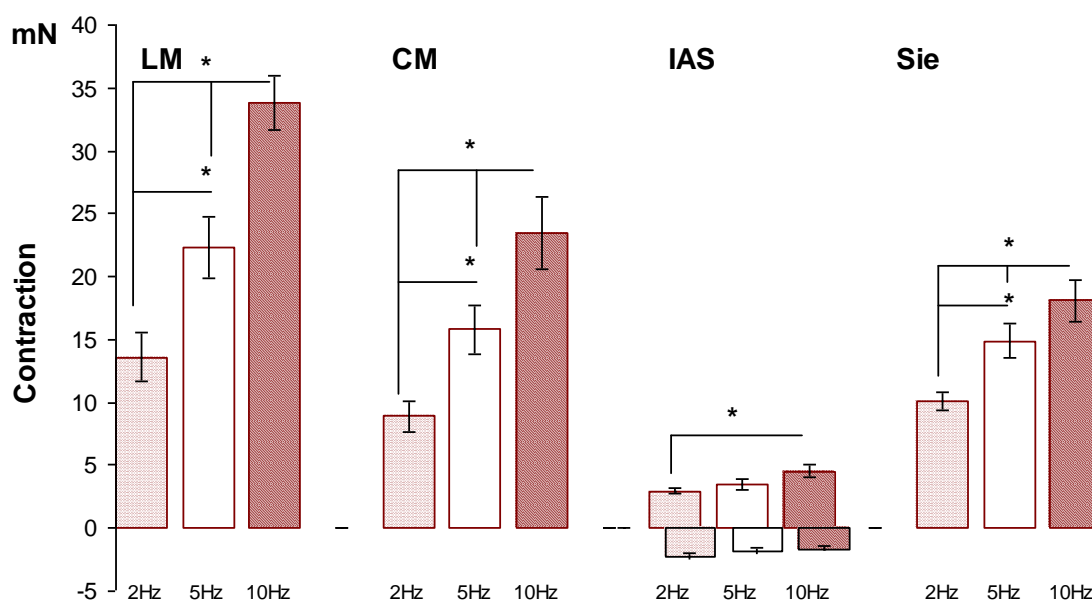
#### 3.2. Локални моторни отговори

Изследвани са електрически-предизвиканите локални моторни отговори на цялостен аноректум от плъх със съхранен анално-сфинктерен комплекс (анатомична цялост на IAS и EAS) и на препарати със съхранен IAS и отстранен EAS. Локалните отговори на циркуларната и лонгитудиналната мускулатура се регистрират при прилагане на електрическа стимулация в оралната камера, а тези на вътрешния сфинктер и аналния канал – в аналната камера.

### 3.2.1. Електрически-предизвикани локални моторни отговори

Локалните отговори на лонгитудиналната и циркуларната мускулатура са едновременно възникващи съкращения. Моторните отговори са тип-пик и са честотно зависими. При 2 Hz амплитудите на контракциите на LM са  $13.6 \pm 1.92$  mN, при 5 Hz –  $22.3 \pm 2.4$  mN, при 10 Hz –  $33.80 \pm 2.18$  mN, а на CM са  $8.88 \pm 1.22$  mN,  $15.81 \pm 1.93$  mN и  $23.48 \pm 2.88$  mN, респективно (Фиг. 3.32, Табл. 3.6). Амплитудите на електрически-предизвиканите съкращения на LM са статистически значимо по-високи от тези на CM при всички прилагани честоти на електрическа стимулация ( $p < 0.05$ ).

Локалният отговор на IAS в цялостен аноректален препарат е двуфазов: начална, краткотрайна контракция, последвана от релаксация, която е по-изразена при електрическа стимулация с честота 2 Hz, а съкращението при 10 Hz ( $p < 0.05$ ). Аналният канал реагира е честотно-зависими по-високоамплитудни съкращения (Фиг. 3.32, Табл. 3.6), намаляващи през периода на стимулация.



**Фигура 3.32.** Локални електрически-предизвикани моторни отговори в аноректум. *Означения:* LM – лонгитудинална мускулатура, CM – циркуларна мускулатура, IAS – вътрешен анален сфинктер, Sie – анален канал. Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 8 препарата. Символите показват: (\*) статистически значима разлика при  $p < 0.05$ .

### 3.2.2. Неадренергични-нехолинергични локални моторни отговори

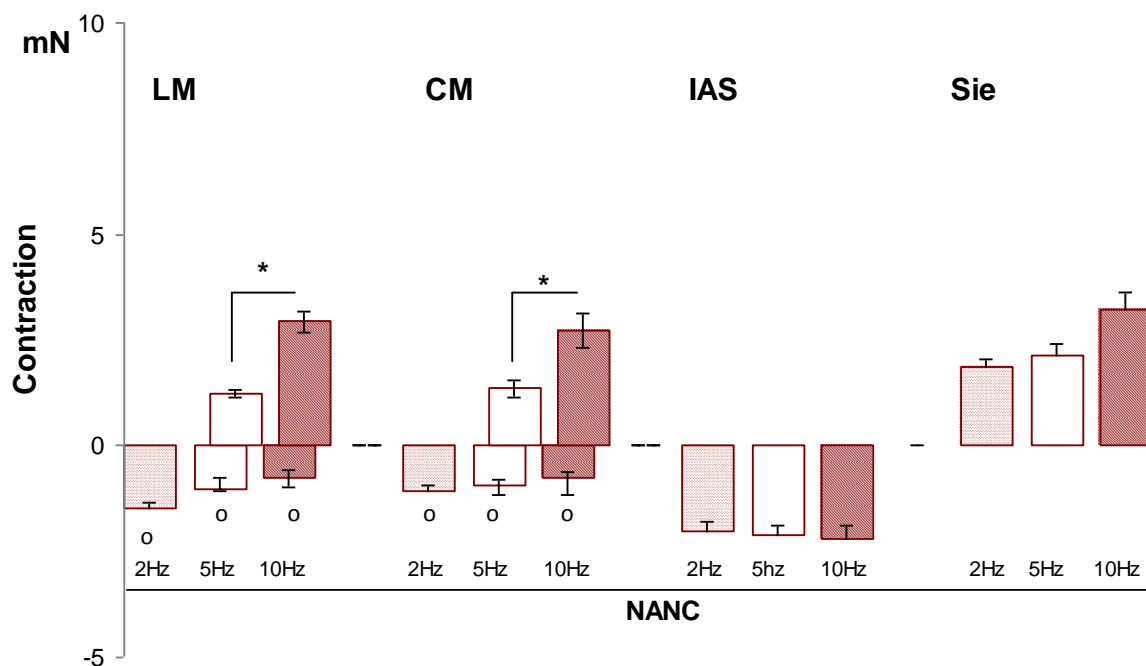
При прибавяне на atropine ( $0.3 \mu\text{M}$ ), propranolol ( $0.1 \mu\text{M}$ ) и prazosin ( $0.1 \mu\text{M}$ ) в органната вана и отчитане на неадренергичните-нехолинергични (NANC) локални отговори се регистрира промяна в типа на моторните отговори. При

електрически стимули с честота 2 Hz реакциите на LM и CM са релаксация, докато при 5 и 10 Hz – двуфазни, релаксация, последвана от съкращение, без статистически зависима разлика в амплитудите, регистрирани от двата мускулни слоя ( $p > 0.05$ ) (Фиг. 3.33; Табл. 3.6). Амплитудите на релаксацията са по-изразени при 2-Hz електрическа стимулация, а на съкращенията – при 10-Hz. Локалните NANC отговори на IAS се променят от двуфазни в релаксация при всички използвани честоти на електрическа стимулация. Тя е по-изразена от релаксацията при локалните електрически-индуцирани отговори. NANC отговорите на аналния канал са статистически значимо по-нискоамплитудни съкращения в сравнение с тези, предизвикани само от EFS ( $p < 0.05$ ) (Фиг. 3.33; Табл. 3.6).

**Таблица 3.6.** Амплитуди на локалните отговори при електрическа полева стимулация и при въздействие с atropine плюс propranolol плюс prazosin (NANC отговори)

EFS	Локални отговори			ANOVA
	2 Hz	5 Hz	10 Hz	LSD тест
LM n=14	13.6±1.92	22.30±2.4	33.80±2.18	2 Hz-5 Hz* 2 Hz -10 Hz* 5 Hz-10 Hz*
CM n=14	8.88±1.22	15.81±1.93	23.48±2.88	2 Hz-5 Hz* 2 Hz -10 Hz* 5 Hz-10 Hz*
IAS n=9	2.97±0.26/ -2.26±0.3	3.46±0.42/ -1.82±0.24	4.56±0.54/ -1.63±0.26	2 Hz -10 Hz*
Sie n=9	10.10±0.73	14.09±1.35	18.10±1.65	2 Hz-5 Hz* 2 Hz -10 Hz* 5 Hz-10 Hz*
<b>NANC локални отговори</b>				
LM n=14	-1.47±0.13	-1.01±0.25/ 1.23±0.08	-0.74±0.18 2.03±0.25	2 Hz-5 Hz* 2 Hz -10 Hz* 5 Hz-10 Hz*
CM n=14	-1.09±0.14	-0.95±0.16/ 1.36±0.21	-0.75±0.15/ 2.71±0.41	2 Hz-5 Hz* 2 Hz -10 Hz* 5 Hz-10 Hz*
IAS n=9	-2.58±0.30	-2.12±0.22	-2.00±0.21	
Sie n=9	1.89±0.16	2.13±0.29	3.23±0.40	

*Означения:* LM – лонгитудинална мускулатура; CM – циркуларна мускулатура; IAS – вътрешен анален сфинктер; Sie – анален канал; NANC отговори – моторни отговори в присъствие на атропин плюс пропранолол плюс празозин в разтвора на Кребс. Стойностите на амплитудите са изрезени като  $m \pm S.E.M.$  в mN.

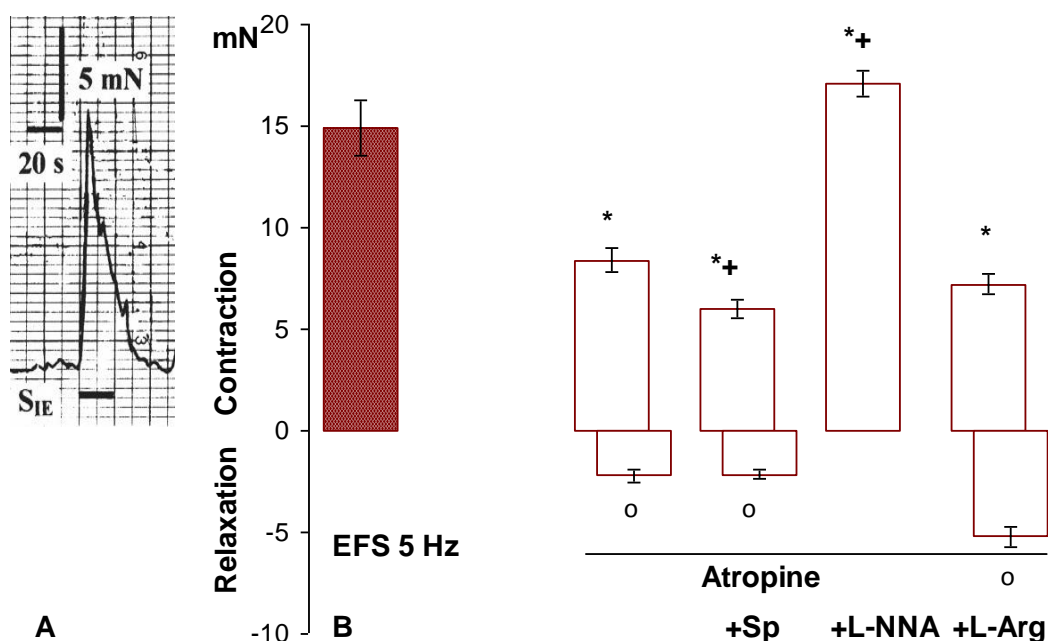


**Фигура 3.33.** Локални електрически-предизвикани неадренергични-нехолинергични (NANC) моторни отговори в аноректум. Означения: LM – лонгитудинална мускулатура, CM – циркулярна мускулатура, IAS – вътрешен анален сфинктер, Sie – анален канал. Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 8 препаратата. Символите показват: (\*) статистически значима разлика при  $p < 0.05$ , и (o) обратен ефект спрямо електрически-предизвиканите локални отговори (не са представени в графиката, виж фиг. 3.32).

### 3.2.3. Локален моторен отговор на анален канал при въздействие с atropine, spantide, L-NNA и L-Arginine

Изследван е локалният моторен отговор на аналния канал (съкращение от  $14.90 \pm 1.35$  mN), предизвикан от електрическа стимулация с честота от 5 Hz в присъствие на atropine, spantide, L-NNA и L-Arginine (Фиг. 3.34). Atropine в концентрация  $0.3 \mu\text{M}$  променя структурата на контрактилния отговор в начално съкращение, последвано от релаксация. Средната стойност на амплитудите на контракцията е  $8.40 \pm 0.6$  mN, ( $n=8$ ,  $p < 0.05$ , в сравнение с електрически-индуцираните локални отговори), а на релаксацията  $-2.20 \pm 0.3$  mN ( $n=8$ ).

Прибавянето на spantide ( $0.1 \mu\text{M}$ ) към препаратите, претретирани с atropine, намалява значително вече потиснатия контрактилен отговор ( $5.02 \pm 0.45$  mN;  $p < 0.05$ ), без да повлиява релаксацията. L-NNA ( $5 \times 10^{-4} \text{M}$ ) преобръща ефекта на atropine в съкращение с амплитуда  $17.1 \pm 0.6$  mN ( $n=8$ ,  $p < 0.05$ ). Електрически-предизвикания локален отговор при добавяне на L-Arg ( $5 \times 10^{-4} \text{M}$ ) към претретирания с atropine разтвор на Кребс слабо повлиява съкращението, но задълбочава релаксацията до  $-5.20 \pm 0.5$  mN ( $n=8$ ,  $p < 0.05$ ).



**Фигура 3.34.** Типичен механографски запис (A) и хистограми (B) на електрически-предизвиканите (0.8 ms, 40 V, 20 s, с честота **5 Hz**) локални моторни отговори на анален канал ( $S_{ie}$ ) при въздействие с atropine, atropine плюс L-NNA и atropine плюс L-arginine. Амплитудите са представени като средна стойност $\pm$ SEM от най-малко 8 препаратата. Символите показват статистически значима разлика  $p < 0.05$  – (\*) към EFS, (+) към atropine и (o) обратен ефект.

### 3.3. Низходящи моторни отговори

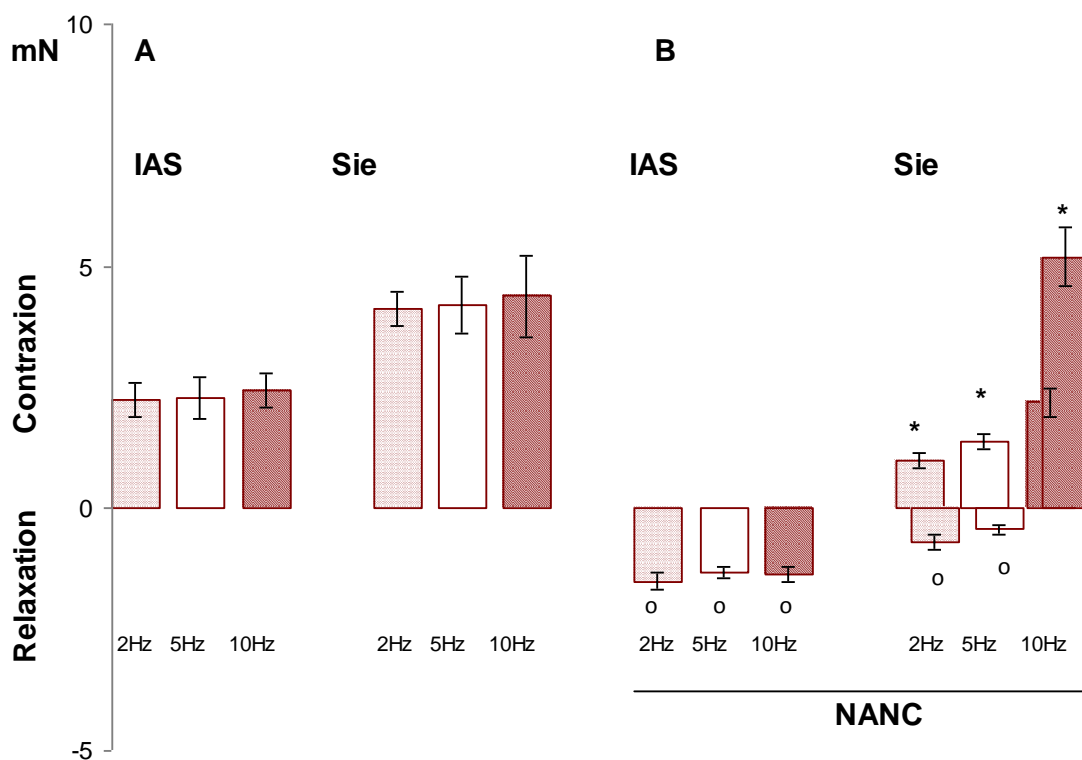
#### 3.3.1. Електрически-предизвикани и неадренергични-нехолинергични низходящи моторни отговори

Моторните отговори на вътрешния анален сфинктер и аналния канал, регистрирани в аналната камера на органната вана, при прилагане на електрическа стимулация в оралната камера се описват като низходящи.

Низходящите моторни отговори на IAS и аналния канал при електрическа стимулация, приложена върху проксималната област на ректума, са съкращения, с по-висока амплитуда при 10 Hz, без значима разлика между 2 Hz, 5 Hz и 10 Hz (Фиг. 3.35; Табл. 3.7). Високоамплитудните фазични осцилации на аналния канал, по време на целия период на стимулация са по-мощни от тези на вътрешния анален сфинктер: при 2 Hz  $4.14 \pm 0.75 \text{ mN}$  и  $2.25 \pm 0.35 \text{ mN}$ ; при 10 Hz  $4.39 \pm 0.85 \text{ mN}$  и  $2.44 \pm 0.32 \text{ mN}$ , респективно ( $p < 0.05$ ).

Низходящите NANC отговори на IAS са противоположни на тези, предизвикани само от EFS – релаксация при електрическа стимулация с прилаганите честоти, без статистически достоверна разлика в регистрираните амплитуди (Фиг. 3.35; Табл. 3.7). Низходящите NANC отговори на аналния

канал са с променена структура: контракция с последваща релаксация при 2-Hz и 5-Hz EFS, като релаксацията е по-изразена при стимулация с честота 2 Hz, а съкращението – при 10 Hz. Статистически значимо са потиснати NANC контракциите на аналния канал в сравнение с низходящите отговори, предизвикани от електрическа стимулация ( $p < 0.05$ ). Неадренергичният-нехолинергичен отговор на аналния канал при стимулация с честота 10 Hz е двукомпонентна контракция, като втората е с по-висока амплитуда.



**Фигура 3.35.** Низходящи електрически-предизвикани (A) и неадренергични нехолинергични (B) моторни отговори в аноректум. *Означения:* IAS – вътрешен анален сфинктер, Sie – анален канал. Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 8 препарата. Символите показват: (\*) статистически значима разлика при  $p < 0.05$ , и (o) обратен ефект

**Таблица 3.7.** Амплитуди на низходящи моторни отговори от аноректм на плъх при електрическа полева стимулация и при въздействие с atropine плюс propranolol плюс prazosin (NANC отговори)

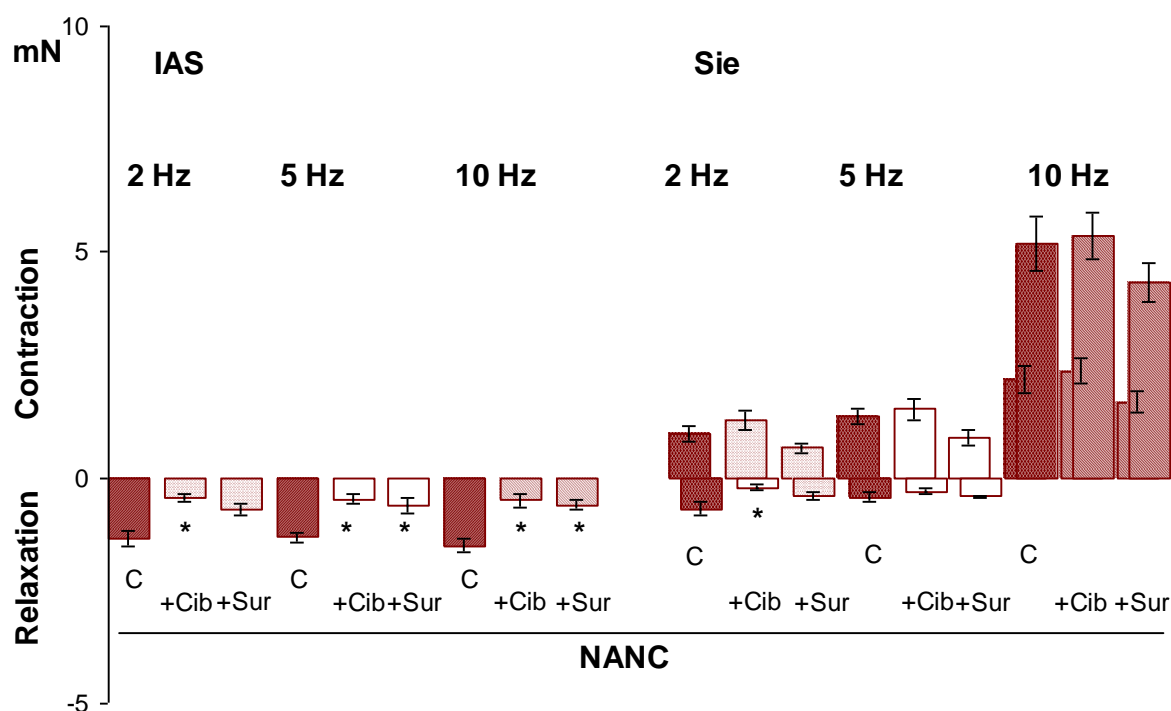
EFS	Низходящи отговори			ANOVA
	2 Hz	5 Hz	10 Hz	LSD тест
IAS n=9	2.25 $\pm$ 0.35	2.28 $\pm$ 0.42	2.44 $\pm$ 0.37	* спрямо съответните NANC
Sie n=9	4.14 $\pm$ 0.75	4.22 $\pm$ 0.59	4.39 $\pm$ 0.86	* спрямо съответните NANC
<b>NANC низходящи отговори</b>				
IAS n=9	-1.36 $\pm$ 0.18	-1.32 $\pm$ 0.11	-1.50 $\pm$ 0.15	* спрямо съответните EFS
Sie n=9	0.98 $\pm$ 0.16/ -0.69 $\pm$ 0.14	1.38 $\pm$ 0.17/ -0.43 $\pm$ 0.11	2.19 $\pm$ 0.30/ 5.19 $\pm$ 0.60	* спрямо съответните EFS

*Означения:* IAS – вътрешен сфинктер; Sie – анален канал. Амплитудите са дадени  $m \pm SEM$  в mN.

### 3.3.2. Низходящи моторни отговори при въздействие с антагонисти на P2-пуринергичните рецептори

Изследвано е въздействието на антагонистите на P2-пуринергичните рецептори cibasron blue (0.01 mM) и suramin (1.0 mM) върху низходящите NANC моторни отговори в аноректум на плъх.

Низходящите NANC моторни отговори на IAS не се променят по структура при въздействие на пуринергичните антагонисти (Фиг. 3.36). Релаксацията на IAS в присъствие на cibasron blue е потисната статистически достоверно до стойности  $-0.45 \pm 0.08$  mN при 2 Hz (66.91%);  $-0.47 \pm 0.11$  mN при 5 Hz (71.97%) и  $-0.50 \pm 0.15$  mN при 10 Hz (66.66%,  $p < 0.05$ ). Suramin потиска релаксацията около 50% сравнено с NANC отговорите до:  $-0.70 \pm 0.12$  mN/2 Hz (48.53%,  $p > 0.05$ ),  $-0.60 \pm 0.17$  mN/5 Hz (54.55%,  $p < 0.05$ ) и  $-0.60 \pm 0.10$  mN/10 Hz (50%,  $p < 0.05$ ).



**Фигура 3.36.** Въздействие на cibasron blue и suramin върху низходящите електрически-предизвикани неадренергични нехолинергични (NANC) моторни отговори в аноректум. Означения: C – NANC отговори; IAS – вътрешен анален сфинктер; Sie – анален канал; Cib – cibasron blue; Sur - suramine. Амплитудите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM от най-малко 8 препаратата. Символите показват: (\*) статистически значима разлика при  $p < 0.05$

Структурата на регистрираните низходящи NANC моторни отговори на аналния канал се запазва при прибавяне на пуринергичните антагонисти (Фиг. 3.36). Cibasron blue увеличава съкратителния отговор с 35.42% при 2 Hz

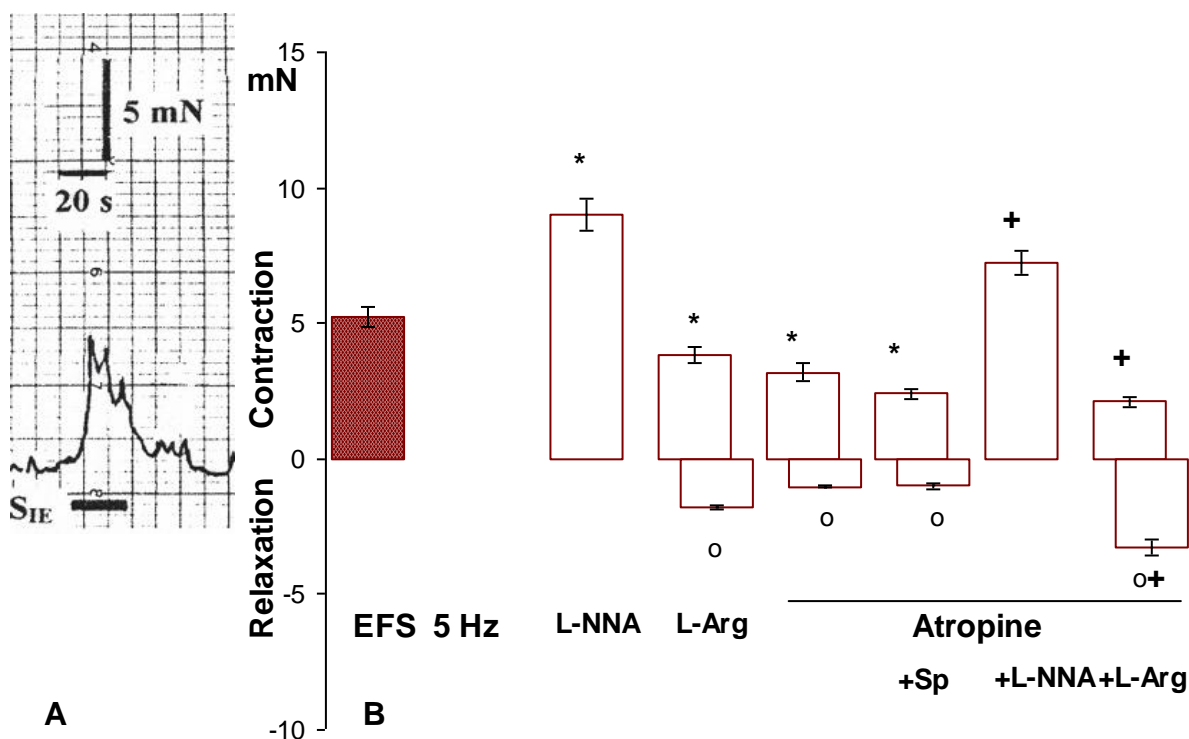
( $1.28 \pm 0.20$  mN); с 14.29% при 5-Hz EFS ( $1.57 \pm 0.24$  mN) и  $2.37 \pm 0.26$  mN и  $5.37 \pm 0.52$  mN/10 Hz) и потиска релаксацията ( $-0.21 \pm 0.07$  mN/2 Hz;  $-0.30 \pm 0.06$  mN/5 Hz), като статистически значима разлика в сравнение с NANC отговорите има само при 2-Hz EFS. Suramin незначително потиска както съкращенията ( $0.66 \pm 0.11$  mN/2 Hz;  $0.90 \pm 0.17$  mN/5 Hz;  $1.68 \pm 0.25$  и  $4.32 \pm 0.42$  mN/10 Hz), така и релаксацията ( $-0.40 \pm 0.08$  mN/2 Hz и  $-0.42 \pm 0.12$  mN/5 Hz).

### **3.3.3. Низходящи моторни отговори на анален канал при въздействие с вещества, повлияващи холинергичната, нитрергичната и тахикининергичната медиация**

Електрическа полева стимулация, приложена в дисталната част на ректума в цялостен аноректален препарат предизвиква низходящ съкратителен отговор на аналния канал, характеризиращ се с фазични осцилации с амплитуди от  $4.42 \pm 0.4$  mN при 2-Hz-EFS,  $5.24 \pm 0.34$  при 5-Hz-EFS и  $8.1 \pm 1.1$  mN при 10-Hz-EFS (n=9). Силата на отговора е честотно-зависима, средните стойности на амплитудите при 10-Hz-EFS са достоверно по-високи от тези при 2 и 5 Hz ( $p < 0.5$ ). Низходящите съкратителни отговори на аналния канал са продължителни, те персистират и след прекъсване на 20-секундната електрическата стимулация (Фиг. 3.37). Амплитудите на представяните низходящите моторни отговори са статистически значимо по-ниски от тези на локалните отговори на аналния канал, но са по-високи от низходящите отговори, индуцирани от електрическа стимулация на проксималната част на аноректума (Табл.3.6; Табл 3.7).

Низходящите моторни отговори на аналния канал, предизвикани от електрическата стимулация с честота 5 Hz се увеличават сигнификантно при прибавяне на L-NNA (0.5 mM). L-arginine (0.5 mM) променя контракциите в отговор, състоящ се начално съкращение, последвано от релаксация с амплитуда  $-1.82 \pm 0.14$  mN (n=8). Предизвиканите от EFS моторни отговори в присъствие на atropine (0.3  $\mu$ M) се състоят от начална по-нискоамплитудна контракция ( $3.2 \pm 0.3$  mN) и последваща релаксация, значително по-слабо изразена от тази на фона на L-arginine ( $-1.02 \pm 0.04$  mN). На фона на atropine, добавянето на тахикининергичния антагонист spantide намалява съкратителния отговор ( $2.42 \pm 0.19$  mN;  $p < 0.05$  спрямо EFS), без значителна промяна в релаксацията. При прибавянето на L-NNA към атропинизирания разтвор на Кребс се регистрира увеличаване на амплитудата на съкращенията до

7.24±0.42 mN (n=8, p<0.05), без последваща релаксация. L-arginine показва обратен ефект – потискане на атропин-инхибираните контракции и значително увеличаване на релаксацията на атропин-чувствителния електрически-индуциран отговор на аналния канал до -3.26±0.28 mN (n=8, p<0.05) (Фиг. 3.37).

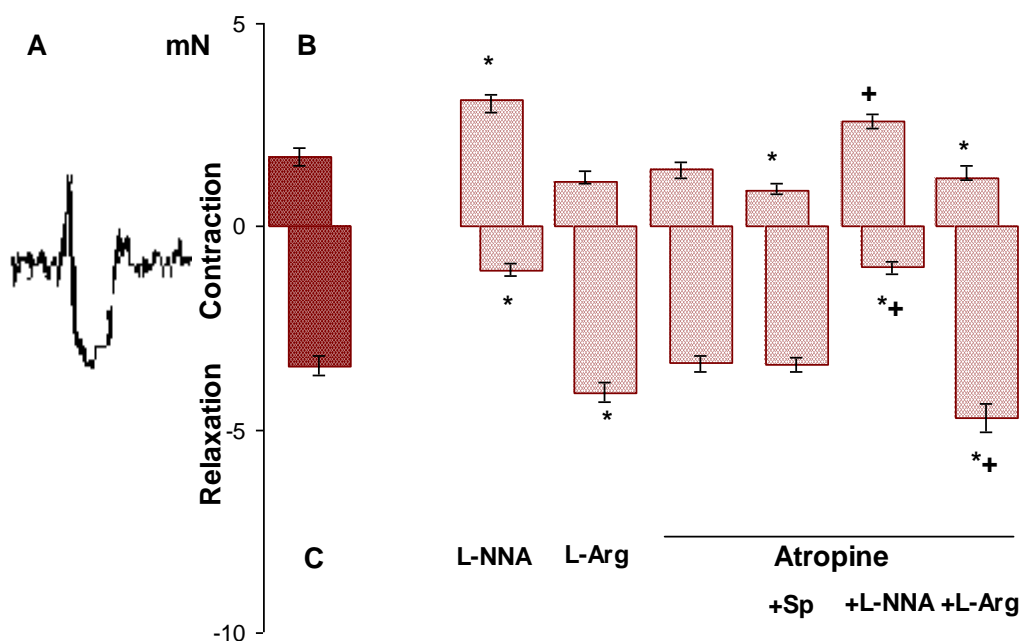


**Фигура 3.37.** Типичен механографски запис (A) и хистограми (B) на електрически-предизвиканите (0.8 ms, 40 V, 20 s, с честота 5 Hz) низходящи моторни отговори на анален канал (S<sub>ie</sub>) в присъствие на atropine, spantide (Sp), L-NNA и L-arginine. Амплитудите са представени като средна стойност ± SEM от най-малко 8 препаратата. Символите показват статистически значима разлика p<0.05 – (\*) спрямо EFS-предизвиканите отговори, (+) спрямо atropine и (o) обратен ефект спрямо EFS-предизвиканите отговори.

### 3.4. Низходящи моторни отговори на анален канал при разтягането на стената на ректума чрез раздуване с балон и въздействие с вещества, повлияващи холинергичната, нитрергичната и тахикининергичната медиация

Разтягането на стената на дисталния ректум, чрез раздуване с балон, на разстояние 3-5 mm от аналния канал предизвиква низходящ моторен отговор на аналния канал, състоящ се от кратка начална контракция, последвана от продължителна дълбока релаксация, продължаваща през 30-секундния период на раздуване на балона. Амплитудите на регистрираните отговори са 1.72±0.20 mN за съкращението и -3.42±0.24 mN за релаксацията (n=8) (Фиг. 3.38). Контракцията е с увеличена амплитуда, а релаксацията е потисната до -

1.06±0.14 mN (n=8, p<0.05) при прибавяне на L-NNA (0.5 mM). L-arg (0.5 mM) намалява съкращението и задълбочава релаксацията до -4.08±0.24 mN (n=8, p<0.05). Началната съкратителна компонента на низходящия моторен отговор, провокиран от разтягане на стената на ректума, се инхибира от atropine (0.3 µM), докато релаксацията не се променя. В присъствие на atropine, spantide (0.1 µM) намалява още амплитудата на атропин-инхибираните отговори. Низходящите отговори се повлияват противоположно от добавянето на L-NNA и L-arg към третирания с atropine разтвор на Кребс: увеличаване на амплитудата на съкращенията до 2.60±mN (n=8, p<0.05) и намаляване на тази на релаксацията до -1.0±0.16 mN (n=8, p<0.05) при добавяне на L-NNA, докато релаксацията се задълбочава до -4.72±0.34 mN (n=8, p<0.05) (Fig.3.38) при прибавяне на L-arginine.



**Фигура 3.38.** Типичен механографски запис (A) и хистограми (B) на низходящи моторни отговори на анален канал ( $S_{ie}$ ), презизвикани от раздуване с балон (контрола, C) и в присъствие на atropine, spantide (Sp), L-NNA и L-arginine. Амплитудите са представени като средна стойност±SEM от най-малко 8 препаратата. Символите показват статистически значима разлика p<0.05 – (\*) спрямо EFS-предизвиканите отговори, (+) спрямо atropine.

#### 4. Ефект на тетродотоксин върху моторните отговори

Не се наблюдават електрически-предизвикани модулаторни моторни отговори на изолираните циркуларни ринг-препарати и ивици лонгитудинална мускулатура от аноректума при третиране с ТТХ в концентрация 0.1 µM (n=4), прибавен към хранителния разтвор в органните вани 10 min преди прилагане на

електрическата стимулация.

При добавяне на ТТХ в оралната или аналната камера не се индуцират локални и десцендентни моторни отговори при прилагане на електрическа стимулация и разтягане на стената на ректума чрез раздуване на балон.

## **5. Морфологични резултати**

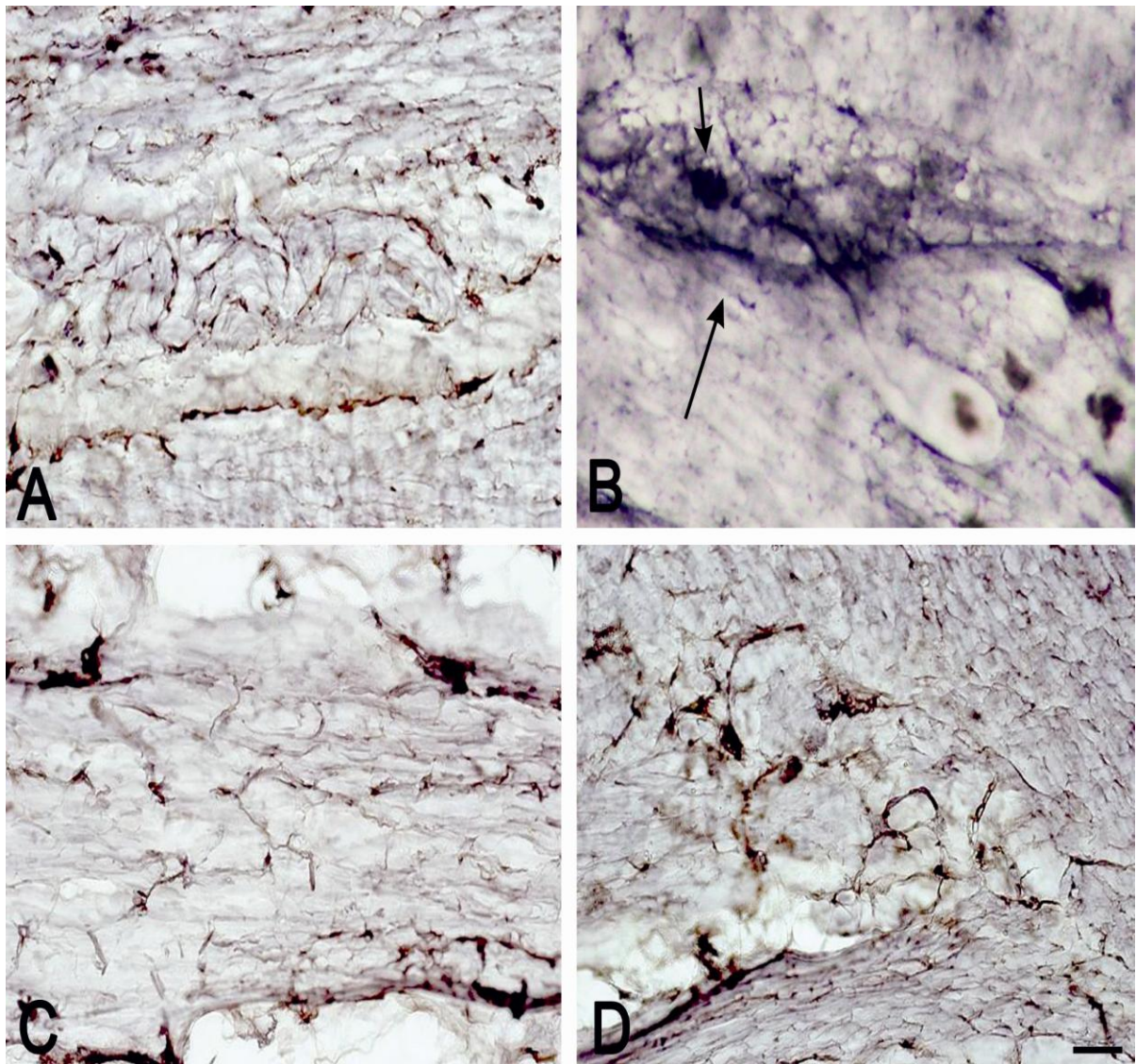
Мускулните слоеве в аноректума на плъх не се различават в морфологичен аспект от тези в другите области на червата и надлъжният мускулен слой е по-тънък от напречния. Миентералният сплит на Auerbach е разположен между двата мускулни слоя и е изграден от телата на миентералните неврони. Мнозинството от миентералните неврони са със средни до големи по размери клетъчни тела, като надлъжният диаметър на перикарионите варира между 45 и 60  $\mu\text{m}$ .

### **5.1. Имунохистохимично изследване за холинацетил-трансфераза**

Имунохистохимичното изследване на миентералните ганглии на ректума показва наличие на множество интензивно оцветени ChAT-имунореактивни варикозни нервни влакна, асоциирани с имунонегативни клетъчни тела на миентерални неврони в областта на дисталния ректум (Фиг. 3.39, A) и по-оскъдни в областта на аналния канал (Фиг. 3.39, D). На Фиг. 3.39, B се визуализират единични позитивни клетъчни тела и множество варикозни нервни влакна, очертаващи миентералния ганглии на нивото на аналния канал. Оскъдни, варикозно нагънати нервни влакна са разпръснати между гладкомускулните влакна на вътрешния анален сфинктер (Фиг. 3.39, C).

### **4.5.2. Имунохистохимично изследване субстанция P**

Имунохистохимичното изследване показва висока плътност на SP-имунореактивни нервни влакна в миентералните ганглии и в интернодалните повлекла. Субстанция P-имунопозитивни варикозни влакна формират гъста мрежа около имунонегативни клетъчни тела на неврони в миентералните ганглии в ректума и аналния канал и единични имунопозитивни перикариони (Фиг. 3.40. A; B, D). В лонгитудиналния и циркуларния мускулни слоеве също се наблюдават SP-имунопозитивни нервни влакна. Обратно, между гладкомускулните клетки на вътрешния анален сфинктер се виждат оскъдни, извити, варикозни, по-слабо оцветени нервни влакна (Фиг. 3.40. C).



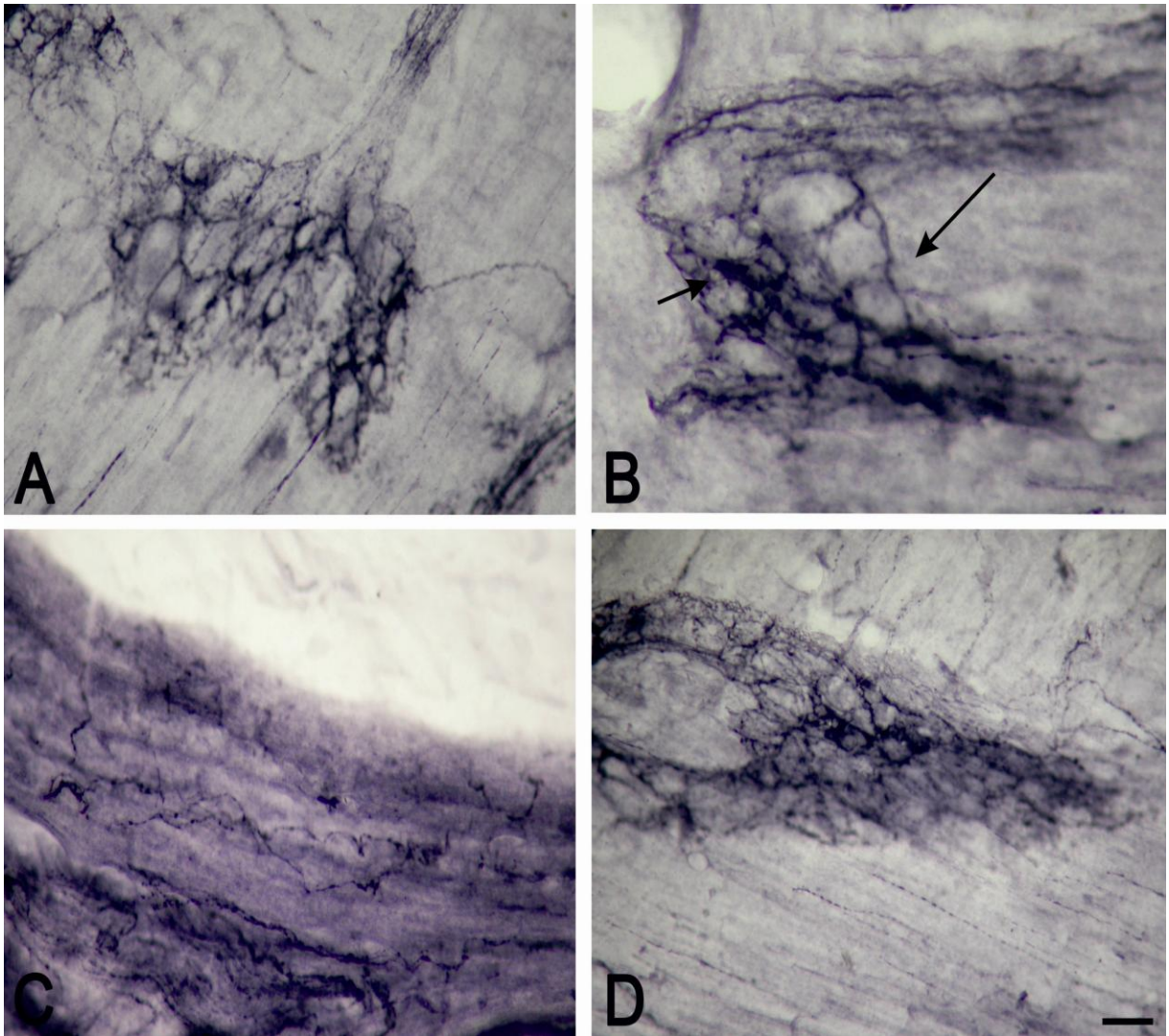
**Фигура 3.39.** ChAT имунохистохимия на аноректум на плъх:

A. Интензивно оцветени нервни влакна, свързани с имунонегативни тела на миентерални неврони в дистален ректум.

B. Голямата стрелка показва миентерален ганглии, а малката – имунопозитивно клеъчно тяло на неврон на ниво анален канал.

C. Окъдни, варикозно нагънати нервни влакна са разпръснати между гладкомускулните влакна на вътрешния анален сфинктер.

D. Оскъдни имунопозитивни нервни влакна, свързани с имунонегативни тела на миентерални неврони в областта на аналния канал. Скала = 100  $\mu\text{m}$  в (A, C, D); 50  $\mu\text{m}$  (B).



**Фигура 3.40.** SP имунореактивност в аноректум на плъх:

A. Имунопозитивни нервни варикозитети формират гъста мрежа около големи имунонегативни тела на миентерални неврони в ректума.

B. Голямата стрелка показва добре очертан от имунопозитивни влакна миентерален ганглии, малката – имунопозитивни перикариони.

C. Между гладкомускулните клетки на вътрешния анален сфинктер се наблюдават оскъдни, варикозни, по-слабо оцветени нервни влакна.

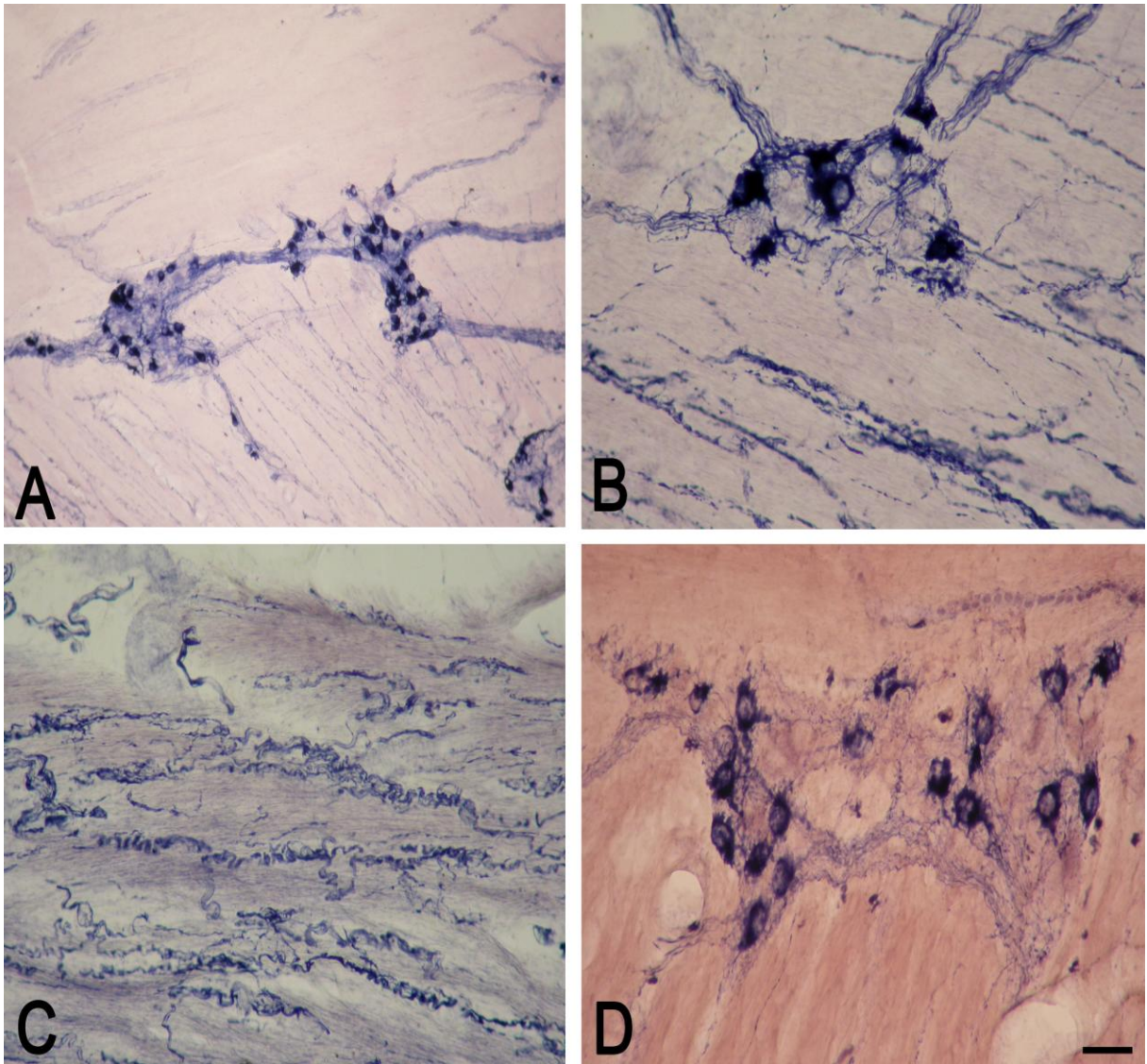
D. Имунопозитивни нервни влакна формират гъста мрежа около имунонегативни тела на миентерални неврони в стената на аналния канал. Скала = 100  $\mu\text{m}$  (C); 50  $\mu\text{m}$  (A-D).

### **5.3. Хистохимично изследване за NADPH-диафораза**

Хистохимичното изследване за NADPH-d показва наличие на позитивни миентерални перикариони в ректума и аналния канал на плъх (Фиг. 3.41, А, В и D). NADPH-d-позитивните неврони са с мултиполарна форма, като добре се визуализира началната част на дендритите (Фиг. 3.41, В и D). Средният брой на реактивните неврони и тяхната оптична плътност в ректума са значително по-ниски от тези в аналния канал. Паралелно на миоцитите в циркуларния мускулен слой са разположени голям брой слабо разширени имунореактивни нервни влакна и малки нервни снопове, докато в лонгитудиналния слой се наблюдават единични нервни влакна (Фиг. 3.41, А). Интензивността на оцветяване на NADPH-d-реактивните нервни влакна във вътрешния анален сфинктер е по-изразена от тази в дисталния ректум (Фиг. 3.41, С).

### **5.4. Имунохистохимично изследване за АТР-синтаза**

Чревната стена на аноректума от плъх показва интензивно оцветяване за АТР синтаза. В миентералния и субмукозния плексус на гладката мускулатура на ректума се наблюдават имунопозитивни ентерални неврони, както и голям брой имунореактивни нервни влакна (Фиг. 3.42, А). Плексусите се състоят от струпване на неврони, чиито перикариони са изпълнени с тъмни натрупвания в резултат на имунохистохимичната реакция (Фиг. 3.42, В). На нивото на аналния канал имунопозитивните нервни влакна в мускулатурата са по-оскъдни, отколкото в останалата част от стената на ректума (Фиг. 3.42, С). В циркуларния мускулен слой обаче, наблюдаваните нервни влакна са по-често дебели и неразширени. В циркуларната мускулатура на вътрешния анален сфинктер АТР-синтаза-позитивните нервните влакна са в изобилие, нагънати и интензивно оцветени (Фиг. 3.42, D).



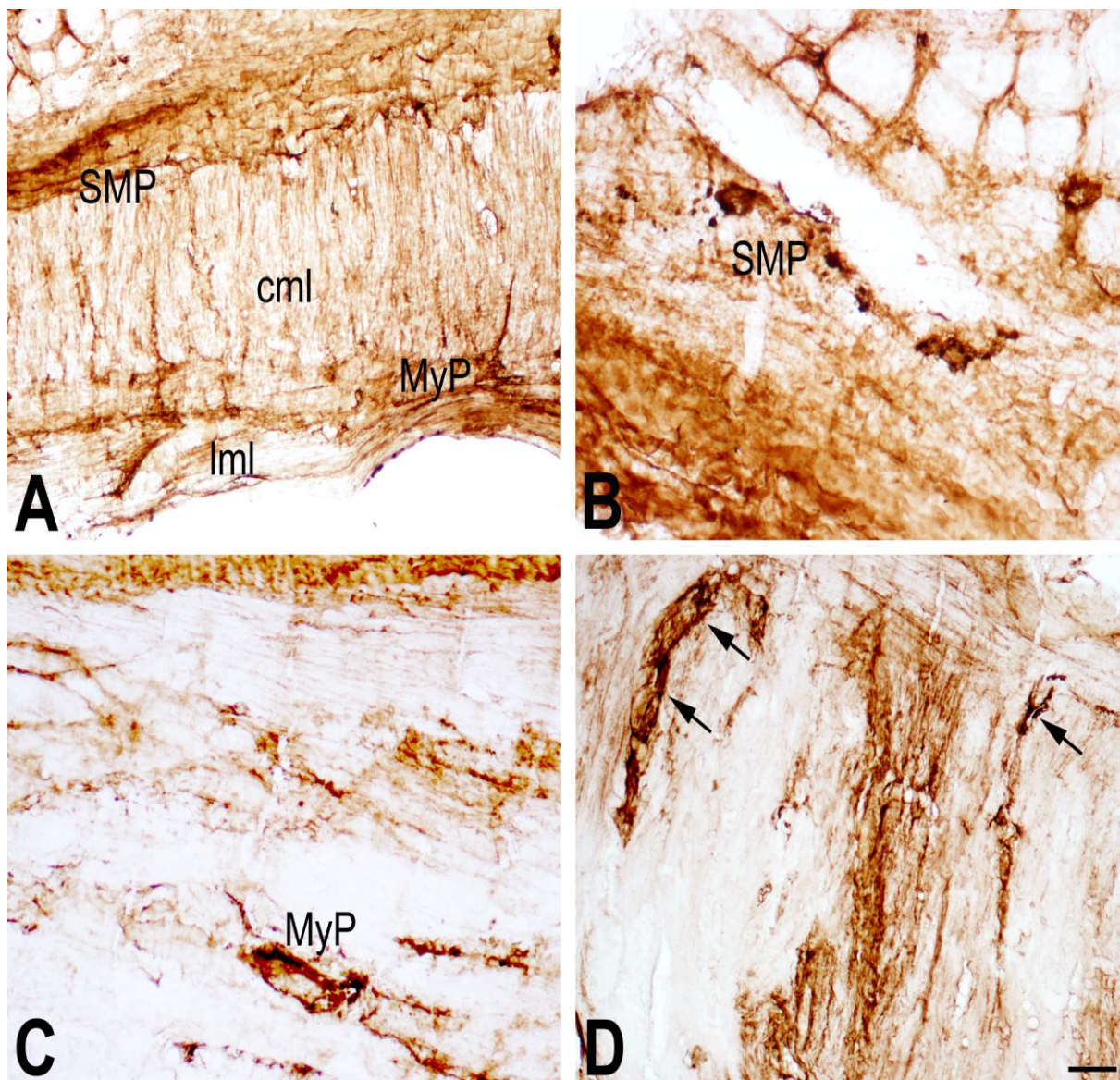
**Фигура 3.41.** NADPH-d-оцветяване в аноректум на плъх:

A. NADPH-d позитивни неврони (депонирали формаза̀н) в миентерален ганглий на ректум. Наблюдават се варикозни влакна в ганглиите и в интернодалните повлекла.

B. NADPH-d позитивни неврони (депонирали формаза̀н) в миентерален ганглий на ректум.

C. Във вътрешния анален сфинктер се наблюдават тънки, интензивно оцветени варикозни нервни влакна между циркуларните гладкомускулни клетки.

D. По-голям средният брой на реактивните неврони и оптичната им плътност в аналния канал. Скала = 100  $\mu\text{m}$  (A и C); 50  $\mu\text{m}$  в (B и D).



**Фигура 3.42.** Фотомикрографии на аноректум на плъх, показващи АТФ-синтазна имунореактивност:

А. АТФ имунореактивност на ректум: в лонгитудиналния (lml) и циркуларния (cml) мускулни слоеве се наблюдават множество позитивни за АТФ-синтаза нервни влакна. В миентералния (MyP) и субмукозния (SMP) сплит се виждат имунореактивни перикариони

В. В субмукозния слой се наблюдават неврони, имунопозитивни за ензима АТФ-синтаза

С. Около миентералните неврони в аналния канал се наблюдават оскъдни имунопозитивни фибри

Д. На нивото на вътрешния анален сфинктер се виждат дебели, нагънати, интензивно оцветени нервни снопове (стрелки) и влакна. Скала = 100  $\mu$ m (А); 50  $\mu$ m (В-Д).

## 6. ОБСЪЖДАНЕ

### 6.1. Експериментални животни и експериментален модел

Експериментите са проведени *in vitro* върху изолирани мускулни препарати и цял аноректум на плъх. Експерименталните модели на животни за изследване на двигателната активност на интестиналния тракт са широко използвани във фундаменталните и клинични изследвания. Малки гризачи, като плъхове, мишки и морски свинчета са най-често използваните животни, докато кучета, порове, котки, зайци, маймуни от вида *Macacus rhesus*, опосуми, овце и свине са по-малко популярни. Идеалният модел трябва да е лесен, евтин, нетрудоемък, да дава възможност за изследване на стимулиране и/или потискане на мотилитета, както и за оценка на лекарство-предизвиканите ефекти и на промените в двигателната активност при генетично модифицирани животни [Merwid-Lad et al., 2009]. Обаче често е доста трудно и непрецизно да се сравняват и екстраполират данните, получени от изследвания при различни видове животни и при различни експериментални условия върху хора.

Въпреки някои различия в анатомията на храносмилателната система между хора и плъхове (липса на жлъчен мехур и апендикс, голям цекум и др.), има съществени морфологичните прилики на микроскопско ниво и двигателната активност е сходна [DeSesso a. Jacobson, 2001]. Мускулни ивици и рингови препарати от дебело черво на хора, кучета и др. не генерират гигантски мигриращи контракции *in vitro* в органични вани, а само тонични и фазични контракции. За разлика от това, циркуларна мускулатура в мускулни ленти и пръстени, както и *ex vivo* сегменти от дебелото черво на плъхове и мишки продължават да генерират гигантски мигриращи контракции [Gonzalez a. Sarna, 2001; Powell et al., 2003]. Тези *in vitro* препарати показват също фазични контракции и тонус. Затова дебелото черво на плъхове може да е отличен модел за изследване на механизмите, обуславящи различните типове двигателна активност. Друга причина за използване на плъхове като обект на експериментални изследвания, е че те са репрезентативен животински вид, с най-добре проучените промени в инервацията на СЧТ по време на развитие, съзряване и стареене [Phillips a. Powley, 2007].

След значимата работа на Magnus върху чревни гладки мускули *in vitro*, датираща от началото на 20 век, съкратителната активност на изолирани препарати от СЧТ се изследва с все по-напреднала техника и усъвършествани

методи. За разлика от *in vivo*, *in vitro* проучванията върху изолирани чревни бримки, сегменти, лонгитудинални или циркуларни мускулни препарати се извършват в органични вани, което позволява да се изследва функцията на мускулите без влияние на други фактори (напр. циркулиращи хормони), като поведението им е много аналогично с тяхния *in vivo* капацитет. Други предимства на тези методи са използване на по-малки групи експериментални животни, както и контролирани и стандартни условия на експеримента [Pozzoli a. Poli, 2010]. Елиминират се спиналните автономни нерви, което дава възможност за проучване на участието на ентералната нервна мрежа в различните видове двигателната активност в СЧТ. Могат да се прилагат вещества, повлияващи мотилитета, както и да се измерва количеството на освободените невротрансмитери. Търсене на локализация на рецептори и рецепторни взаимодействия, изясняване на механизмите на действие прави изследването на *in vitro* препарати оптимален инструмент във физиологичните и фармакологични изследвания. Използването на този подход дава голямо количество информация за мотилитета, но пълното разбиране на двигателното поведение изисква проучвания върху интактни животни и хора, които са ограничени по етични и технически съображения.

## **6.2. Спонтанна моторна активност**

Изолираните гладкомускулни препарати от ректум и аналният канал показват *in vitro* спонтанна моторна активност, състояща се от високочестотни съкращения с малка амплитуда и насложени съкращения с ниска честота и висока амплитуда. Регистрираната спонтанна моторна активност е в съответствие с публикувани данни при морско свинче [Stebbing et al., 1996; Stebbing, 1998], хора [Stebbing, 1998], кучета [Mutafova-Yambolieva et al., 2003], зайци [Kato et al., 2007], плъхове [Radomirov et al., 2009a и 2009b] и др. В литературата е известно, че генерираната от изолирани циркуларни гладкомускулни препарати спонтанна активност се поражда в интерстициалните клетки на Кахал, локализиращи в миентералния и субмукозния плексус [Sanders, 1996; Ward, 2003].

За разлика от гладкомускулните препарати от ректум, вътрешният анален сфинктер и аналният канал показват и устойчив тонус, който е резистентен към тетродотоксин (ТТХ), невротоксин, блокер на потенциал-зависимите бързи натриеви канали в мембраните на нервните клетки. Не се регистрира

намаление на тонуса на IAS, което доказва неговия миогенен характер. Тонусът на вътрешния анален сфинктер се дължи на мембранна електрическа активност – бавни вълни. В повечето интестинални гладки мускули спайк потенциалите са преобладаващ фактор за индуциране на съкращения. Но в гладките мускули на вътрешния анален сфинктер бавните вълни индуцират тонични контракции, без наслаждане на акционни потенциали [Bouvier a. Gonella, 1981]. При покой аналният канал е почти напълно затворен, защото гладката мускулатура на IAS е в състояние на тонична контракция. Приема се, че делът на IAS в поддържане на базалното анално налягане е около 80-85% [Lestar et al., 1989] и е основен фактор, осигуряващ континенцията.

Амплитудите на спонтанните фазични контракции в изолираните циркуларни ринг-препарати се увеличават в анална посока: статистически значимо най-ниски стойности имат Ср в сравнение с Cm и Cd. Регистрираните амплитуди на фазичните спонтанни съкращения на аналният канал са най-големи, както в цялостен аноректум, така и в излирани ринг-препарати са двукратно по-високи от тези в Ср. Мощната съкратителна спонтанна фазична и тонична активност на ринг-препаратите от анален канал, който съдържа *вътрешен (с предимно ентeрална инервация) и външен (със сомато-моторна инервация) анални сфинктери* има значение за поддържане на високото анално налягане и континенцията при покой, което се дължи основно на тоничните съкращения на IAS. *EAS има важна роля във волевия контрол* на дефекацията, при условия на покой неговата роля е по-малка от тази на IAS [Súilleabháin et al., 2001]. Регистрираните спонтанни контракции на аналният канал в цялостен аноректум са най-мощни, което потвърждава ролята му за поддържане на високото анално налягане при покой.

Спонтанните високоамплитудни съкращения на лонгитудиналната и циркуларната мускулатура в цялостен аноректум възникват синхронно, което говори за ко-активация на невроните към двата мускулни слоя. Известно е, че от колона пропагират високоамплитудни съкращения към ректума в резултат на активиране на коло-ректален възбуждащ път [Kraus a. Sarna, 1987; Malcolm a. Camilleri, 2000; Matsufuji a. Yokoyama, 2003]. Обичайно при покой, за поддържане на континенцията, съкратителната активност на ректума се съпровожда с контракция на аналният канал, което показва наличие на възбуждащ ректо-анален рефлекс [Malcolm a. Camilleri, 2000; Matsufuji a. Yokoyama, 2003; Radomirov et al., 2009]. Регистрираните съкращения на

вътрешния анален сфинктер и аналния канал са асоциирани с тези на ректалната гладка мускулатура, което се обяснява с функционирането на този рефлекс. Липсата на релаксация в спонтанната двигателна активност на аноректума най-вероятно се дължи на липсата на фекални пелети и стимул за реализиране на низходящ потискащ рефлексен отговор, както и навлизане на разтвор на Кребс в лумена на аноректума.

### **6.3. Модуларни моторни отговори**

В този раздел се обсъжда двигателната активност на изолираните ринг-препарати от ректум на плъх, като дисплей на електрически-предизвикано стимулиране на локалните модули на ентералните нервните мрежи в аноректума. Няколко са основанията да приемем, че в основата на моторните отговори лежи стимулиране на локалните нервни модули. Spencer и съавт. при електрофизиологично изследване на обсега на разпространение на възбуждащите и инхибиращи постсинаптични потенциали в циркуларна мускулатура от дистален ректум на морско свинче са установили, че проекциите на възбуждащите и потискащи мотоневрони могат максимално да се разпространят до 3 mm [Spencer et al., 2002], а използваните ринг-препарати имат ширина 2 mm. От друга страна се изключва синхронното активиране на възходящи възбуждащи и низходящи потискащи пътища, тъй като според същите автори дължината на препарата трябва да е по-голяма от 7 mm, за да се запази интегритета на интерневроните, необходими за координиране на тези невронални пътища.

*Регистрираните моторни отговори на циркуларните мускулни препарати от ректум, вътрешния анален сфинктер и аналния канал са невrogenни по природата, тъй като те се предотвратяват от ТТХ, блокер на невроналната проводимост.*

Наблюдава се, че функционалните модули [Costa et al., 2000], формирани от изолираните мускулни ринг-препарати, заедно с прилежащите ентерални неврони, отговарят на електрическата полева стимулация. Тези отговори на различните мускулни структури, лежащи в основата на двигателната активност в аноректума по циркуларна ос, могат да се разглеждат като резултат от електрически-индуцирано активиране на невро-невронални и/или невро-мускулни комуникации в модулите, отговорни за локалните мускулни съкращения или релаксация. Ефектите на електрическата стимулация са

следствие от разпространението на акционни потенциали, причинени от локално освобождаване на стимулиращи и/или инхибиращи невротрансмитери [Paton a. Vizi, 1969; Kadlec et al., 1986].

Електрическата стимулация, използвана в представяното изследване, предизвиква съкратителни модулаторни отговори в *циркуларните гладкомускулни пръстени от проксимална, медиална и дистална част на ректума* (фиг. 3.2, 3.3 и 3.4 и табл. 3.1). Увеличаването на честотата на електрическите стимули от 2 Hz до 10 Hz увеличава пропорционално амплитудите на контракциите, без да се променя характера на отговорите (тип „пик“ съкращения). Нарастването на амплитудите при честота 10 Hz в сравнение с 2 Hz е от 130.53% при проксимален до 228.38% при дистален циркуларен препарат. Променените по амплитуда, но не и по вид мускулни съкращения предполагат, че контрактилните отговори се дължат на честотно-зависимо освобождаване на едни и същи невротрансмитери или съвместно освобождаване на ко-трансмитери, чието взаимодействие води до същия отговор. Модуларният отговор на циркуларните мускулни пръстени от дистален ректум превишава този на аналния канал най-вероятно за да се преодолее съпротивлението на аналния канал в процеса на евакуация на ректалното съдържимо.

Амплитудите и видът на модулаторните отговори на *вътрешния анален сфинктер* зависят от честотата на прилаганите електрически стимули (фиг. 3.5 и табл. 3.1). Те варират от дълбока релаксация, продължаваща през целия период на стимулация при 2-Hz EFS, до кратка, нискоамплитудна релаксация, последвана от съкращение при 10-Hz стимулация. Зависимостта на вида на отговорите от честотата на електрическа стимулация показва, че в регулацията на мотилитета на IAS участват честотно-зависими механизми на ентералната нервна регулация. В зависимост от естеството на освободените невротрансмитери, потискащи или възбуждащи, ефектът на електрическата стимулация върху IAS е от релаксация до релаксация, последвана от съкращение. Резултатите показват, че модулаторната нервна мрежа, инервираща вътрешния сфинктер включва нервни пътища, чувствителни към различен тип на възбуждане и освобождаващи ко-локализирани невротрансмитери с разнопосочен ефект. Наблюдаваната електрически-индуцирана релаксация на вътрешния анален сфинктер е в съответствие с описаните в литературата отговори на IAS при морски свинчета и хора [Stebbing 1998], опосум [Rattan et

al., 1993] и мишки [Rattan et al., 2005a]. Cobine и съавт. са описали видово-зависими различия в моторните отговори при електрическа стимулация на IAS в присъствие на атр и N( $\omega$ )-nitro-L-arginine: при маймуни е честотно-зависима (1-30 Hz) контракция, а при зайци и мишки – релаксация [Cobine et al., 2007].

Отговорите на ринг-препаратите от *анален канал*, съдържащи вътрешен и външен анални сфинктери при електрическа полева стимулация са честотно-зависими съкращения (фиг. 3.6 и табл. 3.1). Контракциите са еднотипни, пик-подобни, но по-продължителни и персистират кратко след приключване на стимулацията. При 10-Hz EFS амплитудата нараства със 100% в сравнение с 2-Hz EFS. Получените от експериментите резултати показват, че при електрическа стимулация, въпреки предимно потискащата инервация на вътрешния сфинктер, сумарният ефект, дължащ се на активиране и на външния сфинктер е възбуден. Това предполага, че предимно възбуждащ(и) невротрансмитер(и) доминират и контролират моторната активност на аналния канал като електрически-възбудима невро-мускулна единица. Най-вероятно, във физиологични условия, цялостта на вътрешния и външния анални сфинктери и асоциираните нервни мрежи действат като единен функционален модул, който участва в координирането на двигателната активност на аналния канал.

Откакто Paton през 1955 показва, че електрически стимули могат да предизвикат освобождаване на ацетилхолин от постганглионарните нервни окончания, електрически-индуцираните моторни отговори на изолирани препарати става основен модел за изучаване на освобождаването на невротрансмитерните вещества и на нервно-мускулното предаване. Процесът на отделяне на медиатори зависи както от честотата на приложените електрически стимули, така и от тяхната продължителност. Според Alberts и Stjarne и Kadlec и съавт. с повишаване на честотата на електрическите стимули се увеличава общият броя на ангажираните в отговорите синаптични ваникозитети в сравнение с тези, освобождаващи медиатори при електрическа стимулация с единични импулси [Alberts a. Stjarne, 1982; Kadlec et al., 1986]. В един неврон се съдържат различни вещества с медиаторна функция, които могат да бъдат освободени едновременно като ко-трансмитери, които активират различни рецептори и водят до възбуден и/или инхибиторен ефект [Burnstock, 1976; Su et al., 1971; Bertaccini a. Coruzz, 1987].

Отговорите на циркуларните мускулни пръстени, изолирани от проксимален, медиален и дистален ректум на плъх са еднотипни, тип „пик“ съкращения, които персистират по време на електрическата стимулация. Циркуларните гладкомускулни рингове изолирани от дисталната област на ректума отговарят на EFS с най-високоамплитудни съкращения, сравнени с тези от Ср и См при честота 2, 5 и 10 Hz (фиг. 3.7, 3.8 и 3.9). Нещо повече, всички циркуларни ринг-препарати, които имат по-нискоамплитудни спонтанни фазични контракции, отговарят на електрическата стимулация с по-мощни съкращения, съпоставени с аналния канал (фиг. 3.10 – 3.12 и табл. 3.1). Докато амплитудите на съкращенията на препаратите от Cd превишават с 13.37% тези от проксимален при честота на електрическата стимулация 2 Hz, при 10 Hz тази разлика е 48.55%. При 2 Hz-EFS амплитудата на моторните отговори на Cd е незначително по-висока от тази на аналния канал (с 0,21 mN), разликата се увеличава с повишаване на честотата на електрическите стимули и при 10 Hz-EFS е с 66.66%. Препаратите от *анален канал* показват най-мощна спонтанна активност, но при електрическа стимулация, електрически-предизвиканият отговор, който се получава от синхронната активност на вътрешния анален сфинктер, демонстриращ релаксация и на напречноабраздения външен сфинктер, е по-нискоамплитуден от този на циркуларните мускулни препарати от ректум.

Резултите показват, че в дисталния ректум на плъх съществува гъста възбудна модулаторна нервна мрежа, медираща изразената възбудна моторна активност по циркуларната ос.

Ролята на мускулните слоеве на ректума в мотилитета му не е напълно изяснена и все още има дискусия по отношение на двигателната му функция като проведен или като резервоарен орган [Shafik et al., 2006]. По-скорошни проучвания върху цялостен ректо-анален препарат показват, че спонтанната и предизвиканата от електрическа стимулация контрактилна активност се увеличава от колона към ректума. Релаксация не се наблюдава. Тези резултати демонстрират по-висока контрактилна отколкото релаксираща способност на колоректоаналната туба при плъхове [Radomirov et al., 2006; Brading et al., 2008]. Доминираща съкратителна активност на модулаторните циркуларните мускулни препарати, особено от дисталния аноректум в сравнение с аналния канал и липсата на релаксация е наблюдава в настоящите експерименти. Това показва, че контрактилната потентност на дисталния раздел е необходимо

условие, за да може да се преодолее съпротивата на контрахиращия анален канал в процеса на отделяне на съдържимото в околната среда и подчертава ролята на ректума по-скоро като транзитен, отколкото резервоарен орган.

Резултатите, получени от настоящите експерименти дават основание да се заключи, че възбудната моторната активност, нарастваща в анална посока, превалява в ректума. Във вътрешния анален сфинктер доминира потискаща невротрансмисия. Двигателната активност в различните области на аноректума се регулира от локално преобладаване на стимулиращи или инхибиращи невротрансмитерни системи, което определя цялостта на фазите на процесите на континенция и евакуация.

Модуларните моторни отговори не са описани в достъпната литература, както и участието на различните нервноактивни субстанции в локалните нервни мрежи по циркуларна ос в аноректум на плъх. В представяното проучване са изследвани електрически-предизвиканите модуларни моторни отговори и промените в тях в присъствие на вещества, повлияващи основните невротрансмитерни системи: холинергична, възбуждаща и нитрергична, инхибираща.

Използването на atropine, L-arginine (L-arg) и NG-nitro-L-arginine (L-NNA) в експериментите дава възможност за оценка на холинергичната и нитрергична невротрансмисии в локалните нервни модули, участващи в интергративните мрежи в аноректума на плъх.

*Ацетилхолинът* е главният възбуждащ медиатор, контролиращ функциите на СЧТ: във вагусовите и пелвични преганглионарни неврони, в ентералните интерневрони, ентералните мотоневрони и някои секретомоторни неврони [Schemann et al., 1993; Porter et al., 1996; Galligan, 2004]. Описано е освобождаване на ACh, спонтанно и при електрическа стимулация, от гладкомускулни препарати със съхранен миентерален плексус от илеум на морско свинче [Paton a. Zar, 1968]. Мускаринови антагонисти потискат перисталтиката, но е описана хиосцин- или атропин-резистентна перисталтика [Tonini et al., 1981; Schwörer a. Kilbinger, 1988]. Ацетилхолинът, заедно с тахикинините са основни ко-трансмитери в мотоневроните [Bornstein et al., 2010], но ролята на субстанция P вероятно е по-значима в ентералните сензорни неврони и невро-невроналните синапси [Sang a. Young, 1998]. Моторните отговори в ректума се блокират от мускаринови и неврокининови антагонисти, което показва, че те се предизвикват от освобождаване на

ацетилхолин и тахикинини от ентeралните мотоневрони. Холинергичните отговори се дължат предимно на стимулация на  $M_3$ -рецепторите, тъй като се блокират от селективния  $M_3$  рецепторен антагонист 4-diphenylacetoxy-N-methylpiperidine.  $M_2$ -рецепторите превалят в гладката интестинална мускулатура, но тяхното участие е по-малко и съкращенията се опосредстват предимно от  $M_3$  [Eglen, 2001]. Но въпреки това, проучвания в различни видове експериментални животни и хора, показват синергичен ефект на  $M_2$  и  $M_3$ -рецепторите в контрола на гладкомускулното съкращение [Eglen, 2001; Takeuchi et al., 2007].

Описаните в настоящото проучване електрически-предизвикани моторни отговори в присъствието на неселективния *M*-холинолитик *atropine* [Узунов, 2003; Ламбев и Крушков, 2010; Якимова, 2010] са в съгласие с данните в литературата, че *холинергичната инервация е отговорна за възбуждащи моторни отговори*. Амплитудите на модулаторните моторните отговори се потискат статистически значимо (повече от 40%) от *atropine* във всички *циркуларни гладкомускулни препарати*, изолирани от различните области на ректума, при честота на електрическата стимулация от 2 Hz, 5 Hz и 10 Hz (фиг. 3.13, 3.14 и 3.15 и табл. 3.2, 3.3 и 3.4). Най-изразен потискащ ефект е описан в изолираните препарати от дисталния отдел на ректума, докато в проксималния отдел процентът на инхибиция е по-нисък. При електрическа полева стимулация с честота 2 Hz в присъствие на *atropine* амплитудите на отговорите в проксималните ринг-препарати са потиснати с 44.69%, а в дисталния с 51.51%, при 10 Hz с 41.72% и 53.73%, респективно. Това показва промени във функционалната моторна инервация – *възбуждащата холинергична инервация се увеличава от проксимална към дистална посока*. Най-вероятно в дисталния ректум на плъх съществува по-гъста холинергична възбудна модулаторна нервна мрежа, и/или различни рецепторните популации, които са на разположение за активиране от невротрансмитерите. Атропинът не блокира напълно електрически-индуцираните отговори, наблюдават се атропин-резистентни съкращения, най-вероятно тахикининергични. Tichenor и съавт. също са описали градиент в възбудната инервация в ректум на кучета [Tichenor et al., 2001], като в проксимален ректум  $M_3$ -рецепторният антагонист DAMP блокира моторния отговор 50% и чувствителността към неврокинин 2-рецепторния антагонист GR 94800 е също 50%.

В литературата има категорични доказателства, че *азотният оксид* е основен потискащ неадренергичен-нехолинергичен медиатор в СЧТ [Bult et al., 1990; Li a. Rand, 1989; Rand a. Li, 1995; Barthó a. Lefebvre, 1995; Stebbing et al., 1996]. nNOS се намира в низходящите интерневрони и потискащите моторни неврони, инервиращи интестиналната гладка мускулатура и NO е инхибиращ трансмитер тук [Lecci et al., 2002], участващ в генерирането на комплексната двигателна активност във всички отдели на СЧТ [Lyster et al., 1995; Spencer et al., 1998]. Определянето на точния ефект и място на действие на NO е трудно поради наличие на nNOS в миентералните нервни терминали и миентералните клетъчни тела [Costa et al., 1996]. Ендогенният NO модулира пресинаптично пуринергичната трансмисия [Matsuyama et al., 2003] и увеличава освобождаването на норадреналин от адренергичните неврони [Sotirov a. Parasova, 2000]. Ефектът на NO в миентералния плексус е комплексен, тъй като инхибитори на синтезата и донори на NO имат и стимулиращ и потискащ ефект върху освобождаването на ацетилхолин [Bartho et Lefebvre, 1995]. Все повече са данните в подкрепа на предположението, че азотният оксид участва в нова форма на междуневронни взаимодействия, като инхибира транспортните механизми за моноамини [Kiss a. Vizi, 2001]. Съгласно Vizi (2000) той е идеалният медиатор в механизмите на несинаптичните комуникации. Според Tamura и съавт. (1993) натриевият нитропрусид намалява бавния EPSP в миентералните неврони, докато Dickson и съавт. (2007) доказват, че NO медира инхибиращ синаптичен потенциал в миентералните неврони на морско свинче.

Резултатите от настоящето проучване показват, че веществата действащи върху нитрергичната медиация, повлияват електрически-индуцираните моторни отговори във всички препарати, изолирани от аноректума на плъх.

*L-NNA, конкурентен инхибитор на азотнооксидната синтаза (NOS)* със селективност към невроналната и ендотелната изоформи на ензима, повишава амплитудите на съкратителните отговори или съкратителния компонент на двуфазните моторни отговори, предизвикани от електрическа полева стимулация на изолирани ринг-препарати от аноректум на плъх. L-NNA, блокирайки синтеза на азотен оксид, намалява ендогенното му съдържание. Резултатите са в съгласие с концепцията, че *азотният оксид може да повлияе освобождаването на трансмитери от терминалите на мотоневроните*. Елиминира се потискащото действие на NO върху освобождаването на

ацетилхолин [Barthó a. Lefebvre, 1995; Smith a. McCarron, 1998], което предизвиква повишаване на съкратителната активност на гладката мускулатура от ректума и потискане на релаксацията на вътрешния анален сфинктер в ректоаналната област на морско свинче [Yamanouchi et al., 2002]. Азотнооксид-зависима, субстанция P-медирана невротрансмисия е доказана в тънко черво на морско свинче [Wiklund et al., 1993], така че повишаването на електрически-индуцираните контрактилни модулаторни моторни отговори в аноректум на плъх от L-NNA може да е свързано и с освобождаване на субстанция P. L-NNA увеличава амплитудите на моторните отговори на изолираните ринг-препарати от ректум на плъх, като ефектът е по-изразен при електрическа стимулация с честота 2 Hz и в циркулярна мускулатура от проксимален ректум. При 2-Hz EFS амплитудите на съкращенията в проксималните препарати са увеличени с 35%, в дисталните с 33%, докато при 10 Hz-EFS с 30.33% и 24% респективно.

В присъствие на *L-Arginine*, *прекурсор на азотния оксид*, моторните отговори се повлияват в обратна посока, намалява се съкратителният компонент и се увеличава релаксацията. В циркулярните ринг-препарати от различните области на ректум от плъх L-Arginine намалява амплитудата на моторните отговори. Наблюдава се същата закономерност, както при L-NNA – по-изразен ефект в препаратите от проксимален и медиален ректум в сравнение с тези от дистален (напр. при стимулация с честота 5 Hz амплитудите в Sp, Sm и Cd са намалени с 34.94%, 30.33% и 27.95%; при 10 Hz-EFS съответно с 20.39%, 16.95% и 13.7%). При прибавяне на L-NNA и L-Arginine към атропинизирания разтвор на Кребс, промените са аналогични: L-NNA повишава потиснатите от холинолитика моторни отговори, докато L-Arg още повече ги потиска, но не ги блокира напълно.

Нитрегичните субстанции повлияват съкратителните отговори, характеризиращи *модуларните моторни отговори на ринг-препарати от ректум* при електрическа стимулация, по-изразено в проксималния отдел. По-голямата чувствителност на проксималната част на аноректума към субстанции, повлияващи азотнооксидната трансмисия е най-вероятно отговорна за рецептивната релаксация, чрез която ректумът се адаптира към навлизащите от колона маси, чрез постепенна промяна в напрежението на стената и малко повишение на вътрелуменалното налягане [Abrahamsson, 1983; Desai et al., 1991]. Според Tonini и съавт. именно азотният оксид е

медиаторът осигуряващ комплайнса на циркуларната мускулатура директно и чрез потискащо влияние върху холинергичната инервация [Tonini et al., 2000].

Описаните електрически-предизвикани отговори в циркуларните препарати на ректум от плъх са типични за несфинктерна мускулатура при други животински видове и хора.

От изследваните препарати най-разнообразна активност показва модуларният препарат от *вътрешен анален сфинктер*: с повишаване на честотата на електрическите стимули релаксацията се потиска и се променя до двуфазен отговор (релаксация, последвана от съкращение) при 10 Hz. Веществата, повлияващи нитрергичната медиация имат изразен ефект върху регистрираните моторни отговори: при честота на стимулация 5 Hz моторният отговор в присъствие на L-NNA се превръща в двуфазен: с 63.89% понискоамплитудна релаксация, последвана от контракция, а при L-Arg релаксацията се увеличава със 76.36%. При 10-Hz EFS L-NNA намалява с 60.0% релаксацията и увеличава с 56.96% съкращението, а L-Arg, обратно: релаксацията е по-дълбока с 80.0%, а съкращението е потиснато с 58,48%. В присъствие на atropine амплитудите на потискащите моторни отговори се увеличават, а на съкращението, регистрирано при стимули с честота 10 Hz се потиска. Ефектите на atropine се увеличават при добавяне на L-Arg в разтвора на Кребс: увеличават се релаксиращите моторни отговори и се потискат съкратителните повече от 50%.

Базалният тонус на IAS е първично миогенен. В последните години се натрупват все повече експериментални данни, че симпатикусът няма основна роля върху тонуса, по-скоро има невромодулираща роля, поради комплексния и противоположен ефект на  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  и  $\beta_3$  рецепторите върху сфинктерния тонус [Yamato a. Rattan, 1900; Rattan a. Thatikunta, 1993; Spencer et al., 1999]. Неврохуморални субстанции, като ангиотезин II [Fan et al., 2002] и простагландин  $F_{2\alpha}$  [Cao et al., 2002] осигуряват външни сигнали за базалния тонус на IAS. Базалният тонус и потенциала на покой се контролират основно от NO, докато пурините медиат бавния инхибиращ потенциал чрез P2Y<sub>1</sub> рецепторите, така че ATP може би основно е отговорен за фазичната релаксация, а NO – за продължителната тонична релаксация на IAS при плъхове [Orazo et al., 2011] и свине [Orazo et al., 2009]. Напоследък е доказано участието на субстанция P като възбуждащ медиатор във вътрешния анален сфинктер [Yang et al., 2006]. Обратно, релаксацията на сфинктера е неврогенна

посредством активиране на неадренергични неацетилхолиергични нерви, които освобождават NO, VIP, CO и ATP. Резултатите от настоящото проучване показват, че atropine не инхибира, а задълбочава предизвиканата от електрическата полева стимулация релаксация на вътрешния анален сфинктер, най-вероятно поради демаскиране на неадренергична-нехолинергична инхибираща/и невротрансмисия/и. Съкратителната компонента в отговора на IAS в условията на блокирана холинергична и азотнооксидна медиация може да се обясни с дезинхибиция на симпатикова [Matsufuji et al., 1998; 2003; Cobine et al., 2007] и тахикининергична трансмисия [Yang et al., 2006].

Поради наличието на спонтанен тонус, IAS е отличен модел за проучване на естеството на инхибиращата невротрансмисия за NANC релаксация. Експерименти показват, че в IAS на плъхове, хора, осопуми, свине, котки и зайци NANC релаксацията в значителна степен е NO-зависима, а при мишки CO-зависима [Rattan et al., 2004]. Резултатите от изследването потвърждават данните от литературата, *че азотният оксид е основен потискащ медиатор във вътрешния анален сфинктер в различни животински видове и хора* [Penninckx et al., 1992; Rattan et Chakder, 1992; Rattan et al., 1992; Stebbing, 1998; Kato et al., 2007]. L-NNA не потиска напълно релаксацията моторен отговор, което е доказателство, че инхибиращата трансмисия е комплексна, с участие на невротрансмитери като вазоактивен интестинален пептид [Chakder a. Rattan, 1996], PACAP [Chakder a. Rattan, 1998] ATP и CO [Rattan a. Chakder, 1993] както и взаимодействия между тях.

Въпреки нарастващия брой изследвания относно взаимодействията между възбуждащите и потискащи невротрансмитери в аналната област, все още те не са достатъчно проучени и добре изяснени [Nagano et al. 2004]. Това се усложнява и от факта, че съществуват междувидови различия. При изследване на възбуждащата моторна инервация на вътрешния анален сфинктер при маймуни, зайци и мишки са описани видове специфични разлики. При маймуни електрическата стимулация (с честота от 1 до 30 Hz) и норадреналинът на фона на холинолитик и N(omega)-nitro-L-arginine предизвикват контракция на IAS, докато при зайци и мишки ефектите са обратни [Cobine et al., 2007]. Това определя функционалното значение на симпатиковата инервация чрез  $\alpha$ -адренергични рецептори в IAS на маймуни. Значителни междувидови различия са описани за ефектите на мускариновите агонисти (ацетилхоли, бетанехол и

карбахол) и антагонисти [Fan et al., 2002; Rattan, 2005]. При морски свинчета [Stebbing, 1998], кучета [Matsufuji a. Yokoyama, 2003], маймуни [Cobine, 2007] и хора [Speakman et al., 1992] е описана релаксация на IAS при електрическа стимулация в присъствие на холиномиметици. При изследване на възбудната медиация в ректоаналната област Cobine и съавт. са описали разлики при маймуни и мишки: симпатикова в IAS на маймуни и холинергична в IAS на мишки и ректум на маймуни и мишки [Cobine, 2007]. Релаксацията на IAS в присъствие на холинергични субстанции най-вероятно се дължи на доминиране на ефектите на неадренергични-нехолинергични инхибиращи неврони в тоничната гладка мускулатура [Rattan, 2005]. Съкращения са описани при мишки [Chakder et al., 1997] и опосум [Fan et al., 2001]. Adebajo и съавт. при изследване на потискащата медиация във вътрешния анален сфинктер при различни експериментални животни са отхвърлили идеята, че ацетилхолинът е инхибиращ невротрансмитер поради няколко причини: електрическа стимулация с честота 10 Hz, в присъствие на ацетилхолин предизвиква контрактилен ефект, персистирание на неврогенната електрически-индуцирана релаксация при добавяне на atropine и липсата на потенциране на атропин-резистентната релаксация от физостигмин [Adebajo et al., 1975]. Nissan и съавт. през 1984 са установили, че мускаринови холиномиметици контрахират IAS на плъх, което се антагонизира от холинолитици, а бета-адренергичните миметици и ATP го релаксират, което се блокира от бета-адренергични блокери и апамин [Nissan et al., 1984]. Tomita и съавт. описват функционални различия в двигателното поведение на рингове от проксималната и дисталната част на човешки вътрешния анален сфинктер при EFS. Отговорите на дисталния ринг са съкращения, предизвикани от възбудни ентэрални неврони, главно холинергични. Предизвиканият от EFS релаксиращ отговор на проксималната част се дължи на активиране на NANC ентэрални инхибиторни неврони [Tomita et al., 2008].

В литературата липсват експериментални данни за двигателното поведение на препарати от *анален канал* на плъх, съдържащ анатомично съхранени вътрешен и външен анални сфинктери. При покой аналният канал е затворен, поради сумарния ефект от високия тонус на вътрешния анален сфинктер и скелетните мускули: външен анален сфинктер, levator ani и ruborectalis, а релаксация започва в синхрон с повишаване на ректалното налягане и при дефекация. Това се дължи на координацията между

активирания от миентералния плексус ректо-анален рефлекс и активиране на спинални автономни пътища към ректума и вътрешния анален сфинктер и на соматични към външния анален сфинктер [Bharucha, 2006; Bajwa a. Emmanuel, 2009; Barleben a. Mills, 2010]. EAS е скелетен мускул, съставен от миофибрили с бавна и бърза съкратимост, със сомато-моторна инервация от пудендалните нерви. Електрическата полева стимулация на препарата от анален канал, показва отговор, който е резултат от неврогенната стимулация на напречноабраздения външен анален канал (където холинергичните рецептори са никотинови) и гладкомускулния вътрешен анален сфинктер. При електрическа стимулация с различна честота реакцията на аналния канал е честотно-зависимо съкращение. Нитрергичните субстанции повлияват отговора на аналния канал: L-NNA увеличава амплитудите на контракциите, а L-Arg провокира релаксация и намалява контракциите, както приложени самостоятелно, така и на фона на atropine. Тези ефекти се дължат не само на директни ефекти на азотния оксид върху гладката мускулатура, но и на сложни взаимодействия върху медиаторните системи. Известно е, че при модифицирани мишки с липса на  $M_3$ -рецептори се регистрира релаксация на стомашната гладка мускулатура, чрез влияние върху пресинаптичните  $M_1$ -рецептори по механизъм, медиран от NO [Moro et al., 2005]. От друга страна, потискащият ефект на atropine върху регистрираните отговори може да е резултат от дискутирания по-горе ефект върху гладкомускулния вътрешен сфинктер и модулиращия ефект върху пресинаптичното освобождаване на ацетилхолин в невро-мускулната плочка, главно чрез въздействие върху пресинаптичните  $M_1$ -рецептори [Lambrecht et al., 1999; Santafe et al., 2006]. Отдавна е известно, че atropine, без да е антагонист на ацетилхолина за никотиновите рецептори повлиява невро-мускулната трансмисия в инервирани и денервирани скелетни мускули от базайници [Feith, 1977], като намалява йонния поток и амплитудата на предизвикания акционен потенциал в нервно-мускулната плочица. Този ефект е много по-слабо изразен в сравнение с курарин (100 пъти при *m. sartorius* на жаба и 2000 пъти при диафрагма на плъх) [Beranek a. Vysskouj], 1967; 1968].

Може да се обобщи, че съществува различие в модулаторните възбуждащи и потискащи невротрансмитерни системи по циркуларна ос в аноректум на плъх, лежащи в основата на цялостта и последователността на процесите на континенция и пропульсия. Холинергичната стимулираща невротрансмисия е по-

изразена в нервните модули, инервиращи циркулярната мускулатура в ректума, по-изразено в дисталната област. Нитрергичната потискаща невротрансмисия, представена в целия аноректум, има водещо значение в локалните нервни модули, контролиращи аналния сфинктерен комплекс.

#### **6.4. Моторни отговори на ивици лонгитудинална мускулатура**

Електрически-индуцираните моторни отговори на ивици лонгитудинална мускулатура са изследвани за да се съпостави двигателната им активност с тази на изолираните по циркулярна ос модулари препарати от аноректум на плъх. Ролята на циркулярната мускулатура в осъществяването на перисталтичния рефлекс е изяснена, докато двигателната активност на лонгитудиналната все още е неясна. В литературата има противоречиви данни относно синхронната активност на циркулярната и лонгитудиналната мускулатура, което вероятно се дължи на различните експериментални методи, използвани от авторите [Smith a. Robertson, 1998; Grider, 2003].

Препаратите от лонгитудинална мускулатура не развиват спонтанен тонус, а спонтанните фазичните контракции са по-чести от тези, сравнени с циркулярната мускулатура (фиг. 3.1). Това се обяснява с факта, че бавните вълни в лонгитудиналната мускулатура предизвикват акционни потенциали по-често, отколкото в циркулярната [McKirdy et al., 2004]. Амплитудите на електрически-индуцираните отговори на ивиците от лонгитудинална мускулатура са статистически значимо по-големи от тези на циркулярната при всички използвани честоти на електрическите импулси (табл. 3.5) и се увеличават пропорционално с повишаване на честотата на електрическата стимулация (фиг. 3.28). Съкращенията се потискат повече от 54% при прибавяне на атр в разтвора на Кребс ( $p < 0.05$  спрямо контролите), докато чувствителността към нитрергичните субстанции е по-малка (L-NNA ги увеличава от 11.11% при 2 Hz до 21.29% при 10 Hz, а L-arg ги потиска с 16.80% и 24.19%) (фиг. 3.29 – 3.31 и табл. 3.5).

Лонгитудиналната и циркулярната мускулатура се инервират от различни популации мотоневрони [Smith et al., 1992]. В дебелотп черво и двата му слоя получават и възбуждаща и потискаща инервация, което показва, че те функционират независимо един от друг [Smith a. Sanders, 1995]. Maselli и съавт. при изследване на фармако-механичното куплиране на carbachol и VIP в изолирани ивици лонгитудинална и циркулярна мускулатура от различни

области на дебело черво на хора описват различна чувствителност към холиномиметика, а също така и регионални разлики [Maselli et al., 2011]. Трябва да се отбележи, че в червата на морски свинчета и плъхове 10% от миентералните неврони инервират лонгитудиналната мускулатура и са холинергични и тахикининергични и 10% от мотоневроните към лонгитудиналната мускулатура са само холинергични [Brookes a. Costa, 2002]. Инхибиращите мотоневрони към лонгитудиналната мускулатура са само 3% от мотоневроните, така че съкращенията се опосредстват от активиране на възбудните холинергични/тахикининергични мотоневрони, а релаксацията главно чрез намаляване на активността на тези неврони. Това обяснява резултатите от настоящето проучване, че съкращенията се инхибират значително от холинолитика, а чувствителността към нитрергичните вещества е по-слабо изразена. При използваните честоти на електрическа стимулация отговорът на вътрешния анален сфинктер е неадренергична и нехолинергична релаксация, докато този на лонгитудиналната ивица е контракция, значително зависима от холинергична инервация. Такива резултати са описани и от Orazo и съавт. при сравняване на функциите на лонгитудиналните мускули и вътрешния анален сфинктер при прасета [Orazo et al., 2009]. В областта на аналния канал, между двата сфинктера пропагира лонгитудиналния слой от ректума, разсейвайки се в тях, в пуборекталните мускули и фиброеластичния компонент [Lunniss a. Phillips, 1992]. При съкращение на така фиксираната лонгитудинална мускулатура и едновременната релаксация на вътрешния сфинктер, аналният канал се отваря и скъсява в процеса на евакуация.

### **6.5. Моторни отговори в цялостен аноректум**

За изследване на локалните моторни и рефлексни отговори на изолиран аноректум от плъх е използвана двукамерна органна вана – модификация на метода на многокамерна органна вана по Ivancheva и Radomirov, 2001. С въвеждането на метода на трикамерната органна вана от Tonini и Costa значително се подпомага изучаването на невротрансмитерите в специфични синапси в невронните мрежи [Tonini a. Costa, 1981]. Преградите на камерите разделят разтворите, с които се обливат отделните части на препарата. Циркулиращите хранителни разтвори могат да съдържат различни фармакологично-активни субстанции и фармакологията на предаване във всеки регион може да бъде отделно изследвана. От друга страна, различните

области на препарата могат да бъдат независимо стимулирани, да се регистрират локалните моторни отговори, както и проведените рефлексни отговори в орална и/или анална посока. Антагонисти или агонисти могат поотделно да се прилагат в камерата, където се извършва стимулацията или регистрацията на отговорите, а също така и в средната част, където се повлиява само предаването по интерневронни пътища, възбудени от приложения стимул.

Използваната в настоящото изследване двукамерна органна вана позволява едновременно регистриране на моторните отговори от ректума и аналната част на препаратите от аноректум на плъх. Това позволява да се сравнят локалните отговори и низходящи моторни отговори, предизвикани от активирането на невронните пътища, участващи в интегративните невронални вериги в ано-ректалната област, както и ефектите при въздействие със субстанции, повлияващи невротрансмитерните системи.

Представяните електрически-индуцирани локални и десцендентни моторни отговори, както и десцендентният отговор на аналния канал, предизвикан от разтягане на стената в дисталната област на ректума са невrogenни по природа, защото се предотвратяват от блокера на невроналната проводимост – тетродотоксин.

### **6.5.1. Локални моторни отговори**

Локалните електрически-предизвикани отговори на *лонгитудиналната и циркуларната мускулатура* от проксималната област на ректума са синхронни съкращения, тип „пик” (фиг. 3.32 и табл. 3.6). Средните стойности на амплитудите им нарастват пропорционално с повишаване на честотата на прилаганите електрически стимули от 2 Hz до 10 Hz: при LM амплитудите се увеличават със 146.42%, при CM – със 165.31%. и при анален канал – със 79.20%. Локалните моторни отговори са следствие от разпространение на акционен потенциал, водещ до локално отделяне на невротрансмитери, които могат да имат стимулиращ и/или потискащ ефект [Paton a. Vizi 1969; Kadlec et al., 1986]. Увеличаването на амплитудите на моторните отговори може да бъде обяснено, че с повишаване на честотата на електрическите стимули се увеличават ангажираните в отговорите структури [Alberts a. Stjarne, 1982; Kadlec et al., 1986], освобождаващи най-вероятно едни и същи невротрансмитери. Лонгитудиналната и циркуларната мускулатура се съкращават синхронно при

локална електрическа стимулация. Това категорично показва, че локални възбуждащи мотоневрони в LM и CM получават почти едновременно бързи възбуждащи постсинаптични потенциали [Smith et al., 1999] и генерират синхронни контракции в двата мускулни слоя при локална стимулация. Многобройни са проучванията върху двигателното поведение на LM и CM в осъществяването на перисталтичния рефлекс, провеждани главно върху тънко и дебело черво на морско свинче. Smith и McCarron [1998], Smith и Robertson [1996] са описали едновременно съкращение в орална посока и релаксация в дистална и на двата мускулни слоя в сегмент от колон на морско свинче, в съответствие със „закона на червата”. Spencer и колектив са регистрирали съкращения в орална и анална посока на двата мускулни слоя в сегмент от илеум от морско свинче [Spencer et al., 1999]. Реципрочна активност на лонгитудиналната и циркуларна гладка мускулатура в плосък препарат на колон от плъх е описана от Grider (2003): за разлика от циркуларната мускулатура, лонгитудиналната се контрахира през десцендентната фаза и се релаксира през асцендентната фаза. Различните резултати най-вероятно се дължат на използваните методи, препарати и различните стимули, провокиращи перисталтичен рефлекс: стимулиране на чревната мукоза, разтягане на препарата в циркулярна посока, използване на перисталтичен апарат. Описаните в представеното и предходно [Radomirov et al., 2009] проучвания синхронни съкратителни моторни отговори на двата мускулни слоя са индуцирани с електрическа стимулация, а не чрез ангажиране на механорецептори.

Получените резултати от изследването на локалните моторни електрически-индуцирани отговори в цялостен препарат от аноректум на плъх са твърде сходни с тези на модулаторните моторни отговори в ринг-препарати от циркуларна мускулатура и анален канал, както и в ивици от лонгитудинална мускулатура: еднотипни, честотно-зависими съкращения, статистически значимо по-високи в лонгитудиналната мускулатура при всички прилагани честоти на електрическа стимулация ( $p < 0.05$ ), по-мощни контракции в циркуларната и лонгитудиналната мускулатура от тези на аналния канал. Това вероятно е свързано с тяхната функционална активност. Локалните моторни отговори на гладката мускулатура от ректума превишават тези на аналния канал, илюстрирайки способността му да преодолее съпротивлението на аналния канал при евакуацията на ректалното съдържимо. Докато дебелото

черво има основна функция по-скоро като резервоар на фекалните маси, функцията на ректума като транзитен или резервоарен орган е все още въпрос на дискусия. Преобладаването на релаксиращите или съкратителните отговори в ректо-аналната моторна активност все още е ненапълно изяснен въпрос [Takahashi a. Owyang, 1998; Shafik et al., 2006]. Напоследък има данни за доминиращата възбудна активност на лонгитудиналната мускулатура в двигателната активност на ректума, което предполага водещата роля на този мускулен слой в евакуационния механизъм [Radomirov et al., 2009]. Съкратителната активност на LM и CM се увеличава от колона към ректума при липса на релаксация, което показва по-високата съкратителна активност в колоректоаналната област на плъхове [Brading et al., 2006]. Описаните в представеното изследване модулаторни и локални отговори са в унисон с тези в литературата. По-изразената съкратителна активност на лонгитудиналната мускулатура в ивици и цялостен аноректум и увеличаване на модулаторната съкратителната активност на циркуларната мускулатура в аборална посока най-вероятно е предпоставка за преодоляване на контрахирания анален канал в процеса на дефекация. Доминирането на съкратителната активност в ректоаналната област подкрепя по-скоро транзитната, отколкото резервоарната функция на ректума. Разбира се, при хората и някои животните (напр. домашни любимци от някои животински видове) процесите на континенция и дефекация са под супраспинален контрол. Затова те са в състояние да контролират процесите и да избират подходящото време и място, което е изключително важно за оцеляването и социалната им адаптация.

Локалният отговор на IAS в цялостен аноректален препарат е двуфазов: начална краткотрайна контракция, последвана от релаксация, която е по-изразена при EFS с честота 2 Hz - с 38.65% от тази при 10 Hz, а съкращението при 10 Hz-EFS е с 55.17% по-изразено от това при 2 Hz-EFS ( $p < 0.05$ ) (фиг. 3.32 и табл. 3.6). Локалните моторни отговори на вътрешния анален сфинктер не се променят по структура, но амплитудите на релаксацията са обратно пропорционални на честотата на прилаганите електрически стимули, докато контракциите нарастват с повишаване на честотата. Резултатите показват, че при електрическа стимулация от локалната нервна мрежа, инервираща вътрешния сфинктер, се отделят ко-локализиранни невротрансмитери с потискащ и възбуждащ ефект, повлияващи активността на моторните неврони. Значителен брой научни публикации показват, че електрически-предизвикани

моторни отговори на ивици от IAS са видовоспецифични [Stebbing 1998, et al., 1993; Matsufuji a. Yokoyama, 2003; Rattan et al., 2005a; Cobine et al., 2007; Opazo et al., 2009]. Локални моторни отговори на IAS и анален канал в препарат от аноректум на плъх при електрическа стимулация с честота 5 Hz са описани от Radomirov и колектив [Radomirov et al., 2009].

Модуларните моторни отговори на ринг-препаратите от IAS се различават от описаните локални отговори на IAS в цялостен аноректум. Модуларната двигателна активност се променя от дълбока релаксация при 2-Hz EFS, до релаксация, последвана от съкращение при 10-Hz стимулация, докато локалните отговори се характеризират с начална краткотрайна контракция, последвана от релаксация. Наблюдаваните различия в отговорите най-вероятно се дължат на различия в изследваните препарати: модуларните отговори се отчитат при прецизно изолиран гладкомускулен ринг-препарат с дебелина 2 mm, докато локалният отговор се регистрира при запазен анатомичен и функционален интегритет на IAS с ректума. Модуларният отговор, особено при EFS с ниска честота може да се обясни с локалното активиране предимно на инхибиращи мотоневрони. Известно е, че проекциите на мотоневроните се разпростират максимално до 3 mm [Spencer et al., 2002], така че модуларният отговор може да бъде обяснен с активиране на мотоневроните към циркуларните гладкомускулни влакна. При изследване на локалните отговори в цялостен аноректум не може да се изключи активиране на нервни терминали в състава на низходящите възбуждащи или потискащи рефлексни пътища. Началното краткотрайно съкращение в локалните отговори най-вероятно се дължи на бързи холинергични възбудни постсинаптични потенциали в резултат на активиране на трансмембранен йонен инфлукс, докато излизането на калия от клетките, обуславящо инхибиращия потенциал и мускулната релаксация е по-бавен процес [Gwynne a. Bornstein, 2007]. IAS е единственият препарат, който се релаксира при електрическа стимулация, като амплитудата на отговора е обратно пропорционална на честота на прилаганата EPS.

Получените от експериментите резултати показват, че при електрическа стимулация локалният отговор на *аналния канал* в цялостен препарат от аноректум е съкратителен, подобно на модуларния отговор. Контролът на двигателното поведение на аналния канал се организира от ентералната нервна система под контрола на спиналната и супраспинална нервна система

[Bharucha, 2006]. Аналният канал е със запазен анатомичен и функционален интегритет на вътрешния и външен анален сфинктер и въпреки потискащата инервация към вътрешния сфинктер, сумарният ефект, дължащ се на активиране на IAS и на EAS е възбуден. Вероятно предимно възбуждаща невромедиация преваляра и контролира моторната активност на аналният канал като електрически-възбудима невро-мускулна единица.

Неадренергичните нехолинергични локални отговори са отчетени при прибавяне на неселективния холонолитик atropine (0.3  $\mu\text{M}$ ), неселективния бета-блокатор propranolol (0.1  $\mu\text{M}$ ) и  $\alpha_1$ -селективния антагонист prazosin (0.1  $\mu\text{M}$ ) [Узунов, 2003; Гетова и Ганева, 2010] в съответните камери на двукамерната органна вана (Фиг. 3.33). NANC локалните отговори на LM и CM при 2-Hz EFS са релаксация, без статистически значима разлика в амплитудите им (Фиг. 3.33; Табл. 3.6). При 5-Hz и 10-Hz EFS отговорите са двуфазни, начална релаксация (по-изразена при по-нискофrequentна електрическа стимулация) с последваща контракция (по-изразена при по-високофrequentна електрическа стимулация), също без статистически достоверни разлики в амплитудите. Локалните отговори на LM са статистически значимо по-високоамплитудни от тези на CM, а NANC локалните отговори на лонгитудиналната мускулатура са по-нискоамплитудни от тези на CM, т.е. те са потиснати по-значително от тези в циркуларната мускулатура.

Регистрираните NANC локални отговори са в съответствие с описаните в литературата данни. Още през 1962 г. Burnstock, Campbell a. Bennett при експеримент върху гладката мускулатура на *Taenia coli*, изолирана от колон на морско свинче, след блокиране на отговорите към класическите невротрансмитери ацетилхолин и норадреналин, са наблюдавали неочакван за екипа ефект (бърза хиперполяризация и асоциирана релаксация в отговор на единични електрически стимули [Burnstock et al., 1963]), който те обясняват като резултат на отделяне на NANC инхибиторни невротрансмитери. По-късно, след множество експерименти, са публикувани данни, предполагащи, че NANC трансмитер в *Taenia coli* от морско свинче, илеум от зайци и др. е ATP [Burnstock et al., 1970]. При проучване на нитрергичната инервация Stebbing и колеktiv са описали честотно-зависима неврогенна (тетродотоксин-чувствителна) релаксация на циркуларната и лонгитудиналната мускулатура при претретиране с atropine и guanethidine, която се повлиява от блокери на азотно-оксидната синтаза и донори на азотен оксид [Stebbing et al., 1996; 1997]. В

дебело черво на хора е демонстрирано, че невроналното освобождаване на NO е по-изразено в циркуларната, отколкото в лонгитудиналната мускулатура [McKirdy et al., 2004]. ATP и другите пуринови нуклеотиди медиират потискащата нервно-мускулна трансмисия в червата [Kuriyama et al., 1998]. В колон на плъх е потвърдена ко-трансмисия на ATP и NO, като P2Y<sub>1</sub> рецептори медиират бързия IJP, а NO – бавния IJP [Grasa et al., 2009].

Локалният NANC отговор на IAS се променя от двуфазен в релаксация при всички използвани честоти на електрическа стимулация, без статистически зависима разлика в средните стойности на амплитудите (фиг. 3.33 и табл. 3.6). Този отговор може да се обясни с водещото значение на класическите невротрансмитери в съкратителния електрически-предизвикан отговор, а на NANC медиаторите в потискащия отговор. Много проучвания показват изразена възбуждаща симпатикова инервация на IAS [Tichenor et al., 2002; Brading a. Ramalingam, 2006], докато според други симпатиковите нерви играят невромодулираща роля [Spencer et al., 1999; Yamato a. Rattan, 1990]. Обратно, неврогенната релаксация на сфинктера е посредством активиране на неадренергични-нехолиергични неврони, които освобождават NO, VIP, CO и ATP [Penninckx et al., 1992; Rattan a. Chakder, 1992; Rattan et al., 1992; Stebbing, 1998; Rattan et al., 2004; Kato et al., 2007]. От проучваните NANC инхибиторни невротрансмитери NO най-добре отговаря на критериите да бъде основен потискащ медиатор в IAS: директно релаксиращо действие върху гладката мускулатура, което се инхибира от специфични инхибитори; наличие на субстанции за неговата синтеза, метаболизъм и рециклиране в миентералните инхибиторни неврони в IAS; реално освобождаване и взаимодействие с ензимни протеинни, локализирани върху мембраната или в гладкомускулните клетки на IAS, водещо до каскада от сигнални молекули за гладкомускулна релаксация [Rattan a. Singh, 2011]. Релаксацията на вътрешния анален сфинктер, индуцирана от EFS, не се блокира от atropine (0.3 µM), propranolol (0.1 µM) и prazosin (0.1 µM), което е в доказателство за NANC й генеза. Такива резултати са описани от Rattan и съавт. в анален сфинктер на опосуми и мишки и от Stebbing в анален сфинктер на морски свинчета и хора, Matsufuji и Yokoyama в анален сфинктер на кучета и др. [Rattan et al., 1992; Stebbing, 1998; Rattan et al., 2004; Matsufuji a. Yokoyama, 2003]. Скорошно проучване дава функционални и морфологични доказателства за значително участие на инхибиторна нервно-мускулна NANC пептидергична трансмисия в IAS на мишки,

като пептидергичната релаксация и хиперполяризация могат да се имитират от екзогенен VIP [Keef et al., 2011]. Същите резултати са описани и в препарати от ректум и вътрешен анален сфинктер на хора, като NANC релаксацията на сфинктера се блокира напълно от NG-Nitro-L-arginine, а интестиналната – частично [Burleigh, 1992].

Локалните NANC отговори на *аналния канал* са по-нискоамплитудни съкращения в сравнение с тези, предизвикани само от електрическа полева стимулация (фиг. 3.33 и табл. 3.6). Моторната активност на аналния канал е сложна, тъй като участва в сомато-висцералния рефлекс на дефекация и регулацията на моторната му активност зависи от сомато-моторната и ентерална възбуждаща и потискаща инервация [Bharucha, 2006; Vitton et al., 2007]. Локалните NANC отговори на аналния канал са резултат от неврогенната стимулация на напречноабраздения EAS и гладкомускулния IAS, чийто NANC отговор е релаксация при електрическа стимулация с различна честота.

Неадренергичните-нехолинергични локални отговори на LM, CM и IAS към електрическа стимулация включват релаксация. В ректалните мускули се регистрира последващо съкращение, докато в сфинктерната гладка мускулатура отговорът е само потискащ. Резултатите от изследването потвърждават NANC генеза на релаксиращите отговори, най-вероятно поради освобождаване на нитрергична субстанция и инхибиращи медиаторни пептиди.

Локалният моторен отговор на *аналния канал*, предизвикан от EFS с честота от 5 Hz е изследван в присъствие на atropine, spantide, L-NNA и L-Arg (фиг. 3.34). L-NNA увеличава амплитудите на контракциите, а L-Arg – на релаксацията и намалява контракциите на атропин-сензитивните отговори. Локалният съкратителен отговор на аналния канал, както и въздействието на нитрергичните субстанции и atropine са подобни на описаните и дискутирани по-горе модулаторни отговори. Изследван е ефектът на spantide (потентен тахикининов антагонист, предимно за NK1-рецепторите [Bartho a. Holzer, 1985]), върху локалния отговор при претретиране с atropine. Електрически-предизвиканият локален съкратителен отговор при въздействие с холинолитика се потиска с 43.62%, а при прибавяне на spantide с още 38.09%, което доказва и тахикининергичен компонент в отговора на аналния канал. Ацетилхолинът, заедно с тахикинините са основни възбуждащи ко-трансмисери в мотоневроните [Bornstein et al., 2010]. В СЧТ тахикинините регулират мотилитета, участвайки в невромускулната и невро-невроналната трансмисия.

Блокирането на мускариновите и никотинови рецептори от hyoscine или hexamethonium потиска перисталтиката напълно. При предварителна мускаринова блокада, антагонистът на NK1-рецепторите SR 140333 значително инхибира пропульсията [Tonini et al., 2001]. Локализацията на тахикинините в червата и техните ефекти при въвеждане на екзогенни агонисти или антагонисти са широко проучени [Maggi, 2000; Holzer et Holzer-Petsche, 2001]. Тахикинините (субстанция P, неврокинин A и B) активират NK1, NK2 и NK3 рецепторите, в този ред на афинитет към тях. Tichenor и колектив са описали съкратителни отговори на вътрешния анален сфинктер на кучета при въздействие със субстанция P върху препарати претретирани с atropine и guanethidine [Tichenor et al., 2002], т.е. неврокининът е възбуждащ NANC пептид. Съществуват доказателства, че субстанция P е възбуждащ медиатор във вътрешния анален сфинктер на плъхове [Yang et al., 2006]. Локалният отговор на аналния канал в цялостен аноректум, със запазен анатомичен и функционален интегритет между двата сфинктера и ректума зависи и от реакцията на външния анален сфинктер. Тахикинините и вазопресинът предизвикват възбуждане на пудендалните неврони, инервиращи перинеалните напречноабраздени мускули, вкл. външния анален сфинктер. При мъжки плъхове пудендалните неврони показват субстанция P-свързващи места. Субстанция P-предизвиканата мотоневронна деполяризация е свързана с участието на NK1, не и от NK2 или NK3-рецептори [Ogier et al., 2006].

Резултатите, получени от представяното изследване, показват подобни модуларни и локални моторни отговори в цялостен аноректум на плъх при електрическа полева стимулация. Подобно на модуларните нервни модули, холинергичната стимулираща невротрансмисия е по-изразена в локалните отговори на циркуларната и лонгитудиналната мускулатура на ректума на плъх. Неадренергичната-нехолинергична потискаща невротрансмисия е представена в целия аноректум, но има водещо значение, както в модуларните, така и в локалните отговори на вътрешния сфинктер и аналния канал. В основата на неврогенните модуларни и локални моторни отговори най-вероятно лежат едни и същи стимулиращи и/или инхибиращи невротрансмитерни системи на ентералните нервни мрежи в аноректума на плъх.

### **6.5.2. Низходящи моторни отговори**

Електрическата полева стимулация, приложена в ректалната част на цялостен аноректален препарат, предизвиква локални отговори на

стимулираната част и низходящи отговори в контралатералната, нестимулирана част на препарата, което се дължи на разпространение на импулса по ентерални низходящи пътища. Наблюдаваните низходящи съкратителни отговори на вътрешния сфинктер и аналния канал демонстрират невронални и невро-мускулни комуникации, осъществяващи възбудните отговори в анална посока в аноректума на плъх.

Низходящите моторни отговори на *IAS* и *аналния канал* при електрическа стимулация, приложена върху проксималната област на ректума, са честотно-зависими съкращения (фиг. 3.35 и табл. 3.7). Не е изненадващо, че не се регистрира низходяща релаксация, като компонент на ректо-аналния инхибиращ рефлекс [Gower, 1877; Stebling et al., 1996; Matsufuji et al., 1998; Shafik et al., 2003; Rattan et al., 2005]. Низходящият отговор на *IAS* е съкращение, вероятно поради липса на фекални пелети, или други стимули, които да активират механорецепторите на аферентните сензорни неврони. Резултатите от представяните експерименти показват, че разтягането на стената на ректума от наличния в лумена хранителен разтвор не е стимул, който може да предизвика низходящ потискащ ефект върху аналния сфинктер.

Регистрираните в експериментите десцендентни моторни отговори са понискоамплитудни, в сравнение със съответните съкратителни компоненти на локалните моторни отговори. Тези резултати са в съответствие с наблюденията, че пропагирането на възбудението по нервните структури намалява с увеличаване на разстоянието от мястото на прилагане на стимула [Kadlec et al., 1990; Spencer et al., 1999; Ivancheva et Radomirov, 2001]. Електрически-индуцираните локални и десцендентни отговори на *IAS* са различни по структура. Локалните отговори се състоят от краткотрайна начална контаркция, последвана от релаксация (фиг. 3.32), докато низходящите отговори се характеризират със съкращение, продължаващо през периода на стимулация (фиг. 3.35). Локалният и низходящият отговори на аналния канал представляват съкращения, но първите намаляват по амплитуда по време на стимулациите. Тези резултати потвърждават наличието на възбудни трансмисии и възбудни анално насочени нервни пътища в ректоаналната област на плъх. Холинергични и нехолинергични низходящи възбудни нервни и невромускулни комуникации в аноректума на плъх са описани от Радомиров и съавт., чиято активност се модулира и от нитрергични субстанции [Radomirov et al., 2009a].

Неадренергичните-нехолинергични низходящи отговори на IAS, подобно на локалните са променени по структура – релаксация без статистически достоверна разлика в регистрираните амплитуди (фиг. 3.35). Тези резултати потвърждават NANC природата на релаксацията на IAS, както и вероятен инхибиращ ефект върху аборално насочени холинергични нервни пътища [Portbury et al., 1995; Radomirov et al., 2009a]. Низходящите NANC отговори на аналния канал също са с променена структура, контракция с последваща релаксация, като релаксацията е по-изразена при стимулация с честота 2 Hz. При 10-Hz EFS се регистрира двукомпонентен съкратителен отговор, като амплитудата на първата компонента е потисната статистически достоверно спрямо не-NANC контракцията. Регистрираната втора контракция е интересно наблюдение, което не ни е възможно да обясним без спекулативна дискусия върху участието на ентерални и неентерални нервни структури. При потискане на Sym и PS трансмисия IAS се релаксира, така че втората компонента в този отговор на аналния канал може би се дължи на дезинхибиране на възбудни въздействия върху EAS. Тук може да се има предвид дискутираният в 6.5.1. стимулиращ ефект на тахикинините и вазопресина върху външния сфинктер, както и серотонинергично действие. Установени са серотонинергични имунореактивни пудендални неврони към мотоневроните на EAS и се предполага, че 5-HT може да играе роля в регулиране на рефлексната контракция на външния анален сфинктер и процесите на континенция и дефекация [Holmes et al., 2005].

Съкратителните NANC низходящи моторни отговори, както и локалните, обсъдени в 6.5.1. са потиснати, но ненапълно, което показва, че съществува и друга възбуждаща нехолинергична трансмисия в десцендентните пътища в аноректума на плъх. След като Burnstock (1970) пръв описва NANC медиация в стомашно-чревния тракт са изучени множество невротрансмитери, чието участие се оказва не само видово специфично, но и различно изразено в различните региони на червата [Wood, 2006b]. В циркуларната мускулатура на дебело черво от плъх е доказано, че ендогенни тахикинини са главните възбуждащи трансмитери в NANC възбуждане и генериране на EJP и тяхното действие се медира чрез NK<sub>1</sub> и NK<sub>2</sub>-рецептори [Serio et al., 1998]. Ацетилхолинът и субстанция P са основни възбуждащи невротрансмитери във възходящите рефлексни пътища в тънкото и дебелото черво [Holzer et Maggi, 1994; Johnson et al., 1998; Bian et al., 2004], а за ATP, който оказва инхибиращ

ефект в червата участва и във възбудните пътища [Spencer et al., 2000]. В последните години се наблюдава значителен прогрес в разбирането на серотонинергичната модулация в долния отдел на СЧТ (предимно дебели черва) при гризачи и хора. 5-HT, депониран в ентохромафинните клетки и освободен от тях, действа като медиатор в ENS, като стимулира мотилитета, активирайки сензорните неврони и някои миентерални интерневрони [Galligan et al., 2000; Ren et al., 2003; Bian et al., 2004.,], не само чрез 5-HT<sub>3</sub>-, но и чрез 5-HT<sub>4</sub>-рецептори [Tsukamoto et al., 2007; Bertrand et al., 2012]. Въпреки, че азотният оксид е основен медиатор в низходящите инхибиторни мотоневрони [Lecsi et al., 2002], има експериментални доказателства, че е и мощен модулатор във възходящите и низходящи холинергични и нехолинергични възбудни пътища в аноректума на плъх [Radomirov et al., 2009]. Okishio et al., са описали участието на азотен оксид, вазоактивен интестинален пептид и хипофизен пептид, активиращ аденилатциклазата в NANC релаксацията на гладката мускулатура от различни области на черва на плъхове. Участието на NO в NANC релаксацията е отчетено като най-значимо в ректум и проксимален колон, по-слабо в илеум и дистален колон; на PACAP – в дистален колон, а на VIP – незначително във всички области [Okishio et al., 2000].

Описаните съкратителни низходящи моторни отговори, провокирани от електрическа полева стимулация на проксималния ректум показват наличието на *аборално насочен възбуден нервен път („дълъг” път)*. Релаксиращите компоненти в моторните NANC низходящи отговори на вътрешния сфинктер и аналния канал, подобно на тези в локалните се дължат на *NANC потискаща невротрансмисия*.

Проучено е въздействието на P2Y специфичния блокер cibacron blue и неселективния P2-рецепторен антагонист suramin върху NANC низходящи отговори на *IAS* и *анален канал* в цялостен аноректум при прилагане на електрическа полева стимулация в проксималната част на препарата.

Статистически значимо се потиска релаксацията в NANC низходящите отговори на *IAS* в присъствие на cibacron blue (над 66.66%) или suramin – при 5-Hz EFS и 10-Hz EFS. Cibacron blue достоверно потиска релаксацията в отговора на аналния канал при 2 Hz, без значим потенциращ ефект на съкратителната компонента на отговора. При добавяне на suramin се наблюдава тенденция да се инхибират както съкращенията, така и релаксацията в низходящия NANC отговор на аналния канал (фиг. 3.36).

P2Y блокерът cibatron blue значително потиска релаксацията в NANC низходящия отговор на вътрешния сфинктер, което потвърждава инхибиращия ефект на ATP и наличие на инхибиторни P2Y рецептори в невромускулните структури в аналния сфинктер. Аналогична е тенденцията върху аналния канал – значимото потискане на низходящата релаксация и слабо увеличаване на съкратителния компонент в отговора.

Тъй като suramin е неселективен антагонист на P2-рецепторите, промените в моторните отговори се дължат на блокиране на P2Y-рецепторите, въввлечени в инхибиторната трансмисия и на P2X, участващи в нехолинергичния възбуждащ отговор. Потискането на релаксацията на вътрешния анален сфинктер, най-вероятно се дължи на ефект, опосредстван от P2Y-рецепторите. Блокирането на P2X-рецепторите в миентералните неврони може да обясни намалената амплитуда на съкратителните низходящи NANC отговори.

Промените в NANC пуринергична компонента в моторните отговори при въздействие със cibatron blue и suramin са твърде разнопосочни, и различно изразени в аналния канал и сфинктер, което вероятно се дължи на разнообразието от пуринергични рецептори в СЧТ и различните им ефекти върху невроневроналните и нервно-мускулни комуникации.

Пуринергичните рецептори участват в медиацията от интерневроните към мотоневроните [Bian, 2000], локализирани са в интерстициалните клетки на Кахал [Burnstock a. Lavin, 2002], вероятно имат роля в невромускулните взаимодействия, както и в пре- и постсинаптичната невромодуляция: P2X-рецепторното активиране води до мускулни съкращения, докато за P2Y-рецепторите е прието, че медиират потискащи моторни отговори. Доказано е, че в лонгитудиналната мускулатура на йеюnum от плъх, ATP участва в NANC релаксацията, индуцирана от електрическа полева стимулация, като се активират SK канали [Waseda et al., 2005].

От P2Y-рецепторите главно значение в регулация на мотилитета имат P2Y<sub>1</sub>. Те са доказани в субмукозата на морско свинче, докато при човек и мишка P2Y<sub>1</sub>-рецептори са идентифицирани в миентералния плексус [Giaroni et al., 2002; Gallego et al., 2006; Gallego et al., 2011] и субмукозния при мишка и плъх [Giaroni et al., 2002]. При мишки P2Y<sub>1</sub>-рецептори са доказани в много, но не във всички NOS-имунореактивни миентерални неврони [Giaroni et al., 2002]. В препарати от черва от хора и мишки IPJP и предизвиканата релаксация се

блокира от P2Y<sub>1</sub>-рецепторен антагонист MRS 2179 [Gallego et al., 2006; De Man et al., 2003; Gallego et al., 2011] и е установена имунореактивност към P2Y<sub>1</sub>-рецепторен протеин [Giaroni et al., 2002; Gallego et al., 2006]. P2Y<sub>1</sub>-рецепторно медиран е апамин-зависимият и независимият IPJP в циркуларната мускулатура от колон на мишки [Zhang et al., 2010]. ATP участва и в регулацията на двигателното поведение на вътрешния анален сфинктер. ATP, чрез P2Y<sub>1</sub>-рецепторите, може би основно е отговорен за фазичната релаксация, а NO – за продължителната тонична релаксация на IAS при плъхове [Opazo et al., 2011] и свине [Opazo et al., 2009].

Възбудни постсинаптични потенциали, медираны от P2X-рецепторите са описани в миентералните и субмукозните неврони [Galligan a. Bertrand, 1994; Bertrand a. Ren, 2008]. Стимулацията на P2X-рецепторите в гладкомускулните клетки на колон на куче и мишка води до тяхното съкращение [Giaroni et al., 2002; Lee et al., 2005]. Експериментални данни показват, че ATP, заедно с ACh, предизвикват бърз синаптичен отговор чрез P2X-рецептори в миентералните неврони [Galligan a. Bertand, 1994], като този ефект се антагонизира от PPADS и се среща предимно между десцендентните интерневрони и инхибиращите мотоневрони в низходящия рефлексен път [Bian et al., 2000]. Spencer и съавт. (2000) са описали, че заедно с ацетилхолин, ATP изглежда е важен нехолинергичен възбуждащ медиатор, вероятно в трансмисията между асцендентните и десцендентните интерневрони. Тъй като асцендентните интерневрони и три класа от низходящите, са холинергични [Costa et al. 1996], се предполага, че ATP е ко-локализиран с Ach [Spencer et al., 2000]. В морско свинче P2X-рецептори са идентифицирани имунохистохимично в три класа миентерални неврони с различна функция: AN/Dogiel тип II неврони с имунореактивност към P2X<sub>2</sub> [Castelucci et al., 2002] и P2X<sub>7</sub> рецептори [Hu et al., 2007]; асцендентни интерневрони – за P2X<sub>3</sub> [Poole et al., 2002]; повечето NOS неврони – за P2X<sub>2</sub> [Castelucci et al., 2002] и P2X<sub>3</sub>-рецептори [Poole et al., 2002]. P2X<sub>1</sub>-рецептори не са установени при чревни неврони във всички проучени видове. P2X<sub>2</sub>-рецептори са доказани в миши миентерални неврони [Ren et al., 2003], калретинин имунореактивни миентерални неврони и калбиндин имунореактивни миентерални неврони на плъх [Ren et al., 2003]. Около 80% от калретинин невроните в миентералния плексус на илеум на плъх са P2X<sub>3</sub>-рецептор имунореактивни [Ren et al., 2003].

АТР и Асh могат да действат като ко-трансмитери не само в ентералните невронални мрежи, но и в мотоневроните, инервиращи скелетната мускулатура, като пуринергичното участие се опосредства главно от P2X рецептори [Burnstock, 2011].

Резултатите от представените експерименти потвърждават участието на АТР или АТР-свързани пурини чрез P2-рецепторно действие в неадренергичната-нехолинергична невротрансмисия в аноректума на плъх. Потвърждава се потискащият на АТР върху вътрешния анален сфинктер чрез инхибиторни P2Y-рецептори.

Низходящите съкратителни отговори на *аналния канал* при електрическа полева стимулация, приложена в дисталната част на ректума са честотно-зависими съкращения, средните стойности на амплитудите при 10-Hz-EFS са сигнификатно по-високи от тези при 2 Hz и 5 Hz ( $p < 0.5$ ). Амплитудите на низходящите моторни отговори, индуцирани от електрически стимули с честота 5 Hz, приложени в дисталния ректум, са с 52.87% по-ниски от тези на локалните отговори на аналния канал, а тези на низходящите отговори, индуцирани от електрическа полева стимулация в проксималната част на ректума са с 58.22% по-ниски от локалните. Тези резултати потвърждават твърдението, че силата на моторните отговори е обратно пропорционална на разстоянието между точката на прилагане на стимула и точката на регистрация на отговора [Kadlec et al., 1990; Spencer et al., 1999; Ivancheva a. Radomirov, 2001].

Резултатите от експериментите показват, че десцендентните, електрически-предизвикани съкратителни отговори на аналния канал се потискат от atropine, но не се блокират (Фиг. 3.37). В аноректума на плъх потискането на холинергичната медиация показва наличието на други, нехолинергични възбуждащи невромедиаторни системи. Spantide (NK1 тахикининов антагонист) намалява амплитудите на атропин-предизвиканото потискане на низходящите моторни отговори на аналния канал, без промяна в релаксацията. Тези резултати показват участието на субстанция P в съкратителната активност на аналния канал. Тахикинин NK1-, но не и NK2-рецепторно медиран е нехолинергичният възбуден постсинаптичен потенциал и гладка мускулатура на колон от морско свинче [Zagorodnyuk et al., 1993]. Johnson и колектив, чрез измерване на интрацелуларните постсинаптични потенциали, са доказали ролята на NK1 и NK3-рецепторите в синаптичната трансмисия между миентералните неврони [Johnson et al., 1998]. Тахикинините,

чрез NK1-рецепторите частично медираат трансмисията към инхибиторните мотоневрони. NK3-рецепторите имат роля в трансмисията от вътрешните сензорни неврони и от асцендентните интерневрони към възбуждащите мотоневрони при моторните рефлексии. В колон на морско свинче, оралните и анални съкращения се дължат на активиране на холинергични моторни неврони, инервиращи LM и CM [Smith a. Robertson, 1996]. Във възходящото активиране участват предимно холинергични интерневрони, докато в низходящите отговори участват холинергични и нехолинергични интерневрони [Hirst et al., 1974; Costa a. Furness, 1983; Smith a. Robertson, 1996; Smith a. McCarron, 1998; Bian et al., 2000; 2004]. Наблюдаваната релаксация в присъствие на atropine, подсказва, че блокирането на ефекта на възбуждащата холинергична невротрансмисия демаскира активността на инхибираща нехолинергична невротрансмисия/и. Азотният оксид, освобождаван от неадренергични-нехолинергични неврони, се приема за основен потискащ медиатор в ректоаналната област [Rand et Li, 1995; Stebbing et al., 1996], макар че е доказано и участието на ATP и вазоактивния интестинален пептид [Sanders a. Ward, 1992; Smith a. Robertson, 1996]. Низходящите моторни отговори на аналния канал, предизвикани от електрическа полева стимулация с честота 5 Hz, се увеличават сигнификантно при прибавяне на L-NNA. При съвместното действие на L-NNA и atropine се регистрира увеличаване на амплитудата на съкращенията, без последваща релаксация. Самостоятелно приложението L-Arg провокира релаксация след началната контракция и потиска атропин-инхибираните контракции като значително увеличава релаксацията. Тези наблюдения са в съответствие с разбирането за потискащия ефект на азотния оксид и участието му в модулиране на освобождаването на трансмитери от окончанията на мотоневроните. L-NNA-предизвиканото блокиране на синтеза на NO вероятно води до блокиране на потискащата модулация на освобождаване на ацетилхолин [Bartho a. Lefebvre, 1995; Smith a. McCarron, 1998]. Може да се намесва участие и на субстанция P в нитрергичните промени в низходящия отговор на аналния канал, тъй като е доказана NO-зависимо освобождаване на тахикинини в тънко черво на морско свинче [Wiklund et al., 1993]. Някои от десцендентните неврони са холинергични (ChAT позитивни), други са NOS-позитивни, част от които са имунорективни за NOS и ChAT. Нитрергичните неврони се свързват помежду си и с възбуждащи и потискащи мотоневрони, което предполага участие на NO, не само като медиатор от

инхибиращите мотоневрони, но и в между интерневронните комуникации [Costa et al., 1996]. Азотният оксид действа като невротрансмитер и/или невромодулятор. NO действа и като ретрограден трансмитер, отделен от десцендентните нитрергични интерневрони [Yuan et al. 1995; Stebbing et al., 1996b].

Низходящите моторни отговори на аналния канал в аноректум на плъх, индуцирани от EFS в дистален ректум, са съкратителни. При запазен анатомичен и функционален интегритет между ректум, IAS и EAS функционира възбуден „къс“ ректоанален път, провокиран от електрическа стимулация. Във възбуждащите невронални пътища към аналния канал, ацетилхолинът и субстанция P имат участие в нервните мрежи, контролиращи функционалната активност на аналния канал. Нитрергичните субстанции, повлияват значително съкратителните и релаксиращи компоненти на електрически-индуцираните моторни отговори на аналния канал, което потвърждава участието на NO като важен инхибиращ медиатор в низходящите невронални мрежи в аноректума на плъх.

Рефлексите и различните видове двигателна активност в СЧТ включват различни структурни елементи: разнообразните подкласове ентерални неврони (сензорни, интерневрони, мотоневрони), интерстициалните клетки на Cajal, както и съгласуване на активността на гладките мускулни слоеве. EFS се прилага като съществена и надеждна процедура за предизвикване на отделяне на трансмитери от терминалите на ентералните неврони и за проучване на участието на различните невротрансмитерни системи и рецептори в комуникацията между невроните в ентералната система, но физиологичната адекватност на тази методика е под въпрос. Разтягането на чревната стена и дразненето на лигавиците са стимули, които предизвикват перисталтичен рефлекс и координирана активност между мускулните слоеве. Тези стимули са много по-"физиологични", отколкото EFS за проучване на рефлексната дейност в червата.

В представяното изследване е използвана методика чрез раздуване за 30 s на балон, имитиращ фекална пелета на разстояние 5 mm от аналния канал [Radomirov et al., 2009b]. Низходящият моторен отговор на аналния канал, индуциран от разтягане на стената на дисталния ректум, е различен по вид в сравнение с електрически-индуцирания низходящ отговор (фиг. 3.38). Радиалното разтягането на стената на ректума предизвиква низходящ моторен

отговор на аналния канал, състоящ се от кратка начална контракция, последвана от продължителна дълбока релаксация, траеща през 30-секундния период на раздуване на балона. *Раздуването на интралуменен балон активира вътрешните първични сензорни неврони чрез стимулиране на ректалните механорецептори.* Циркумферентното разтягане на дисталния колон активира популация от вътрешни механосензитивни неврони които активират асцендентни възбудни и десцендентни инхибиторни пътища към циркуларната мускулатура. Тези механочувствителни неврони са чувствителни по-скоро на разтягане, отколкото на мускулното напрежение, понеже са резистентни към мускулна парализа с нифедипин [Spencer et al., 2002]. Гъста аферентна външна инервация от механорецептори, кореспондиращи с ректалните интраганглионарни окончания, чувствителни на механична деформация, са описани в ректум на морско свинче [Lynn et al., 2003]. Разтягане на ректалната стена от ректалното съдържимо е достатъчен стимул да инициира рефлекс на дефекация при хора [Shafik et al., 2006]. Очевидно активирането на механорецептор-зависими низходящи рефлексни пътища, локализирани в областта на дисталния ректум, е важно за релаксацията на аналния канал, което може би осигурява пропульсията на ректалното съдържимо. Radomirov и съавт. са описали, че активирането на низходящия рефлексен път и отговора на аналния канал зависят от мястото на прилагане на стимула по дължината на ректума [Radomirov et al., 2009b]. Раздуването на балона в проксималната част на ректума предизвиква активиране на „дълъг“ аборално насочен възбуден холин- и нехолинергичен рефлексен път, а в дисталната част – „къс“ инхибиторен нитрергичен рефлексен път.

Ентерални възбуждащи и инхибиращи невротрансмисии осигуряват процеса на дефекация, контролирайки процесите на съкращение и релаксация [Bhargava, 2006; Kijima et al., 2006]. Превалиране на възбуждащи или потискащи процеси и невротрансмисии в процесите на затваряне на аналния канал и пропульсия, както и рефлекса на дефекация при плъхове не са добре проучени [Nagano et al., 2004]. Резултатите от експериментите показват, че съкратителната компонента в отговора на аналния канал се потиска в присъствие на atropine, а прибавянето на spantide намалява още амплитудата на атропин-инхибираните отговори. Проучвания, провеждани в трикамерни органи вани, са използвани за охарактеризиране на синаптичната трансмисия в рефлексорните пътища [Tonini a. Costa, 1990; Johnson et al., 1998]. Тези

експерименти показват, че във възходящите пътища медиацията между интерневроните и между интерневроните и възбуждащите мотоневрони се доминират от ацетилхолина, действащ върху никотинови рецептори. Трансмисията от вътрешните сензорни неврони към възходящите интерневрони изглежда се опосредства чрез никотинови, мускаринови и тахикининови NK3 рецептори. Природата на невротрансмисията в десцендентните инхибиращи рефлексни пътища е по-сложна и по-малко изяснена. Въпреки доказаното участие на ACh и тахикинини чрез NK1 и NK3-рецептори [Johnson et al., 1998], десцендентният инхибиращ рефлекс, провокиран от разтягане или стимулацията на лигавиците не се блокират напълно при използване на съответните антагонисти [Smith et al., 1992; Johnson et al., 1998]. Описаните в настоящето изследване резултати потвърждават литературните данни, че други трансмитери, освен ацетилхолин, субстанция P участват в трансмисията между невроните в низходящите инхибиращи ректо-анални рефлексни пътища на плъх, вероятно ATP, 5-HT, глутамата [Gwynne a. Bornstein, 2007]. Скорошно проучване на Nicholas и Spencer относно перисталтиката и пропульсията на фекални пелети в изолиран дистален колон от морско свинче описва резултати, намиращи се в противоречие с възприетите разбирания [Nicholas a. Spencer, 2010]. Те са описали незначително участие на ацетилхолин в перисталтичния рефлекс и неповлияване на нехолинергичния невроневронален път от блокиране на P2-пуринергичните, 5-HT<sub>3</sub> или NK<sub>3</sub>-рецепторите.

L-NNA, самостоятелно или прибавен на фона на atropine увеличава амплитудите на контрактилната компонента и намалява тези на релаксиращата компонента на отговора на аналния канал. L-arg намалява съкращенията и задълбочава релаксацията. Подобни резултати са описани в аноректума на морско свинче: L-NNA увеличава рефлекс-медираните контракции на ректума и предотвратява рефлекс-медираната релаксация на вътрешния анален сфинктер на морско свинче [Yamanouchi et al., 2002]. Резултатите от експериментите показват, че нитрергичните субстанции повлияват низходящия моторен отговор на аналния канал, провокиран от разтягане на ректалната стена. Това е в съответствие с разбирането, че *NO може да действа и като модулятор на освобождаването на невротрансмитери от мотоневроните и интерневроните в рефлаторните пътища*. Някои от десцендентните интерневрони са ChAT-позитивни, други – NOS-позитивни, а са описани и

имунореактивни за двете субстанции [Furness et al., 1989; Williamson et al., 1996]. Нитрергични интерневрони правят синаптични контакти помежду си, а също и с възбудни и инхибиторни мотоневрони, което показва, че NO може би е не само невротрансмитер, освобождаван от потискащи мотоневрони към гладката мускулатура, но участва и в комуникациите между интерневроните [Costa et al., 1996]. Yuan et al. (1995), използвайки трикамерна вана, са проучили участието на NO в невро-невроналната трансмисия в рефлексните пътища на тънко черво от морско свинче. Те са установили, че NO може да действа като ретрограден трансмитер, отделен от десцендентните нитрергични интерневрони и потискащ синаптичната активност на вътрешните сензорни неврони. Ефектът на NO в миентералния сплит е сложен, защото инхибитори на NOS и донори на NO имат и стимулиращ, и потискащ ефект върху освобождаването на ацетилхолин [Bartho a. Lefebvre, 1995; Kilbinger, 1996]. Smith и McCarron (1998) са доказали, че еднородният NO улеснява холинергичната невротрансмисия в асцендентните, възходящи рефлексорни пътища и я инхибира в десцендентните инхибиторни и възбудни рефлексни пътища. В обяснението на ефекта на нитрергичните субстанции L-Arg и L-NNA върху низходящият отговор на аналния канал може да бъде добавено и пресинаптичното потискане на освобождаването на субстанция P и ацетилхолин в миентералния плексус в тънко черво на морско свинче [Wiklund et al., 1993].

Описаните резултати потвърждават *наличието на „къс“ инхибиторен рефлексен път, отговорен за низходящия отговор (начална контракция и последваща дълбока релаксация) на аналния канал при разтягане на стената на ректума чрез раздуване на балон*. Описаният отговор, се повлиява по-слабо от възбудни трасмитери (ацетилхолин, субстнция P) и се *медиира основно от дистално насочен нитрергичен път*, който осъществява релаксацията на аналния канал.

## **6.6. Морфологични потвърждения**

Морфологичните изследвания са извършени за да отговорят на два въпроса. Първият е: налични ли са в миентералния сплит на ректоаналната област на плъх структури, съдържащи ChAT, субстанция P, NADPH-d и ATP-синтаза? Вторият е: разпределението и плътността на такива структури потвърждават или не потвърждават механографските резултати за участието

на изследваните невротрансмитери в двигателната активност на аноректума?

Имунохистохимичното изследване за ChAT показва наличие на множество интензивно оцветени варикозни нервни влакна, асоциирани с имунонегативни клетъчни тела на миентерални неврони в областта на дисталния ректум; по-оскъдни в областта на аналния канал; окъдни, варикозно нагънати нервни влакна между гладкомускулните влакна на IAS и единични позитивни клетъчни тела на нивото на аналния канал (фиг. 3.39). Тези резултати потвърждават изразената холинергична възбудна трансмисия, предимно в ректума, особено в дисталната му част, като описаните ChAT-имунореактивни влакна може би са в структурата на низходящите възбудни ректо-анални пътища.

Имунохистохимичното изследване показва висока плътност на SP-имунореактивни нервни влакна в миентералните ганглии на ректума и аналния канал, а между гладкомускулните клетки на IAS нервните влакна са оскъдни, варикозни, по-слабо оцветени (фиг. 3.40). Имунохистохимичното изследване показва участието на SP в двигателната активност на аноректума, най-вероятно също в състава на низходящите възбудни рефлексни пътища.

Наличието на NADPH-d-позитивни нервни структури в миентералните ганглии и мускулните слоеве на ректума, аналния канал и IAS говори за значителна физиологична роля на нитрергичната трансмисия в ректоаналната област. Средният брой на реактивните неврони и тяхната оптична плътност в ректума са значително по-ниски от тези в аналния канал, а интензивността на оцветяване на NADPH-d-реактивните нервни влакна във IAS е по-изразена от тази в дисталния ректум (фиг. 3.41), което потвърждава значението на NO в релаксиращата активност на аналния сфинктер. Наличието на NADPH-d-позитивни перикариони в аналната област е морфологично доказателство за „къс“ нитрергичен път, контролиращ релаксацията на IAS и пропульсивната активност.

Имунохистохимичните данни показват, че нервни структури в стената на ректума са имунореактивни за ATP-синтаза (фиг. 3.42). Тези наблюдения доказват, че субпопулация ентерални неврони в ректоаналната област и нервни влакна към LM и CM слоеве синтезират и съдържат ензима, отговорен за синтеза на ATP. В IAS ATP-синтаза-позитивните нервните влакна са в изобилие, нагънати и интензивно оцветени. Тези резултати потвърждават комплексна роля на пуринергичната невротрансмисия и в ректума и в аналния сфинктер.

Имунохистохимичните и хистохимичното изследвания доказват наличие на нервни структури, съдържащи ChAT, субстанция P, ATP-синтаза и NADPH-d в миентералния сплит и между гладкомускулните влакна на ректоаналната област на плъх. Получените резултати са морфологично потвърждение на механографските резултати за участие на Ach, SP, NO и ATP в двигателната активност на аноректум на плъх.

## ИЗВОДИ

1. Изолираните циркуларни ринг-препарати проявяват спонтанна моторна активност, като амплитудите на фазичните контракции се увеличават в анална посока и доминират в аналния канал. Препаратите от вътрешен анален сфинктер развиват устойчив спонтанен тонус с насложени фазични съкращения.
2. Амплитудите на електрически-предизвиканите честотно-зависими модулари съкращения на ринг-препаратите от проксимален, медиален и дистален ректум нарастват в дистална посока. Моторните отговори на дистален ректум превишават тези на аналния канал. Моторният отговор на вътрешния анален сфинктер при електрическа стимулация с честота 2 Hz е релаксация, а при 10 Hz – релаксация, последвана от съкращение.
3. М-холинолитикът атропин намалява амплитудите на модулари електрически-предизвикани моторни отговори на ринг-препаратите от ректум и анален канал и увеличава амплитудите на релаксация на вътрешния анален сфинктер. В присъствие на блокера на азотнооксидната синтаза NG-нитро-L-аргинин амплитудите на съкращения на ринг-препаратите от ректум и анален канал се увеличават и се намаляват амплитудите на релаксация на вътрешния анален сфинктер, а донорът на азотен оксид L-аргинин има обратен ефект.
4. Амплитудите на електрически-индуцираните съкращения на ивиците лонгитудинална мускулатура са значимо по-големи от моторните отговори на ринг-препаратите от циркуларна мускулатура. В лонгитудиналната мускулатура холинергичната медиация е по-изразена от нитрергичната.
5. Електрически-индуцираните локални моторни отговори на лонгитудиналния и циркуларния мускули в цялостен аноректум възникват синхронно; честотно-зависимите амплитуди на съкращенията на лонгитудиналния мускул са значимо по-високи от тези на циркуларния мускул.
6. Низходящите моторни отговори на вътрешния анален сфинктер и аналния канал в цялостен аноректум на плъх, индуцирани от електрическа стимулация, приложена в ректума, са съкратителни. Низходящият моторен отговор на аналния канал при разтягане на стената на дисталния ректум е краткотрайно съкращение, последвано от дълбока релаксация.

7. Блокерът на P2Y-рецепторите цибакрон блу и неселективният P2-рецепторен антагонист сурамин потискат низходящата електрически-предизвикана неадренергична-нехолинергична релаксация на вътрешния анален сфинктер. NG-нитро-L-аргининът увеличава контрактилния отговор на аналния канал в низходящия моторен отговор, докато L-аргининът значимо го потиска и предизвиква релаксация. M-холинолитикът атропин и блокерът на NK1-тахикининергичните рецептори спантид намаляват амплитудата на електрически-индуцираната контракция и предизвикват релаксация.
8. Блокерът на азотнооксидната синтаза NG-нитро-L-аргинин увеличава контрактилния и намалява релаксиращия компонент в низходящия отговор на аналния канал при разтягане на стената на дисталния ректум, докато донорът на азотен оксид L-аргинин намалява съкратителния отговор и увеличава релаксацията. M-холинолитикът атропин и блокерът на NK1-тахикокнинергичните рецептори спантид намаляват амплитудите на контракция на аналния канал.
9. Хистохимичното и имунохистохимичните изследвания показват наличие на нервни структури, съдържащи нукотинамид аденин динуклеотид фосфат-диафороза, холинацетилтрансфераза, субстанция P, аденозин трифосфат-синтаза в миентералния сплит и между гладкомускулните влакна в ректо-аналната област на плъх.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Резултатите от експериментите показват, че спонтанните фазични контракции на изолираните циркуларни ринг-препарати се увеличават в анална посока. Спонтанният тонус на вътрешния анален сфинктер и мощната спонтанна съкратителна активност на аналния канал в ринг-препаратите и в цялостен аноректум осигуряват поддържане на високо анално налягане и континенция при покой.

Резултатите от електрически-предизвиканите модуларни моторни отговори на ринг-препаратите, изолирани по дължината на ректума са честотно-зависими съкращения и амплитудите им нарастват в дистална посока. Модуларните отговори на ринг-препарата от дистален ректум надвишават по амплитуда тези на аналния канал, най-вероятно за да се преодолее съпротивлението му в процеса на евакуация на ректалното съдържимо. Променените по амплитуда, но не и по вид мускулни съкращения предполагат, че отговорите се дължат на честотно-зависимо освобождаване на едни и същи невротрансмитери или съвместно освобождаване на ко-трансмитери, чието взаимодействие води до същия отговор. Модуларните моторни отговори на вътрешния анален сфинктер се характеризират с релаксация, или релаксация с последващо съкращение. Във вътрешния анален сфинктер доминира потискаща невротрансмисия. В регулацията на мотилитета на вътрешния анален сфинктер участват честотно-зависими механизми на ентералната нервна регулация, водещи до отделяне на потискащи и възбуждащи невротрансмитери.

Холинергичната възбуждаща невротрансмисия участва основно в контрола на контрактилната активност на ректума и е по-изразена в нервните модули, контролиращи моторните отговори в дистален ректум. Нитрергичната потискаща невротрансмисия, представена в целия аноректум, има водещо значение в локалните нервни модули, контролиращи вътрешния анален сфинктер и най-вероятно осигурява пропульсивния капацитет на аналния канал. По-голямата чувствителност на проксималната част на ректума към азотнооксидната трансмисия е отговорна за релаксацията за адаптиране на ректума към навлизащите от колона маси, чрез постепенна промяна в напрежението на стената и малко повишение на вътрелуменното налягане.

Експерименталните резултати относно електрически-индуцираните съкращения на ивиците от лонгитудинална мускулатура, както и локалните

отговори показват водещата роля на лонгитудиналния мускулен слой в двигателната активност на аноректума. Спонтанните и електрически-индуцираните съкращения на лонгитудиналната и циркуларната мускулатура в цялостен аноректум възникват синхронно, което говори за ко-активация на невроните към двата мускулни слоя. Препаратите и от двата мускулни слоя – циркуларен и лонгитудинален отговарят със съкращение при електрическа стимулация, липсва релаксация, което потвърждава функционалната роля на ректума по-скоро като транзитен орган.

Локалните електрически-индуцирани моторни отговори в цялостен препарат от аноректум на плъх са твърде сходни с тези на модулаторните моторни отговори в ринг-препарати от циркуларна мускулатура, вътрешен анален сфинктер, анален канал и в ивици от лонгитудинална мускулатура, което най-вероятно се дължи на участие на едни и същи нервни мрежи в реализирането им.

Експерименталните данни от неадренергичните-нехолинергични локални отговори потвърждават неадренергична-нехолинергична генеза на релаксацията, вероятно в резултат на освобождаване на нитрергична субстанция и инхибиращи медиаторни пептиди. Аденозин трифосфатът или свързани пурины участват чрез P<sub>2</sub>-рецепторите в неадренергичната-нехолинергична невротрансмисия в аноректума на плъх. Потвърждава се потискащият ефект на аденозин трифосфата върху вътрешния анален сфинктер чрез инхибиторни P<sub>2</sub>Y-рецептори.

Резултатите от изследваните локални и низходящи отговори на аналния канал, индуцирни от прилагане на електрическа стимулация в проксимален и дистален ректум потвърждават твърдението, че силата на моторните отговори е обратно пропорционална на разстоянието между точката на прилагане на стимула и точката на регистрация на отговора.

Низходящите моторни отговори на аналния канал в цялостен аноректум на плъх, индуцирани от електрическа стимулация, приложена в проксимален или дистален ректум са съкратителни. При запазен анатомичен и функционален интегритет между ректум, вътрешен и външен анални сфинктери функционират „дълъг” и „къс” възбудни ректо-анални пътища, провокирани от електрическа стимулация. Ацетилхолинът и субстанция P имат участие във възбуждащите нервни пътища контролиращи функционалната активност на аналния канал. Нитрергичните субстанции, повлияват значително съкратителните и

релаксиращи компоненти на моторните отговори на аналния канал, което потвърждава участието на азотния оксид като важен инхибиращ медиатор и модулатор в низходящите невронални мрежи в аноректума на плъх. Разтягането на стената на дисталния ректум активира механорецептор-зависим низходящ „къс“ нитрергичен инхибиторен рефлексен път, отговорен за релаксацията на аналния канал.

Получените резултати от хистохимичното и имунохистохимичните изследвания са морфологично потвърждение на механографските резултати за участие на ацетилхолин, субстанция Р, азотен оксид и аденозин трифосфат в двигателната активност на аноректум на плъх.

Представените експериментални изследвания на модулаторни моторни отговори на циркуларни гладкомускулни ринг-препарати, на анален канал, на ивици лонгитудинална мускулатура, както и локални и низходящи моторни отговори в аноректум на плъх дават потвърдителни и допълнителни данни за двигателната активност по дължината на аноректума, за функционално различните ректо-анални низходящи пътища и участието на основни възбуждащи и потискащи невротрансмитери в тях. В същото време те пораждават въпроси, между които:

- Комбинирана терапия между лекарства, увеличаващи комплайанса на ректума (донори на азотен оксид, clonidine) или намаляващи сензомоторната активност на ректума (clonidine) с анална електрическа стимулация, би ли била ефективна *in vivo* при фекална инконтиненция?
- Електрическа стимулация на дисталния ректум и на вътрешния анален сфинктер *in vivo* би ли провокирала евакуация на ректалното съдържимо?
- След като локалните отговори при електрическа стимулация на ректума са по-мощни от низходящите, електрическата стимулация на ректума *in vivo* би ли провокирала евакуация на ректалното съдържимо?

...*"За мишките и хората"*...

Основната тематика, която Нобеловият лауреат Джон Стайнбек развива чрез своите герои в новелата "За мишките и хората", е разбирането на човека.

...От мишките за хората...Отнася се до експериментални изследвания върху мишки и натрупване на данни, които биха обогатили разбирането на регулаторните механизми и възможностите за повлияване им при хората.

## **Приноси на дисертационния труд**

### **Изследвания с оригинален характер**

1. Разработен е и приложен в експерименталните програми модел за характеризирание и фармакологично повлияване на модуларни моторни отговори в ректоаналната област на плъх.
2. Проучването доказва, че модуларните моторни отговори на ринг-препаратите от циркуларна мускулатура, изолирани по дължината на ректум на плъх, се дължат на нарастващо в дистална посока, зависимо от честотата на стимулация участие на възбуждащи невротрансмитери. В моториката на вътрешния анален сфинктер участват честотно-зависими механизми на ентерална нервна регулация, водещи до отделяне на потискащи и възбуждащи невротрансмитери.
3. Показана е водещата роля на възбудната холинергична медиация в локалните нервни мрежи, контролиращи модуларната моторната активност на ректум на плъх и ролята на нитрергичната трансмисия, регулираща релаксацията на вътрешния анален сфинктер.
4. Проучването предоставя експериментални доказателства, че ефектът на нитрергичните субстанции върху изолираните препарати по дължината на ректума доминира в проксималната част, което способства за адаптиране на ректума към навлизащите от колона маси.
5. Установена е водеща роля на лонгитудиналния мускул във функционалната координация на активността на лонгитудинален и циркуларен мускули в локалните моторни отговори в цялостен аноректум на плъх. В лонгитудиналната мускулатура холинергичната медиация е по-изразена от нитрергичната.
6. Доказани са функционално различни ректоанални пътища, участващи в реализиране на низходящия отговор на анален канал – холинергично и тахикининергично по природа съкращение при прилагане на електрическа стимулация и предимно нитрергична релаксация в отговор на разтягане на стената на дистален ректум на плъх.

## Библиография

1. Гетова Д, М Ганева. Адренолитици (симпатолитици). В: Фармакология, Второ издание. Под ред. И Ламбев, Н Бояджиева. София: Арсо; 2010. стр. 101-111.
2. Казаков Л, М Власковска. Пуринаргична невротрансмисия. Една парадигма петнадесет години след създаването ѝ. Аргументи, противоречия и перспективи. В: Новости във фармакологията и фармакотерапията. Том V. Под ред. Д. Станева-Стойчева. София: Медицина и физкултура; 1989. стр. 40-63.
3. Ламбев И, И Крушков. Вегетотропни лекарства. В: Фармакотерапевтичен справочник, Седмо основно преработено издание. Под ред. И Ламбев. София: АРСО; 2010. стр. 147-156.
4. Мицов В, М Власковска, Л Казаков. Невротрансмитери и невромодулатори. София: Медицина и физкултура; 1989.
5. Радомиров Р. Рефлексни пътища на ректо-анален евакуаторен мотилитет – здравни и научни аспекти. Здраве и Наука 2011;1:53-56.
6. Стоименова Б. Физиология на храносмилателната система. Във: Физиология на човека, Първо издание. Под ред. Л Витанова, Р Гърчев. София: АРСО; 2008. стр. 195-210.
7. Узунов П. Лекарствени средства, повлияващи вегетативната нервна система. В: Фармакология, Трето преработено издание. Под ред. А. Белчева и П. Узунов. Знание; 2003. стр. 70-98.
8. Якимова К. Холинергична медиация. В: Фармакология, Второ издание. Под ред. И Ламбев, Н Бояджиева. София: Арсо; 2010. стр. 79-88.
9. Abbracchio MP, Burnstock G, Bogaards J-M et al. International union of pharmacology LVIII: update on the P2 Gprotein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev.* 2006;58:281-341.
10. Abrahamsson H. Non-adrenergic non-cholinergic nervous control of gastrointestinal motility patterns. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1986;280:50-61.
11. Adebajo AO, Ambache N, Verney J. The inhibitory transmission to internal anal sphincter. *Proceedings of B.P.S. 17<sup>th</sup>-19<sup>th</sup> December, 1975.* P. 392P-393P.
12. Adegate E, al-Ramadi B, Saleh AM, Vijayarasathy C, Ponery AS, Arafat K, Howarth FC, El-Sharkawy T. Increase in neuronal nitric oxide synthase content of the gastroduodenal tract of diabetic rats. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60:1172-1179.
13. Alberts P, Stjerne L. Facilitation and muscarinic alphaadrenergic inhibition of the secretion of <sup>3</sup>H-acetylcholine and <sup>3</sup>H-noradrenaline from guinea pig ileum myenteric nerve terminals. *Acta Physiol Scand* 1982; 116: 83-92.
14. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. Guide to receptors and channels. 2nd edn. *Br J Pharmacol.* 2006;147(Suppl 3):S1-S180
15. Altschulet SM, Escardo J, Lynn RB, Miselis RR. The central organization of the vagus nerve innervating the colon of the rat. *Gastroenterology.* 1993;104:502-509.
16. Bajwa A, Emmanuel A. The physiology of continence and evacuation. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2009;23(4):477-485.
17. Barleben A, Mills S. Anorectal anatomy and physiology. *Surg Clin North Am.* 2010;90(1):1-15.
18. Bartho L, Holzer P. Search for a physiological role of substance P in gastrointestinal motility. *Neuroscience* 1985; 16: 1-32.

19. Barthó L, Lefebvre RA. Nitric oxide-mediated contraction in enteric smooth muscle. *Arch Int Pharmacodyn. Ther.* 1995;329:53-66.
20. Bartolo DCC, Paterson HM. Anal incontinence. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2009;23:505-15.
21. Bayguinov O, Keef KD, Hagen B, and Sanders KM. Parallel pathways mediate inhibitory effects of vasoactive intestinal polypeptide and nitric oxide in canine fundus. *Br J Pharmacol.* 1999;126:1543-1552.
22. Bayliss WM, Starling EH. The movement and innervation of the small intestine. *J Physiol (Lond).* 1899;26:125-138.
23. Beranek R, Vysskoujl F. The action of tubocurarine and atropine on the normal and denervated rat diaphragm. *J Physiol.* 1967;188:53-66.
24. Berthoud HR, Carlson NR, Powley TL. Topography of efferent vagal innervation of rat gastrointestinal tract. *Am J Physiol.* 1991;260:R200-R2007.
25. Bertrand PP, Ren J. Purinergic receptors and synaptic transmission in enteric neurons. *Purinergic Signalling.* 2008;4:255-66.
26. Bertrand RL, Senadheera S, Tanoto A, Tan KL, Howitt L, Chen H et al. Serotonin availability in rat colon is reduced during a Western diet model of obesity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;303(3):G424-34.
27. Bharucha AE. Pelvic floor: anatomy and function. *Neurogastroenterol Motil.* 2006;18(7):507-19.
28. Bharucha AE. Lower gastrointestinal functions. *Neurogastroenterol Motil.* 2008;20(Suppl 1):103-13.
29. Bharucha AE, Karthik R, Zinsmeister AR. Comparison of selective M<sub>3</sub> and nonselective muscarinic receptor antagonists on gastrointestinal transit and bowel habits in humans. *Am J Gastrointest Liver Physiol.* 2010;299:G215-G219.
30. Bian X-C, Bertrand PP, Bornstein JC. Descending inhibitory reflexes involve P2X receptor-mediated transmission from interneurons to motor neurons in guinea-pig ileum. *J Physiol (Lond).* 2000;528:551-560.
31. Bian X-C, Bornstein JC, Bertrand PP. Nicotinic transmission at functionally distinct synapses in descending reflex pathways of the rat colon. *Neurogastroenterol Motil.* 2003;15:161-171.
32. Bian X-C, Heffer LF, Gwynne RM, Bornstein JC, Bertrand PP. Synaptic transmission in simple motility reflex pathways excited by distension in guinea pig distal colon. *Am J Physiol.* 2004;287:G1017-G1027.
33. Bishop BJ. Reflex activity of external anal sphincter of cat. *J Neurophysiol.* 1959;22(6):679-692.
34. Bliss DZ, Norton C. Conservative management of fecal incontinence. *Am J Nurs.* 2010;110(9):30-8.
35. Bornstein JC, Furness JB, Kunze WAA, Bertrand PP. Enteric reflexes that influence motility. In: Brookes SJH, Costa M-, editors. *Innervation of the Gastrointestinal Tract.* London: Taylor & Francis; 2002. p. 1-55.
36. Bornstein JC, Costa M, Grider JR. Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. *Neurogastro Mot.* 2004;16 (Suppl 1):34-38.
37. Bornstein JC, Marks KA, Foong JPP, Gwynne RM, Wang ZH. Nitric oxide enhances inhibitory synaptic transmission and neuronal excitability in guinea-pig submucous plexus. *Frontiers in Neuroscience.* 2010;4. P 6.
38. Bouvier M, Gonella J. Electrical activity from smooth muscle of the anal sphincteric area of the cat. *J Physiol.* 1981;310:445-56.

39. Brading AF, Ivancheva C, Radomirov R. Functional coordination of motor activity in colonic and rectoanal smooth muscles in rat experimental model. *Methods Fin Exp Clin Pharmacol.* 2008;30:201-207.
40. Brading AF, Ramalingam T. Mechanisms controlling normal defecation and the potential effects of spinal cord injury. *Prog Brain Res.* 2006;152:345-358.
41. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature (Lond).* 1990;347:768-770.
42. Broad RM, McDonald TJ, Brodin E et al. Adenosine A1 receptors mediate inhibition of tachykinin release from perfused enteric nerve endings. *Am J Physiol.* 1992;262:G525-G531.
43. Brookes SJH, Song ZM, Steele PA, Costa M. Identification of motor neurons to the longitudinal muscle of the guinea pig ileum. *Gastroenterology* 1992;103:961-973.
44. Brookes SJH. Classes of enteric nerve cells in the guinea pig small intestine. *Anat Res* 2001;262:58-70.
45. Brookes SJH, Costa M. Cellular organisation of the mammalian enteric nervous system. In: Brookes SJH, Costa M, editors. *Innervation of the Gastrointestinal Tract.* London: Taylor & Francis; 2002. pp. 393-467.
46. Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature (Lond).* 1990;345:346-347.
47. Burleigh DE. Ng-nitro-L-arginine reduces nonadrenergic, noncholinergic relaxations of human gut. *Gastroenterology.* 1992;102(2):679-83.
48. Burnstock G, Campbell G, Bennett M. Inhibition of the smooth muscle of the taenia coli. *Nature.* 1963;200:581-2.
49. Burnstock G et al. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol.* 1970;40:668-88.
50. Burnstock G et al. Atropine resistant excitation of the urinary bladder: the possibility of transmission via nerves releasing a purine nucleodide. *Br J Pharmacol.* 1972;44:451-61.
51. Burnstock G. Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience.* 1976;1:239-48.
52. Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P-purinoceptor? *Gen Pharmacol.* 1985;16:433-440.
53. Burnstock G. Noradrenaline and ATP: cotransmitters and neuromodulators. *J Physiol Pharmacol.* 1995;46:365-384.
54. Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998;50:413-492.
55. Burnstock G, Lavin S. Interstitial cells of Cajal and purinergic signalling. *Auton Neurosci.* 2002;97:68-72.
56. Burnstock G. Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4:47-52.
57. Burnstock G. P2X receptors in the gut. *WIREs Membr Transp Signal.* 2011. doi: 10.1002/wmts.16
58. Cannon WB. Peristalsis, segmentation and the myenteric reflex. *Am J Physiol.* 1912;30:114-128.
59. Cao W, Harnett KM, Behar J, Biancani P. PGF2 $\alpha$ -induced contraction of cat esophageal and lower esophageal sphincter circular smooth muscle. *Am J Physiol.* 2002;283:G282-291.
60. Carini F, Lecci A, Tramontana M, Guiliiani S, Maggi CA. Tachykinin NK<sub>2</sub> receptors and enhancement of cholinergic transmission in the inflamed rat colon: an in vivo motility study. *Br J Pharmacol.* 2001;133:1107-113.

61. Castelucci P, Robbins HL, Poole DP, Furness JB. The distribution of purine P2X(2) receptors in the guinea-pig enteric nervous system. *Histochem Cell Biol.* 2002;117:415-422.
62. Cauffield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* 1998;50(2):279-290.
63. Celtek S, Thangiah R, Bassil AK et al. Demonstration of functional neuronal  $\beta_3$ -adrenoceptors within the enteric nervous system. *Gastroenterology* 2007;133:175-83.
64. Chakder S, Rattan S. Evidence for VIP-induced increase in NO production in myenteric neurons of opossum internal anal sphincter. *Am J Physiol* 1996; 270: G492-7.
65. Chakder S, McHugh KM, Rattan S. Inhibitory neurotransmission in lethal spotted mutant mice: a model for Hirschsprung's disease. *Gastroenterology* 1997; 112:1575-85.
66. Chakder S, Rattan S. Involvement of pituitary adenylate cyclase-activating peptide in opossum internal anal sphincter relaxation. *Am J Physiol* 1998; 275: G769-77.
67. Cobine CA, Fong M, Hamilton R, Keef KD. Species dependent differences in the actions of sympathetic nerves and noradrenaline in the internal anal sphincter. *Neurogastroenterol Motil.* 2007;19(11):937-945.
68. Cobine CA, Henning GW, Bayguinov PO, Hatton WJ, Ward SM, Keef KD. Interstitial cells of Cajal in the cynomolgus monkey rectoanal region and their relationship to sympathetic and nitrergic nerves. *Am J Gastroenterol Liver Physiol.* 2010;298(5):G643-G656.
69. Cobine CA, Henning GW, Kurahashi M, Sanders KM, Ward SM, Keef KD. Relationship between interstitial cells of Cajal, fibroblast-like cells and inhibitory motor nerves in the internal anal sphincter. *Cell Tissue Res.* 2011;344:17-30.
70. Cook TA, Brading AF, Mortensen NJ. Differences in contractile properties of anorectal smooth muscle and the effects of calcium channel blockade. *Br J Surg.* 1999;86(1):70-5.
71. Cooke PH, Kargacin G, Craig R, Fogarty K, Fay FS. Molecular structure and organization of filaments in single, skinned smooth muscle cells. *Prog Clin Biol Res.* 1987;245:1-25.
72. Costa M, Furness JB. The origins, pathways and terminations of neurons with VIP-like immunoreactivity in the guinea pig small intestine. *Neuroscience* 1983;8:665-676.
73. Costa M, Furness JB, Pompolo S, Brookes SJH, Bornstein JC, Bredt DS, Snyder SH. Projections and chemical coding of neurons with immunoreactivity for nitric oxide synthase in the guinea pig small intestine. *Neurosci Lett.* 1992;148:121-125.
74. Costa M, Brookes SJ. The enteric nervous system. *Am J Gastroenterol.* 1994;89:129-137.
75. Costa M, Brookes SJ, Steele PA, Gibbins I, Burcher E, Kandiah CJ. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 1996;75:949-967.
76. Costa M, Brookes SJH, Henning GW. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut.* 2000;47(Suppl. IV):15-19.
77. Craven KB, Zagotta WN. CNG and HCN channels: Two peas, one pod. *Annu Rev Physiol.* 2006;68:375-401.
78. Crist JR, He XD, Goyal RK. Both ATP and the peptide VIP are inhibitory neurotransmitters in guinea-pig ileum circular muscle. *J Physiol (Lond).* 1992;447:119-31.
79. Dani JA, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:699-729.
80. De Godoy MA, Rattan S. Role of Rho kinase in the functional and dysfunctional tonic smooth muscles. *Trend in Pharmacology Sciences.* 2011; 32(7):384-393.

81. de Lorijn F, de Jonge WJ, Wedel T, Vanderwinden JM, Benninga MA, Boeckstaens GE. Interstitial cells of Cajal are involved in the afferent limb of the rectoanal inhibitory reflex. *Gut*. 2005;54:1107-13
82. De Man JG, De Winter BY, Seerden TC et al. Functional evidence that ATP or a related purine is an inhibitory NANC neuro-transmitter in the mouse jejunum: study on the identity of P2X and P2Y purinoceptors involved. *Br J Pharmacol*. 2003;140:1108-16.
83. DeGroat WC, Krier J. The sacral parasympathetic reflex pathway regulating colonic motility and defecation in the cat. *J. Physiol. (Lond.)* 1978;276: 481-500.
84. Desai KM, Sessa WC, Vane JR. Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. *Nature (Lond)*. 1991;351:477-9.
85. DeSesso JM, Jacobson CF. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem Toxicol*. 2001;39(3):209-28.
86. Diamant NE, Kamm MA, Wald A, Whitehead WE. AGA technical review on anorectal testing techniques. *Gastroenterol*. 1999;116:735-60.
87. Dickson EJ, Spencer NJ, Hennig GW, Bayguinov PO, Ren J, Heredia DJ, Smith TK. An enteric occult reflex underlies accommodation and slow transit in the distal large bowel. *Gastroenterology* 2007;132:1912-1924.
88. Dickson EJ, Heredia DJ, Smith TK. Critical role of 5-HT1A, 5-HT3, and 5-HT7 receptor subtypes in the initiation, generation, and propagation of the murine colonic migrating motor complex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299(1):G144-57.
89. Donnerer J, Barthó L, Holzer P, Lembeck F. Intestinal peristalsis associated with release of immunoreactive substance P. *Neuroscience* 1984;11:913-8.
90. Eglén RM. Muscarinic receptors and gastrointestinal tract smooth muscle function. *Life Sci* 2001;68:2573-8.
91. Fan Y-P, Chakder S, Gao F, Rattan S. Inducible and neuronal nitric oxide synthase involvement in lipopolysaccharide-induced sphincteric dysfunction. *Am J Physiol*. 2001; 280:G32-42.
92. Fan Y-P, Puri RN, Rattan S. Animal model for angiotensin II effects in the internal anal sphincter smooth muscle: mechanism of action. *Am J Physiol*. 2002;282:G461-469.
93. Feitz A, large WA, Trautmann A. Analysis of atropine action at the frog neuromuscular junction. *J Physiol*. 1977;269(1):109-30.
94. Fox M, Thumshirn M, Fried M. Barostat measurement of rectal compliance and capacity, *Dis Colon Rectum*. 2006;49: 360–370.
95. Franck H, Sweeney KM, Sanders KM, Shuttleworth CWR. Effect of novel guanylate cyclase inhibitor of nitric oxide-dependent inhibitory neurotransmission in canine proximal colon. *Br J Pharmacol*. 1997;122:1223-1229.
96. Friebe A, Mergia E, Dangel O, Lange A, Koesling D. Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 2007;104:7699-7704.
97. Furness JB, Morris JL, Gibbins IL, Costa M. Chemical coding of neurons and plurichemical transmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1989;29:289-306.
98. Furness JB, Bornstein JC, Pompolo S, Young HM, Kunze WAA, Kelly H. The circuitry of the enteric nervous system. *Gastroenterol Motil*. 1994;6:241:253.
99. Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clere N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog Neurobiol*. 2004; 72:143-164.
100. Furness JB. Novel gut afferents: Intrinsic afferent neurons and intestinofugal neurons. *Autonom*

- Neurosci. 2006;125(1-2);81-85.
101. Furuzono S, Nakayama S, Imaizumi Y. Purinergic modulation of pacemaker  $Ca^{2+}$  activity in interstitial cells of Cajal. *Neuropharmacology* 2005;48:264-273.
  102. Gallego D, Hernández P, Clavé P. P2Y<sub>1</sub> receptors mediate inhibitory purinergic neuromuscular transmission in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;291:G584–G594.
  103. Gallego D, Gil V, Aleu J, Auli M, Clave P, Jimenez M. Purinergic and nitrgergic junction potential in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;295:G522-G533.
  104. Gallego D, Gil V, Aleu J, Martinez-Cutillas M, Clavé P, Jimenez M. Pharmacological characterization of purinergic inhibitory neuromuscular transmission in the human colon. *Neurogastroenterol Motil*. 2011;23(8):792–e338.
  105. Galligan JJ, Bertrand PP. ATP mediates fast synaptic potentials in enteric neurons. *J Neurosci*. 1994;14:7563-7571.
  106. Galligan JJ, LePard KJ, Schneider DA et al. Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst*. 2000;81:97-103.
  107. Galligan JJ, North RA. Pharmacology and function of nicotinic acetylcholine and P2X receptors in the enteric nervous system. *Neurogastro Mot*. 2004;16(Suppl 1):64-70.
  108. Galligan J. Fecal propulsion in the colon: what a long, strange trip it is! *J Physiol*. 2008;586(17):4029.
  109. Garthwaite J. Concept of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci*. 2008;27:2783-802.
  110. Garza A, Huang LZ, Son JH, Winzer-Serhan UH. Expression of nicotinic acetylcholine receptors and subunit messenger RNAs in the enteric nervous system of the neonatal rat. *Neuroscience* 2009;158(4):1521-1429.
  111. Gershon MD. The enteric nervous system: a second brain. *Hosp Parc (Minneap)*. 1999;34(7):35-38.
  112. Gershon MD, Ratcliffe EM. Develpolment of the enteric nervous system. In: Johson LR. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 4<sup>th</sup> ed. Vol. 1. Elsevier; 2006. p. 499-522.
  113. Giaroni C, Knight GE, Ruan H-Z et al. P2 receptors in the murine gastrointestinal tract. *Neuropharmacology* 2002;43:1313-23.
  114. Gibbins IL, Morris JL, Furness JB, Costa M. Chemical coding of autonomic neurons. *Exp Brain Res*. 1987;16:23-7.
  115. Gil V, Gallego D, Grasa L, Teresa Martín MT, Jiménez M. Purinergic and nitrgergic neuromuscular transmission mediates spontaneous neuronal activity in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299 (1):G158-G169.
  116. Glushakov AV, Voytenko LP, Skok MV, Skok V. Distribution of neuronal nicotinic acetylcholine receptors containing different alpha-subunits in the submucosal plexus of the guinea-pig. *Auton Neurosci*. 2004;110:19-26.
  117. Gonzalez A, Sarna SK. Neural regulation of in vitro giant contractions in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;281: G275-G282.
  118. Gower, WR. The autonomic action of of the sphincter ani. *Proceedings of the Royal Society Lond*. 1877;26:77-84.
  119. Grady EF, Baluk P, Bohm S, Gamp PD, Wong H, Payan D G et al. Characterisation of antisera specific to NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub>, and NK<sub>3</sub> neurokinin receptors and their utilisation to localize receptors in

- the rat gastrointestinal tract. *J Neurosci* 1996;16:6975-86.
120. Grasa L, Gil V, Gallego D, Martín MT, Jiménez M. P2Y<sub>1</sub> receptors mediate inhibitory neuromuscular transmission in the rat colon. *Br J Pharmacol*. 2009;158(6):1641-52.
  121. Grider JR, Makhlouf GM. Nitric oxide (NO) is generated from muscle cells by the action of relaxant neurotransmitter, VIP. *Gastroenterology* 1992;102:A735.
  122. Grider JR. Reciprocal activity of longitudinal and circular muscle during intestinal peristaltic reflex. *Am J Physiol Gastrointest Physiol*. 2003;284:G768-G775.
  123. Gulbransen BD, Bians JS, Sharkey KA. Enteric glia are target of sympathetic innervations of the myenteric plexus in the guinea pig distal colon. *J Neurosci*. 2010;30(19):6801-6809.
  124. Gwynne RM, Bornstein JC. Synaptic Transmission at Functionally Identified Synapses in the Enteric Nervous System: Roles for Both Ionotropic and Metabotropic Receptors *Curr Neuropharmacol*. 2007;5(1):1-17.
  125. Harrington AM, Hutson M, Southwell BR. Immunohistochemical localisation of substance P NK1 receptor in guinea pig distal colon. *Neurogastroenterol Motil* 2005;17:727-737.
  126. Harrington AM, Huston JM, Southwell BR. Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system. *Prog Histochem Cytochem*. 2010;44(4):173-202.
  127. Hasler WL. Motility of the small intestine and colon. In: Yamada T ed. *Textbook of Gastroenterology*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 1999. pp.215-245.
  128. Hens J, Cajda M, Scheuermann DW, Adriaensen D, Timmermans JP. The longitudinal smooth muscle layer of the pig small intestine is innervated by both myenteric and submucous neurons. *Histochem Cell Biol*. 2002;117:481-492.
  129. Hirabayashi T, Matsufuji H, Yokoyama J, Hagane K, Hoshino K, Morikawa Y, Kitajima M. Colorectal motility by sacral nerve electrostimulation in a canine model. *Dis Colon Rectum*. 2003;46:809-817.
  130. Hirst GDS, Holman ME, Spence I. Two types of neurones in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig. *J Physiol (Lond)*. 1974;236:303-326.
  131. Holmes GM, Van Meter MJ, Beattie MS, Bresnahanb JC. Serotonergic fiber sprouting to external anal sphincter motoneurons after spinal cord contusion. *Exp Neurol*. 2005; 193:29-42.
  132. Holzer P, Maggi CA. Synergistic role of muscarinic acetylcholine and tachykinin NK<sub>2</sub> receptors in intestinal peristalsis. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1994;349:194-201.
  133. Holzer P, Holzer-Petsche U. Tachykinin receptors in the gut: physiological and pathological implications. *Curr Opin Pharmacol*. 2001;1:583-90.
  134. Hoyle CHV, Knight GE, Burnstock G. Suramin antagonizes responses to P2-purinoceptor agonists and purinergic nerve stimulation in the guinea-pig urinary bladder and taenia coli. *Br J Pharmacol*. 1990;99:617-621.
  135. Hoyle CHV, Milner P, Burnstock G. Neuroeffector transmission in the intestine. In: Brookes SJH, Costa M eds. *Innervation of the gastrointestinal tract*. London: Taylor & Francis; 2002.
  136. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotinperoxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. *J Histochem Cytochem*. 1981;29:577-80.
  137. Hu H-Z, Gao N, Lin Z et al. P2X<sub>7</sub> receptors in the enteric nervous system of guinea-pig small intestine. *J Comp Neurol*. 2007;440:299-310.

138. Huizinga JD, Tomlinson J, Pintin-Quezada J. Involvement of nitric oxide in nerve-mediated inhibition and action of vasoactive intestinal peptide in colonic smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;260:803-8.
139. Hulme EC. Muscarinic acetylcholine receptors: Typical G-coupled receptors. *Symp Soc Exp Biol.* 1990;44:39-54.
140. Ivancheva C, Radomirov R. Met-enkephalin-dependent nitrergically mediated relaxation in the guinea pig ileum. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1996;18:521-5.
141. Ivancheva C, Radomirov R. Excitatory ascending and descending motor responses in the guinea pig small intestine: a comparative study of longitudinal and circular muscles by a triple bath method. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2001;23:223-9.
142. Ivancheva C, Rahamimoff R, Radomirov R. Apamin-sensitive nitric oxide- and ATP-mediated motor effects on the guinea pig small intestine. *Gen Physiol Biophys.* 2001(a);20:97-108.
143. Jin JG, Grider JR. Nitric oxide is produced in ganglia isolated from the myenteric plexus of guinea-pig intestine. *Gastroenterology* 1992;102:A463.
144. Jin JG, Murthy KS, Grider JR, Makhlof GM. Stoichiometry of VIP release, nitric oxide formation and relaxation induced by nerve stimulation of rabbit and rat gastric muscle. *Am J Physiol.* 1996;271:G357-G369.
145. Johnson PJ, Bornstein JC, Burcher E. Roles of neuronal NK1 and NK3 receptors in synaptic transmission during motility reflexes in the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol.* 1998;124:1375-1384.
146. Kadlec O, Somogyi GT, Seferna I, Masek K, Vizi ES. Interactions between the duration of stimulation and noradrenaline on cholinergic transmission in the myenteric plexus-smooth muscle preparation. *Brain Res Bull.* 1986; 16: 171-8.
147. Kadlec O, Seferna I, Sevcik J, Somogyi GT, Vizi ES. The topographical basis of cholinergic transmission in guinea-pig ileum myenteric plexus. *Neuroscience.* 1990;36:793-802.
148. Kadowaki M, Yoneda S, Takaki M. Involvement of a purinergic pathway in sympathetic regulation of motility in rat ileum. *Auton Neurosci.* 2003;104:10-6.
149. Kamm MA, van der Sijp JR, Lennard-Jones JE. Colorectal and anal motility during defaecation. *Lancet* 1992;339:820.
150. Kato K, Kito Y, Suzuki H. Mechanical and electrical responses modulated by excitation of inhibitory nerves during stimulation with high-potassium solutions in circular smooth muscle of the rabbit rectum. *J. Smooth Muscle Res.* 2007;43(6):229-46.
151. Keef KD, Kaminski RE, Mc Dowall RA, Duffy AM, Cobine CA. Peptidergic inhibitory neuromuscular transmission in the mouse internal anal sphincter. *Neurogastroenterol Motil.* 2011;23(Suppl 1):16-18.
152. Kewenter J. The vagal control of the jejunal and ileal motility and blood flow. *Acta Physiol Scand.* 1965; 257:1-68.
153. Kirchgessner AL, Tamir H, Gershon MD. Identification and stimulation by serotonin of intrinsic sensory neurons of the submucosal plexus of the guinea pig gut: activity-induced expression of fos immunoreactivity. *J Neurosci.* 1992;12:235-48.
154. Kiss JP, Vizi ES. Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. *Trends Neurosci* 2001;24:211-5.
155. Kong ID, Koh SD, Sanders KM. Purinergic activation of spontaneous outward currents in guinea pig taenia colonic myocytes. *Am J Physiol.* 2000;278:C352-C362.

156. Kraus M, Sarna SK. Giant migrating contractions during defecation in the dog colon. *Gastroenterol.* 1987;92:925-933.
157. Krumenacker JS, Hanafy KA, Murad F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res Bull.* 2004;62:505-15.
158. Kumar D, Williams NS, Waldron D, Wingate DL. Prolonged manometric recording of anorectal motor activity in ambulant human subjects: evidence of periodic activity. *Gut.* 1989;30(7):1007-1011.
159. Kunze WA, Clerc N, Bertrand PP, Furness JB. Contractile activity in intestinal muscle evokes action potential discharge in guinea-pig myenteric neurons. *J Physiol (Lond).* 1999;517:547-61.
160. Kurahashi M, Zheng X, Dwyer L, Ward SM, Koh SD, Sanders KM. A functional role for the 'fibroblast-like cells' in gastrointestinal smooth muscles. *J Physiol.* 2011;589(3):697-710.
161. Kuriyama H, Kitamura K, Itoh T et al. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels. *Physiol Rev.* 1998;78:811-920.
162. Kurtz MM, Wang R, Clements MK, Cascieri MA, Austin CP, Cunningham BR, Chicchi GG, Liu Q. Identification, localisation, and receptor characterisation of novel mammalian substance P-like peptides. *Gene* 2002;296:205-12.
163. Lambrecht G, Gross J, Mutschler E. Neuronal somadendritic and prejunctional M1-M4 receptors in gastrointestinal and genitourinary smooth muscle. *Life Sci.* 1999;64:403-10.
164. Langley JN. *The Autonomic Nervous System*, Cambridge: Heffer; 1921.
165. Lanzafame AA, Christopoulos A, Mitchelson F. Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. *Receptors Channels.* 2003;9(4):241-60.
166. Law NM, Bharucha AE, Zinsmeister AR. Rectal and colonic distension elicit viscerovisceral reflexes in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;283(2):G384-G389.
167. Lecci A, De Giorgio R, Bartho L, Sternini C, Tramontana M, Corinaldesi R et al. Tachykinin NK receptor-mediated inhibitory responses in the guinea-pig small intestine. *Neuropeptides.* 1999;33:91-97.
168. Lecci A, Santicoli P, Maggi CA. Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. *Curr Opin Pharmacol.* 2002;2:630-41.
169. Lecci A, C Apria Ti A, Altamura M, Maggi CA. Tachykinins and tachykinin receptors in the gut, with special reference to NK<sub>2</sub> receptors in humans. *Auton Neurosci Basic Clin.* 2006;126:232-49.
170. Lecea B, Gallego D, Farré R, Opazo A, Aulí M, Jiménez M, Clavé. Regional functional specialization and inhibitory nitrenergic and nonnitrenergic coneurotransmission in the human esophagus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;300(5):G782-G794.
171. Leclere PG, Lefebvre RA. Influence of nitric oxide donors and of the alpha-2 agonist UK-14,304 on acetylcholine release in the pig gastric fundus. *Neuropharmacology* 2001;40:270-278.
172. Lee HK, Ro S, Kim YH. Differential expression of P2X- purinoceptor subtypes in circular and longitudinal muscle of canine colon. *Neurogastro Mot.* 2005;17:575-584.
173. Li CG, Rand MJ. Evidence for a role of nitric oxide in the neurotransmitter system mediating relaxation of the rat anococcygeus muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1989;16:933-938
174. Lino S, Nojyo Y. Muscarinic M<sub>2</sub> acetylcholine receptor distribution in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Neuroscience* 2006;138(2):549-559.
175. Loeffler S, Holzer P, Maggi CA, Kilbinger H. Inhibition by NK<sub>1</sub>receptors of the electrically evoked release of acetylcholine from guinea pig myenteric neurones. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1994;349:352.

176. Lunniss PJ, Phillips RKS. Anatomy and function of the anal longitudinal muscle. *Br J Surg.* 1992;79(9):882-884.
177. Lynn PA, Olsson C, Zagorodnyuk V. Rectal intraganglionic laminar endings are transduction sites of extrinsic mechanoreceptors in the guinea pig rectum. *Gastroenterology* 2003;125:786-794.
178. Lyster DJK, Bywater RAR, Taylor GS. Neurogenic control of myoelectric complexes in the mouse isolated colon. *Gastroenterology* 1995;108:1371-1378.
179. Maggi CA, Zagorodnyuk V, Giuliani S. Specialization of tachykinin NK1 and NK2 receptors in producing fast and slow atropine-resistant neurotransmission to the circular muscle of the guinea-pig colon. *Neuroscience* 1994;63:1137-1152.
180. Maggi CA. The mammalian tachykinin receptors. *Gen Pharmacol.* 1995;26:911-944.
181. Makhlof GM, Murthy KS. Cellular physiology of gastrointestinal smooth muscle. In: Johnson LR. *Physiology of the gastrointestinal tract.* 4<sup>th</sup> ed. Vol. 1. Elsevier; 2006. p. 523-532.
182. Malcolm A, Camilleri M. Coloanal motor coordination in association with high-amplitude colonic contractions after pharmacological stimulation. *Am J Gastroenterol.* 2000;5:715-9.
183. Martin E, Berka V, Bogatenkova E, Murad F Tsai AL. Ligand selectivity of soluble guanylyl cyclase: effect of the hydrogen-bonding tyrosine in the distal heme pocket on binding of oxygen, nitric oxide, and carbon monoxide. *J Biol Chem.* 2006;281:27836-45.
184. Maselli MA, Trisolini P, Petitta C, Lorusso D, Cicienia A, Scirocco A et al. Myogenic regional responsiveness to cholinergic and VIPergic stimulation in human colon. *Neurogastroenterol Motil.* 2011. DOI:10.1111/j.1365-2982.2012.01927.x
185. Matsufuji H, Yokoyama J, Hirabayashi T, Watanabe S, Sakurai K. Cooperative roles of colon and anorectum during spontaneous defecation in conscious dogs. *Dig Dis Sci.* 1998;43:2042-7.
186. Matsufuji H, Yokoyama J. Neural control of the internal anal sphincter motility. *J Smooth Muscle Res* 2003; 39:11-20.
187. Matsuyama H, El-Mahmoudy A, Shimizu Y, Takewaki T. Nitroergic prejunctional inhibition of purinergic neuromuscular transmission in the hamster proximal colon. *J Neurophysiol.* 2003;89:2346-53.
188. McConalogue K, Todorov L, Furness JB, Westfall DP. Direct measurement of the release of ATP and its major metabolites from the nerve fibres of the guinea-pig taenia coli. *Cl Exp Pharmacol Physiol.* 1996;23:807-12.
189. McKirdy HC, Richardson SE, Green JT, Rhodes J, Williams GT, Marshall RW. Differential effect of nitric oxide synthase inhibition on sigmoid colon longitudinal and circular muscle responses to nicotine and nerve stimulation in vitro. *Br J Surg.* 2004;91:229-34.
190. Merwid-Lad A, Trocha M, Książczyńska D, Sozański T, Szelaż A. Animal models for the gastrointestinal motility evaluation. *Gastroenterologia Polska* 2009;16(3):201-6.
191. Michael S, Warstat C, Michel F, Yan L, Muller CE, Nieber K. Adenosine A<sub>2A</sub>-agonist and A<sub>2B</sub>-antagonist mediate an inhibition of inflammation-induced contractile disturbance of a rat gastrointestinal preparation. *Purinergic Signalling* 2010;6:117-24.
192. Milenov K, Kalfin R. Cholinergic-nitroergic interactions in the guinea-pig gastric fundus. *Neuropeptides* 1996;30:365-71.
193. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol.* 1989;38:1709-15.
194. Mongardi Fantaguzzi C, Thacker M, Chiocchetti R, Furness JB. Identification of neuron types in the submucosal ganglia of the mouse ileum. *Cell Tissue Res* 2009;336:179-89.

195. Monro RL, Bertrand PP, Bornstein JC. ATP and 5-HT are the principal neurotransmitters in the descending excitatory reflex pathway of the guinea-pig ileum. *Neurogastro Motil.* 2002;14:255-64.
196. Moro E, Crema F, Dandolo C, De Ponti F, Frigo G. Effect of muscarinic receptor blockade on canine gastric tone and compliance in vivo. *Pharmacol Res.* 2005;51(4):289-96.
197. Murthy KS, Kuemmerle JF, Makhoul GM. Release of arachidonic acid by agonist-mediated activation of PLA<sub>2</sub> initiates Ca<sup>2+</sup> mobilization in intestinal smooth muscle. *Am J Physiol.* 1995;269:G93-G102.
198. Murthy KS, Makhoul GM. Interaction of cA-kinase and cG-kinase in mediating relaxation of dispersed smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1995;268:C171-C180.
199. Murthy KS, Zhou H, Grider JR, Makhoul GM. Inhibition of sustained smooth muscle contraction by PKA and PKG preferentially mediated by phosphorylation of RhoA. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284:G1006-G1016.
200. Mutafova-Yambolieva VN, O'Driscoll K, Farrelly A, Ward SM, Keef KD. Spatial localization and properties of pacemaker potentials in the canine rectoanal region. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284:G748-G755.
201. Nagano M, Ishimizu Y, Saitoh S, Okada H, Hiroyuki Fukuda H. The defecation reflex in rats: fundamental properties and the reflex center. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.* 2004;111: 48-56.
202. Nakano IM, Erdodi F, Hartshorne DJ. Myosine phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem.* 2004;259:197-209.
203. Nasser Y, Ho W, Sharkey KA. Distribution of adrenergic receptors in the enteric nervous system of the guinea pig, mouse, and rat. *J Comp Neurol.* 2006; 495: 529-53.
204. National Institute of Standards and Technology. In: Taylor BN, Thompson A, editors. *The International System Of Units (SI)*. 2008 Ed. Gaithersburg (MD): Natl. Inst. Stand. Technol.; Spec. Pub. 330. 2008. 96 p.
205. Neil MC, Rampton DS. Is the rectum usually empty? A quantitative study in subjects with and without diarrhea. *Dis Colon Rectum.* 1981;24:596-9.
206. Neild TO, Kotecha N. Actions of neuropeptide Y on arterioles of the guinea-pig small intestine are not mediated by smooth muscle depolarization. *J Auton Nerv Syst.* 1990;30:29-36.
207. Neunlist M, Michel K, Aube AC, Galmiche JP, Scheman M. Projections of excitatory and inhibitory motor neurons to the circular and longitudinal muscle of the guinea pig colon. *Cell Tissue Res.* 2001;305:325-30.
208. Nicholas S, Spenser NJ. Peristalsis and fecal pellet propulsion do not require nicotinic, purinergic, 5-HT<sub>3</sub>, or NK<sub>3</sub> receptors in isolated guinea pig distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;298:G952-G961.
209. Nichols K, Staines W, Krantis A. Neural sites of the human colon colocalize nitric oxide synthase-related NADPH diaphorase activity and neuropeptide Y. *Gastroenterology* 1994;107:968-975.
210. Niel JP, Bywater RAR, Taylor GS. Apamin-resistant post-stimulus hyperpolarization in the circular muscle of the guinea-pig ileum. *J Auton Nerv Syst.* 1983;9:565-569.
211. Nissan S, Vinograd Y, Hadari A, Merguerian P, Zamir O, Lernau O, Hanani M. Physiological and pharmacological studies of the internal anal sphincter in the rat. *J Pediatr Surg.* 1984;19(1):12-14.
212. North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* 2002;82:1013-1067.

213. Ogier R, Tribollet E, Suarez P, Raggenbass M. Identified Motoneurons Involved in Sexual and Eliminative Functions in the Rat Are Powerfully Excited by Vasopressin and Tachykinins. *J Neurosci*. 2006;26(42):10717-26.
214. Okishio Y, Niioka S, Yamaji M, Yamazaki Y, Nishio H, Takeuchi T et al. Mediators of Nonadrenergic, Noncholinergic Relaxation in Sprague Dawley Rat Intestine: Comparison with the Mediators of Other Strains. *J Vet Med Sci*. 2000;62(8):821-8.
215. Olgart C, Iversen HH. Nitric oxide-dependent relaxation induced by M<sub>1</sub> muscarinic receptor activation in the rat small intestine. *Br J Pharmacol*. 1999;127:309-313.
216. Onori L, Aggio A, Taddei G, Tonini M. Contribution of NK2 tachykinin receptors to propulsion in the rabbit distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;278:G137-G147.
217. Opazo A, Lecea B, Admella C, Fantova MJ, Jiménez M, Martí-Ragué J, Clavé P. A comparative study of structure and function of the longitudinal muscle of the anal canal and the internal anal sphincter in pigs. *Dis Colon Rectum*. 2009;52(11):1902-11
218. Opazo A, Lecea B, Gil V, Jimenez M, Clave P, Gallego D. Specific and complementary roles for nitric oxide and ATP in the inhibitory motor pathways to rat internal anal sphincter. *Neurogastroenterol Motil*. 2011;23:e11-e25.
219. Orkin BA, Hanson RB, Kelly KA. The Rectal Motor Complex. *Gastroenterol Motil*. 1989;1(1):5-8.
220. Osthaus LE, Galligan JJ. Antagonists of nitric oxide synthesis inhibit nerve-mediated relaxations of longitudinal muscle in guinea pig ileum. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;260:140-145.
221. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature (Lond)*. 1987;327:524-526.
222. Patel CA, Rattan S. Spontaneously tonic smooth muscle has characteristically higher levels of RhoA/ROK compared with the phasic smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;291:G830-G837.
223. Patel CA, Rattan S. Cellular regulation of basal tone in internal sphincter smooth muscle by RhoA/ROCK. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292:G1747-G1756.
224. Paton WD. The response of the guinea pig ileum to electrical stimulation by coaxial electrodes. *J Physiol* 1955; 127: 40–1P.
225. Paton WD, Zar A. The origin of acetylcholine released from guinea-pig intestine and longitudinal muscle strip. *J Physiol (Lond)*. 1968;194:13-33.
226. Paton WD, Vizi ES. The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on acetylcholine output by guinea-pig ileum longitudinal muscle strip. *Br J Pharmacol*. 1969;35,10-28.
227. Pennefather JN, Lecci A, Luz Candenas M, Patak E, Pinto FM, Maggi CA. Tachykinin and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci*. 2004;74:1445-1463.
228. Penninckx F, Lestar B, Kerremans R. The internal anal sphincter: mechanisms of control and its role in maintaining anal continence. *Baillieres Clin Gastroenterol*. 1992;6:193-214.
229. Phillips RJ, Powley TL. Innervation of the gastrointestinal tract: pattern of aging. *Auton Neurosci*. 2007;136(1-2):1-19.
230. Poole DP, Castelucci P, Robbins HL et al. The distribution of P2X<sub>3</sub> purine receptor subunits in the guinea pig enteric nervous system. *Auton Neurosci*. 2002;101:39-47.
231. Portbury AL, Pompolo S, Furness JB, Stebbing MJ, Kunze WAA, Bornstein JC, Hughes S. Cholinergic, somatostatin-immunoreactive interneurons in the guinea pig intestine – morphology, ultrastructure, connections and projections. *J Anat*. 1995;187:303-321.
232. Porter AJ, Wattchow DA, Brookes SJ, Schemann M, Costa M. Choline acetyltransferase

- immunoreactivity in the human small and large intestine. *Gastroenterology* 1996;111:401-408.
233. Porter AJ, Wattchow DA, Brookes SJ, Costa M. The neurochemical coding and projections of circular muscle motor neurons in human colon. *Gastroenterology* 1997;113:1916-1923.
234. Porter AJ, Wattchow DA, Brookes SJ, Costa M. Projection of nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide-reactive submucosal neurons in the human colon. *J Gastroenterol Hepatol*. 1999;14:1180-1187.
235. Porter AJ, Wattchow DA, Brookes SJ, Costa M. Cholinergic and nitrergic interneurons in the myenteric plexus of the human colon. *Gut* 2002;51:70-75.
236. Powey TL, Prechtl JC, Fox EA, Berthoud HR. Anatomical considerations for surgery of the rat abdominal vagus: distribution, paraganglia and regeneration. *J Auton Nerv Syst*. 1983;9:79-97.
237. Powell AK, Fida R, Bywater RA. Motility in the isolated mouse colon: migrating motor complexes, myoelectric complexes and pressure waves. *Neurogastroenterol Motil*. 2003;15:257-66.
238. Pozzoli C, Poli E. Assessment of Gastrointestinal Motility Using Three Different Assays In Vitro. *Curr Protoc Toxicol*. 2010 Nov 1; Wiley online library. doi: 10.1002/0471140856.tx2108s46.
239. Prior A, Fearn UJ, Read NW: Intermittent rectal motor activity: a rectal motor complex? *Gut*. 1991;32:1360-3.
240. Radomirov R, Venkova K. Pharmacological characteristics of the postsynaptically mediated contractile responses of guinea-pig ileum to long-lasting electrical field stimulation. *Neuropharmacology* 1988;27:729-735.
241. Radomirov R, Ivancheva C, Brading AF, Itzev D, Rakovska A, Negrev N. Ascending and descending reflex motor activity of recto-anal region. Cholinergic and nitrergic implications in a rat model. *Brain Res Bull*. 2009a;79:147-155.
242. Radomirov R, Ivancheva C, Itzev D, Petkova-Kirova P. Locality-dependent descending reflex motor activity in the anal canal - cholinergic and nitrergic contributions in the rat model. *Acta Pharmacol Sin*. 2009b;30:1276-1282.
243. Rae MG, Muir TC. Neuronal mediators of inhibitory junction potentials and relaxation in the guinea-pig internal anal sphincter. *J Physiol (Lond)*. 1996;493:517-527.
244. Rajasekaran MR, Jiang Y, Bhargava V, Littlefield R, Lee A, Lieber RL, Mittal RK. Length-tension relationship of the external anal sphincter muscle: implications for the anal canal function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;295:G367-G373.
245. Rajasekaran MR, Jiang Y, Bhargava V, Lieber RL, Mittal RK. Novel application of external anal sphincter muscle sarcomere length to enhance the canal function. *Neurogastroenterol Motil*. 2011;23:70-77.
246. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*. 1998;50:413-492.
247. Rand MJ, Li CG. Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:659-82.
248. Ranganath S, Strohbehn K. Fecal Incontinence. Updated: Jan 13, 2012. <http://emedicine.medscape.com/article/268674-overview>.
249. Rathi S, Kazerounian S, Banwait K, Schulz S, Waldman SA, Rattan S. Functional and molecular characterization of  $\beta$ -adrenoceptors in the internal anal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 305: 615-24.
250. Rattan S, Chakder S. Role of nitric oxide as a mediator of internal anal sphincter relaxation. *Am J Physiol*. 1992;262(1 Pt 1):G107-12.

251. Rattan S, Thatikunta P. Role of nitric oxide in sympathetic neurotransmission in opossum internal anal sphincter. *Gastroenterology* 1993; 105: 827-36
252. Rattan S, Chakder S. L-Citrulline recycling in opossum internal anal sphincter relaxation by nonadrenergic, noncholinergic nerve stimulation. *Gastroenterology* 1997;112:1250-9.
253. Rattan S, Al Haj R, De Godoy MA. Mechanism of internal anal sphincter relaxation by CORM-1, authentic CO and NANC nerve stimulation. *Am J Physiol*. 2004;287:G605-G611.
254. Rattan S, Regan RF, Patel CA, De Godoy MA. Nitric oxide not carbon monoxide mediates nonadrenergic noncholinergic relaxation in the murine internal anal sphincter. *Gastroenterology* 2005, 129: 1954–66.
255. Rattan S. The internal anal sphincter: regulation of smooth muscle tone and relaxation. *Neurogastroenterol Motil*. 2005b;17(Suppl. 1):50-59
256. Rattan S, Singh J. Basal internal anal sphincter tone, inhibitory neurotransmission, and other factors contributing to the maintenance of high pressures in the anal canal. *Neurogastroenterol Motil*. 2011;23(1):3-7.
257. Ren J, Bian X-C, DeVries M et al. P2X2 subunits contribute to fast synaptic excitation in myenteric neurons of the mouse small intestine. *J Physiol (Lond)*. 2003;552:809–821
258. Roberts RR, Murphy JL, Young HM, Bornstein JC. Development of colonic motility in the neonatal mouse – studies using spatiotemporal maps. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292,G930-G938.
259. Roberts RR, Bornstein JC., Bergner AJ, Young HM. Disturbances of colonic motility in mouse models of Hirschprung’s disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;294: G996-G1008.
260. Roberts RR, Ellis M, Gwynne RM, Bergner AJ, Lewis MD, Beckett EA, Bornstein JC, Young HM. The first intestinal motility patterns in fetal mice are not mediated by neurons or interstitial cells of Cajal. *J Physiol*. 2010;588(7):1153-69.
261. Rodrigo J, Uttenthal LO, Peinado MA, Esteban FJ, Fernandez AP, Serrano J et al. Distribution of nitric oxide synthase in the esophagus of the cat and monkey. *J Auton Nerv Syst*. 1998;70:164-179.
262. Sakamoto T, Unno T, katazawa T, Taneike T, Yamada M, Wess J et al. Tree distinct muscarinic signaling pathways for cationic channel activation in mouse gut smooth muscle cells. *J Physiol*. 2007;582:41-61.
263. Sanders KM. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 1996;111(2):492-515.
264. Sanders KM, Keef KD. Nitroergic neurotransmission in the enteric nervous system. *Nitric Oxide in Biology and Medicine* 2000;2:114-37.
265. Sanders K, Ward S. Interstitial cells of Cajal: a new perspective on smooth muscle function. *J Physiol*. 2006;576(Pt 3):721-726.
266. Sang Q, Young HM. The identification and chemical coding of cholinergic neurons in the small and large intestine of the mouse. *Anat Rec*. 1998;251:185-199.
267. Sanger GJ, Tuladhar BR, Bueno L, Furness JB. Defensive and pathological functions of the gastrointestinal NK3 receptors. *Vasc Pharmacol* 2006;45:215-220.
268. Sangwan YP, Collier JA, Barrett RC, Murray JJ, Roberts PL, Schoetz DJ Jr. Distal rectoanal excitatory reflex: a reliable index of pudendal neuropathy? *Dis Colon Rectum*. 1995;38(9):916-20.
269. Sangwan YP, Solla JA. Internal anal sphincter: advances and insights. *Dis Colon Rectum*. 1998;41:1297-1311.

270. Santafe MM, Lanuza MA, Garcia N, Tomas J. Muscarinic autoreceptors modulate transmitter release through protein kinase C and protein kinase A in the rat motor nerve terminal. *Eur J Neurosci.* 2006;23(8):2048-56.
271. Sarna SK. Myoelectric correlates of colonic motor complexes and contractile activity. *Am J Physiol.* 1986;250:G213–G220.
272. Schemann M, Grundy D. Electrophysiological identification of vagally innervated enteric neurons in guinea pig stomach. *Am J Physiol.* 1992;263:G709-G718.
273. Schemann M, Sann H, Schaaf C, Mäder M. Identification of cholinergic neurons in enteric nervous system by antibodies against choline acetyltransferase. *Am J Physiol.* 1993;265(5 Pt 1):G1005-9.
274. Scherer-Singler U, Vincent SR, Kimura H, McGeer EG. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J Neurosci Methods.* 1983;9:229-234.
275. Schlossmann J, Hofmann F. cGMP-dependent kinases in drug discovery. *Drug Discov Today.* 2005;10:627-634.
276. Schneider DA, Galligan JJ. Nicotinic acetylcholine receptors on nerve terminals releasing slow synaptic transmitters in the myenteric plexus of guinea pig ileum. *Am J Physiol.* 2000;279:G528-G535.
277. Schneider DA, Perrone M, Galligan JJ. Nicotinic acetylcholine receptors at sites of neurotransmitter release to the guinea pig intestinal circular muscle. *J Pharm Exp Ther.* 2000;294:363-369.
278. Schwörer H, Kilbinger H. Enhancement of guinea-pig intestinal peristalsis by blockade of muscarinic M<sub>1</sub>-receptors. *Br J Pharmacol.* 1988;93:715-720.
279. Sculptoreanu A, De Groat W C. Protein kinase C is involved in neurokinin receptor modulation of N and L-type Ca<sup>2+</sup> channels in DRG neurons of the adult rat. *J Neurophysiol.* 2003; 90: 21-31.
280. Serio R, Mulè F, Bonvissuto F, Postorino A. Tachykinins mediate noncholinergic excitatory neural responses in the circular muscle of rat proximal colon. *Can J Physiol Pharmacol.* 1998;76(6):684-9.
281. Sethi AK, Sarna SK. Contractile mechanisms of canine colonic propulsion. *Am J Physiol.* 1995;268:G530-G538.
282. Shafik A, El-Sibai O, Ahmed I. Role of the sigmoid colon in the defecation mechanism with evidence of sigmoido-anal inhibitory and ano-sigmoid excitatory reflex. *Front Biosci.* 2001;6:B25-B29.
283. Shafik A, Shafik AA, Ahmed I. Role of positive anorectal feedback in rectal evacuation: the concept of a second defecation reflex: the anorectal reflex. *J Spinal Cord Med.* 2003;26:380-383.
284. Shafik A, Shafik AA, El-Sibai O, Ali YA. Videodefecography: a study of the rectal motile pattern. *Surg. Radiol. Anat.* 2003;25:139-144.
285. Shafik A, Mostafa RM, Shafik I, El-Sibai O, Shafik AA. Functional activity of the rectum: A conduit organ or a storage organ or both? *World J Gastroenterol.* 2006;12(28):4549-4552.
286. Shafik A, El Sibai O, Ahmed I. The identification of specialized pacemaking cells in the anal sphincters. *Int J Colorectal Dis.* 2006;21(5):453-457.
287. Skinner MA. Hirschsprung's disease. *Curr Probl Surg.* 1996;33:389-460.
288. Smith TK, Bornstein JC, Furness JB. Convergence of reflex pathways excited by distension and mechanically deforming the mucosa onto morphologically characterized myenteric neurons of the guinea-pig small intestine. *J Neurosci.* 1992;12:1502-10.

289. Smith TK, Robertson WJ. Synchronous movements of longitudinal and circular muscle during peristalsis in the isolated guinea-pig colon. *J Physiol.* 1996;506(2):563-77.
290. Smith TK, McCarron SL. Nitric oxide modulates cholinergic reflex pathways to the longitudinal and circular muscle in the isolated guinea-pig distal colon. *J Physiol.* 1998;512:893-906.
291. Somlyo AV, Goldman YE, Fujimori T, Bond M, Trentham DR, Somlyo AP. Cross-bridge kinetics, cooperativity, and negatively strained cross-bridges in vertebrate smooth muscle. *J Gen Physiol.* 1988;91(2):165-92. DOI: 10.1085/jgp.91.2.165
292. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* 2003;83:13250-54.
293. Sotirov E, Papisova M. Nitric oxide modulates release of noradrenaline in guinea-pig gastric fundus. *Brain Res Bull.* 2000;51:401-405.
294. Speakman CTM, Hoyle CHV, Kamm MA, Henry MM, Nicholls RJ, Burnstock G. Decreased sensitivity of muscarinic but not 5-hydroxytryptamine receptors of the internal anal sphincter in neurogenic faecal incontinence. *Br J Surg* 1992; 79:829-32.
295. Spencer NJ, Bywater RAR, Taylor GS. Disinhibition during myoelectric complexes in the mouse colon. *J Auton Nerv Syst.* 1998;71:37-47.
296. Spencer N, Walsh M, Smith TK. Does the guinea-pig ileum obey the 'law of the intestine'? *J Physiol (Lond).* 1999;517:889-98.
297. Spencer NJ, Walsh M, Smith TK. Purinergic and cholinergic neuro-neuronal transmission underlying reflexes activated by mucosal stimulation in the isolated guinea-pig ileum. *J Physiol (Lond).* 2000;522:321-31.
298. Spenser NJ, Hennig GW, Smith TK. A rhythmic motor pattern activated by circumferential stretch in guinea pig distal colon. *J Physiol.* 2002; 545(2): 629-48.
299. Stark ME, Bauer AJ, Szurszewski JH. Effect of nitric oxide on circular muscle of canine small intestine. *J Physiol (Lond).* 1991;444:743-761.
300. Stebbing JF, Brading AF, McC Mortensen NJ. Nitrgergic innervations and relaxant response of rectal circular smooth muscle. *Dis Colon Rectum.* 1996;39(3):294-9.
301. Stebbing JF, Brading AF, Mortensen NJ. Nitric oxide and the rectoanal inhibitory reflex: retrograde neuronal tracing reveals a descending nitrgergic rectoanal pathway in a guinea-pig model. *Br J Surg.* 1996b;83:493-8.
302. Stebbing JF, Brading AF, McC Mortensen NJ. Role of nitric oxide in relaxation of the longitudinal layer of rectal smooth muscle. *Dis Colon Rectum.* 1997;40(6):706-10.
303. Stebbing JF. Nitric oxide synthase neurones and neuromuscular behaviour of the anorectum. *Ann R Coll Surg Engl.* 1998;80:137-45.
304. Stebbing MJ, Johnson PJ, Vremec MA, Bornstein JC. Role of  $\alpha_2$ -adrenoceptors in the sympathetic inhibition of motility reflexes of guinea-pig ileum. *J Physiol (Lond).* 2001;534:465-78.
305. Stratowa C, Machat H, Burger E, Himmler A, Schafer R, Spevak W et al. Functional characterisation of the human neurokinin receptors NK1, NK2, and NK3 based on a cellular assay system. *J Rec Signal Transd.* 1995;15:617-630.
306. Su C et al. <sup>3</sup>H adenosine triphosphate: release during stimulation of enteric nerves. *Science.* 1971;173:336-38.
307. Súilleabháin CB, Horgan AF, McEnroe L, Poon FW, Anderson JH, Finlay IG, McKee RF. The relationship of pudendal nerve terminal motor latency to squeeze pressure in patients with idiopathic fecal incontinence. *Dis Colon Rectum.* 2001;44(5):666-71

308. Takahashi T, Owyang C. Regional differences in the nitrergic innervation between the proximal and the distal colon in rats, *Gastroenterology* 1998;115:1504-12.
309. Takahashi T. Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthases in the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol.* 2003;38:421-430.
310. Takaki M. Gut pacemaker cells: the interstitial cells of Cajal (ICC). *J Smooth Muscle Res.* 2003;39(5):137-61.
311. Takaki M, Suzuki H, Nakayama S. Recent advances in studies of spontaneous activity in smooth muscle: ubiquitous pacemaker cells. *Prog Biophys Mol Biol.* 2010;102(2-3):129-35. Epub 2010 May 27.
312. Takeuchi T, Tanaka K, Nakajima H, Matsui M, Azuma Y-T. M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub> muscarinic receptors are involved in enteric nerve-mediated contraction in the mouse ileum: finding obtained with muscarinic-receptor knocking mouse. *Am J Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292:G154-G164.
313. Tamura K, Schemann M, Wood JD. Actions of nitric oxide-generating sodium nitroprusside in myenteric plexus of guinea pig small intestine. *Am. J. Physiol.* 1993;265:G887-G893.
314. Teng B-Q, Grider JR, Murthy Ks. Identification of VIP-specific receptor in guinea pig tenia coli. *Am J Physiol.* 2001;281:G718-G725.
315. Terauchi A, Kobayashi D, Mashimo H. Distinct roles of nitric oxide synthases and interstitial cells of Cajal in rectoanal relaxation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;289(2):G291-299.
316. Thomas EA, Sjövall H-, Bornstein JC. Computational model of the migrating motor complex of the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;286:G564-G572.
317. Tichenor SD, Buxton IL, Johnson P, O'Driscoll K, Keef KD. Excitatory motor innervation in the canine rectoanal region: role of changing receptor populations. *Br J Pharmacol.* 2002;137(8):1321-9.
318. Timmermans J-P, Adriaensen D, Cornelissen. W, Scheuermann DW. Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes. *Comp Biochem Physiol.* 1997;118:331-40.
319. Tsukamoto K, Hajime A, Mantyh C, Pappas TN, Yanagi H, Yamamura T et al. Luminally released serotonin stimulates colonic motility and accelerates colonic transit in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;293:R64-R69.
320. Tobin G, Giglio D, Lundgren O. Muscarinic receptor subtype in the alimentary tract. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60:3-21.
321. Toda N, Baba H, Okamura T. Role of nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic nerve-mediated relaxation in dog duodenal longitudinal muscle strips. *Jpn J Pharmacol.* 1990;53:281-4.
322. Tomita T, Watanabe H. A comparison of the effects of adenosine triphosphate with noradrenaline and with the inhibitory potential of the guinea-pig taenia coli. *J Physiol (Lond).* 1973;231:167-77.
323. Tomita R, Igarashi S, Fujisaki S, Koshinaga T, Kusafuka T. Are there any functional differences of enteric nervous system between the proximal and distal parts from the dentate line in the normal human internal anal sphincter? *Hepatogastroenterology.* 2008;55(88):2083-6.
324. Tong WD, Ridolfi TJ, Kosinski I, Ludwig K, Takahashi T. Effects of autonomic nerve stimulation on colorectal motility in rats. *Neurogastroenterol Motil.* 2010;22(6):688-93.
325. Tonini M, Frigo G, Lecchini S, D'Angelo L, Crema A. Hyoscine-resistant peristalsis in guinea-pig ileum. *Eur J Pharmacol.* 1981;71:375-381.
326. Tonini M, Costa M. A pharmacological analysis of the neuronal circuitry involved in distension-

- evoked enteric excitatory reflex. *Neuroscience*. 1990;38:787-795.
327. Tonini M, Costa M, Brookes SJ, Humphreys CM. Dissociation of the ascending excitatory reflex from peristalsis in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience* 1996;73:287-297.
  328. Tonini M, De Giorgio R, De Ponti F, Stemini C, Spelta V, Dionigi P et al. Role of nitric oxide- and vasoactive intestinal polypeptide-containing neurons in human gastric fundus spasm relaxations. *Br J Pharmacol*. 2000;129:12-20.
  329. Tonini M, Spelta V, De Ponti F, De Giorgio R, D'agostino G, Stanghellini V, Corinaldesi R, Sternini C, Crema F. Tachykinin-dependent and -independent components of peristalsis in the guinea pig isolated distal colon. *Gastroenterology* 2001;120:938-945.
  330. Trybus KM, Waller GS, Chatman TA. Coupling of ATPase activity and motility in smooth muscle myosin is mediated by the regulatory light chain. *J Cell Biol*. 1994;124:963-969.
  331. Tucek S. Transport of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in central stump and isolated segment of peripheral nerve. *Brain Res*. 1975;86:259-270.
  332. Ustach TJ, Tolon F, Hambrecht T, Bass DD, Schuster MM. Electrophysiological aspects of human sphincter function. *J Clin invest*. 1970;49:41-48.
  333. Valero MS, Fagundes DS, Grasa L, Arruebo MP, Plaza MÁ, Murillo MD. Contractile effect of tachykinins on rabbit small intestine. *Acta Pharmacol Sin*. 2011;32(4):487-94.
  334. Van Crombruggen K and Lefebvre RA. Nitroergic-purinerbic interactions in rat distal colon motility. *Neurogastroenterol Motil*. 2004;16:81-98.
  335. Van der Veek PP, Schots ED, Masclee AA. Effect of neurotensin on colorectal motor and sensory function in humans. *Dis Colon Rectum*. 2004;47(2):210-218.
  336. Van Geldre LA, Lefebvre RA. Nitroergic relaxation in rat gastric fundus: influence of mechanism of induced tone and possible role of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase. *Life Sci*. 2004;74:3259-3274.
  337. Vasina V, Abu-Gharbieh E, Barbara G. The  $\beta_3$ -adrenoceptor agonist SR58611A ameliorates experimental colitis in rats. *Neurogastroenterol Motil*. 2008;20:1030-41.
  338. Venkova K, Krier J. Stimulation of lumbar sympathetic nerves evokes contractions of cat colon circular muscle mediated by ATP and noradrenaline. *Br J Pharmacol*. 1993;110:1260-1270.
  339. Vitton VR, Abysique A, Gaige S, Leroi A, Bouvier M. Colonosphincteric electromyographic responses to sacral root stimulation: evidence for a somatosympathetic reflex. *Neurogastroenterol Motil*. 2007;20:407-16.
  340. Vizi ES, Knoll J. The effects of sympathetic nerve stimulation and guanethidine on parasympathetic neuroeffector transmission; the inhibition of acetylcholine release. *J Pharm Pharmacol* 1971;23:918-25.
  341. Vizi ES. Role of high-affinity receptors and membrane transporters in nonsynaptic communication and drug action in the central nervous system. *Pharmacol Rev*. 2000;52:63-89.
  342. von Euler US, Gaddum JH: An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol (Lond)*. 1931;72:74-87.
  343. Ward SM, McKeen ES, Sanders KM. Role of nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory junction potentials in canine ileocolonic sphincter. *Br J Pharmacol*. 1992;105:776-782.
  344. Ward SM, Beckett EA, Wang X, Baker F, Khoyi M, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal mediated cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons. *J Neurosci*. 2000;20(4):1393-1403.
  345. Ward SM, Sanders KM, Hirst GD. Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles. *Neurogastroenterol Motil*. 2004;1:112-117.

346. Waseda K, Takeuchi T, Ohta M, Okishio Y, Fujita A, Hata F et al. Participation of ATP in Nonadrenergic, Noncholinergic Relaxation of Longitudinal Muscle of Wistar Rat Jejunum. *J Pharmacol Sci.* 2005;97(1):91-100.
347. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Edu.* 2003;27:201-206.
348. Wester T, O'Briain S, Puri P. NADPH diaphorase-containing nerve fibers and neurons in the myenteric plexus are resistant to postmortem changes: studies in Hirschsprung's disease and normal autopsy material. *Arch Pathol Lab Med.* 1998;122:461-466.
349. White TD, Leslie RA. Depolarization-induced release of adenosine 5'-triphosphate from isolated varicosities derived from the myenteric plexus of the guinea pig small intestine. *J Neurosci.* 1982;2:206-215.
350. Whitehead WE, Borrud L, Goode PS, et al. Fecal incontinence in US adults: epidemiology and risk factors. *Gastroenterology.* 2009;137:512-517.
351. Wiklund CU, Olgart C, Wiklund NP, Gustafsson LE. Modulation of cholinergic and substance P-like neurotransmission by nitric oxide in the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol.* 1993;110:833-9.
352. Wiklund NP, Celtek S, Leone AM, Iversen HH, Gustafsson LE, Brundin I et al. Visualisation of nitric oxide released by nerve stimulation. *J Neurosci Res.* 1997;47:224-232.
353. Wilson AJ, Liewellyn Smith IJ, Furness JB, Costa M. The source of the nerve fibres forming the deep muscular and circular muscle plexuses in the small intestine of guinea-pig. *Cell Tissue Res.* 1987;247:497-504.
354. Wood JD. Intrinsic neural regulation of intestinal motility. *Ann Rev Physiol* 1981;43:31-49.
355. Wood JD. The enteric purinergic P2Y1 receptor. *Curr Opin Pharmacol.* 2006a;6:564-570.
356. Wood JK. Cellular neurophysiology of enteric nervous system. In: Johnson LR. ed. *Physiology of the gastrointestinal tract.* 4<sup>th</sup> ed. Vol. 1. Elsevier; 2006b. p. 629-664.
357. Wray S, Burdyga T, Noble K. Calcium signalling in smooth muscle. *Cell Calcium.* 2005;38(3-4):397-407.
358. Wu M, Majewski M, Wojtkiewicz J, Vanderwinden JM, Adriaensen D, Timmermans JP. Anatomical and neurochemical features of the extrinsic and intrinsic innervation of the striated muscle in the porcine esophagus: evidence for regional and species differences. *Cell Tissue Res.* 2003;311:289-297.
359. Yamanouchi M, Shimatani H, Kadowaki M, Yoneda S, Nakagawa T, Fuji H, et al. Integrative control of rectoanal reflex in guinea pig through lumbar colonic nerves. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;283:G148-56.
360. Yamato S, Rattan S. Role of alpha adrenoceptors in opossum internal anal sphincter. *J Clin Invest.* 1990;86(2):424-429.
361. Yang G, Zhong T, Cheng WY, Ding GS. Change of substance P in portal vein during rectoanal inhibitory reflex. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi.* 2006;9:538-41.
362. Yau WM, Dorsett JA, Parr EL. Characterization of acetylcholine release from enzyme-dissociated myenteric ganglia. *Am J Physiol.* 1989;256:G233-G239.
363. Yau WM, Mandel KG, Dorsett JA, Youther ML. Neurokinin3 receptor regulation of acetylcholine release from myenteric plexus. *Am J Physiol.* 1992;263:G659-G664.
364. Yuan SY, Bornstein JC, Furness JB. Pharmacological evidence that nitric oxide may be a retrograde messenger in the enteric nervous system. *Br. J. Pharmacol.* 1995;114:428-32.

365. Zagorodnyuk V, Santicoli P, Maggi CA. Tachykinin NK1 but not NK2 receptors mediate non-cholinergic excitatory junction potentials in the circular muscle of guinea-pig colon. *Br J Pharmacol.* 1993;110:795-803.
366. Zagorodnyuk V, Maggi CA. Neuronal tachykinin NK2 receptors mediate release of non-adrenergic non-cholinergic inhibitory transmitters in the circular muscle of the guinea-pig colon. *Neuroscience* 1995;69:643-50.
367. Zhang Y, Lomax AE, William G. Paterson WG. Zhang P2Y<sub>1</sub> Receptors Mediate Apamin-Sensitive and -Insensitive Inhibitory Junction Potentials in Murine Colonic Circular Smooth Muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;333(2):602-11.
368. Zholos AV, Zholos AA, Bolton TB. G-protein-gated TRP-like cationic channel activated by muscarinic receptors: effect of potential on single-channel gating. *J Gen Physiol.* 2004;123(5):581-98.
369. Zhou X, Galligan JJ. Synaptic activation and properties of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors in myenteric neurons of guinea pig intestine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;290:803–810.