

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН
ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА

КАТЕДРА „ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА И КЛИНИЧНА ФАРМАКОЛОГИЯ,
ДЕРМАТОЛОГИЯ И ВЕНЕРОЛОГИЯ”

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

Официални рецензенти:
Проф. д-р Анна Белчева Беронова, дмн
Доц. д-р Иван Тодоров Ламбев, дм

Плевен • 2012

Дисертационният труд е представен на 174 страници. Съдържа 49 фигури (42 с представени резултати, от които 38 графични изображения и 4 снимки) и 9 таблици. Библиографията обхваща 369 литературни източника, от които 8 на кирилица.

Експериментите са проведени в лаборатория „Периферни синапси“, а морфологичните изследвания – в лаборатория „Функционална невроанатомия“ при Институт по невробиология, БАН.

Експерименталните програми са провеждани в съответствие с изискванията на Комисия по етика на научно-изследователската дейност на Институт по невробиология при БАН.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита на Разширен катедрен съвет на катедра „Експериментална и клинична фармакология, дерматология и венерология“ при Медицински университет гр. Плевен.

Изказвам признателността си към всички, които ми помогнаха да започна, осъществя и завърша това изследване. Благодаря на моите учители, близки и колеги за подкрепата и съпричастността.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 20.12.2012 г. от 12 часа в зала „Амброаз Паре“ на ТЕЛЕЦ при Медицински Университет – Плевен.

Материалите по защитата са въведени в сайта на МУ – Плевен www.mu-pleven.bg

СЪДЪРЖАНИЕ

I.	ВЪВЕДЕНИЕ	5
II.	ЦЕЛ, ЗАДАЧИ И МЕТОДИЧНИ ПОДХОДИ	
1.	Цел	6
2.	Задачи	6
3.	Материали и методични подходи	
3.1.	Експериментални животни	7
3.2.	Изследване на модулари моторни отговори	7
3.3.	Изследване на рефлексни отговори в цялостен аноректум	8
3.4.	Техническо оборудване	9
3.5.	Експериментален протокол	10
3.6.	Имунохистохимични и хистохимично изследвания	11
3.7.	Статистически методи	13
III.	РЕЗУЛТАТИ ОТ ПРОУЧВАНЕТО	
1.	Модуларни моторни отговори	13
1.1.	Спонтанна моторна активност	13
1.2.	Електрически-предизвикани модулари моторни отговори на изолирани ринг-препарати в зависимост от локализацията им по дължината на аноректума	14
1.3.	Модуларни моторни отговори при въздействие на субстанции, повлияващи холинергичната и нитрергичната невромедияция	17
2.	Моторни отговори на ивици лонгитудинална мускулатура	25
3.	Моторни отговори в цялостен аноректум	27
3.1.	Спонтанна моторна активност	27
3.2.	Локални електрически-предизвикани моторни отговори	28
3.3.	Низходящи електрически-предизвикани моторни отговори	29
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	32
4.	Ефект на тетродотоксин върху моторните отговори	33
5.	Морфологични резултати	33
5.1.	Имунохистохимичното изследване за холинацетил трансфераза	34
5.2.	Имунохистохимичното изследване субстанция Р	34
5.3.	Хистохимично изследване за NADPH-диафораза	35
5.4.	Имунохистохимичното изследване за АТФ-синтаза	35
6.	ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ	
6.1.	Експериментални животни и експериментален модел	37
6.2.	Спонтанна моторна активност	37
6.3.	Модуларни моторни отговори	37
6.4.	Моторни отговори на ивици лонгитудинална мускулатура	42
6.5.	Моторни отговори в цялостен аноректум	43
6.5.1.	Локални моторни отговори	43
6.5.2.	Низходящи моторни отговори	45
6.6.	Морфологични изследвания	49
	ИЗВОДИ	50
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	51
	Приноси на дисертационния труд	53
	Публикации и съобщения от експериментални изследвания, свързани с дисертационния труд	54
	ANNOTATION	56

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

cAMP	Cyclic adenosine-monophosphate (<i>цикличесен аденозин монофосфат</i>)
cGMP	Cyclic guanosine-monophosphate (<i>цикличесен 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>
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>)
5-HT	5-hydroxytryptamine (<i>серотонин</i>)
IAS	Internal anal sphincter (<i>вътрешен анален сфинктер</i>)
EFS	Electrical field stimulation (<i>електрическа полева стимулация</i>)
IPAN	Intrinsic primary afferent neurons (<i>вътрешни първични аферентни неврони</i>)
IPSP	Inhibitory postsynaptic potentials (<i>задържащи постсинаптични потенциали</i>)
L-Arg	L-arginine
L-NAME	L-N ^G -Nitroarginine methyl ester
L-NNA	NG-nitro-L-arginine
LM	<i>Ивици от лонгитудидална гладка мускулатура</i>
mACh	Muscarinic cholinergic (<i>мускаринови холинергични</i>)
nACh	Nicotinic cholinergic (<i>никотинови холинергични</i>)
NADPH-d	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (<i>никотинамид аденин динуклеотид фосфат-диафораза</i>)
NA	Noradrenaline (<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>)
СЧТ	<i>Стомашно-чревен тракт</i>
SP	Substance P (<i>субстанция P</i>)
Sie	<i>Анален канал</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.

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

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Нормалната двигателна активност в дисталните отдели на стомашно-чревния тракт е от изключително значение за качеството на живот. Крайните отдели на дебелото черво 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 медиират ректоаналните функции. През последните 20 години, след доказване на неадренергичната-нехолиергична невротрансмисия се уточнява значението на ентералната нервна регулацията за функциите на интестиналния тракт в норма и патология.

Според Costa и колектив (2000) малки пръстени от циркуларна мускулатура, заедно с прилежащите ентерални неврони, могат да се съкращават независимо и се разглеждат като функционални модули. Въпреки обширните данни в научната литература за двигателна активност на дебелото черво, все още ролята на локалните нервни модули в мотилитета по циркуларната ос в ректо-аналната 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 на плъх.

Ролята на локалните нервни мрежи, лежащи в основата на съкратителната и/или релаксиращата активност на лонгитудиналния и циркуларния мускулен слой в 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 мускул в дебелото черво на морско свинче [Smith a. 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.

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. Влиянието на ректалните рефлексии върху двигателната активност на аналния канал, при съхранен анатомичен и функционален интегритет на ректума, вътрешния и външен анален сфинктер, както и фармакологията на основните невромедиатори в ректоаналната област са недостатъчно проучени.

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 тя 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 интестиналния тракт. Фармакологични аспекти за ролята на отделни невромедиаторни системи в моториката на ректоаналната област са предмет на изследване в настоящия дисертационен труд.

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 пълх.

2. ЗАДАЧИ

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

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

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

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 пълх.

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 пълх.

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

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИЧНИ ПОДХОДИ

3.1. Експериментални животни

Използвани са 120 мъжки имбредни нормотензивни бели мъжки плъхове порода Wistar с тегло 250-280 g (възраст 10-12 седмици). Животните са отглеждани във вивариума на Институт по невробиология на БАН, при температура $22.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$, 12:12 h светъл-тъмен цикъл и свободен достъп до храна и вода. Те са оставяни на глад през нощта преди експеримента и са убивани чрез гилотиниране. Коремната кухина е отваряна и 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 разтвор на Кребс на стайна температура. Препаратите са промивани с разтвор на Кребс, прилаган със спринцовка в техния проксималния край.

3.2. Изследване на модулаторни моторни отговори

Изолirани препарати за изследване на модулаторни 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.

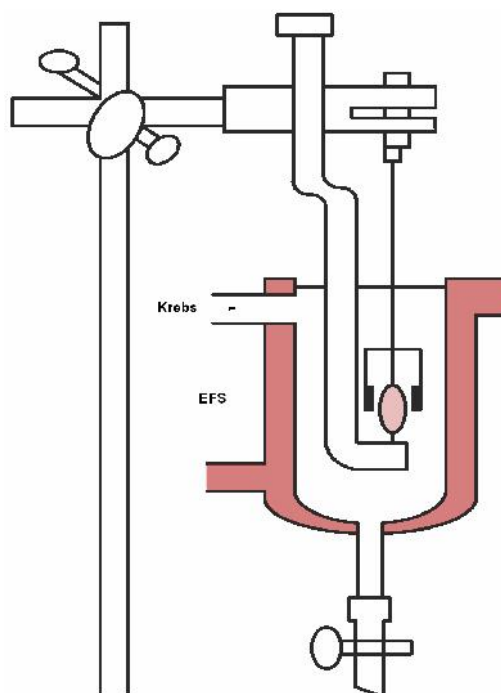
За проучване на модулаторните отговори са изолирани следните ринг-препарати: анален канал (Sie): съдържащ вътрешен и външен анален сфинктер (EAS), с ширина 3-4 mm; вътрешен анален сфинктер (ISA); циркуларни гладкомускулни ринг-препарати с ширина 2 mm от дисталната (Cd; на 3-4 mm от аналния край на препарата); медиалната (Cm; на 10 mm от аналния край на препарата) и проксималната част на препарата (Cp; на 20 mm). Изолиран е IAS (около 2.0 mm), намиращ се 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 ос 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 $36,5^\circ\text{C}$ (фиг. 1). На всички препарати се прилага натоварване, равностойно на 10 mN [Ivancheva a. Radomirov, 2001]. Тонусът и спонтанната контрактилна активност на препаратите се стабилизират за 45-минутния период на адаптация. Компютъризирана механографска on-line техника се използва за регистриране на моторната активност на изолираните препарати.

Електрическа полева стимулация на изолирани гладкомускулни препарати

За предизвикване на възбуждане на нервните структури е използвана електрическа полева стимулация (EFS) [Paton a. Vizi, 1969]. Тя е прилагана чрез два платинени електрода (с 0.45 mm дебелина), фиксирани 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 [Ivancheva a. Radomirov, 2001].

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



Фигура 1. Схема на органна вана за изследване на електрически-предизвикани моторни отговори

3.3. Изследване на рефлексни отговори в цялостен аноректум

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 EAS и запазена анатомична цялостност на ректума и IAS.

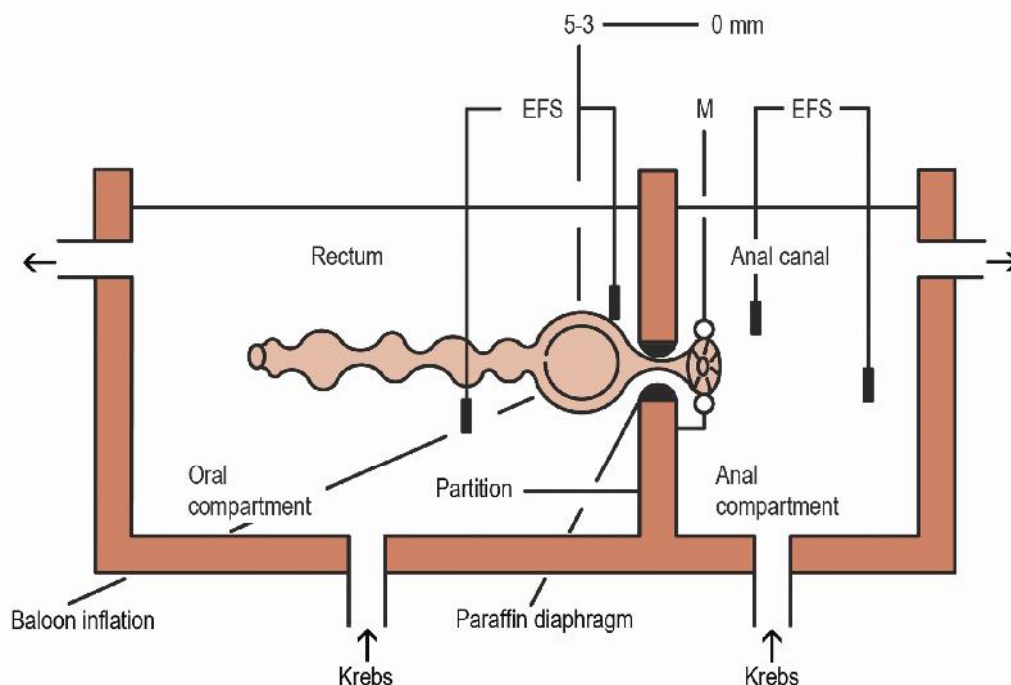
Метод на двукамерна органна вана

За изучаване на моторните рефлексни отговори на изолирания аноректум е използвана модификация на метода на многокамерна органна вана [фиг 2; Ivancheva a. Radomirov, 2001].

Плоска органна вана с хоризонтално разположение се разделя на две части от преграда с цепка, запълнена с парафинова диафрагма (фиг. 2). Ваната се състои от орална и анална част, всяка с обем 10 ml и със система за независима доставка и оттичане на осигигениран разтвор на Krebs. Препаратът 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 IAS – 3-4 mm) – в аналната част. Инертна силиконова маз се поставя върху 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 отговора на лонгитудиналната мускулатура. Моторната активност на циркуларната мускулатура се регистрира чрез тензодатчик, свързан с конец обхващащ напречно мускулно снопче. Моторната активност на двата мускула се регистрира едновременно [Brading et al., 2008]. По същия начин се фиксират IAS или аналния канал. Лонгитудиналните, циркуларните мускули, както и вътрешния сфинктер или аналния канал се натоварват с начален еквивалент от 10 mN.

Електрическа полева стимулация в цялостен аноректум

За предизвикване на възбуждане на нервните структури в цялостен аноректум е използвана EFS, с описаните по-горе параметри. 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.



Фигура 2. Схема на двукамерна органна вана за изследване на електрически- и балон-предизвикани моторни отговори в изолиран цялостен аноректум

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 възбуждането по дистално насочени ентeрални пътища.

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. Балонът, напълнен с разтвор на Krebs 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. 2). Балонът се надува постепенно (обемно контролирано раздуване с 0.04-0.40 ml разтвор на Krebs 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 възбуждането по дистално насочен ректоанален 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 монтиране 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. EFS-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 за tetrodotoxin е 10 min, а за всички останали субстанции – 15 min. Когато субстанциите са прибавяни последователно (atropine плюс NG-nitro-L-arginine (L-NNA) и т.н.), времето на действие е 30 min [Radomirov et al., 2009a]. В табл. 1 са дадени използваните субстанции, фирмите-производители и концентрациите на използваните разтвори.

Таблица 1. Използвани субстанции при изследване на EFS-предизвиканите отговори на изолирани препарати

	Субстанция	Фирма	Концентрация
1.	Atropine sulfate	Merck, Darmstadt, Germany	0.3 μ M (3×10^{-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 μ M (10^{-7} M)
4.	L-arginine	Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA	0.5 mM (5×10^{-4} M)
5.	NG-nitro-L-arginine (L-NNA)	Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA	0.5 mM (5×10^{-4} M)
6.	Prazosin hydrochloride	Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA	0.1 μ M (10^{-7} M)
7.	Propranolol hydrochloride	Merck, Darmstadt, Germany	0.1 μ 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 μ M (10^{-7} M)

Съставът на разтвора на Кребс в mM е: NaCl 120, KCl 5.9, NaHCO₃ 15.4, NaH₂PO₄ 1.2, MgCl₂ 1.2, CaCl₂ 2.5 и глюкоза 11.5. Разтворът се аерира постоянно с 95 % O₂ и 5 % CO₂ (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 L-NNA. Prazosin hydrochloride до концентарция 10⁻⁵ M е разтварян в двойно дестилирана вода и 96° етилов алкохол в съотношение 1:1, L-NNA е умерено разтворим във вода (50 mg/ml) и е разтварян в нагрятата до 60°C бидестилирана вода. Основният разтвор на TTX 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 пуринергичните – 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-блоккер propranolol hydrochloride и α_1 -селективния блоккер prazosin hydrochloride. Неврогенната или миогенна природа на моторните отговори е тествана чрез претретиране с тетродотоксин (TTX) – селективен блоккер на бързия натриев канал.

3.6. Имунохистохимични и хистохимично изследвания

Наличието и локализацията на ацетилхолин-, субстанция P-, АТФ- 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 АТФ-синтаза и хистохимичен метод – за NADPH-диафороза.

Морфологичните експерименти са извършени върху 10 мъжки плъха, порода Wistar с тегло 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 min, последвано от фиксатора 4% параформалдехид в 0.1 M фосфатен буфер (pH 7.3) за 20 min. 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 µm и са разпределени в четири групи. Имунохистохимичното оцветяване на първите три групи, за изследване на ChAT-, SP- и АТФ-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-диафороза по метода на Scherer-Singler et al., 1983. Препаратите за имунохисто-химично изследване са улавяни и промивани трикратно с PBS/0.5% Triton X-100. Ендогенната пероксидаза е блокирана с 1.2% H₂O₂ 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 антители в работно разреждане 1:6000; а тези за изследване на АТФ-синтазна активност – в миши моноклонални антители в разреждане 1:10000. Второто антитяло, използвано за първите две групи срезове, е кози антизаешки 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 антители 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/H₂O₂ (3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride/H₂O₂). Контролните реакции са проведени върху срезове, инкубирани без първично антитяло, или с PBS и резултатите са отрицателни.

Хистохимично изследване за NADPH-диафороза

Редуцираната никотинамид аденин динуклеотид фосфат-диафороза (NADPH-d) и Ca²⁺/калмодулин-зависимият ензим NOS участват в образуването на NO чрез превръщането на L-arginine в цитролин. В тази реакция NADPH е ко-субстрат. Затова NOS-съдържащите структури могат морфологично да се визуализират чрез хистохимична техника за оцветяване на NADPH-d. Препаратите за изследване на NADPH-диафороза 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 β-

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

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

За микроскопските изследвания е използвано следното оборудване: светлинен микроскоп Jenaval (Germany), 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.

В табл. 2 са дадени използваните субстанции, фирмите-производители и концентрациите на използваните разтвори за хистохимичната и имунохистохимичните процедури.

Таблица 2. Използвани субстанции при хистохимичната и имунохистохимичните процедури

	Субстанция	Фирма	Концентрация
1.	Фосфатен буфер физиологичен разтвор PBS	Fluka AGBuch, Switzerland	5x10 ⁻⁵ M с pH 7.3 10 ⁻⁴ 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 ₂ O ₂ разтвор в абсолютен метанол
5.	Paraformaldehyde	Merck, Darmstadt, Germany	4% разтвор в 0.1 M фосфатен буфер
6.	EntellanMethanol	Merck, Darmstadt, Germany	
7.	Normagoat serum	Sigma Chemicals, StLouis, MO, USA	5% разтвор
8.	Reduced β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β-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 µl 30%H ₂ O ₂ ; проявяване от 2 до 10 min
11.	Rabbit polyclonal anticholine 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 Lab. Inc. Burlingame, USA	Разреждане 1:10000
15.	Mouse IgG Goat anti-Mouse Polyclonal (Biotin) Antibody	Vector Lab. Inc. Burlingame, USA	Разреждане 1:250
16.	Avidin-biotin complex (Vectastain ABC kit)	Vector Lab. Inc. Burlingame, USA	(62.6 ml A + 62.6 ml B/10 ml 0.01M PBS)

3.7. Статистически методи

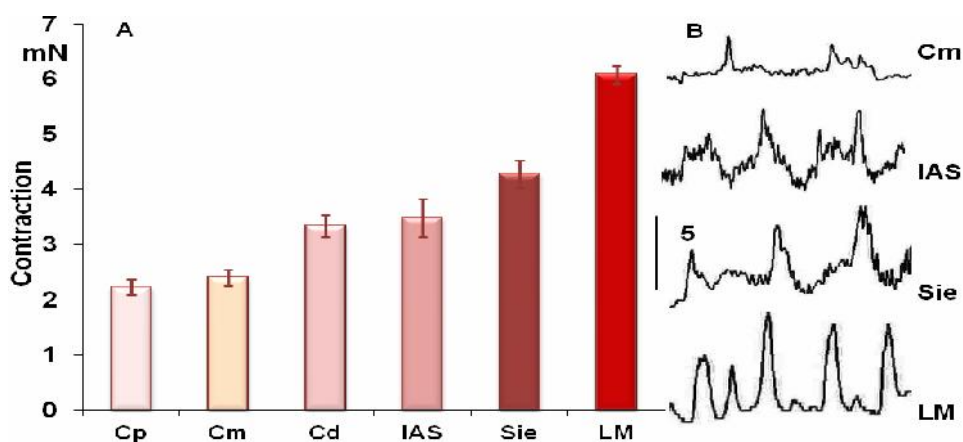
Установеното след 45-минутна адаптация ниво на тонуса се приема за изходна точка за измерване на амплитудата на моторните отговори. Амплитудите са представени в milliNewton (mN; 1 mN=0.102 g). Амплитудите на регистрираните отговори са съпоставяни чрез Student *t*-теста и а еднофакторен ANOVA, *post hoc* (LSD, Bonferroni и Duncan) тестове. 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 представяне на механографските записи е използван програмен продукт Origin 7.5 Pro.

III. РЕЗУЛТАТИ ОТ ПРОУЧВАНЕТО

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. 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: Cp – 2.23 ± 0.15 mN ($n=18$); Cm – 2.40 ± 0.15 mN ($n=14$); Cd – 3.34 ± 0.21 mN ($n=16$); IAS – 3.43 ± 0.35 mN ($n=12$) и Sie – 4.28 ± 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 ($p < 0.05$; фиг. 3). Не е наблюдавана релаксация в спонтанната двигателна активност във всички изолирани препарати. В присъствие на ТТХ не се регистрира намаление на спонтанно развилия се мускулен тонус на IAS.



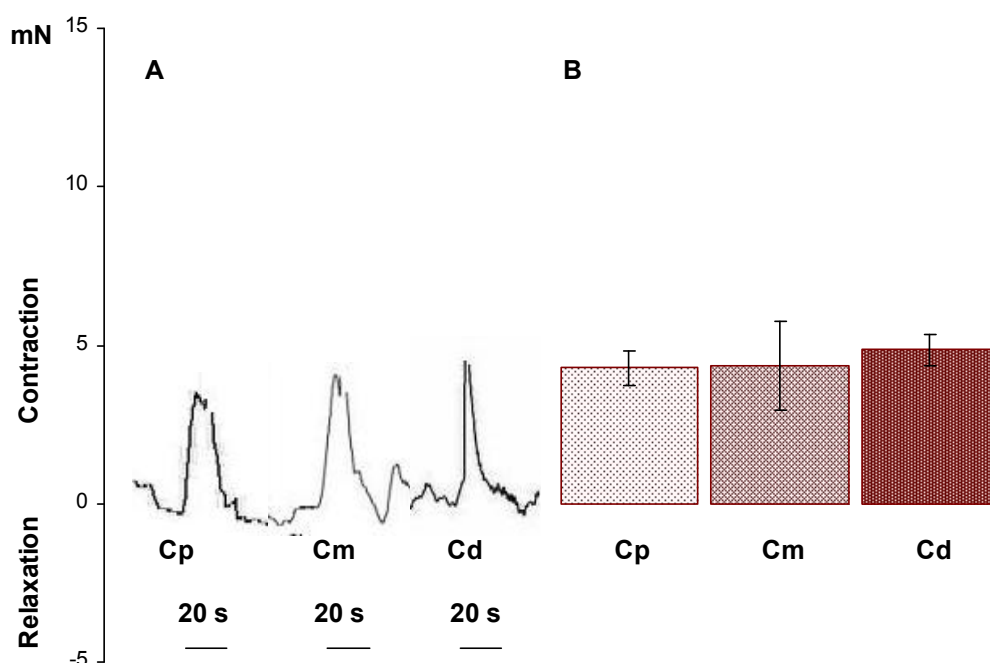
Фигура 3. Спонтанна двигателна активност на изолирани препарати от ректоанална област. А – хистограми на амплитудите на фазичните съкращения; В – типични механографски записи. Амплитудите са представени като средна стойност \pm SEM от 12 препаратата. Post hoc ANOVA LSD тестът показва статистически достоверни разлики между амплитудите на фазичните съкращения с изключение на Cp към Cm и Cd към IAS ($p < 0.05$)

1.2. Електрически-предизвикани модулари моторни отговори на изолирани ринг-препарати в зависимост от локализацията им по дължината на аноректума

Електрическата стимулация (EFS, 0.8 ms, 40 V, 20 s), приложена с честота 2, 5 и 10 Hz върху изолираните ринг-препарати от различни области на ректума и аналния канал, предизвиква моторни отговори, характеризиращи се с бързоразвиващи се тип „пик“ съкращения. Амплитудите на отговорите се увеличават с повишаването на честотата на електрическите стимули. 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 (-3.57 ± 0.43 mN; $n=12$); при 5 Hz – с кратка релаксация; при 10 Hz – с по-кратка и нискоамплитудна релаксация (-2.00 ± 0.31 mN), последвана от съкращение с амплитуда 3.95 ± 0.28 mN.

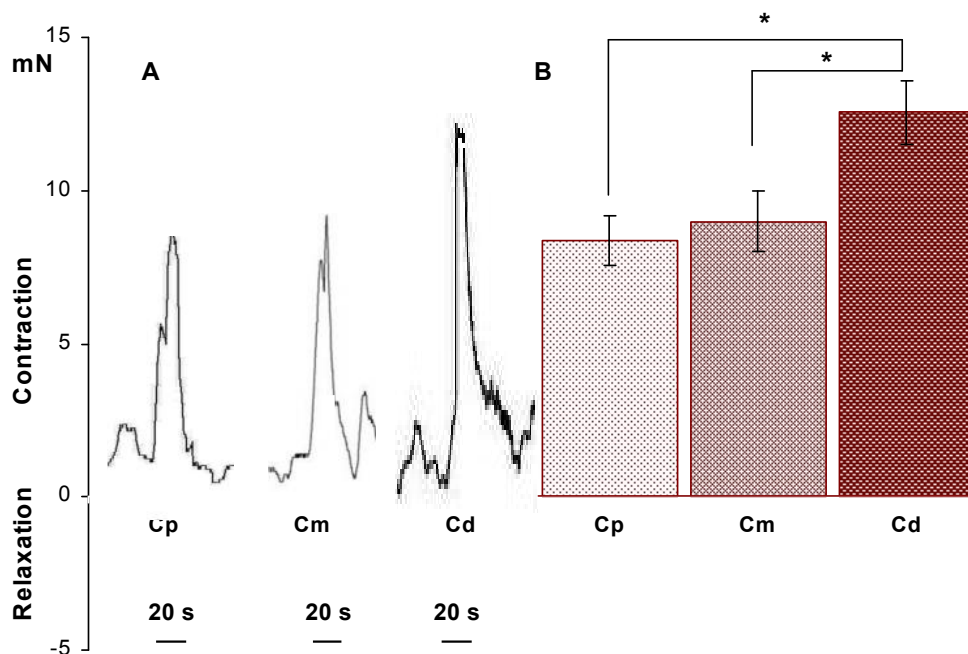
Съкращенията на циркуларните ринг-препарати, изолирани от различни части на ректума, се увеличават по амплитуда в анална посока. Най-слаб съкратителен отговор се наблюдава в Cp (фиг. 4, 5 и 6). Пръстените Cd отговарят на електрическата стимулация с по-висока амплитуда на съкращенията в сравнение с Cp и Cm. 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. 5), а с честота 10 Hz с 48.40% ($n=18$, $p < 0.05$), респективно (фиг. 6).

Не е наблюдавана релаксация в електрически-предизвиканите модулари моторни отговори на Cp, Cm, Cd и аналния канал.

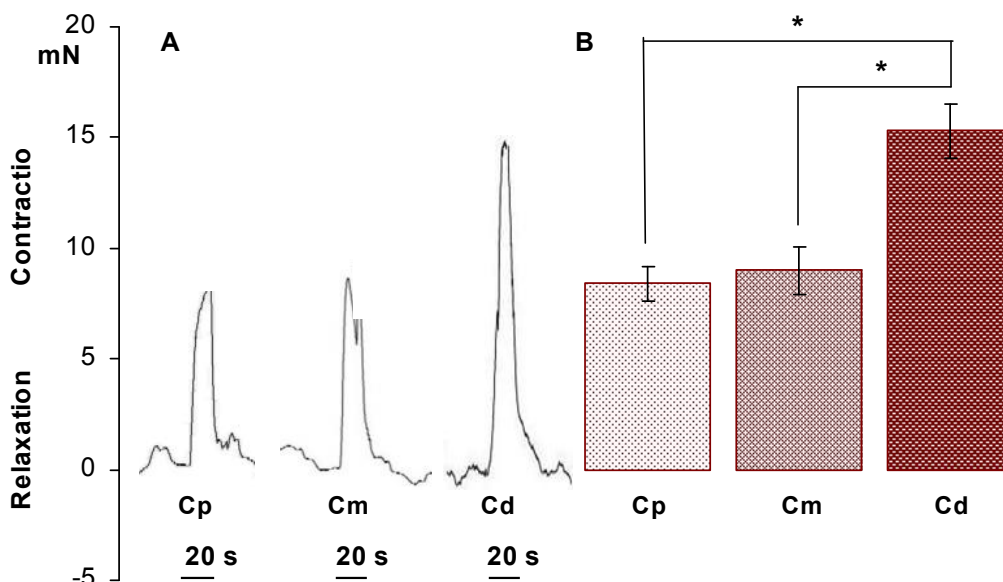


Фигура 4. Типични механографски записи (A) и хистограми (B), показващи електрически-предизвиканите (0.8 ms, 40 V, 20 s, 2 Hz) моторни отговори на на ринг-препарати, изолирани от проксимална (Cp), медиална (Cm) и дистална (Cd) част на ректум. Амплитудите са представени като средна стойност \pm SEM от най-малко 14 препаратата

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. 7). Контрактилните отговори на Cd и Sie при електрически стимули с честота 2 Hz са близки по амплитуда 4.85 ± 0.48 mN ($n=13$) и 4.64 ± 0.51 mN ($n=16$, $p>0.05$) респективно, въпреки че контракциите на ректалните мускулни пръстени са по-изразени.

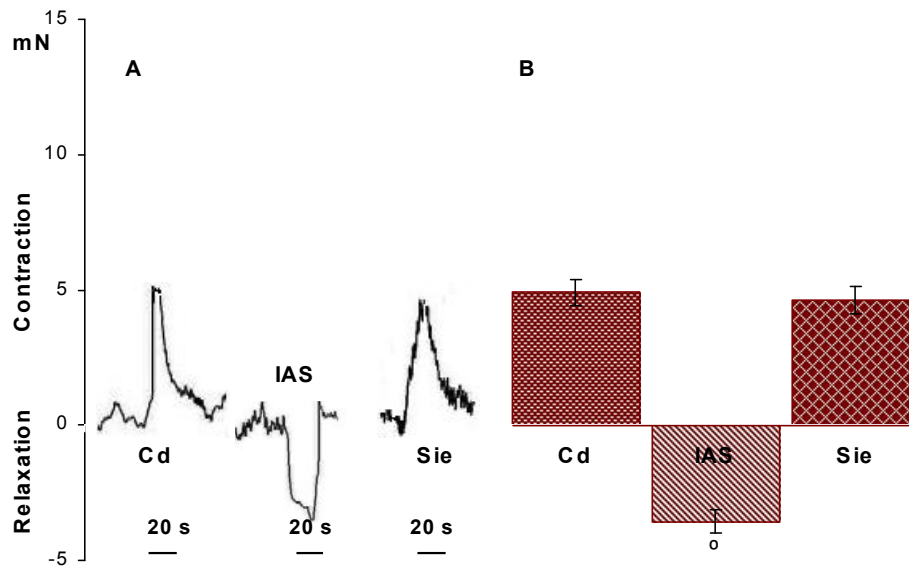


Фигура 5. Типични механографски записи (A) и хистограми (B), показващи електрически-предизвиканите (0.8 ms, 40 V, 20 s, **5 Hz**) моторни отговори на на ринг-препарати, изолирани от проксимална (C_p), медиална (C_m) и дистална (C_d) част на ректум. Амплитудите са представени като средна стойност \pm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

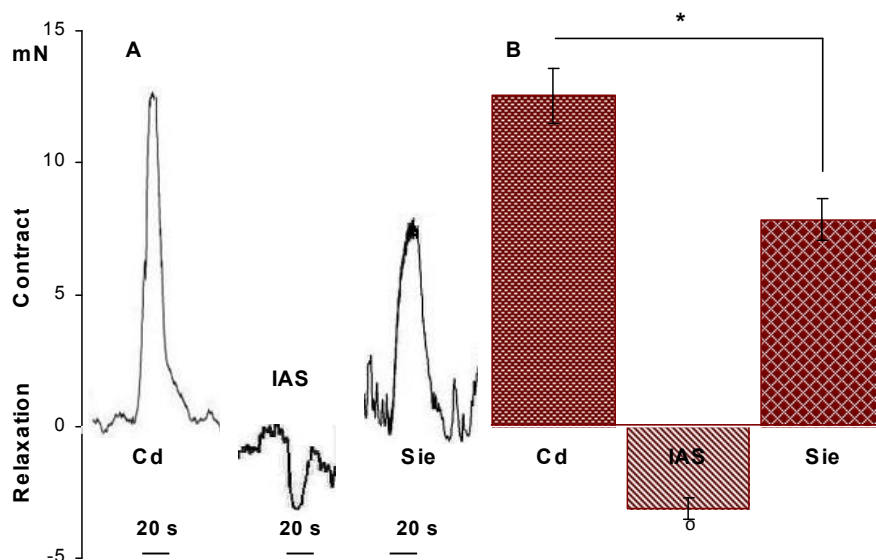


Фигура 6. Типични механографски записи (A) и хистограми (B), показващи електрически-предизвиканите (0.8 ms, 40 V, 20 s, **10 Hz**) моторни отговори на на ринг-препарати, изолирани от проксимална (C_p), медиална (C_m) и дистална (C_d) част на ректум. Амплитудите са представени като средна стойност \pm SEM от най-малко 14 препаратата. Символът (*) показва статистически значима разлика в регистрираните амплитуди ($p<0.05$)

Модуларните съкращения на циркулярната мускулатура от Cd и Sie се увеличават при EFS с честота 5 и 10 Hz (фиг. 8 и 9), като амплитудите значително надишават тези при 2 Hz електрическа стимулация. Контрактилните отговори на циркулярната 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% ($p < 0.05$). 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 и е по-слабо изразена в сравнение с тази при EFS с честота 2 Hz EFS.

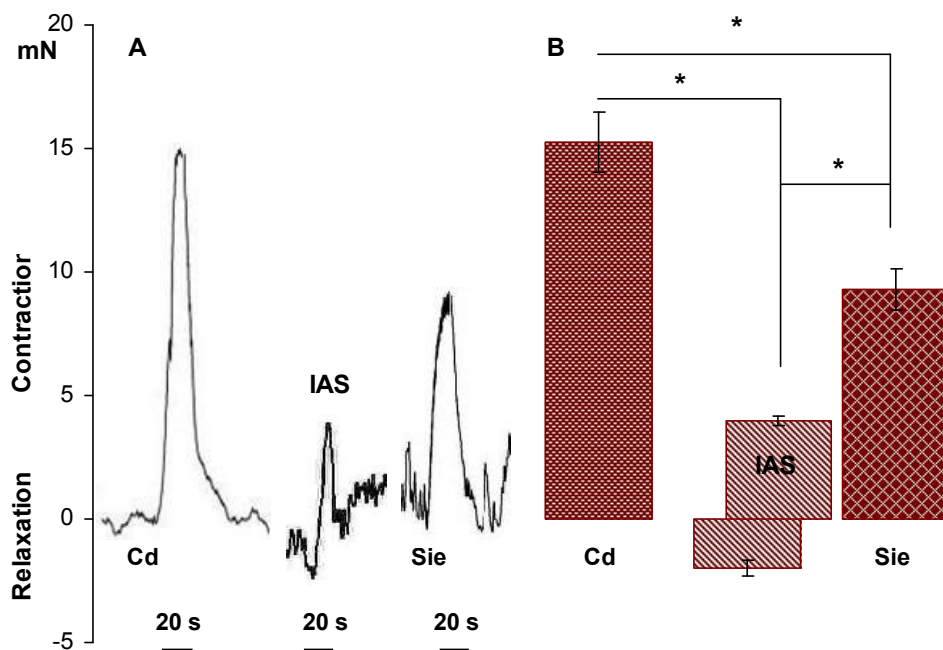


Фигура 7. Типични механографски записи (A) и хистограми (B), показващи електрически-предизвиканите (0.8 ms, 40 V, 20 s, 2 Hz) моторни отговори на на ринг-препарати от дистале ректум (Cd), вътрешен анален сфинктер (IAS) и анален канал (Sie). Амплитудите са представени като средна стойност \pm SEM от най-малко 12 препаратата. Символът (o) показва обратен отговор



Фигура 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 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 препаратата. Символите показват: (*) статистически значима разлика в амплитудите спрямо Cd ($p < 0.05$); (o) обратен моторен отговор

Електрическите стимули с честота от 10 Hz предизвикват модулаторни моторни отговори на IAS, състоящи се от начална релаксация и последващо съкращение с максимална амплитуда 3.95 ± 0.28 mN (n=12) (фиг. 9). Контрактилният отговор на IAS е достоверно по-слаб от тези на циркулярния пръстен от Cd и Sie и това е единственият препарат, който отговаря с релаксация при електрическа стимулация.



Фигура 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 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 препаратата. (*) показва статистически значима разлика в амплитудите спрямо Cd ($p < 0.05$)

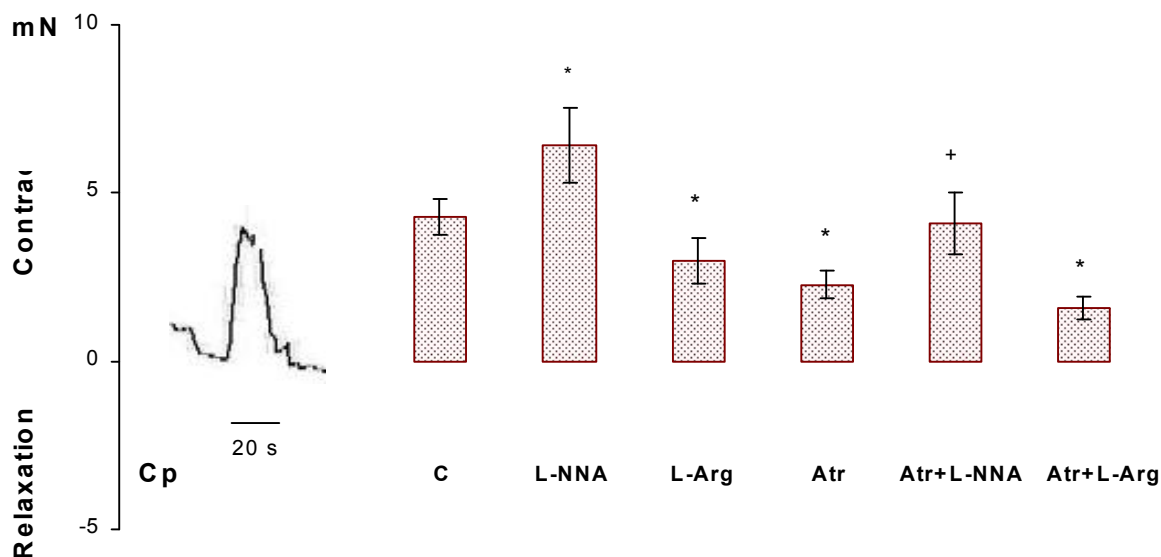
1.3 Модуларни отговори при електрическа стимулация и въздействие на субстанции, повлияващи холинергичната и нитрергичната невромедиация

Модуларни отговори при електрическа стимулация с честота 2 Hz и въздействие на субстанции, повлияващи холинергичната и нитрергичната невромедиация

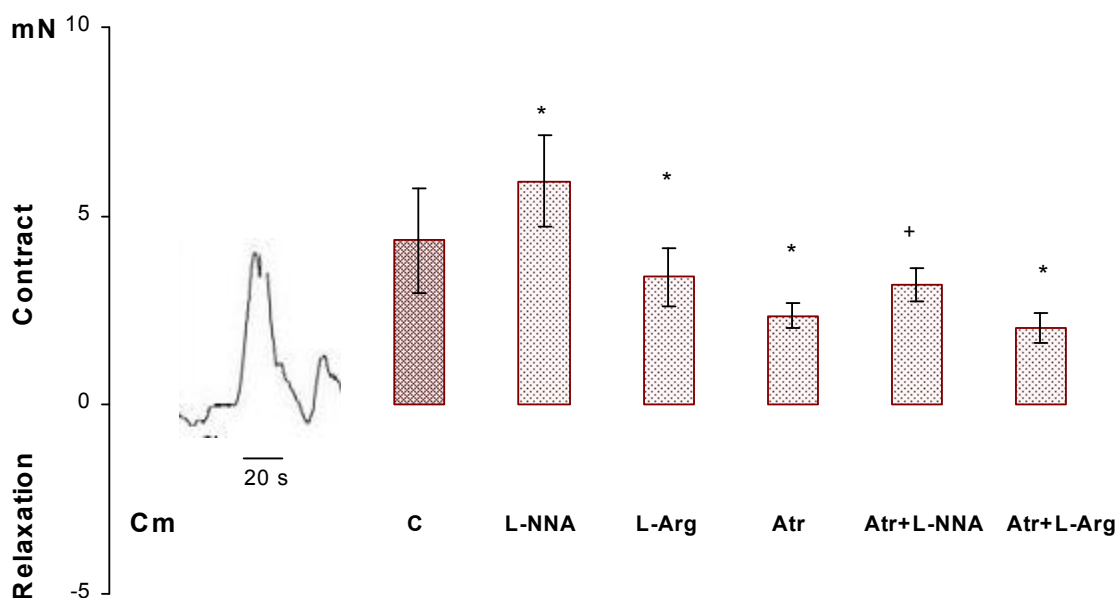
Електрически-предизвиканите модулаторни моторни отговори са проучвани при прилагане на холинолитика atropine, донора на азотен оксид – L-arginine (L-Arg) и блокера на азотнооксидната синтаза NG-nitro-L-arginine (L-NNA). Като контроли в тези експерименти са използвани модулаторните моторни отговори, индуцирани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

Прибавянето на L-NNA към разтвора на Krebs увеличава амплитудите на електрически-предизвиканите моторни отговори на Cr, Cm и Cd ринг-препаратите, докато L-Arg ги намалява. Ефектът на субстанциите, повлияващи нитрергичната медиация е по-изразен в препаратите от проксимален ректум (фиг. 10, 11 и 12). При въздействие с L-arginine съкращенията са потиснати максимално в Cr с 35.56%, а в Cd – с 18.56%. Модуларните съкращения на циркулярните гладкомускулни ринг-препарати са потиснати достоверно при прилагане на atropine в сравнение с съкращенията, предизвикани от 2 Hz EFS: в Cr (2.27 ± 0.41 mN, n=9, $p < 0.05$; фиг. 10); в Cm (2.36 ± 0.32 mN, n=8, $p < 0.05$; фиг. 11) и в Cd (2.38 ± 0.52 mN, n=9, $p < 0.05$; фиг. 12). Регистрираните амплитуди в Cd са намалени с 50.93%, в Cm – 46.73% и в Cr –

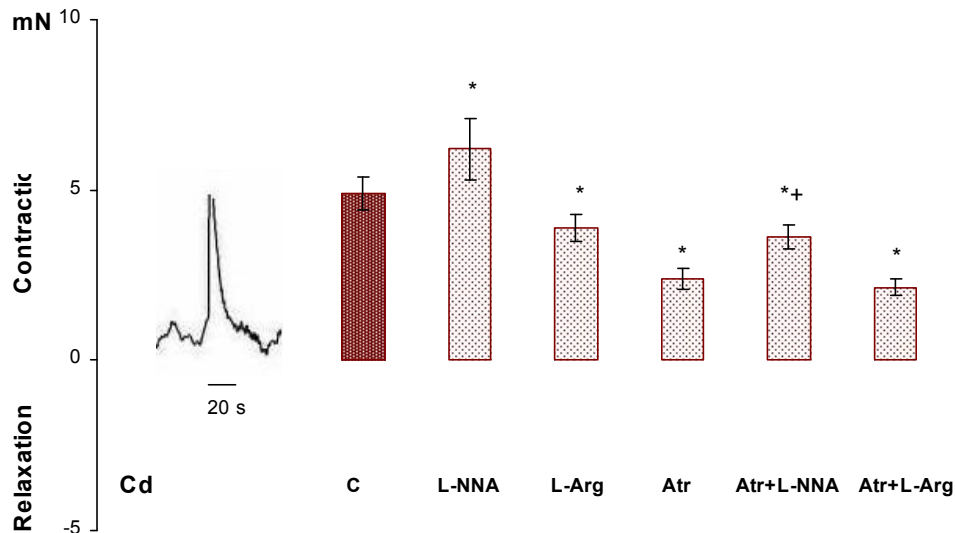
45.97%. В присъствие на L-Arg съкращенията, в отговор на електрическа стимулация се потискат по-малко в сравнение с тези при atropine. Инхибираните от atropine съкращения на препаратите от циркуларна мускулатура се увеличават по амплитуда при прибавяне на L-NNA. Моторните отговори се променят в обратна посока при прибавяне на L-Arg 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, третирани с L-NNA, с L-NNA плюс atropine, но не и спрямо тези с atropine.



Фигура 10. 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

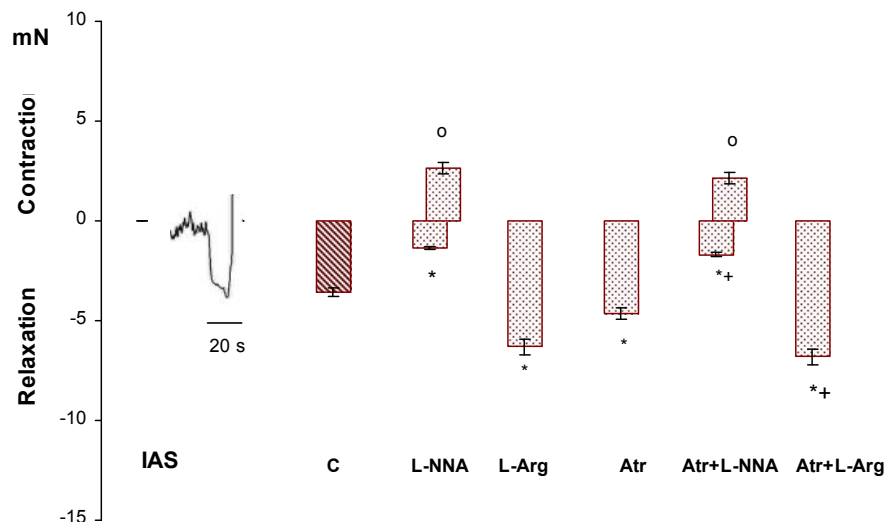


Фигура 11. Модуларни моторни отговори на ринг-препарати, изолирани от медиален ректум (Cm) при EFS (0.8 ms, 40 V, 20 s) с честота 2 Hz. *Означения:* контролен отговор, EFS (C); в присъствие на: atropine (Atr), L-NNA (L-N) и L-arginine (L-Arg). Амплитудите са представени като средна стойност \pm SEM от най-малко 8 препарата. *Символите* показват статистически значима разлика $p < 0.05$ – (*) към контролите, (+) към atropine



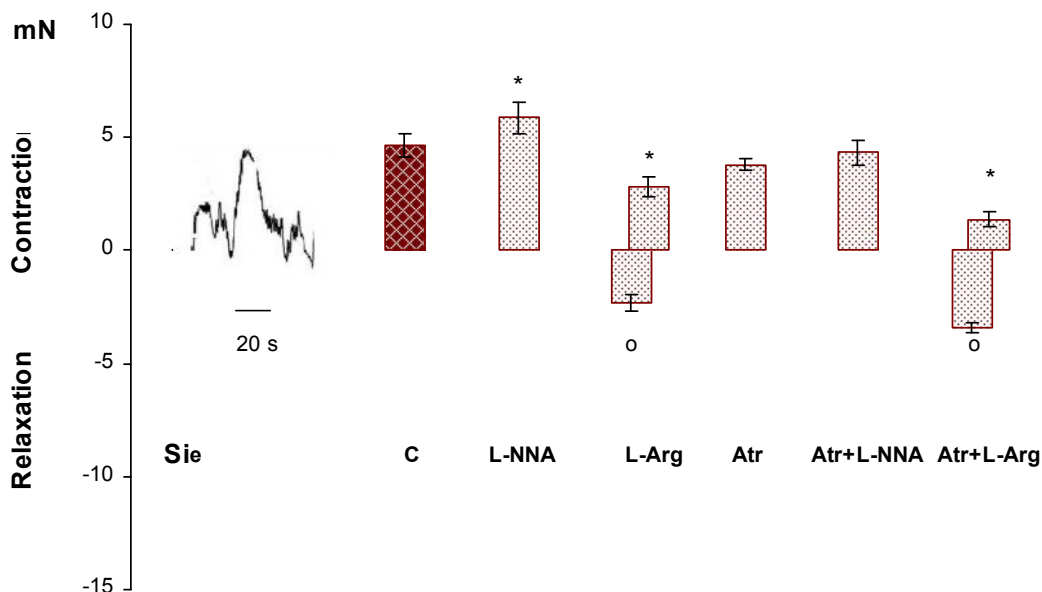
Фигура 12. Модуларни моторни отговори на ринг-препарати, изолирани от дистален ректум (Cd) при EFS (0.8 ms, 40 V, 20 s) с честота 2 Hz. Означения: контролен отговор, EFS (C); в присъствие на: atropine (Atr), L-NNA (L-N) и L-arginine (L-Arg). Амплитудите са представени като средна стойност \pm SEM от най-малко 8 препаратата. Символите показват статистически значима разлика $p < 0.05$ – (*) към контролите, (+) към atropine

Електрически-предизвиканият отговор на IAS се променя при добавяне на блокера на азотноосидната синтаза от 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-Arg релаксацията се задълбочава до -6.32 mN с 75.55% (фиг. 13). Релаксацията на IAS се увеличава в присъствие на atropine с 29,69% до -4.62 ± 0.34 mN ($n=8$, $p < 0.05$). Намаляване на релаксацията и съкращение се регистрира в 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 ± 0.42 mN) в сравнение с контролите и препаратите, третирани с atropine.



Фигура 13. 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 препаратата. Символите показват статистически значима разлика $p < 0.05$ – (*) към контролите, (+) към atropine и (o) обратен ефект спрямо контролите

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 първоначална релаксация с амплитуди -2.34 ± 0.41 и -3.42 ± 0.34 mN респективно, последвана от статистически значимо понискоамплитудна контракция, спрямо с контролите ($p < 0.05$; фиг. 14)



Фигура 14. 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 препарата. Статистически значима разлика $p < 0.05$ – (*) към контролите, (+) към atropine и (o) обратен ефект спрямо контролите

Модуларни отговори при електрическа стимулация с честота 5 Hz и въздействие на субстанции, повлияващи холинергичната и нитрергичната невромедиация

Модуларните съкращения на ринг-препаратите от циркуларна мускулатура от различните области на ректума се увеличават сигнификантно по амплитуда на фона на L-NNA в сравнение с тези, предизвикани от 5-Hz EFS. Максимална амплитуда на модуларните съкращения показва Cd (16.814 ± 0.82 mN, $n=8$, $p < 0.05$; табл 3). EFS-предизвиканите съкращения се повлияват в обратна посока при прибавяне на L-Arg в органните вани, като отговорите в Cp, Cm и Cd се потискат съответно с 34.94%, 30.33% и 27.95%. Потискане на амплитудите на контрактилните отговори се регистрира в присъствие на atropine, като тези промени са статистически достоверни спрямо 5-Hz EFS. Инхибирането на съкращенията в присъствие на atropine е 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, добавен към атропинизирания разтвор повлиява в обратна посока ефекта на холинолитика, увеличавайки амплитудите на контрактилните отговори. Значително се потискат амплитудите на съкращения на циркуларните глакомускулни пръстени при добавяне на L-arginine 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 ± 0.5 mN ($n=9$, $p < 0.05$) в Cp; 3.14 ± 0.81 mN ($n=8$, $p < 0.05$) в Cm, но без отчетлива разлика в Cd – 5.62 ± 0.54 ($n=9$, $p > 0.05$).

Таблица 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 ⁻⁵ M	L-ARG 5X10 ⁻⁵ M	ATR 3x10 ⁻⁷ 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* ATP-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* ATP-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

При прибавяне на L-NNA модулариот отговор на IAS към EFS с честота 5 Hz, представляващ краткотрайна релаксация с амплитуда -3.13 ± 0.41 mN (n=12) се променя в нискоамплитудна релаксация, последвана от съкратителен отговор (-1.13 ± 0.44 mN и 2.87 ± 0.34 mN). L-arginine и atropine увеличават релаксацията до -5.52 ± 0.51 mN (n=8, p<0.05) и -3.92 ± 0.36 mN (n=8, p>0.05), респективно. В присъствие на atropine и L-NNA се регистрира двуфазен отговор: релаксация (-1.42 ± 0.16) и съкращение (2.14 ± 0.36), докато при прибавяне на L-arginine към атропинизирания разтвор се регистрира продължителна релаксация с амплитуда от -6.64 ± 0.18 (112.14% по-голяма амплитуда от тази при EFS; n=8, p<0.05). Аналният канал отговаря на EFS с продължително съкращение с амплитуда от 7.84 ± 0.78 mN (n=13). Отговорът се увеличава по амплитуда при добавяне на L-NNA и се превръща в двуфазен при добавяне на L-arginine: появява се релаксация от -1.84 ± 0.22 mN, а съкращението се намалява до 5.52 ± 0.28 mN (n=8, p<0.05). Atropine намалява амплитудите на съкращенията на аналния канал, докато прибавянето на L-NNA незначително ги увеличава. На фона на холинолитика и L-arginine съкращението се потиска и се регистрира релаксация от -2.10 ± 0.22 mN (n=8).

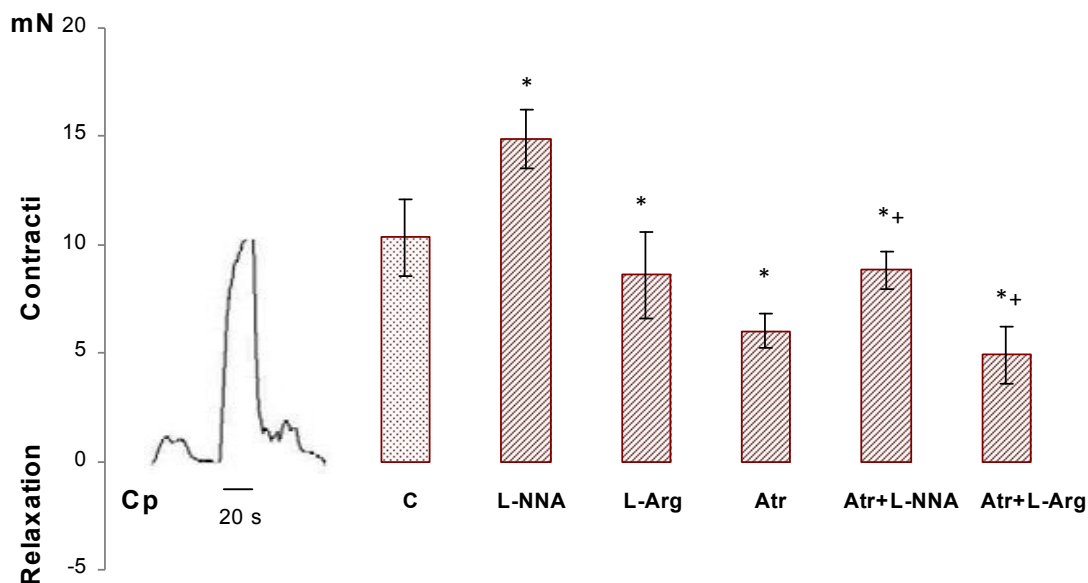
Модуларни отговори при електрическа стимулация с честота 10 Hz и въздействие на субстанции, повлияващи холинергичната и нитергичната невромедиация

Модуларните съкращения на ринг-препаратите от различните области на ректума се увеличават достоверно по амплитуда в присъствие на L-NNA в сравнение с тези, предизвикани от 10-Hz EFS (фиг. 15, 16 и 17). Повишението на амплитудите на съкратителните отговори в присъствие на L-NNA е по-изразено в Ср – 33.33%, а в Cd – 24.03%. Електрически-предизвиканите съкращения се повлияват в обратна посока при прибавяне на L-arginine в органните вани: контракциите са с 20.39% в Ср и с 13.7% в Cd по-ниски амплитуди в сравнение с контролите. Амплитудите се потискат по-слабо в сравнение с инхибирането на контрактилните отговори при 2 и 5 Hz.

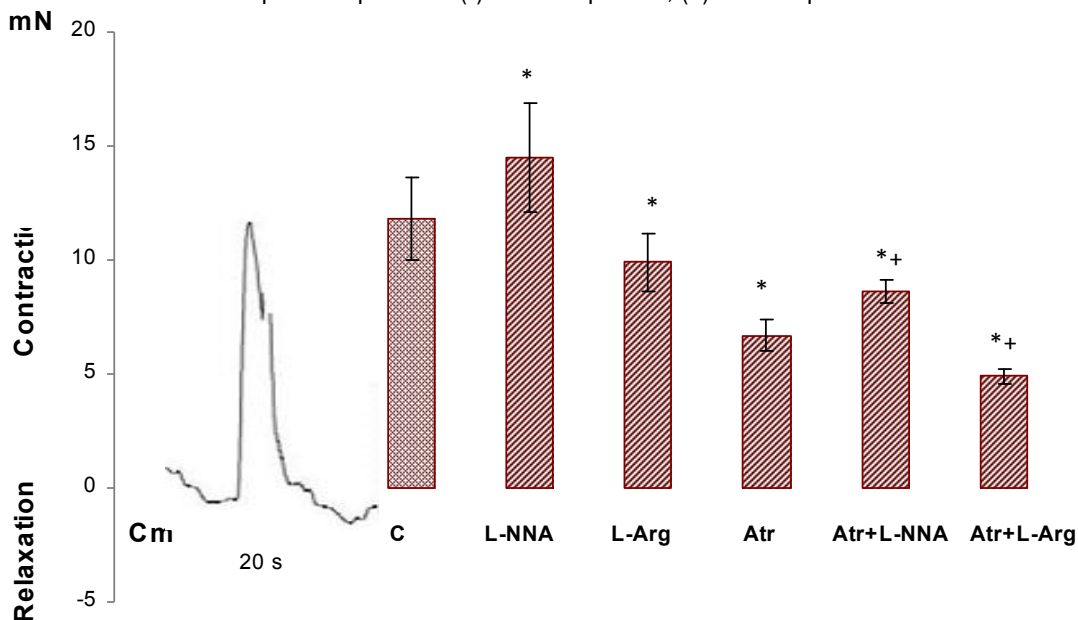
Намаляване на средните стойности на амплитудите на контрактилните отговори се регистрира в присъствие на atropine в хранителния разтвор, като тези промени са статистически значими спрямо амплитудите в отговор на 10-Hz EFS, съответно 42.72%, 46.45% и 53.73% в Ср, Cm и Cd. L-NNA, добавен към атропинизирания 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 към атропинизирания хранителен разтвор, като промените са статистически значими в сравнение с тези, предизвикани от EFS. Съпоставени с тези на фона на atropine сигнификатно намаляване се регистрира в Ср до 4.92 ± 0.90 mN (n=9, p<0.05) и Cm до 5.20 ± 0.31 (n=8, p<0.05).

Модуларният отговор на IAS към EFS с честота 10 Hz, представлява краткотрайна релаксация с амплитуда -2.00 ± 3.41 mN, последвана от съкращение от 3.95 ± 0.28 mN (n=12). При прибавяне на L-NNA се запазва двуфазния характер, като амплитудата на релаксацията намалява, а тази на контракцията се увеличава до 5.22 ± 0.41 mN (p<0.05; фиг. 18). L-arginine и atropine увеличават релаксацията; L-arginine статистически значимо до -3.62 ± 0.029 mN и намалява контракцията до 1.64 ± 0.2 mN (n=8, p<0.05). В присъствие на atropine и L-NNA се регистрира двуфазен отговор: релаксация (-1.02 ± 0.08 mN) и съкращение (3.96 ± 0.20 mN). При

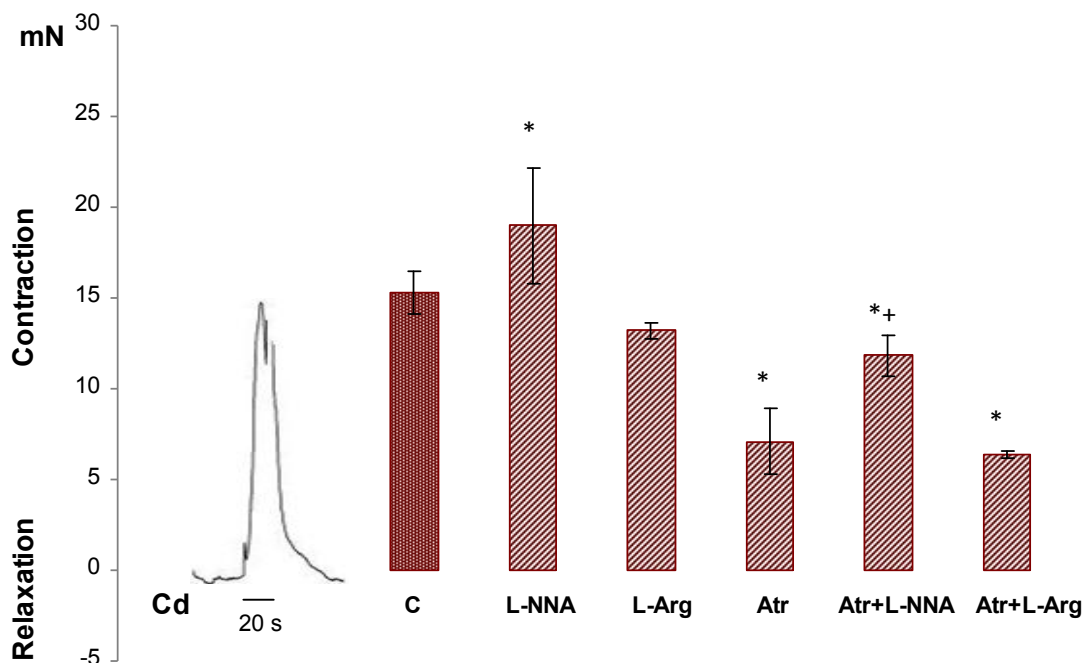
прибавяне на L-Arg към атропинизирания разтвор се задълбочава релаксацията (-3.44 ± 0.22) и значимо се потиска съкращението (1.32 ± 0.18 mN; $p < 0.05$). Аналният канал отговаря на 10-Hz EFS със съкращение с амплитуда от 9.27 ± 0.93 mN (фиг 19). Отговорът се увеличава по амплитуда при добавяне на L-NNA и се превръща в двуфазен при добавяне на L-Arg: съкращението се намалява до 5.62 ± 0.22 mN ($p < 0.05$) и се появява релаксация -1.08 ± 0.21 mN ($n=8$).



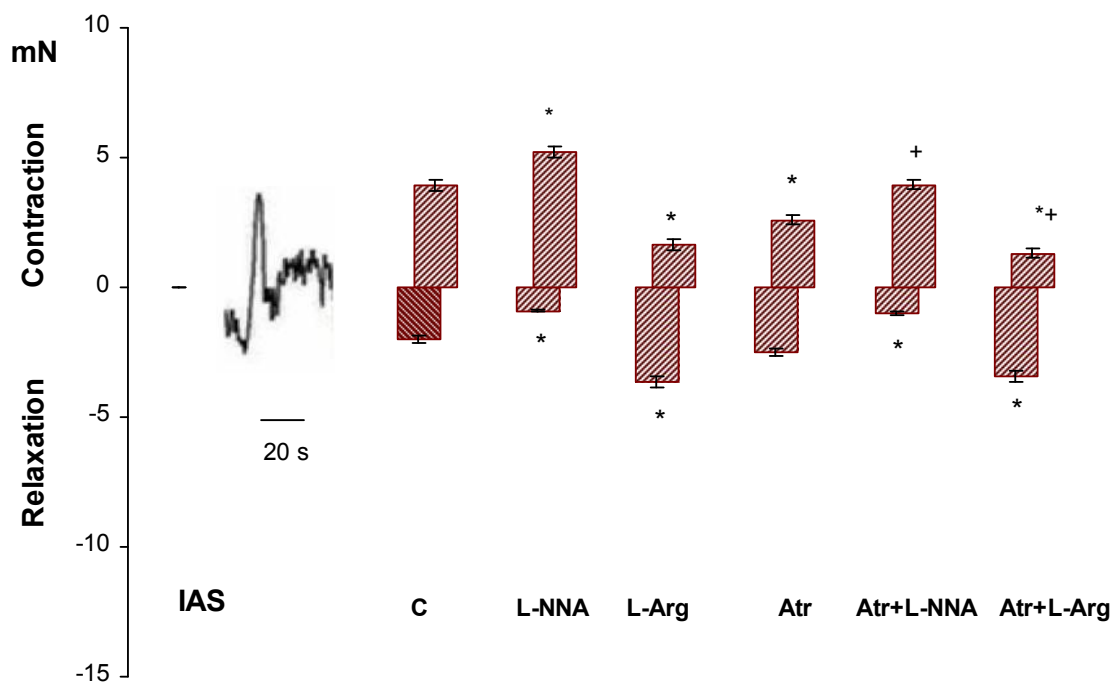
Фигура 15. Модуларни моторни отговори на изолирани ринг-препарати от проксимален ректум (Cp) при EFS (0.8 ms, 40 V, 20 s) с честота **10 Hz**. Означения: контролен отговор, EFS (C); в присъствие на: atropine (Atr), L-NNA (L-N) и L-arginine (L-Arg). Амплитудите са представени като средна стойност \pm SEM от най-малко 8 препарата. Символи: статистически значима разлика $p < 0.05$ – (*) към контролите, (+) към atropine



Фигура 16. 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

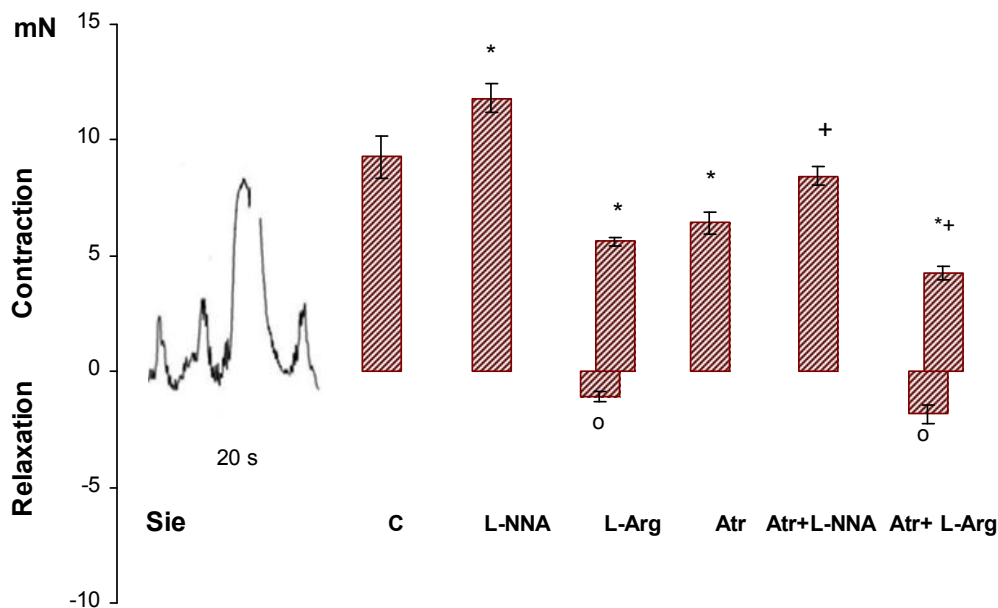


Фигура 17. Модуларни моторни отговори на ринг-препарати, изолирани от дистален ректум (Cd) при EFS (0.8 ms, 40 V, 20 s) с честота **10 Hz**. Означения: контролен отговор, EFS (C); в присъствие на: atropine (Atr), L-NNA (L-N) и L-arginine (L-Arg). Амплитудите са представени като средна стойност \pm SEM от най-малко 8 препарата. Символите показват статистически значима разлика $p < 0.05$ – (*) към контролите, (+) към atropine



Фигура 18. 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 препарата. Символите показват статистическа значимост $p < 0.05$ – (*) към контролите, (+) към atropine и (o) обратен ефект спрямо контролите

Atropine достоверно намалява съкращенията на аналния канал, докато прибавянето на L-NNA ги увеличава. На фона на холинолотика и L-arginine съкращенията се потискат и се регистрира релаксация с амплитуда -1.84 ± 0.28 mN (фиг. 19).



Фигура 19. 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 препарата. *Символите* показват статистически значима разлика $p < 0.05$ – (*) към контролите, (+) към atropine и (o) обратен ефект спрямо контролите

2. Моторни отговори на ивици лонгитудинална мускулатура

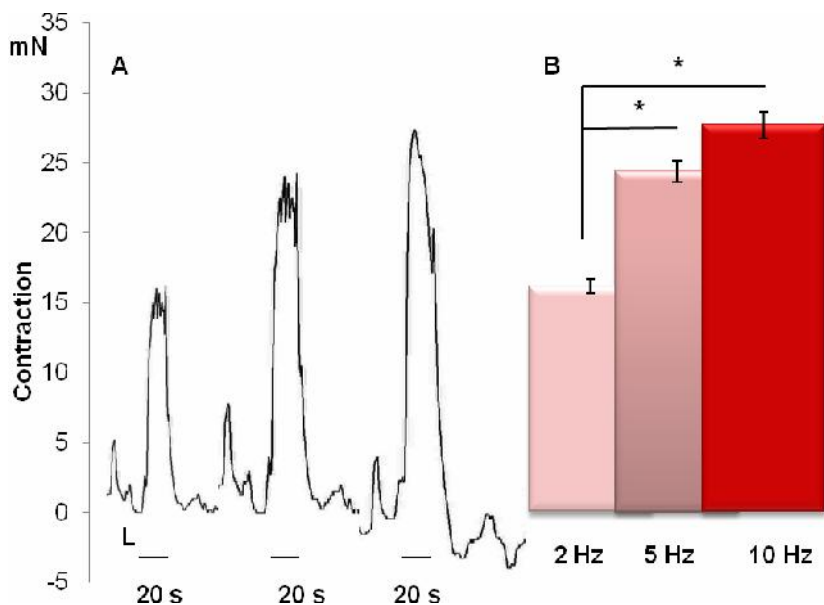
През периода на адаптация ивиците лонгитудинална мускулатура проявяват спонтанна моторна активност, като средната стойност на фазичните съкращения е най-висока в сравнение с останалите ринг-препарати (средна стойност 6.080 mN, SD=0.602, SE=0.173).

Ивиците LM, изолирани по дължината на ректума, се контрахират в отговор на EFS. Електрически-предизвиканите съкращения достигат най-висока амплитуда (27.698 ± 2.04 mN; $n=19$) при честота на стимулацията 10 Hz, със статистически значима разлика със съкращенията при 2 Hz (16.20 ± 1.52 mN; $t=-4.142$; $p=0.0001$; фиг. 20). Достоверно по-високоамплитудни са и съкращенията при 5-Hz EFS (24.660 ± 1.18 mN) в сравнение с тези при 2 Hz ($t=-3.184$; $p=0.0029$). Контрактилните отговори на LM достоверно надвишават тези на гладкомускулните циркуларни пръстени и аналните сфинктери при електрическа стимулация при 2 Hz, 5 Hz и 10 Hz ($p < 0.05$).

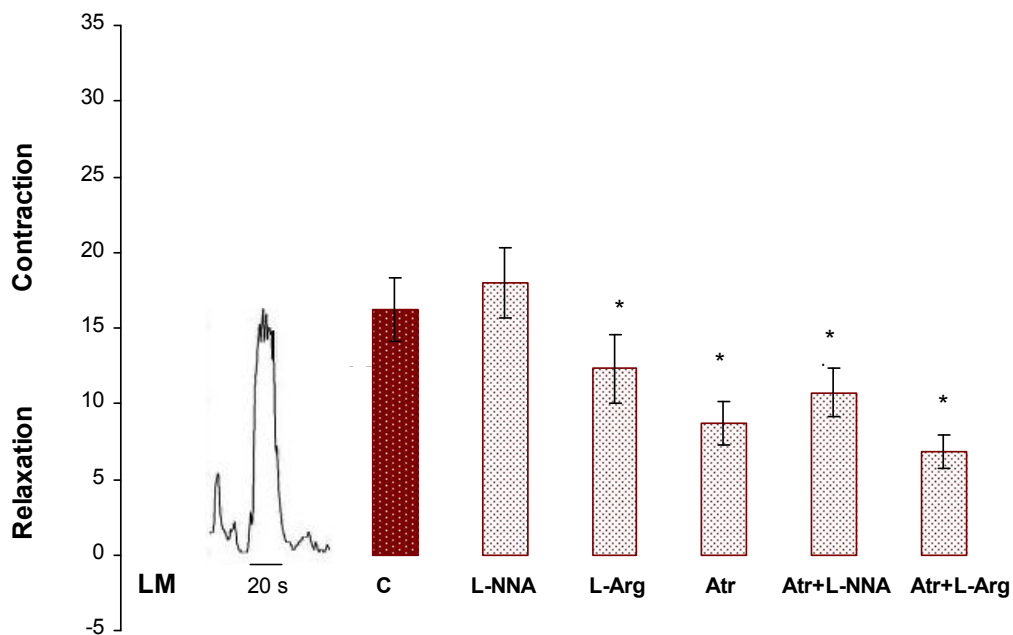
Моторните отговори се увеличават по амплитуда при прилагане на L-NNA (18.01 ± 2.27 mN/2 Hz; 30.26 ± 1.12 mN/5 Hz и 33.61 ± 2.5 mN/10 Hz) и намаляват при L-Arg (12.27 ± 2.32 mN/2 Hz; 20.34 ± 2.18 mN/5 Hz и 21.2 ± 1.78 mN/10 Hz), като има статистически значима разлика спрямо контролите при EFS от 5 и 10 Hz ($n=8$, $p < 0.05$) (фиг. 21, 22 и 23). 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 ± 1.43 mN; при 5 Hz – 10.352 ± 1.08 mN; при 10 Hz – 12.03 ± 1.85 mN) и промените са статистически значимо по-

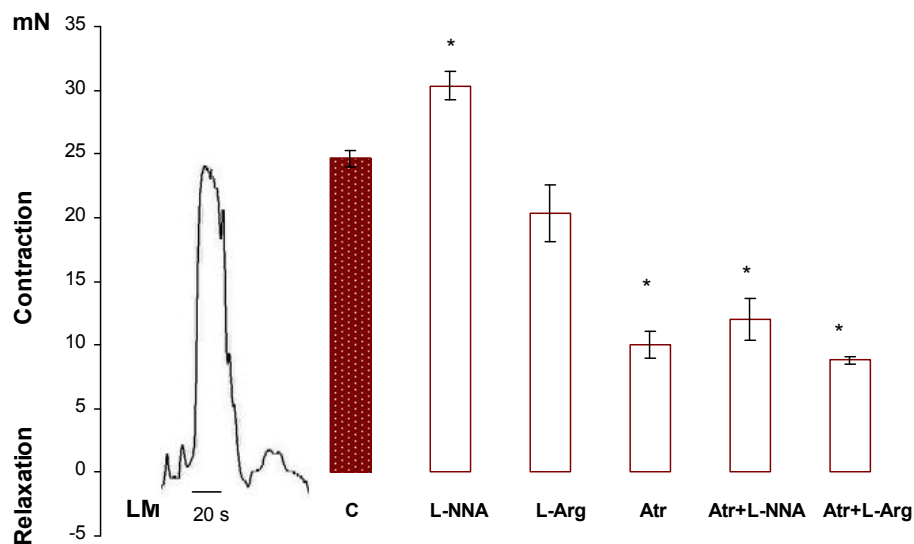
изразени в сравнение с тези, предизвикани от L-Arg. Съкращенията са по-мощни при едновременно въздействие на L-NNA и atropine и по-слаби при L-Arg и atropine (при 2 Hz – 6.81 ± 1.06 mN; при 5 Hz – 8.84 ± 1.68 mN; при 10 Hz – 9.04 ± 2.6 mN). Статистически значими разлики в амплитудите се регистрират при съвместното въздействие на холинолитика и нитрегичните субстанции спрямо atropine само при 10-Hz EFS.



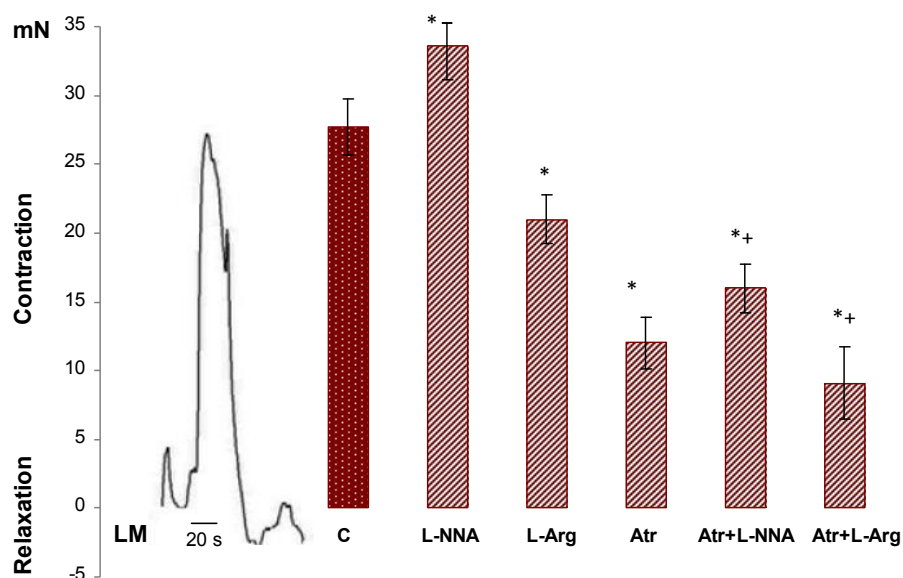
Фигура 20. Типични механографски записи (A) и хистограми (B), показващи електрически-предизвиканите (0.8 ms, 40 V, 20 s, 2, 5 и 10 Hz) моторни отговори на ивици лонгитудинална мускулатура (L). Амплитудите са представени като средна стойност \pm SEM от 19 препаратата. Символът (*) показва статистически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



Фигура 21. 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 препаратата. Символът (*) показва статистически значима разлика $p < 0.05$ към контролите



Фигура 22. 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 препаратата. Символът (*) показва статистически значима разлика $p < 0.05$ към контролите



Фигура 23. 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 препаратата. Символът (*) показва статистически значима разлика $p < 0.05$ към контролите (+) спрямо atropine

3. Моторни отговори в цялостен аноректум

3.1. Спонтанна моторна активност

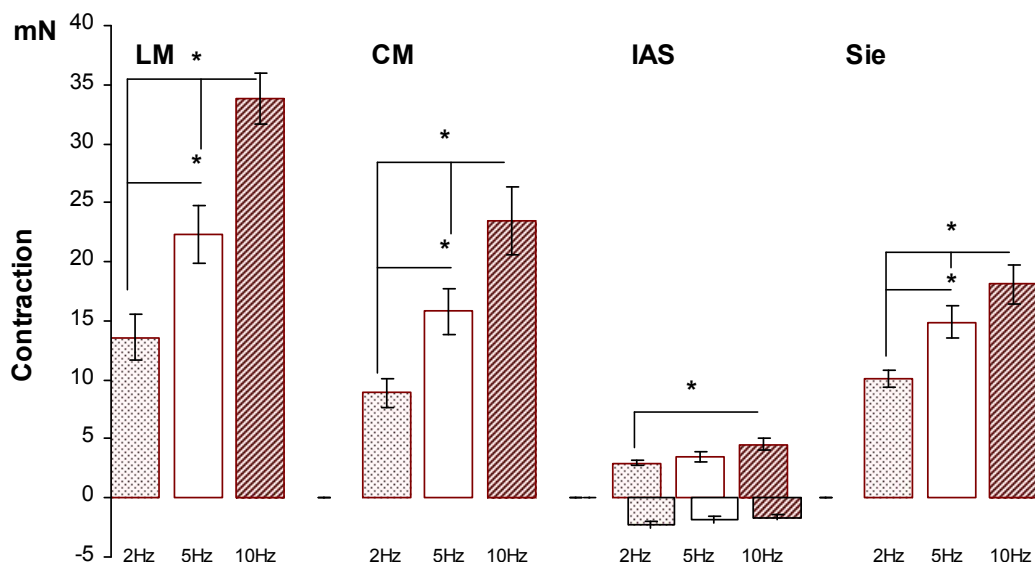
През периода на адаптация в аноректума се регистрира спонтанна моторна активност, както в LM и CM от проксимален ректум, така и в аналния канал и IAS. Спонтанната моторната активност на LM и CM се характеризира с високоамплитудни неритмични съкращения, които възникват обичайно синхронно в двата мускулни слоя. Амплитудите на LM са с по-висока

средна стойност – 6.2 ± 1.2 mN ($n=12$), а на CM – 5.1 ± 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 ± 1.6 mN, $n=8$).

3.2. Локални електрически-предизвикани 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 LM и CM се регистрират при прилагане на EFS в оралната камера, а тези на IAS и аналния канал – в аналната камера.

Локалните отговори на LM и CM са едновременно възникващи съкращения. Моторните отговори са тип „пик” и са честотно-зависими. При 2 Hz амплитудите на контракциите на LM са 13.6 ± 1.92 mN, при 5 Hz – 22.3 ± 2.4 mN, при 10 Hz – 33.80 ± 2.18 mN, а на CM са 8.88 ± 1.22 mN, 15.81 ± 1.93 mN и 23.48 ± 2.88 mN, респективно (фиг. 24). Амплитудите на електрически-предизвиканите съкращения на LM са статистически значимо по-високи от тези на CM при всички прилагани честоти на електрическа стимулация ($p < 0.05$).

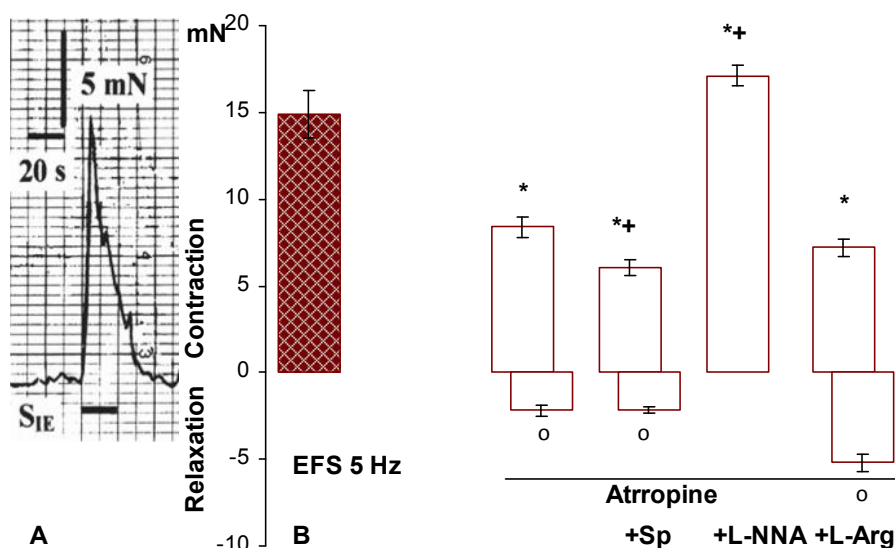


Фигура 24. Локални електрически-предизвикани моторни отговори в аноректум. *Означения:* LM – лонгитудинална мускулатура, CM – циркулярна мускулатура, IAS – вътрешен анален сфинктер, Sie – анален канал. Амплитудите са представени като средна стойност \pm SEM от най-малко 8 препарата. Символът (*) показва статистически значима разлика при $p < 0.05$

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 ($p < 0.05$). Sie реагира е честотно-зависими по-високоамплитудни съкращения, намаляващи през периода на стимулация.

Локален моторен отговор на анален канал при въздействие с atropine, spantide, L-NNA u L-arginine

Изследван е локалният моторен отговор на аналния канал (съкращение от 14.90 ± 1.35 mN), предизвикан от електрическа стимулация с честота от 5 Hz в присъствие на atropine, spantide, L-NNA и L-arginine (фиг. 25).



Фигура 25. 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±SEM от най-малко 8 препаратите. Символите показват статистически значима разлика p<0.05 – (*) към EFS, (+) към atropine и (o) обратен ефект

Atropine променя структурата на контрактилния отговор в начално съкращение, последвано от релаксация. Средната стойност на амплитудите на контракцията е 8.40 ± 0.6 mN, (n=8, p<0.05, в сравнение с електрически-индуцираните локални отговори), а на релаксацията - 2.20 ± 0.3 mN (n=8). Прибавянето на spantide към препаратите, претретирани с atropine, намалява значително вече потиснатия контрактилен отговор (5.02 ± 0.45 mN; p<0.05), без да повлиява релаксацията. L-NNA преобръща ефекта на atropine в съкращение с амплитуда 17.1 ± 0.6 mN (n=8, p<0.05). При добавяне на L-Arg към претретирания с atropine разтвор на Krebs, съкратителният локален отговор се повлиява слабо, а релаксацията се задълбочава до -5.20 ± 0.5 mN (n=8, p<0.05).

3.3. Низходящи електрически-предизвикани моторни отговори

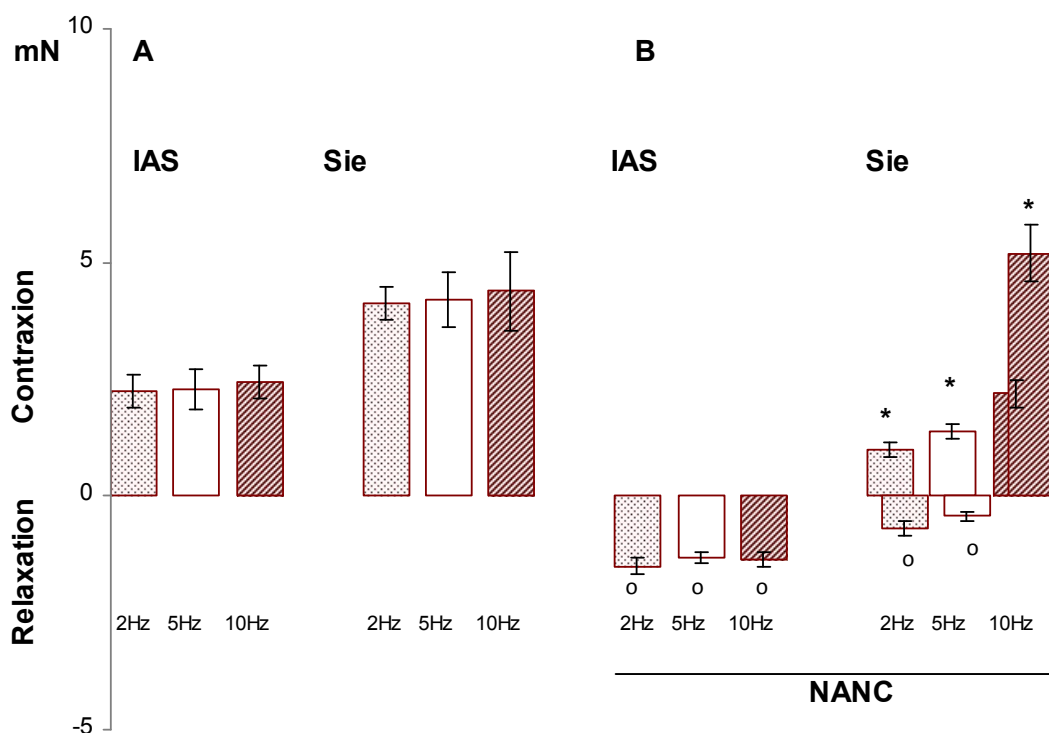
Електрически-предизвикани и неадренергични-нехолинергични низходящи моторни отговори

Моторните отговори на IAS и аналния канал, регистрирани в аналната камера на органната вана, при прилагане на EFS в оралната се описват като низходящи.

Низходящите моторни отговори на IAS и аналния канал при EFS, 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. 26). 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 ± 0.75 mN и 2.25 ± 0.35 mN; при 10 Hz 4.39 ± 0.85 mN и 2.44 ± 0.32 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. 26). 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 26. 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 спрямо EFS-предизвиканите отговори и (o) обратен ефект ($p < 0.05$)

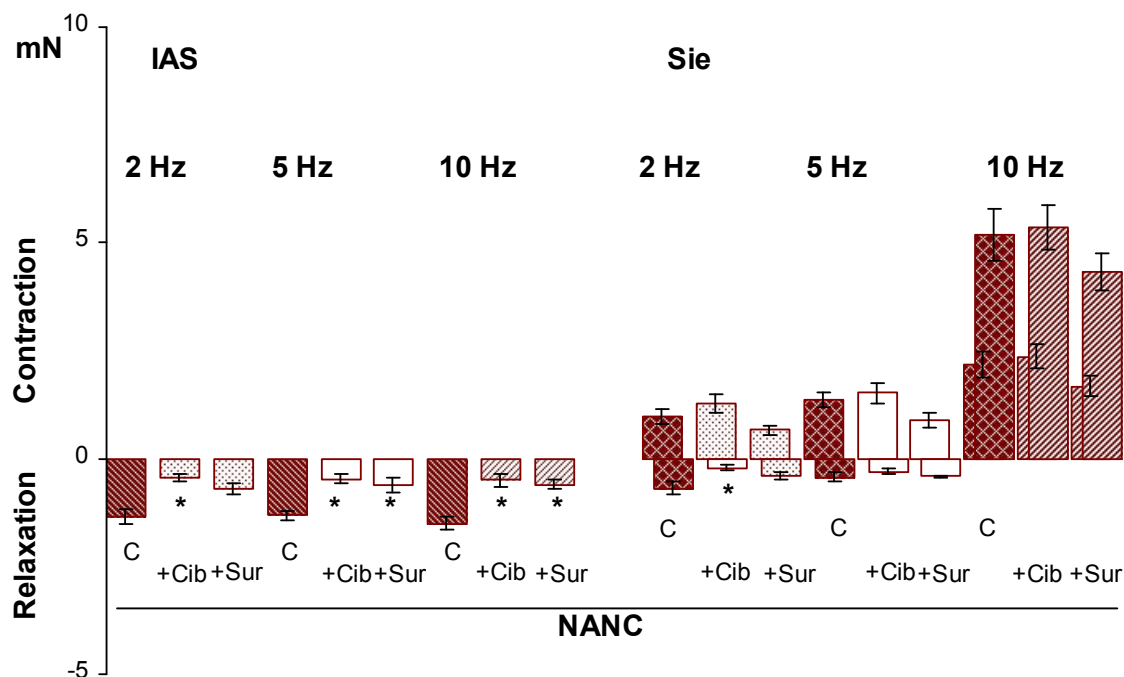
Низходящи моторни отговори при въздействие с антагонисти на P2-пуринергичните рецептори

Изследвано е въздействието на антагонистите на P2-пуринергичните рецептори cibasron blue и suramin 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. 27). Релаксацията на IAS в присъствие на cibasron blue е потисната статистически достоверно до стойности -0.45 ± 0.08 mN при 2 Hz (66.91%); -0.47 ± 0.11 mN при 5 Hz (71.97%) и -0.50 ± 0.15 mN при 10 Hz (66.66%, $p < 0.05$). Suramin потиска релаксацията около 50% сравнено с NANC отговорите до: -0.70 ± 0.12 mN/2 Hz (48.53%, $p > 0.05$), -0.60 ± 0.17 mN/5 Hz (54.55%, $p < 0.05$) и -0.60 ± 0.10 mN/10 Hz (50%, $p < 0.05$).

Структурата на регистрираните низходящи NANC моторни отговори на аналния канал се запазва при прибавяне на пуринергичните антагонисти (фиг. 27). Cibasron blue увеличава съкратителния отговор с 35.42% при 2 Hz (1.28 ± 0.20 mN); с 14.29% при 5-Hz EFS (1.57 ± 0.24 mN) и 2.37 ± 0.26 mN и 5.37 ± 0.52 mN/10 Hz) и потиска релаксацията (-0.21 ± 0.07 mN/2 Hz; -0.30 ± 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 ± 0.11 mN/2 Hz; 0.90 ± 0.17 mN/5 Hz; 1.68 ± 0.25 и 4.32 ± 0.42 mN/10 Hz), така и релаксацията (-0.40 ± 0.08 mN/2 Hz и -0.42 ± 0.12 mN/5 Hz).



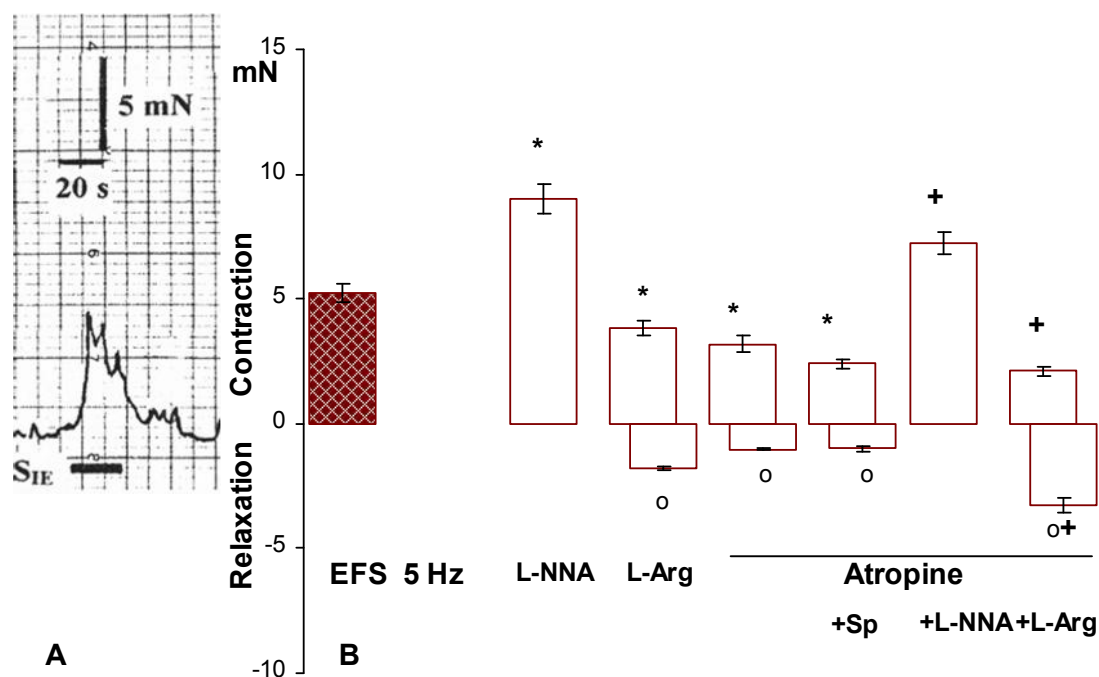
Фигура 27. Въздействие на cibacron blue и suramin върху низходящите електрически-предизвикани NANC моторни отговори в аноректум. *Означения:* C – NANC отговори; IAS – вътрешен анален сфинктер; Sie – анален канал; Cib – cibacron blue; Sur - suramine. Амплитудите са представени като средна стойност \pm SEM от най-малко 8 препаратата. Символът (*) показва статистически значима разлика при $p < 0.05$

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 ± 0.4 mN при 2-Hz-EFS, 5.24 ± 0.34 при 5-Hz-EFS и 8.1 ± 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 персистерат и след прекъсване на 20-секундната електрическата стимулация (фиг. 28). 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.

Низходящите моторни отговори на аналния канал, предизвикани от електрическата стимулация с честота 5 Hz, се увеличават сигнификантно при прибавяне на L-NNA. L-arginine променя контракциите в отговор, състоящ се от начално съкращение, последвано от релаксация с амплитуда -1.82 ± 0.14 mN ($n=8$). Предизвиканите от EFS моторни отговори в присъствие на atropine се състоят от начална по-нискоамплитудна контракция (3.2 ± 0.3 mN) и последваща релаксация, значително по-слабо изразена от тази на фона на L-Arg (-1.02 ± 0.04

mN).



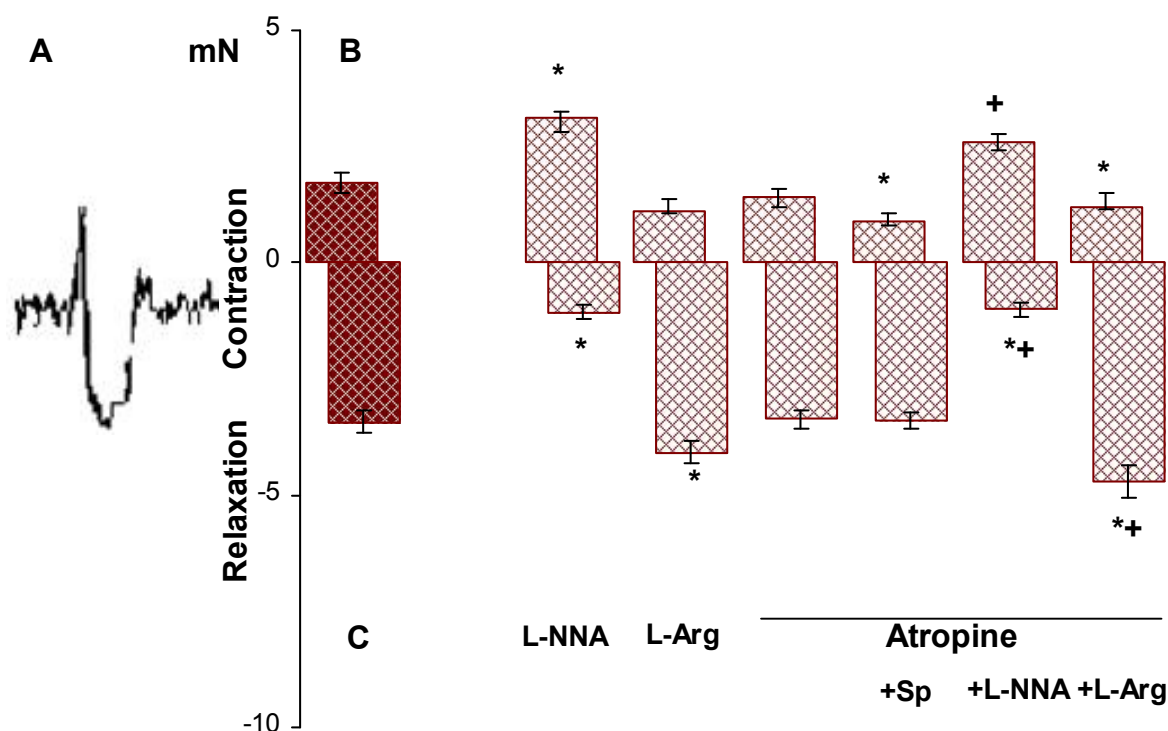
Фигура 28. Типичен механографски запис (A) и хистограми (B) на електрически-предизвиканите (0.8 ms, 40 V, 20 s, с честота 5 Hz) низходящи моторни отговори на анален канал (Sie) в присъствие на atropine, spantide (Sp), L-NNA и L-arginine. Амплитудите са представени като средна стойност±SEM от най-малко 8 препаратата. Символите показват статистически значима разлика при $p < 0.05$ – (*) спрямо EFS-предизвиканите отговори, (+) спрямо atropine и (o) обратен ефект спрямо EFS-предизвиканите отговори

На фона на atropine, добавянето на тахикининергичния антагонист spantide намалява съкратителния отговор (2.42 ± 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-Arg показва обратен ефект – потискане на атропин-инхибираните контракции и значително увеличаване на релаксацията на атропин-чувствителния отговор на аналния канал до -3.26 ± 0.28 mN ($p < 0.05$).

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. 29). 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. L-Arg 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, докато релаксацията не се променя. В присъствие на atropine, spantide

намалжава още амплитудата на атропин-инхибираните отговори.



Фигура 29. Типичен механографски запис (A) и хистограми (B) на низходящи моторни отговори на анален канал (Sie), предизвикани от раздуване с балон (контрола, C) и в присъствие на atropine, spantide (Sp), L-NNA и L-arginine. Амплитудите са представени като средна стойност \pm SEM от най-малко 8 препаратата. Символите показват статистически значима разлика $p < 0.05$: (*) – спрямо EFS-предизвиканите отговори, (+) – спрямо atropine

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 ± 0.16 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 ($n=8$, $p < 0.05$) при прибавяне на L-arginine.

4. Ефект на тетродотоксин върху моторните отговори

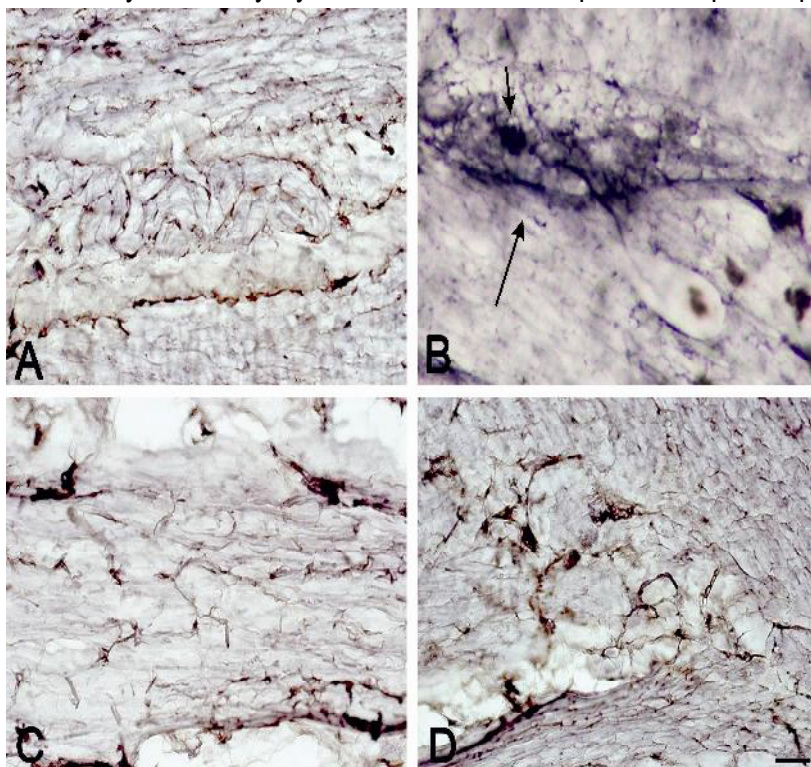
Не се наблюдават EFS-предизвикани модулаторни отговори на изолираните циркуларни ринг-препарати и ивици LM при третиране с TTX, прибавен към хранителния разтвор в органните вани 10 min преди прилагане на EFS. При прибавяне на TTX в оралната или аналната камера не се индуцират локални и десцендентни моторни 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. Миентералните неврони са със средни до големи по размери клетъчни тела и надлъжният диаметър на перикарионите варира между 45 и 60 μ m.

5.1. Имунохистохимично изследване за холинацетил трансфераза

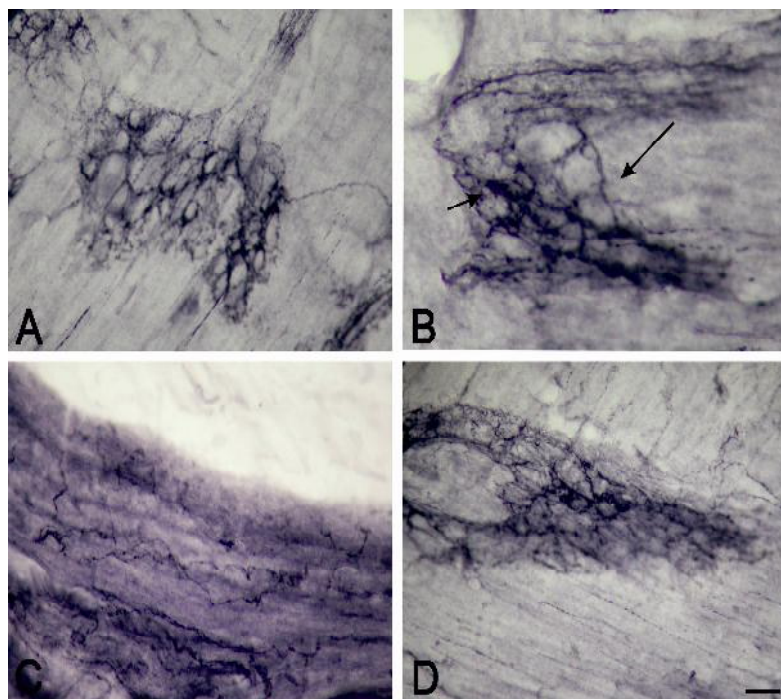
Имунохистохимичното изследване на миентералните ганглии на ректума показва наличие на множество интензивно оцветени ChAT-имунореактивни варикозни нервни влакна, асоциирани с имунонегативни клетъчни тела на миентерални неврони в областта на дисталния ректум (фиг. 30, А) и по-оскъдни в областта на аналния канал (фиг. 30, D). На фиг. 30, В се визуализират единични позитивни клетъчни тела и множество варикозни нервни влакна, очертаващи миентералния ганглии на нивото на аналния канал. Оскъдни, варикозни нервни влакна са разпръснати между гладкомускулните влакна на вътрешния сфинктер (фиг. 30, С).



Фигура 30. ChAT имунохистохимия на аноректум на плъх. **А.** Интензивно оцветени нервни влакна, свързани с имунонегативни тела на миентерални неврони в дистален ректум. **В.** Голямата стрелка показва миентерален ганглии, а малката – имунопозитивно клетъчно тяло на неврон на ниво анален канал. **С.** Оскъдни, варикозно нагънати нервни влакна са разпръснати между гладкомускулните влакна на вътрешния анален сфинктер. **Д.** Оскъдни имунопозитивни нервни влакна, свързани с имунонегативни тела на миентерални неврони в областта на аналния канал. Скала = 100 μm в (А, С, D); 50 μm (В)

5.2. Имунохистохимично изследване субстанция Р

Имунохистохимичното изследване показва висока плътност на SP-имунореактивни нервни влакна в миентералните ганглии. Субстанция Р-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. 31. А; В, 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. 31. С).



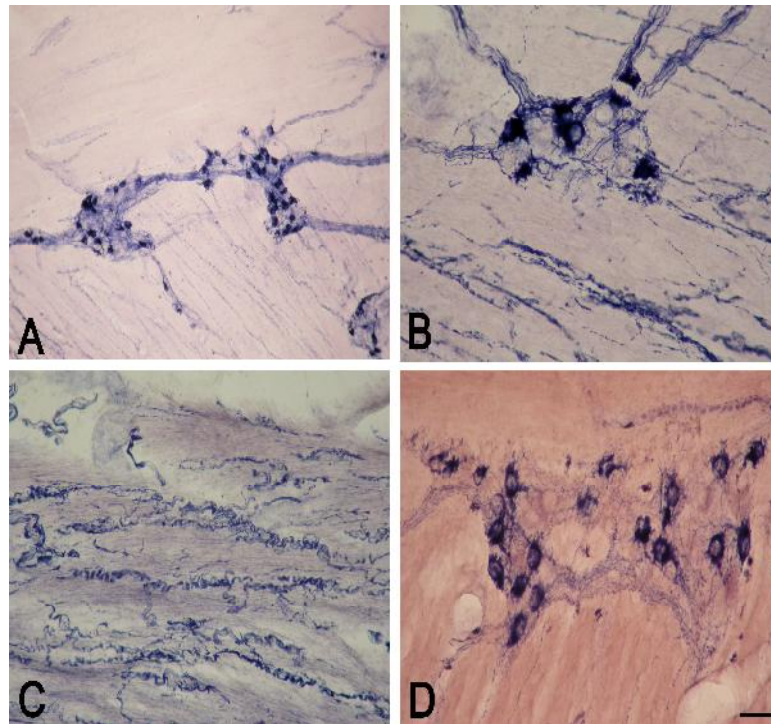
Фигура 31. SP имунореактивност в аноректум на плъх. **А.** Имунопозитивни нервни варикозитети формират гъста мрежа около големи имунонегативни тела на миентерални неврони в ректума. **В.** Голямата стрелка показва добре очертан от имунопозитивни влакна миентерален ганглии, малката – имунопозитивни перикариони. **С.** Между гладкомускулните клетки на вътрешния анален сфинктер се наблюдават оскъдни, варикозни, по-слабо оцветени нервни влакна. **Д.** Имунопозитивни нервни влакна формират гъста мрежа около имунонегативни тела на миентерални неврони в стената на аналния канал. Скала = 100 μm (C); 50 μm (A-D)

5.3. Хистохимично изследване за NADPH-диафораз

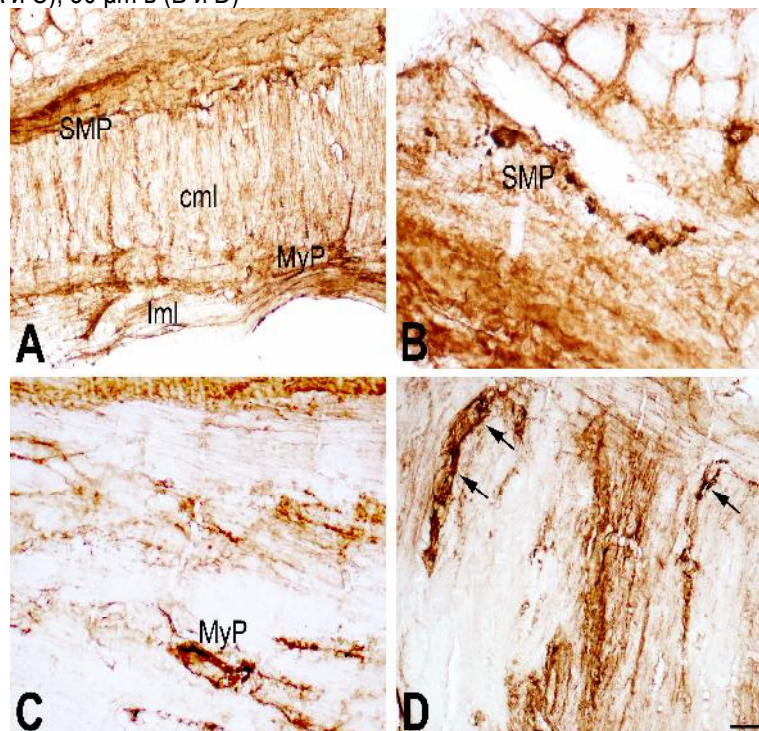
Хистохимичното изследване за NADPH-d показва наличие на позитивни миентерални перикариони в ректума и аналния канал на плъх (фиг. 32, A, B и D). NADPH-d-позитивните неврони са с мултиполарна форма, като добре се визуализира началната част на дендритите (фиг. 32, B и D). Средният брой на реактивните неврони 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. 32, A). Интензивността на оцветяване на NADPH-d-реактивните нервни влакна във вътрешния анален сфинктер е по-изразена от тази в дисталния ректум (фиг. 32, C).

5.4. Имунохистохимично изследване за АТФ-синтаза

Чревната стена на аноректума от плъх показва интензивно оцветяване за АТФ синтаза. В миентералния и субмукозния плексус на гладката мускулатура на ректума се наблюдават имунопозитивни ентерални неврони, както и голям брой имунореактивни нервни влакна (фиг. 33, A). Плексусите се състоят от струпване на неврони, чиито перикариони са изпълнени с тъмни натрупвания в резултат на имунохистохимичната реакция (фиг. 33, B). На нивото на аналния канал имунопозитивните нервни влакна в мускулатурата са по-оскъдни, отколкото в останалата част от стената на ректума (фиг. 33, C). В циркуларния мускулен слой обаче, наблюдаваните нервни влакна са по-често дебели и неразширени. В циркуларната мускулатура на вътрешния анален сфинктер АТФ-синтаза-позитивните нервните влакна са в изобилие, нагънати и интензивно оцветени (фиг. 33, D).



Фигура 32. NADPH-d-оцветяване в аноректум на плъх. **А.** NADPH-d позитивни неврони (депонирали формазан) в миентерален ганглий на ректум. Наблюдават се варикозни влакна в ганглиите и в интернодалните повлекла. **В.** NADPH-d позитивни неврони (депонирали формазан) в миентерален ганглий на ректум. **С.** Във вътрешния анален сфинктер се наблюдават тънки, интензивно оцветени варикозни нервни влакна между циркуларните гладкомускулни клетки. **Д.** По-голям е средният брой на реактивните неврони и оптичната им плътност в аналния канал. Скала = 100 μm (А и С); 50 μm (В и D)



Фигура 33. Фотомикрографии на аноректум на плъх, показващи ATP-синтазна имунореактивност. **А.** ATP имунореактивност на ректум: в лонгитудиналния (lml) и циркуларния (cml) мускулни слоеве се наблюдават множество позитивни за ATP-синтаза нервни влакна. В миентералния (MyP) и субмукозния (SMP) сплит се виждат имунореактивни перикариони. **В.** В субмукозния слой се наблюдават неврони, имунопозитивни за ензима ATP-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 (стрелчки) и влакна. Скала = 100 μm (А); 50 μm (B-D)

6. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

6.1. Експериментални животни и експериментален модел

Експериментите са проведени *in vitro* върху изолирани мускулни препарати и цял аноректум на плъх. Между хора и плъхове има морфологични 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 други не генерират гигантски мигриращи контракции *in vitro*, а само тонични и фазични контракции. За разлика от това, циркулярна мускулатура в мускулни ленти и пръстени, както и *ex vivo* сегменти от дебело черво на плъхове и мишки продължават да генерират гигантски мигриращи контракции [Gonzalez a. Sarna, 2001; Powell et al., 2003], фазични контракции и тонус. Друга причина за използване на плъхове като обект на експериментални изследвания, е че са репрезентативен животински вид, с добре проучените промени в инервацията на СЧТ по време на развитие, съзряване и стареене [Phillips a. Powley, 2007].

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], хора [Stebbing, 1998], кучета [Mutafova-Yambolieva et al., 2003], плъхове [Radomirov et al., 2009a и 2009b] и др. За разлика от гладкомускулните препарати от ректум, IAS и аналният канал показват и устойчив тонус, миогенен по природа, тъй като е резистентен към блокера на потенциал-зависимите бързи натриеви канали тетродотоксин. 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.

Спонтанните високоамплитудни съкращения на LM и CM в цялостен аноректум възникват синхронно, което говори за ко-активация на невроните към двата мускулни слоя. Обикновено при покой, за поддържане на континенцията, съкратителната активност на ректума се съпровожда с контракция на аналния канал, което показва наличие на възбуждащ ректоанален рефлекс [Malcolm a. Camilleri, 2000; Matsufuji a. Yokoyama, 2003; Radomirov et al., 2009]. Регистрираните в експериментите съкращения на IAS и аналния канал са асоциирани с тези на ректалната гладка мускулатура, което се обяснява с функционирането на този рефлекс.

6.3. Модуларни моторни отговори

Няколко са основанията да приемем, че в основата на моторните отговори лежи стимулиране на локалните нервни модули. Спенсер и съавт. (2000) при електрофизиологично изследване на обсега на разпространение на постсинаптични потенциали в CM от дистален ректум на морско свинче са установили, че проекциите на възбуждащите и потискащи мотоневрони могат максимално да се разпространят до 3 mm, 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.

Наблюдава се, че функционалните модули [Costa et al., 2000], формирани от изолираните мускулни ринг-препарати, заедно с прилежащите ентэрални неврони, отговарят на EFS със съкращение. Този ефект е следствие от разпространението на акционни потенциали, причинени от локално освобождаване на стимулиращи и/или инхибиращи невротрансмитери [Paton et Vizi, 1969; Kadlec et al., 1986]. 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 Sr до 228.38% при Cd. 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.

Модуларните отговори на IAS зависят от честотата на прилаганата EFS, което показва, че в регулацията на мотилитета на IAS участват честотно-зависими механизми на ентэралната нервна регулация. Наблюдаваната релаксация на IAS е в съответствие с описаните в литературата отговори при морски свинчета и хора [Stebbing, 1998], опосум [Rattan et al., 1993] и мишки [Rattan et al., 2005a]. Отговорите на ринг-препаратите от анален канал, са честотно-зависими съкращения. Получените резултати показват, че при EFS, въпреки предимно потискащата инервация на IAS, сумарният ефект, дължащ се на активиране и на EAS е възбуден. Това предполага, че предимно възбуждащ(и) невромедиатор(и) доминират и контролират моторната активност на аналния канал и при физиологични условия. *IAS и EAS и асоциираните нервни мрежи действат като единен функционален модул, който участва в координирането на двигателната активност на аналния канал.*

Процесът на отделяне на медиатори зависи от честотата и продължителността на приложените електрически стимули: с повишаване на честотата на електрическите стимули се увеличава общият брой на ангажираните в отговорите синаптични варикозитети [Alberts a. Stjarne, 1982; Kadlec et al., 1986], с което се обяснява честотно-зависимото нарастване на регистрираните контракции.

Cd отговарят на EFS с най-високоамплитудни съкращения, сравнени с тези на Sr и Sm. Нещо повече, всички циркуларни ринг-препарати, които имат по-нискоамплитудни спонтанни фазични контракции, отговарят на EFS с по-мощни съкращения, съпоставени с аналния канал. 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%. Резултатите показват, че в дисталния ректум на плъх съществува гъста възбудна модуларна нервна мрежа, медираща изразената възбудна моторна активност по циркуларната ос, нарастваща в анална посока. Във вътрешния анален сфинктер доминира потискаща невротрансмисия. Модуларният отговор на циркуларните мускулни пръстени от дистален ректум надвишава този на аналния канал, най-вероятно за да се преодолее съпротивлението на аналния канал в процеса на евакуация на ректалното съдържимо.

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 проводен или като резервоарен орган [Shafik et al., 2006]. Доминираща съкратителна активност на

модуларните циркуларните мускулни препарати, особено от дисталния аноректум в сравнение с аналния канал се наблюдава в настоящите експерименти. Релаксация не се наблюдава. Това показва, че контрактилната потентност на дисталния раздел е необходимо условие за да може да се преодолее съпротивата на контрахирувания анален канал в процеса на отделяне на съдържимото в околната среда и подчертава ролята на ректума по-скоро като транзитен, отколкото резервоарен орган.

Модуларните моторни отговори не са описани в достъпната литература, както и участието на различните нервноктивни субстанции в локалните нервни мрежи в аноректум на плъх. Използването на atropine, L-arginine и NG-nitro-L-arginine в експериментите дава възможност за оценка на холинергичната и нитрергична невротрансмисии в локалните нервни модули, участващи в интергитивните мрежи в аноректума на плъх.

Ацетилхолинът е главният възбуждащ медиатор в СЧТ: във вагусовите и пелвични неврони, в ентэралните интерневрони, ентэралните мотоневрони и някои секретомоторни неврони [Porter et al., 1996; Galligan a. North, 2004]. Описано е спонтанно и при електрическа стимулация освобождаване на ACh от гладкомускулни препарати със съхранен миентэрален плексус от илеум на морско свинче [Paton a.t Zar, 1968]. Мускаринови антагонисти потискат перисталтиката, но е описана хиосцин- или атропин-резистентна перисталтика [Tonini et al., 1981; Schwörer a. Kilbinger, 1988]. ACh, заедно с тахикинините са основни ко-трансмитери в мотоневроните [Bornstein et al., 2010]. Холинергичните отговори се дължат предимно на стимулация на M₃ рецепторите, тъй като се блокират от селективния M₃-рецепторен антагонист 4-diphenylacetoxy-N-methylpiperidine. M₂-рецепторите превалят в интестинална мускулатура, но тяхното участие е по-малко и съкращенията се опосредстват предимно от M₃ рецепторите [Eglen, 2001]. Проучвания в различни видове експериментални животни и хора, показват синергичен ефект на M₂ и M₃-рецепторите в контрола на гладкомускулното съкращение [Eglen, 2001; Takeuchi et al., 2007]. При модифицирани мишки с липса на M₃-рецептори се регистрира релаксация на стомашната гладка мускулатура чрез влияние върху пресинптичните M₁-рецептори по механизъм, медиран от NO [Moro et al., 2005].

Описаните в настоящото проучване EFS-предизвикани моторни отговори в присъствието на неселективния M-холинолитик atropine [Ламбев и Крушков, 2010; Якимова, 2010] са в съгласие с данните в литературата, че холинергичната инервация е отговорна за възбуждащи моторни отговори. Амплитудите на модуларните отговори се потискат значимо от atropine във всички ринг-препарати. Най-изразен потискащ ефект е описан в Cd; напр. при EFS с честота 10 Hz амплитудите на отговорите в Ср са потиснати с 41.72%, а в Cd с 53.73%. Това показва промени във функционалната моторна инервация – възбудната холинергична инервация се увеличава от проксимална към дистална посока. Atropine не блокира напълно EFS-индуцираните отговори, наблюдават се атропин-резистентни, най-вероятно тахикининергични съкращения. Tichenor и съавт. (2001) също са описали градиент във възбудната инервация в ректум на кучета, като в проксимален ректум M₃-рецепторният антагонист DAMP блокира моторния отговор 50% и неврокинин 2- рецепторният антагонист GR 94800 – също 50%.

В литературата има категорични доказателства, че NO е основен потискащ NANC медиатор в стомашно-чревния тракт [Bult et al., 1990; Li и Rand, 1989; Rand и Li, 1995; Barthó и 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 в интестиналната система [Lecci et al., 2002], участващ в генерирането на комплексната двигателна активност във всички отдели на СЧТ [Lyster et al., 1995; Spencer et al., 1998]. Ендогенният NO модулира пресинаптично пуринергичната трансмисия [Matsuyama et al., 2003] и увеличава освобождаването на норадреналин от адренергичните неврони [Sotirov a. Papasova, 2000]. Ефектът на NO в миентералния плексус е комплексен, тъй като инхибитори на синтеза и донори на NO имат и стимулиращ и потискащ ефект върху освобождаването на ACh [Bartho a. Lefebvre, 1995]. Според Tamura и съавт. (1993) натриевият нитропрурид намалява възбуждащия потенциал, докато Dickson и съавт. (2007) доказват, че NO медира инхибиращ потенциал в миентералните неврони на морско свинче.

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 EFS на изолирани ринг-препарати от аноректум на плъх, като ефектът е по-изразен при стимули с честота 2 Hz и в Ср. При 10-Hz EFS амплитудите на съкращенията в Ср са увеличени с 30.33%, а в дисталните с 24%. В присъствие на L-arginine, прекурсор на азотния оксид, моторните отговори се повлияват в обратна посока. Наблюдава се същата закономерност, както при L-NNA – по-изразен ефект в препаратите от Ср и См ректум в сравнение с Cd (напр. при стимулация с честота 5 Hz амплитудите в Ср, См 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-Arg 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. 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 невротрансмитери от терминалите на мотоневроните. Елиминира се потискащото действие на NO върху освобождаването на ACh [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 ректо-аналната област на морско свинче [Yamanouchi et al., 2002]. Азотнооксид-зависима, субстанция P-медирирана невротрансмисия е доказана в тънко черво на морско свинче [Wiklund et al., 1993], така че повишаването контрактилните отговори в аноректум на плъх от L-NNA може да е свързано и с освобождаване на субстанция P. 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 вътрелуменното налягане [Abrahamsson, 1983; Desai et al., 1991]. Според Tonini и съавт. (2000) именно NO е медиаторът осигуряващ комплайнса на циркуларната мускулатура директно и чрез потискащо влияние върху холинергичната инервация.

Веществата, повлияващи нитрергичната медиация, имат изразен ефект върху регистрираните моторни отговори на IAS: при честота на стимулация 5 Hz моторният отговор в присъствие на L-NNA се превръща в двуфазен: с 63.89% по-нискоамплитудна релаксация, последвана от контракция, а при L-Arg релаксацията се увеличава с 76.36%. 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 симпатикуът няма основна роля върху тонуса, а по-скоро има невромодулираща роля, поради комплексния и противоположен ефект на α_1 , α_2 , β_1 , β_2 и β_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. ATP 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]. Доказано е участие на субстанция P като възбуждащ медиатор в IAS [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 EFS релаксация на IAS, най-вероятно поради демаскиране на NANC 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 тя е CO-зависима [Rattan et al., 2004]. Резултатите от изследването потвърждават данните от литературата, че NO е основен потискащ медиатор във IAS 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 релаксиращия моторен отговор, което е доказателство, че инхибиращата трансмисия е комплексна [Chakder a. Rattan, 1996]. Съществуват значителни междувидови различия в инервацията на IAS [Cobine et al., 2007], вкл. за ефектите на мускариновите агонисти 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 EFS 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]. Nissan и съавт. (1984) са установили, че мускаринови холиномиметици контрахират IAS на плъх, което се антагонизира от холинолитици, а бета-миметиците и ATP го релаксират, което се блокира от бета-блокери и апамин. Tomita и съавт. (2008) описват функционални различия в двигателното поведение на рингове от проксималната и дисталната част на човешки IAS при EFS. Отговорите на дисталния ринг са съкращения, предизвикани от възбудни ентэрални неврони, главно холинергични. Релаксиращият отговор на проксималната част се дължи на активиране на NANC ентэрални инхибиторни неврони.

В литературата липсват експериментални данни за двигателното поведение на

препарати от анален канал на плъх, съдържащ анатомично съхранени IAS и EAS. При покой аналният канал е затворен, а релаксация започва в синхрон с повишаване на ректалното налягане и при дефекация. Това се дължи на координацията между активирания от миентералния плексус ректоанален 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]. 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 NO върху гладката мускулатура на IAS, но и на сложни взаимодействия върху медиаторните системи. Потискащият ефект на atropine върху регистрираните отговори може да е резултат от модулиращия ефект върху пресинаптичното освобождаване на ACh в невро-мускулната плочка, главно чрез въздействие върху пресинаптичните M₁-рецептори [Lambrecht et al., 1999; Santafe et al., 2006]. Atropine, без да е антагонист за никотиновите рецептори, повлиява невро-мускулната трансмисия в инервирани и денервирани скелетни мускули от базайници [Feith, 1977], като намалява йонния поток и амплитудата на акционен потенциал в нервно-мускулната плочица. Този ефект е по-слабо изразен в сравнение с курарин (100 пъти при *m. sartorius* на жаба и 2000 пъти при диафрагма на плъх) [Beranek a. Vysskoujl, 1967; 1968].

Може да се обобщава, че съществува различие в модулаторните 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 доминира в нервните модули, инервиращи циркуларната мускулатура в ректума и е по-изразена в дисталната област. Нитрергичната потискаща медиация, представена в целия аноректум, има водеща роля в локалните модули на аналният сфинктерен комплекс.

6.4. Моторни отговори на ивици лонгитудинална мускулатура

Ролята на CM в осъществяването на перисталтичния рефлекс е изяснена, докато двигателната активност на LM все още е неясна. В литературата има противоречиви данни относно синхронната активност на LM и CM [Smith a. Robertson, 1998; Grider, 2003].

Амплитудите на EFS-индуцираните отговори на ивиците от LM са значимо по-големи от тези на CM при всички използвани честоти на стимулация и се увеличават пропорционално с повишаване на честотата на стимулация. Съкращенията се потискат повече от 54% при прибавяне на atp 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%).

Лонгитудиналната и циркуларната мускулатура се инервират от различни популации мотоневрони [Smith et al., 1992]. В дебелото черво и двата слоя получават и възбуждаща и потискаща инервация, което показва, че те функционират независимо един от друг [Smith a. Sanders, 1995]. Maselli и съавт. (2011) при изследване на фармако-механичното куплиране на carbachol и VIP в изолирани ивици LM и CM от различни области на дебелото черво на хора описват различна чувствителност към холиномиметика. Инхибиращите мотоневрони към LM са само 3%, 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 IAS е NANC релаксация, докато този на LM е контракция, значително зависима от холинергична инервация. Такива резултати са описани и от Оразо и съавт. (2009) при сравняване на функциите на LM и IAS при прасета. В областта на аналния канал между двата сфинктера пропагира лонгитудиналният слой от ректума, разсейвайки се в тях, в пуборекталните мускули и фиброеластичния компонент [Lunniss a. Phillips, 1992]. При съкращение на така фиксираната LM и едновременната релаксация на IAS, 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). Това дава възможност да се сравнят локалните и низходящи моторни отговори, предизвикани от активирането на невронните пътища, участващи в интегративните невронални вериги в ректоаналната област, както и ефектите при въздействие със субстанции, повлияващи невротрансмитерните системи.

Представяните EFS-индуцирани локални и десцендентни отговори, както и десцендентният отговор на аналния канал, предизвикан от разтягане на стената в дисталната област на ректума, са неврогенни по природа, защото се предотвратяват от ТТХ.

6.5.1. Локални моторни отговори

Локалните EFS-предизвикани отговори на LM и CM от проксималната област на ректума са синхронни съкращения. Амплитудите им нарастват пропорционално с повишаване на честотата на прилаганите стимули от 2 Hz до 10 Hz: при LM амплитудите се увеличават с 146.42%, при CM – със 165.31% и при анален канал – със 79.20%. LM и CM се съкращават синхронно при локална електрическа стимулация. Това показва, че локални възбуждащи мотоневрони в LM и CM получават почти едновременно бързи възбуждащи потенциали [Smith et al., 1999] и генерират синхронни контракции в двата мускулни слоя. 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]. Различните резултати най-вероятно се дължат на използваните методи: стимулиране на чревната мукоза, разтягане на препарата в циркуларна посока. Описаните в представяното и предходно [Radomirov et al., 2009] проучвания синхронни съкратителни моторни отговори са двата мускулни слоя са индуцирани с EFS, а не чрез ангажиране на механорецептори.

Получените резултати от изследването на локалните EFS-индуцирани отговори в цялостен аноректум на плъх са твърде сходни с тези на модуларните отговори в ринг-препарати от CM, анален канал и ивици от LM: по-високи съкращения в LM при всички прилагани честоти на електрическа стимулация ($p < 0.05$), по-мощни контракции в CM и LM от тези на аналния канал. Докато дебелото черво има основна функция по-скоро като резервоар на фекалните маси, то функцията на ректума като транзитен или резервоарен орган е все още въпрос на

дискусия. Напоследък има данни за доминиращата възбудна активност на LM в двигателната активност на колона и ректума, което предполага водещата роля на този мускулен слой [Radomirov et al., 2009]. Съкратителната активност на LM и CM се увеличава от колона към ректума при липса на релаксация, което индицира по-високата съкратителна активност в коло-ректоаналната област на плъхове [Brading et al., 2006]. Описаните в представяното изследване модулари и локални отговори са в унисон с литературните данни. По-изразената съкратителна активност на LM и увеличаване на модуларната съкратителната активност на CM в аборална посока най-вероятно е предпоставка за преодоляване на контрахиращия анален канал в процеса на дефекация. Доминирането на съкратителната активност в ректоаналната област подкрепя по-скоро транзитната, отколкото резервоарната функция на ректума.

Локалният отговор на IAS в аноректум е двуфазов: начална, краткотрайна контракция, последвана от релаксация, която е по-изразена при EFS с честота 2 Hz, а съкращението при 10 Hz-EFS. Локални моторни отговори на IAS и анален канал в препарат от аноректум на плъх при EFS с честота 5 Hz са описани от Radomirov и колектив (2009). Получените резултати показват, че при EFS локалният отговор на аналния канал е съкратителен, подобно на модуларния отговор. Контролът на двигателното поведение на аналния канал се организира от ентэралната нервна система под контрола на спиналната и супраспинална нервна система [Bharucha, 2006]. Предимно възбуждаща невромедияция превалира и контролира моторната активност на аналния канал като електрически-възбудима невро-мускулна единица.

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. L-NNA увеличава амплитудите на контракциите, а L-Arg – на релаксацията и намалява контракциите на атропин-сензитивните отговори. Локалният отговор на аналния канал, както и въздействието на нитрегичните субстанции и atropine са подобни на описаните и дискутирани по-горе модулари. Изследван е ефектът на spantide, potentен тахикининов антагонист, предимно за NK1 рецепторите [Bartho et Holzer, 1985], върху локалният отговор при претретиране с атр. EFS-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. ACh, заедно с тахикинините са основни възбуждащи ко-трансмитери в мотоневроните [Bornstein et al., 2010]. При предварителна мускаринова блокада, антагонистът на NK1-рецепторите SR 140333 значително инхибира пропульсията [Tonini et al., 2001]. Тахикинините (субстанция P, неврокинин A и B) активират NK1, NK2 и NK3-рецепторите. Tichenor и колектив (2002) са описали съкратителни отговори на IAS на кучета при въздействие със субстанция P върху препарати претретирани с atropine и guanethidine, следователно 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 зависи и от реакцията на EAS. Тахикинините и вазопресинът предизвикват възбуждане на пудендалните неврони, инервиращи перинеалните напречноабраздени мускули, вкл. EAS. При мъжки плъхове пудендалните неврони показват субстанция P-свързващи места, като мотоневронната деполяризация е медирана от NK1, не и от NK2 или NK3-рецептори [Ogier et al., 2006].

Получените резултати показват подобни модулари и локални моторни отговори в

аноректум на плъх при EFS. Подобно на модулните нервни модули, холинергичната стимулираща невротрансмисия е по-изразена в локалните отговори на LM и CM на ректума. NANC потискаща невротрансмисия е представена в целия аноректум, но има водещо значение в локалните отговори на IAS и аналния канал. В основата на неврогенните модулари и локални отговори най-вероятно лежат едни и същи стимулиращи и/или инхибиращи трансмитерни системи на ентeралните мрежи в аноректума на плъх.

6.5.2. Низходящи моторни отговори

EFS, приложена в ректалната част на аноректума, предизвиква низходящи отговори в аналната, нестимулирана част на препарата, което се дължи на разпространение на импулса по ентeрални низходящи пътища.

Низходящите моторни отговори на IAS и аналния канал при EFS, приложена върху проксималната област на ректума, са честотно-зависими съкращения. Низходящият отговор на IAS е съкращение, вероятно поради липса на фекални пелети, или други стимули, които да активират механорецепторите на аферентните сензорни неврони. Резултатите 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.

Локалните отговори на IAS се състоят от начална контракция, последвана от релаксация, докато низходящите отговори се характеризират със съкращение, а локалният и низходящият отговори на аналния канал са съкращения. Тези резултати потвърждават наличието на 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 Radomirov и съавт. (2009a), чиято активност се модулира и от нитрергични субстанции.

NANC низходящите отговори на IAS са променени по структура – релаксация без статистически достоверна разлика в регистрираните амплитуди. 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 ентeрални и неентeрални нервни структури. При потискане на парасимпатиковата и симпатикова 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 стимулиращият ефект на тахикинините и вазопресинът върху EAS, 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 анал сфинктер и процесите на континенция и дефекация [Holmes et al., 2005].

Описаните съкратителни низходящи моторни отговори, провокирани от електрическа

стимулация на проксималния ректум, показват наличието на аборално насочен възбуден невронален път („дълъг“ път). Релаксиращите компоненти в моторните NANC низходящи отговори на IAS и аналния канал, подобно на тези в локалните се дължат на NANC потискаща невротрансмисия.

Проучено е въздействието на P2Y специфичния блокер cibasron blue и неселективния P2-рецепторен антагонист suramin върху NANC низходящи отговори на IAS и анален канал в цялостен аноректум, при прилагане на EFS в проксималната част на препарата. P2Y-блокертът cibasron blue значително потиска релаксацията в NANC низходящия отговор на IAS, което потвърждава инхибиращия ефект на ATP и наличие на инхибиторни P2Y-рецептори в невромускулните структури в аналния сфинктер. 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-рецепторите, участващи в нехолинергичния възбуждащ отговор. Потискането на релаксацията на IAS, най-вероятно се дължи на ефект, опосредстван от P2Y-рецепторите. Блокирането на P2X-рецепторите може да обясни намалената амплитуда на съкратителните низходящи NANC отговори.

Пуринергичните рецептори участват в медиацията от интерневроните към мотоневроните [Bian, 2000], локализирани в интерстициалните клетки на Кахал [Burnstock et 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 е прието, че медира потискащи моторни отговори. Доказано е, че в лонгитудиналната мускулатура на йеюnum от плъх ATP участва в NANC релаксацията, индуцирана от електрическа полева стимулация, като активира SK канали [Waseda et al., 2005]. В препарати от черва от хора и мишки IPJP и предизвиканата релаксация се блокира от P2Y₁-рецепторен антагонист MRS 2179 [Gallego et al., 2006; De Man et al., 2003; Gallego et al., 2011]. P2Y₁-рецепторно медиран е апамин-зависимият и независимият IPJP в циркуларната мускулатура от колон на мишки [Zhang et al., 2010]. ATP, чрез P2Y₁-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, медиранни от P2X рецепторите са описани в миентералните и субмукозните неврони [Galligan a. Bertrand, 1994; Bertrand a.t 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]. Spenceг и съавт. (2000) са описали, че заедно с ацетилхолин, ATP е важен нехолинергичен възбуждащ медиатор, участващ вероятно в трансмисията между асцендентните и десцендентните интерневрони. ATP и ACh могат да действат като ко-трансмиситери не само в ентералните невронални мрежи, но и в мотоневроните, иницииращи скелетната мускулатура, като пуринергичното участие се опосредства главно от P2X-рецептори [Burnstock, 2011].

Резултатите от представените експерименти потвърждават участието на ATP чрез P2-рецепторно действие в NANC 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 EFS, приложена в дисталната част на ректума са честотно-зависими съкращения. Амплитудите на низходящите моторни отговори, индуцирани от EFS, приложена в дисталния ректум, са с 52.87% по-ниски от тези на локалните отговори на аналния канал, а тези на низходящите отговори, индуцирани от EFS в проксималната част на ректума, са 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 EFS-предизвикани съкратителни отговори на аналния канал се потискат от atropine, но не се блокират. Във възходящото активиране участват предимно холинергични интерневрони, докато низходящите отговори се медиират от холинергични и нехолинергични интерневрони [Smith a. Robertson, 1996; Smith a. McCarron, 1998; Bian et al., 2004]. Spantide намалява амплитудите на атропин-предизвиканото потискане на низходящите моторни отговори на аналния канал, без промяна в релаксацията. Тези резултати показват участието на субстанция Р в съкратителната активност на аналния канал. Johnson и колектив (1998), чрез измерване на интрацелуларните постсинаптични потенциали, са доказали ролята на NK1 и NK3-рецепторите в синаптичната трансмисия между миентералните неврони. Наблюдаваната релаксация в присъствие на atropine, подсказва, че блокирането на възбуждащата холинергична трансмисия демаскира активността на инхибираща нехолинергична невротрансмисия/и. Низходящите съкратителни отговори на аналния канал се увеличават значимо при прибавяне на L-NNA, а L-Arg значително увеличава релаксацията. Някои от десцендентните неврони са холинергични, 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]. NO 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, индуцирани от EFS в дистален ректум, са съкратителни, което показва, че в аноректума на плъх функционира възбуден „къс“ ректоанален път. Във възбуждащите невронални пътища към аналния канал, ACh и субстанция Р имат участие в нервните мрежи, контролиращи функционалната активност на аналния канал. Нитрергичните субстанции повлияват значително съкратителните и релаксиращи компоненти на EFS-индуцираните моторни отговори на аналния канал, което потвърждава участието на NO като важен инхибиращ медиатор в низходящите невронални мрежи в аноректума на плъх.

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 представеното изследване е използвана методика чрез раздуване на балон, имитиращ фекална пелета на разстояние 5 mm от аналния канал [Radomirov et al., 2009b]. Раздуването на интралуменен балон активира вътрешните първични сензорни

неврони чрез стимулиране на ректалните механорецептори. Тези механочувствителни неврони са чувствителни по-скоро на разтягане [Spencer et al., 2002]. 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, са отговорни за релаксацията на аналния канал, което осигурява пропульсията на ректалното съдържимо.

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. 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 описаните в литературата данни, че други трансмитери, освен ACh и субстанция P участват в трансмисията между невроните в низходящите инхибиращи ректоанални рефлексни пътища на плъх, вероятно ATP, 5-HT и/или глутамат [Gwynne a. Bornstein, 2007].

L-NNA увеличава амплитудите на контрактилната компонента и намалява тези на релаксиращата, докато L-Arg има обратен ефект. Подобни резултати са описани в аноректума на морско свинче: L-NNA увеличава рефлекс-медираните контракции на ректума и предотвратява рефлекс-медираната релаксация на IAS 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 модулатор на освобождаването на трансмитери от мотоневроните и интерневроните в рефлекторните 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 и с възбудни и инхибиторни мотоневрони, което показва, че NO вероятно 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. Smith и McCarron (1998) са доказали, че едногенният NO улеснява холинергичната невротрансмисия в асцендентните, възходящи рефлекторни пътища и я инхибира в десцендентните инхибиторни и възбудни рефлексни пътища.

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 антагонисти на възбудните невротрасмитери (ACh и

субстанция P) и се медира основно от дистално насочен нитрергичен път, който осъществява релаксацията на аналния канал.

Регистрираните модулари, локални и низходящи електрически-предизвикани моторни отговори, както моторният отговор на аналния канал, провокиран от разтягане на стената на ректума са невrogenни по природата, тъй като те се предотвратяват от ТТХ, блокер на невроналната проводимост.

6.6. Морфологични изследвания

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, SP, 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?

Резултати от имунохистохимичното изследване за ChAT 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 ректоанални 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 те оскъдни, варикозни, по-слабо оцветени. Това предполага участие на SP в двигателната активност на аноректума, може би 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, 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.

Морфогичните данни показват ATP-синтаза-позитивните нервните влакна и неврони в ректалната област, така и изобилие от интензивно оцветени нервни влакна в IAS, което потвърждава комплексна роля на пуринергичната невротрансмисия и в ректума и в аналния сфинктер.

Имунохистохимичните и хистохимичното изследвания показват наличие на нервни структури, съдържащи ChAT, SP, 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 в *цялостен аноректум* на плъх. NG-нитро-L-аргининът увеличава контрактилния отговор на аналния канал в низходящия моторен отговор, докато L-аргининът значимо го потиска и предизвиква релаксация. М-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. М-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 ректоаналната 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.

Спонтанният тонус на вътрешния анален сфинктер е миогенен по природа. Модуларните, локалните и низходящи моторни отговори са неврогенни и не се генерират при претретиране с блокера на невронната проводимост тетродотоксин.

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 пурини участват чрез P₂-рецепторите в неадренергичната-нехолинергична невротрансмисия в аноректума на плъх. Потвърждава се потискащият ефект на аденозин трифосфата върху вътрешния анален сфинктер чрез инхибиторни P_{2Y}-рецептори.

Резултатите от изследваните локални и низходящи отговори на аналния канал, индуцирани 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 ректоанални 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 P, 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 ректоанални низходящи пътища и участието на основни възбуждащи и потискащи невротрансмитери в тях. В същото време те пораждат въпроси,

между които:

- Комбинирана терапия между лекарства, увеличаващи комплайанса на ректума (донори на азотен оксид и клонидин) или намаляващи сензомоторната активност на ректума (клонидин) 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

1. Разработен е и приложен в експерименталните програми модел за характеризирание и фармакологично повлияване на модулари моторни отговори в ректоаналната област на плъх.
2. Проучването доказва, че модулари 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 модулари 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.

Публикации и съобщения от експериментални изследвания, свързани с дисертационния труд

I. Научни публикации в България

1. Stavreva, G., L. Simeonova, D. Maslarov, R. Radomirov. Modular nerve circuit-mediated motor activity in circular axis of rectum in rat model. *C.R.Bulg.Acad.Sci.* 2011;64(5):705-710. (IF 0,204; 0.051).

II. Научни публикации в чужбина

2. Radomirov, R., N. Negrev, D. Itzev, G. Stavreva. Activation-dependent descending reflex evacuation of anal canal in a rat model. *Archives Italiennes de Biologie*,148, 377-388, 2010 (IF 0.972; 0.243).
3. Stavreva, G., N. Nedialkova, N. Negrev, D. Maslarov, R. Radomirov. Modular and functionally-different descending recto-anal motor pathways in rat model. *Central European Journal of Biology* 2011;6(4):510-517. (IF 1.0; 0.2).
4. Stavreva, G., R. Radomirov. Region-related modular nerve-dependent motor activity in anorectum – cholinergic and nitrenergic contribution to rat model. *Acta Neurobiologiae Experimentalis.* 2012;72:185-194. (IF 2.11; 1.055).

III. Научни съобщения в България

1. Ставрева, Г., Р. Радомиров. Модуларни и десцендентни рефлексни отговори на ректоанална област при плъх. Двадесет и първа международна научна конференция, СУБ, Стара Загора, 2-3 юни 2011, П 10, с. 46.
2. Ставрева, Г., Р. Радомиров. Модуларни моторни отговори в ректална област на плъх – участие на холинергична и нитрергична невротрансмисия. Двадесет и първа международна научна конференция, СУБ, Стара Загора, 2-3 юни 2011, П 11, с. 46.
3. Stavreva, G., R. Radomirov. Cholinergic and nitrenergic implications in modular nerve network of anal region, X Национален конгрес по физиология, Варна, 6-9 октомври, 2011 год. *Scripta Scientifica Medica.* 2011;43(3):237.

IV. Научни съобщения в чужбина

4. Stavreva, G., R. Radomirov. Cholinergic, substance P-ergic and nitrenergic implications in descending reflex responses of anal canal in a rat model. *Join Congress of FEBS and Turkish Society of Physiological Sciences*, 3-7 September, 2011, Istanbul, Turkish, PC 149.
5. Stavreva, G., N. Lazarov, R. Radomirov. Effect of cibacron blue and suramin on adrenergic and non-adrenergic non-cholinergic motor responses in the rat anorectum" 6th European Congress of Pharmacology, EPHAR 2012; July 17th-20th, Granada, Spain. *Proceedings of the British Pharmacological Society* at <http://www.pA2online.org/abstracts/Vol10Issue3abst607P.pdf>.

DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHARMACOLOGY,
DERMATOLOGY AND VENEREOLOGY

Galya Tsvetanova Marinova – Stavreva, MD

**PHARMACOLOGICAL ASPECTS OF MODULAR AND DESCENDING
MOTOR RESPONSES IN RECTOANAL AREA**

PhD Thesis

Scientific Advisor:

Prof. Radomir Georgiev Radomirov, MD, DMSc

Official Reviewers:

Prof. Anna Belcheva Beronova, MD, DMSc
Assoc. Prof. Ivan Todorov Lambev, DM, PhD

ANNOTATION

Background: Disorders in the evacuation function of the gastrointestinal tract are a significant medical and social problem. Therefore, an increasing number of experimental and clinical studies have focused on nerve-mediated motor activity of the recto-anal region. It is accepted now that the rectoanal evacuation activity is a complex process involving voluntary control of excretion as well as autonomic innervation of rectum and internal and external anal sphincters.

Objective: The aim of this study was to characterize the contribution of major neurotransmitter systems to modular and descending motor responses in Wistar rat rectoanal region.

Methods: Mechanographic on-line technique, partitioned organ bath, electrical field stimulation (EFS; 0.8 ms; 40 V; 2, 5 or 10 Hz; 20 s) or distension were used to evaluate motor responses of circular and longitudinal muscles of rectum and anal canal in rat rectoanal preparation as a display of excitation of modules of nerve networks or descending pathways. Drugs were used to characterize the contribution of cholinergic, nitroergic, tachikyninergic, and purinergic neurotransmissions to modular networks and descending pathways in a rat experimental model. Immunohistochemical and histochemical techniques were used to study the presence and distribution of choline acetyltransferase, substance P, ATP-synthase and NADPH-diaphorase in neuronal structures of the myenteric plexus of rat anorectum.

Results: Twitch-like frequency-dependent contractions, more pronounced in distal rectal preparations, characterized the modular motor responses of rectal circular muscle rings and anal canal. The motor activity of internal anal sphincter depended on the frequency of stimulation and varied from deep long-lasting relaxation to an initial short-lasting relaxation followed by a contraction. The responses were significantly less pronounced as compared with those of longitudinal muscle strips. In the presence of atropine (0.3 μ M), the contractions of rectal rings decreased, the relaxation of internal anal sphincter increased, and inhibition of the contractions of the anal canal, followed by relaxation was observed. NG-nitro-L-arginine (0.5 mM) increased the contractile responses and suppressed the relaxations of the internal anal sphincter. L-arginine (0.5 mM) decreased the contractions and extended the relaxations of the internal anal sphincter and anal canal. In entire recto-anal preparation, application of EFS to distal rectum elicited descending contractile response (5.16 ± 0.46 mN) of anal canal, while distension by balloon induced descending response that consisted of contraction (1.50 ± 0.18 mN) followed by relaxation (3.12 ± 0.34 mN). In the presence of atropine, the EFS-elicited descending contractions of the anal canal were suppressed, and a relaxation occurred. The initial contraction component of the distension-induced response was decreased, while the relaxation remained unchanged. Spantide (0.1 μ M) lowered the contractile component of the anal canal response even more. NG-nitro-L-arginine enhanced the contraction, prevented the atropine-dependent relaxation of the EFS-elicited response and inhibited the distension-induced relaxation. L-arginine suppressed the contraction and extended the relaxation. The electrically- and balloon-evoked responses of anorectal preparations were tetrodotoxin (0.1 μ M)-sensitive. ChAT-, substance P-, NADPH-diaphorase- and ATP-synthase-positive nerve fibers and NADPH-diaphorase-positive perikarya were found in myenteric ganglia of the anal canal.

Conclusion: The results obtained suggest that cholinergic and nitroergic systems are not equally involved in modular nerve networks in different regions of anorectum. Cholinergic neurotransmission, more expressed in distal rectum, underlies the contractile potency of rectal circular muscles, while nitric oxide-dependent neurotransmission(s) control the relaxation ability of internal anal sphincter and anal canal. The results show that excitatory neurotransmission(s), more expressed to longitudinal muscle, dominate in the local recto-anal nerve networks. Our findings suggest activation-dependent descending reflex motority of the anal canal, involving electrical stimulation-displayed cholinergic and tachikyninergic, as well as distension-manifested nitroergic neuro-muscular communications.

Key words: rat anorectum, descending motor response, modular motor response, atropine; L-arginine; NG-nitro-L-arginine, ATP, spantide.