

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ВАРНА
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ- ВАРНА
УНИВЕРСИТЕТСКА БОЛНИЦА "СВЕТА АННА"
УНС ПО УРОЛОГИЯ**

Д-Р АМАР КУМАР МАНАНДХАР

**"ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА СУБТИПОВЕТЕ МУСКАРИНОВИ
РЕЦЕПТОРИ В МЕХУРНАТА ЛИГАВИЦА И ПРОУЧВАНЕ
НА ВЛИЯНИЕТО НА УРОТЕЛА ВЪРХУ ДЕТРУЗОРНИЯ
КОНТРАКТИЛИТЕТ *IN VITRO*"**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**ДЕСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН "ДОКТОР"**

**Научна специалност
Урология**

Научен ръководител:
Доц. Д-р Лидия Петкова, Д.М.

Официални рецензенти:

1. Проф. Чавдар Славов ДМН
2. Проф. Димитър Младенов ДМН

Варна, 2012

Съдържание:

Въведение.....	5
Цели и Задачи.....	7
Материали и методи.....	8
Резултати.....	14
Обсъждане.....	39
Изводи.....	49
Приноси.....	50
Списък на научните публикации и съобщения във връзка с дисертационен труд	51
Благодарности.....	53

Списък на използвани съкращения:

5-НТ- 5- хидрокситриптамин

ACh – Ацетилхолин

АСНЕ – Ацетилхолинестераза

АМР – Аденозин моно фосфат

АТР – Аденозин три фосфат

СGRP - Calcitonin related peptide

ГАВА – Гама Амино Бутиринова Киселина

ГАГ – Глюкозоамин гликан

ІВМХ - 3-Isobutyl-1-methylxanthine

RTX – Резинифератоксин

ТРСК - N-Tosyl-L-Phenylalanine Chloromethyl Ketone

cGMP – Цикличен гуанидин моно фосфат

cАТР – Цикличен Аденозин трифосфат

ИФОУ- Инхибиращ фактор отделен от уротел

СДПЛ Симптоми на долни пикочни пътища

Kd Константа на дисоциация

PPS – Pentosanpolysulphate

VIP - Vasoactive intestinal polypeptid

NANC- Nonadrenergic noncholenergetic

P2X3 - Purinergic receptors

mRNA messenger ribonucleic acid

[³H]QNB (1-[benzyl-4,-4'-³H]-quinuclidinyl benzilate

EC₅₀ концентрацията на агонист, която предизвиква
50% отговор, използва се за измерване на
потенцията на агониста

PEC_{50} отрицателен логаритъм на EC_{50} , ако EC_{50} е (-6) PEC_{50} ще бъде 6.

IC_{50} концентрация на инхибитор, която предизвиква 50% инхибиция.

r^2 Фактор показващ степента на пасване

pK_i – логаритмична дисоциационна константа в равновесие

Въведение

Инконтиненцията на урина става все по-гореща тема за обсъждане в медицинските и фармакологичните среди поради нейната социална значимост. Причините за огромния интерес към този проблем в последните години са: наличието на огромен брой пациенти с подобни оплаквания и финансовото бреме за тяхното лечение, дори за развитите държави. Само в САЩ има 17 милиона мъже и жени, които страдат от инконтиненция на урината и много от тези хора са с неудържим позив за уриниране без инконтиненция /ърдж-симптом при хиперактивен мехур - ХАМ/. Според Американската Агенция за Health Care Policy and Research (Агенция за здравна политика и изследване) лечението и поддържането качеството на живота на тези хронично болни струва на държавата около 26 милиарда долара годишно. Поради продължаващата тенденция към стареене на нацията, проблемите свързани с инконтиненция и ХАМ сигурно ще продължат да растат. Друга причина за растящият интерес към тези заболявания е откриването на все по-нови и нови медикаменти и начини на приложението им.

По настоящем антиму斯卡риновите препарати са единствените медикаменти, които намаляват страданията на тези пациенти. Други медакаменти като антидепресанти, мускулни релаксанти и естрогени също повлияват положително по един или друг начин, но не променят детрузорната активност. За съжаление

антимускариновите препарати са с много странични действия, най често сухота в устата. Търсят се различни начини на приложения и по-специфични медикаменти влияещи само върху пикочния мехур за намаляване на тези неприятни странични действия, но засега няма особен успех. Хирургичното лечение се прилага в краен случай, ако медикаментозното лечение не повлияе и качеството на живота на пациента е компрометирано вследствие техния ХАМ. Поради тези причини надпреварата за откриване на нови медикаменти продължава в световен мащаб.

Цели и задачи:

1. Цел:

Целта на това изследване е :

Идентификация на мускаринови рецепторни субтипове намиращи се в лигавицата на пикочния мехур, проучване на ролята на лигавицата на пикочния мехур при регулиране на детрузорния контрактилитет, опит за идентификация на неизвестен за сега инхибиращ фактор, който се отделя от лигавицата на пикочен мехур и опит за намиране на невротрансмитери или други субстанции в експериментални условия, които допринасят за освобождаване на ИФОУ (инхибиращ фактор отделен от уротел).

Задачите, които бяха поставени във връзка с формулираната цел бяха:

1. Да се потвърди наличието на мускариновите рецептори в лигавицата на пикочния мехур.
2. Да се идентифицират субтиповете на мускариновите рецептори в лигавицата на пикочния мехур на прасета чрез използване на радиолигандно вещество и селективните мускаринови антагонисти.

3. Да се проучат влиянието на лигавицата на пикочния мехур при контракция с мускаринов агонист, KCl и ATP върху парчета тъкани от пикочния мехур на прасета и на човека.
4. Да се проучат влиянието на различни ензимни инхибитори на нуклеотидната система за клетъчен отговор върху контракцията на детрузора и значението на лигавицата при тези експерименти.

2. Материал и методи:

1. Пикочен мехур на прясно умъртвени прасета.
2. Пикочен мехур след цистектомия от пациенти оперирани по повод карцином на пикочния мехур. Парчета тъкани се вземат от здрави места от пикочния мехур.

Методи:

1. Радиолигандно свързване на рецепторите намиращи се в лигавицата на пикочния мехур с помощта на радиоактивно вещество, ($[^3\text{H}]\text{QNB}$) (1-[benzyl-4,4'- ^3H]-quinuclidinyl benzilate) с радиоактивно съдържание 37 кюри в милимол ($37 \text{ Ci} \cdot \text{mmol}^{-1}$)

А. Сатурационно свързване за определяне на плътността на рецепторите в уротела и в детрузора. При този експеримент се използва различна концентрация на белязан радиоактивен лиганд ($[^3\text{H}]\text{QNB}$), което се свързва с небелязан специфичен антагонист в различни концентрации. Измерва се свързване на рецептори с лиганд в равновесие.

Б. Конкурентно свързване за идентификация на субтипове на мускариновите рецептори. При този експеримент

се използва определена концентрация на белязан радиоактивен лиганд ($[^3\text{H}]\text{QNB}$), което се свързва с небелязани антагонисти в различни концентрации. Измерва се свързване на рецептори с радиоактивно вещество в равновесие.

2. Построяване на кумулираща концентрационна крива за контракция на детрузора с и без лигавица след третиране с различни ензимни инхибитори. За всяка двойка тъкани резултата се нанася като процент от максималната контракция на контролите.

3. Построяване на релаксационна крива за релаксация на детрузора с и без лигавица след третиране с различни фармакологични вещества. За всяка двойка тъкани резултата се нанася като процент от максималната контракция на контролите.

4. Всички криви се построяват с помоща на програмата-“Prism” – Graph PAD софтуер-гр. Сан Диего Калифорния, САЩ.

5. Student’s t-test се използва за да се сравни максималната контракция и също така логаритмичните стойности на EC_{50} .

6. Средните стойности \pm стандартно отклонение/ бяха пресметнати и използвани за построяване на кривата.

7. В случаите, когато се налага да сравняваме повече от две групи се използва ANOVA последвана от t-test.

3. Използвани лекарствени вещества и разтвори

Carbamylcholine chloride (Carbachol) Карбахол- мускаринов агонист използван за стимулация на детрузора.

KCl (Potassium Chloride) Калиев Хлорид- използван за контракция на детрузора

ATP (Adenosine Tri phosphate) Аденозин Трифосфат- използван за контракция на детрузора

Papaverine

неспецифичен фосфодиестеразен инхибитор използван за блокиране на нуклеотидна реакция

3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) неспецифични фосфодиестеразни инхибитори, използван за блокиране на нуклеотидна реакция

N-Tosyl-1-Phenylalanine Chloromethyl Ketone (TPCK)

протеинкиназа А инхибитор използван за блокиране на нуклеотидна реакция

golipram-cAMP зависим фосфодиестеразен

инхибитор- използван за блокиране на нуклеотидна реакция

Тези продукти са закупени от Sigma, Poole, Dorset, UK.

2',5' dideo 2',5'- Dideoxyadenosine аденил циклаза инхибитор- използван за блокиране на нуклеотидна реакция

[3H]QNB [3H]QNB (1-[benzyl-4,-4'-3H]-quinuclidinyl benzilate) - радиоактивно вещество използван за радиолигандни експерименти закупен от NEN Life Science Products, Inc. MA, USA;

pirenzepine hydrochloride -специфичен мускаринов антагонист

atropine sulphate -неспецифичен мускаринов антагонист

oxybutynin chloride - неспецифичен мускаринов антагонис
EDTA (ethylenediamine tetra-acetic acid) и
Tris (tris(hydroxymethyl)methylamine) – използвани за
стабилизиране на тъкания хомогенат са закупени от от
Sigma Chemical Co. MO, USA;
4-DAMP methiodide (1,1-Dimethyl-4-diphenylac-etoхуриperidinium
methiodide) и methoctramine tetrahydrochloride -
специфичен мускаринов антагонист
са закупени от Research Biochemicals International, MA, USA.

4. Експериментални методи:

4.1 Тъканна подготовка за радиолигандно свързващи експерименти:

Пикочният мехур се взема от прясно заклани прасета, от местна кланица. Веднага се съхраняват в разтвор на Кребс (състав в mM : NaCl 118.4, NaHCO₃ 24.9, CaCl₂ 1.9, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, glucose 11.7) при 4 градуса. Тъканта се използва веднага или се оставя на дълбоко замразяване при минус 80 градуса в течен азот до използването им. Детрузора и уротела се разделят внимателно един от друг и се нарязват на ситни парчета. След това тъканите се хомогенизират при приблизително 0.125 mg.ml⁻¹ в разтвор на Tris buffer (50 mM Tris,) при 24000 rpm за 30 секунди, използвайки Ultra turrax® хомогенизатор. Полученият хомогенат се филтрира през четирислоен марлен филтър и полученият филтрат се хомогенизира още веднъж, използвайки Тefлонов хомогенизатор. След това хомогената се центрофугира двукратно при 45000 g за 10 минути при 4°C във

високоскоростна студено-спинираща центрофуга (Centaur 2, MSE Scientific Instruments). Горния течен слой се изхвърля и останалата част – утайката от тъканта се поставя на Tris разтвор и се центрофугира още веднъж. Финалният хомогенат се пази в 4 мл. буферен разтвор. През цялото време тъканта се обработва при 4°C температура. След подготовката, хомогенатът се използва веднага.

4.2 Сатурационни експерименти :

Сатурационните експерименти са извършени в двойки използвайки седем концентрации на радиолиганд (^3H QNB) между 0.0156 nM и 2 nM (нано молар). 10 μM (микро молар) атропин като неспецифичен антагонист е използван за неспецифично свързване с мускариновите рецептори на тъканните проби. Експериментите са извършени в обем 0.25 мл. Мембраните са инкубирани за 30 минути при 37°C да се свързват с белязан лиганд и неспецифичен антагонист с рецептори до получаване на сатурация. Пробите се вакуум филтрират през стъкло-фибрените филтри (Whatman grade GF/B) за да се премахнат по-големи частици. Измиват се три пъти с ледено студен Tris разтвор, с помощта на M-30R Brandel Cell Harvester за да свързват трайно с рецепторите. Към филтрите се прибавят 3 ml Emulsifier-Safe™ течен сцинтилационен коктейл и дезинтегрираните на минута [^3H]QNB частици се броят, използвайки Packard 1600TR течен сцинтилационен брояч. Така изброените рецептори свързани с

белязан лиганд се обработва с помощта на компютърен софтуер за да се открие плътността на мускариновите рецептори.

4.3 Конкуrentни експерименти :

Тези експерименти също се правят във двойни проби от 0.1 nM [³H]QNB и серия от 12 концентрации на atropine (0.01 nM – 200 nM), pirenzepine (0.1 nM – 10 μM), methoctramine (0.1 nM – 10 μM), 4-DAMP (0.2 nM – 1 μM), и oxybutynin (0.5 nM – 2 μM) в същия инкубационен обем и условията посочени горе. При конкурентни експерименти радиолигандното вещество е с една и съща концентрация на всичките 13 проби в двойки (26 проби), но концентрацията на различни специфични и неспецифичен антагонист е различна.

5. Обработка на данните:

Данните са обработени с помощта на Microsoft Excel и GraphPad 'Prism' компютърен софтуер. Като резултати са представени средната величина и ± стандартното отклонение на експериментите. За сатурационните експерименти концентрацията на белтък в тъканния хомогенат бе определен по метода на Lowry *et al.* (1951) и плътността на рецепторите беше представена в fmole mg protein⁻¹.

Кривите от конкурентните експерименти са анализирани чрез съпоставянето на данните към one site and two site binding model на GraphPad 'Prism'. Когато P<0.05 (при F-test) two site binding model пасва много добре, в сравнение с one site binding model.

Собствени резултати:

1. Експерименти с радиолиганд за определяне на плътността на мускариновите рецептори и идентификация на техните субтипове:

1.1 Сатурационно свързване (saturation binding) :

Специфичното свързване на радиолиганд [³H] QNB с уротелния хомогенат бе 72.24 % (n= 28), и се стигна до пълна сатурация. Дисоциационната константа (K_D) бе 0.058 ± 0.0 nM (n=4) за уротела и 0.57 ± 0.10 nM за детрузора. Плътността на рецепторната популация B_{max} бе 338.46 ± 22.43 и 186.1 ± 37.36 fmoles mg protein⁻¹ за уротела и съответно за детрузора. Фигура 1, показва представителни криви за уротела и детрузора, а резултатите са дадени на таблица 1.

Фигура 1: Графики показващи типично сатурационно свързване с [^3H] QNB в А- уротела и В- детрузора.

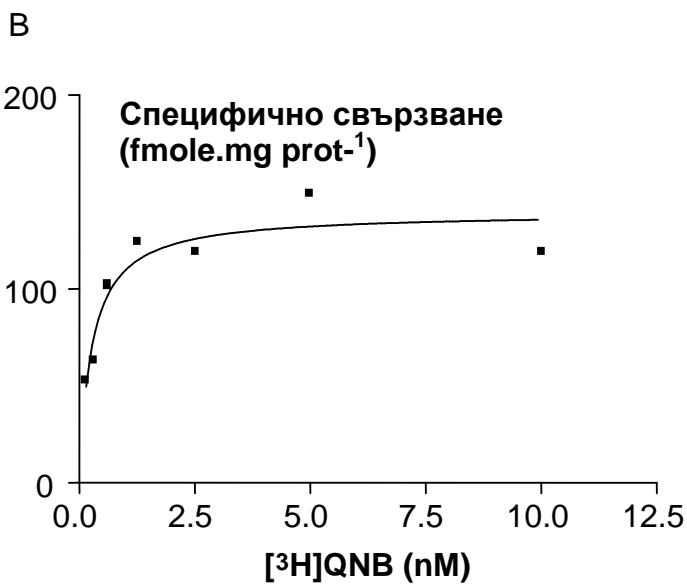
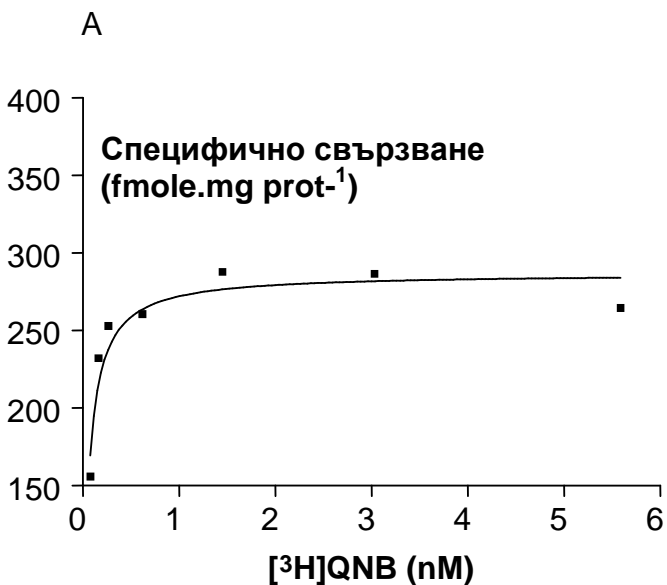


Таблица 1: резултати на осемте (по четири) сатурационни експерименти на уротел и детрузор.

	уротел		детрузор	
Експерименти	Bmax	KD (nM)	Bmax	KD (nM)
1	286.9± 8.18	0.054±0.01	112.4±10.8	1.18± 0.35
2	468.0±41.46	0.03±0.02	407.8±18.9	0.34±0.07
3	270.57±24.4	0.058±0.03	84.8 ±10.4	0.052±0.25
4	328.4±35.28	0.092 ±0.05	139.4±8.9	0.27 ±0.08
Средно	338.46± 22.43	0.05±0.0	186.1± 37.36	0.57±0.1

1.2 Конкурентни свързване (*competition binding*):

Всички конкурентни криви за 4-DAMP (n=7) паснаха на двата рецепторни модела: one site and two site binding model. От седемте експеримента с този антагонист, два от случаите паснаха с two site binding model сигнификантно в сравнение с one site binding model. Р стойностите на седемте експеримента са дадени на таблица 2.

Всеки от петте антагонисти (atropine, pirenzepine, methoctramine, 4-DAMP и oxybutynin) се конкурират срещу

[³H]QNB за свързване с рецепторната популация. Atropine, pirenzepine, methocramine и oxybutynine пасваха само с едно-рецепторен модел (one site binding model, фигура 6), а всички имаха средни стойности на Hill slopes близо до единица (таблица 3)

*Таблица 2: P стойности за сигнификантност, получени след F-test , които анализират най-доброто пасване на one site и two site binding model. * = сигнификантни стойности P<0.05, затова тук в два експеримента two site binding model пасва най-добре.*

Експеримент	1	2	3	4	5	6	7
4-DAMP	0.002*	0.045*	0.29	0.66	1.0	0.23	0.18

Средно Hill slope и pK_i стойностите за петте антагонисти и процент на местата с висок афинитет за рецепторните популации са дадени на таблица 3.

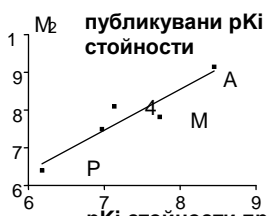
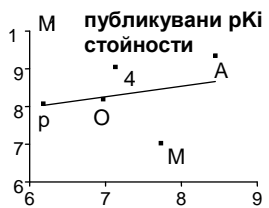
Таблица 3: Средни стойности на Hill slope и pKi стойности за петте антагонисти и процент от местата, където антагонистите показват по-висок афинитет. Стойностите са калкулирани от индивидуални криви за всеки антагонист.

Антагонисти	Hill slope	pKi (високо)	pKi (ниско)	намерени рецептори с висок афинитет (%)
Atropine (n = 4)	1.79± 0.45	-	8.45± 0.33	-
Pirenzepine (n = 4)	1.0±0.21	-	6.18±0.05	-
Methoctramine (n= 5)	1.19±0.45	-	7.73±0.14	-
Oxybutynin (n = 4)	1.29±0.14	-	6.97±0.04	-
4-DAMP (n = 7)	0.99±0.11	10.2 ±0.19	7.13 ± 0.0	< 20 (n = 2)

1.3 Корелационни криви:

За идентифициране на мускариновите рецептори бе построена графика с предварително детерминирани pKi стойности (таблица 5) за съответните антагонисти при клонирани човешки мускаринови рецептори срещу получените стойности на pKi при експерименти. Данните от анализа на корелационните криви (slope, X-intercept- пресечена точка и r^2) са изнесени в таблица 4. Наклонът (Slope-ът) и r^2

стойностите клонящи към единица с X-пресечена точка (X intercept) клонящи към нула е индикатор за добра корелация между експерименталните и предварително публикуваните r^2 стойности. Най-голямата корелация ($r^2 = 0.87$) бе с M_2 популации. Наклонът (Slope-ът) за тази графика е единица (1.0 ± 0.23). Графиката, показваща най-малка корелация, е за M_1 популация ($r^2 = 0.07$).



rKi стойности при уротела на прасета **rKi стойности при уротела на прасета**



- P = Pirenzepine
- A = Atropine
- M = Methoctramine
- 4 = 4- DAMP
- O = Oxybutynin

Фигура 2: Корелационни графики на основните мускаринови популации в пикочния мехур на прасета . Графиките се получават чрез съпоставяне на rKi стойностите от радиолигандното свързване на уротела на прасета и rKi стойностите, получени при клонирани човешки мускаринови рецептори от M₁ – M₅.

Таблица 4: Стойности, получени при корелационен анализ след конкурентно свързване.

	Slope	X-intercept	r ² стойности
Major population:			
M ₁	0.28 ± 0.60	22.35	0.07
M ₂	1.00 ± 0.23	0.179	0.87
M ₃	0.18 ± 0.69	-5.40	0.15
M ₄	0.39 ± 0.30	-5.20	0.40
M ₅	0.43 ± 0.55	-2.86	0.30

Таблица 5: Стойности на афинитети на антагонистите към мускаринови рецепторни субтипове. Стойностите са резултат от многобройни изследвания цитирани в литературата (Caulfield and Birdsall, 1998^a; Eglen et al, 1996^b; Eglen and Nahorski, 2000^c; and Lazareno et al, 1990^d).

	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
Atropine ^a	9.35	9.15	9.35	9.35	9.30
Pirenzepine ^{a,b}	8.08	6.40	6.85	7.30	6.78
Methoctramine ^{a,b}	7.03	7.82	6.35	7.33	6.73
Tropicamide ^d	-	-	-	8.00	-
4-DAMP ^{a,b}	9.05	8.10	9.20	8.65	8.93
Oxybutynin ^c	8.20	7.50	8.30	8.10	7.70

2. Кумулираща концентрационни криви:

2.1 Контракция на детрузора с и без лигавица след третиране със Carbachol

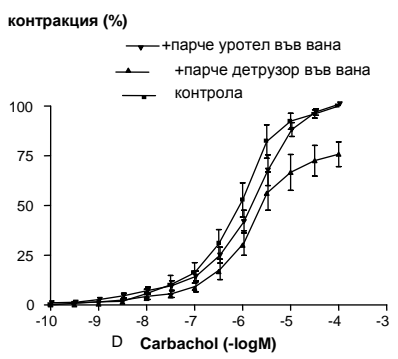
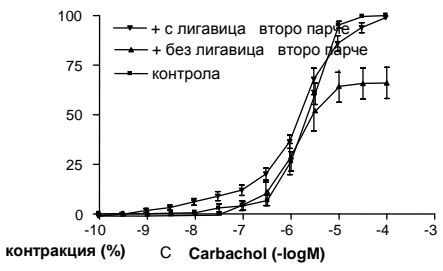
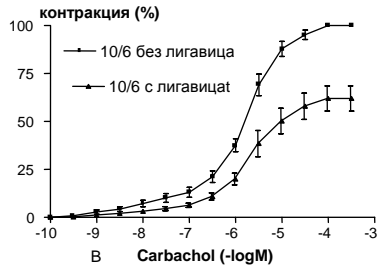
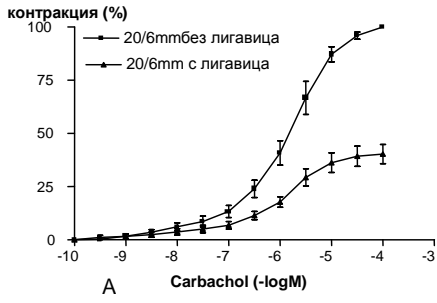
Максималният контрактилен отговор към Carbachol на изолиран детрузор с уротел при големина 20/6 мм, беше $40.3 \pm 4.4\%$ ($n = 12$) ($p > 0.05$) от максималната контракция (100%) на парчета без лигавица (фигура 8-А). Наличието на лигавицата също доведе до увеличение на pEC_{50} от 5.77 ± 0.04 to $5.86 \pm .06$ (таблица 6), но бе статистически несигнификантно съответно показва, че същата концентрация на агонист е необходима за постигане на максимална контракция при ивици с тъкани с и без лигавица. ($p > 0.05$). В други серии от експерименти (размери 10/6 mm) максималния отговор бе $61.9 \pm 6.5 \%$ ($n = 14$) за парчета с наличие на лигавицата от контрола, pEC е 5.6 ± 0.03 и 5.8 ± 0.04 (EC_{50} 1.6 μ M (1.32 –1.37) до 2.24 μ M (1.87-2.67)-респективно за без и с лигавица (фигура 8-В). Независимо от големината на парчетата и площта им, максималните контракции, предизвикани от мускариновия агонист бяха почти еднакви. В двете групи контракциите, предизвикани от Carbachol бяха намалели сигнификантно, поради наличието на лигавица доказвайки инхибиращо й влияние. Подобно на пикочните мехури на прасетата, наличието на лигавица значително инхибира контракцията на детрузора на човешки пикочен мехур. Максималната контракция, която се получи при

парчета с лигавица е 56.6 ± 11.4 % в сравнение с контракцията на тъканите без лигавица (фигура 8).

2.2 Съвместно инкубиране на детрузорната тъкан с или без лигавица :

Максималният контрактилен отговор се редуцира до $66.0 \pm 7.9\%$ ($n=9$) в сравнение с контрола, поради присъствието на второ парче с лигавица в непосредствена близост ($p < 0.05$) без да бъде свързан с трансдусер. Присъствието на такова парче без лигавица в непосредствена близост в контролната група нямаше съществено влияние върху контрактилитета на първото парче детрузор, което още веднъж доказва инхибиторното влияние иминно на уротела (Фигура 8-C). pEC_{50} 5.64 ± 0.02 и 5.92 ± 0.02 което показва сигнификантно намаляване на чувствителността в присъствието на парче с лигавица близо до детрузора (Таблица 6).

В друга серия от експерименти беше поставено парче от тъкан с и без лигавица да виси във ваната. Така тъканите са далече от контрахиращи парчета но в една и съща среда (във ваната). Те биха повлияли само по дифузен механизъм отделяйки трансмитери във ваната. Въпреки отдачечността, само поради присъствието на парчето с лигавицата във ваната, контракцията на детрузора намаля до 75.7 ± 6.2 % ($n=9$, $p < 0.05$ фигура 8-D) в сравнение с контролата при което допълнителната тъкан във ваната бе без лигавица.



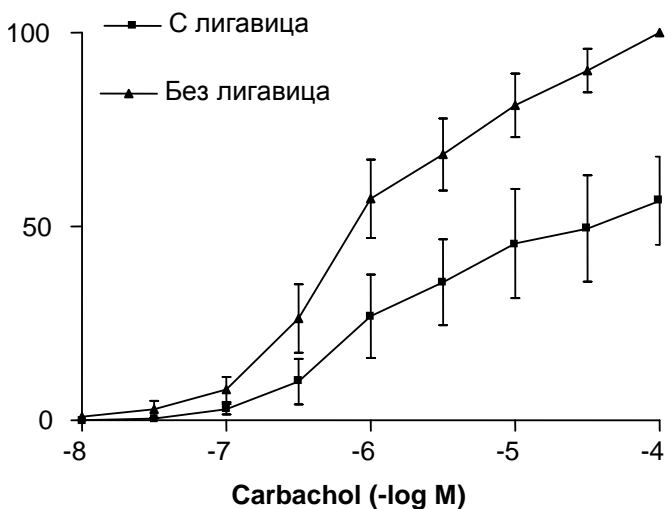
Фигура 3: Графики, показващи отговор на пикочния мехур на прасета при стимулация с carbachol с и без лигавица: А-20/8 мм ивици, В-10/8мм ивици, С- при наличието на ивица с и без лигавица в непосредствена близост и D-при наличие на ивицас и без лигавица потопена във органна вана.

Таблица 6: pEC_{50} стойности и % от максималния отговор в различни експерименти $p < 0.01$ (сигнификантни) на всички експерименти. pEC_{50} (логаритъм стойност на EC_{50}) за човешкия мхур не се изчислява поради малък брой експерименти. При KCl и ATP също не се изчисляват pEC_{50} , защото не са кумуляционни криви

	N	с лигави ца pEC_{50}	без лигавица pEC_{50}	отговор на тъкан с лигавица спрямо без лигавица В %
20/6mm (120sq.mm ²)				
10/6mm (60sq. mm ²)	12	5.77±0.06	5.86 ± 0.06	61.9 ± 6.5
10/6мм	14	5,60± 0.03	5.80 ± 0.04	40.3 ± 4.5
Човешки пикочен мехур	6			56.6 ± 11.4

Контракция с КСІ	23			30.27 ± 3.38
контракция с АТР	10			48.5 ± 4.08
Ко-инкубация в непосредствена близост	9	5.64 ± 0.02	5.92 ± 0.02	66.2 ± 7.9
ко-инкубация във ваната	8	5.73 ± 0.53	6.10 ± 0.47	75.7 ± 6.2

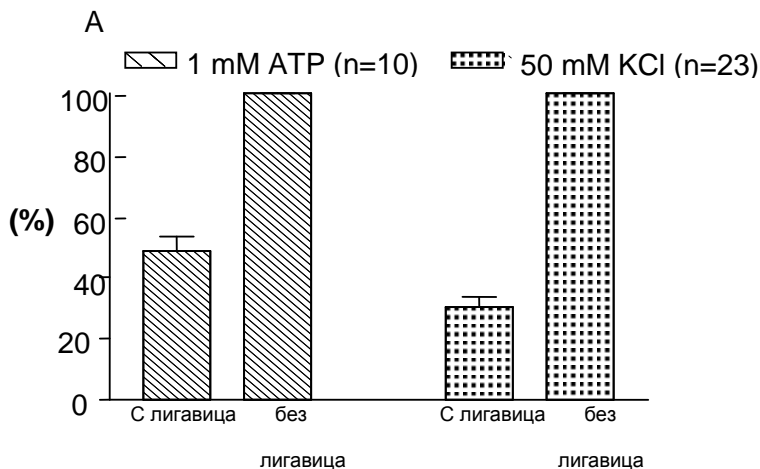
Фигура 4 : Графика, изразяваща отговор на човешкия детрузор при стимулация с carbachol с и без лигавица.



Пикочен мехур на човека

2.3 Контрактилен отговор спрямо KCl и ATP:

Детрузорните мускулни влакна бяха контрахирани с и без лигавица с помощта на KCl (50 mM). Подобно на опитите с карбахол, наличието на лигавицата успя да инхибира контракцията му с около 70% и резултата бе 30.27 ± 3.38 % от максималната контракция при парчета без лигавици. По същия начин, когато двете групи тъкани с и без лигавица бяха контрахирани с ATP (1mM), наличието на лигавица инхибира контракцията на повече от половината. Стойностите бяха 48.5 ± 4.08 % в сравнение с парчетата без лигавица (фигура 9, таблица 10)



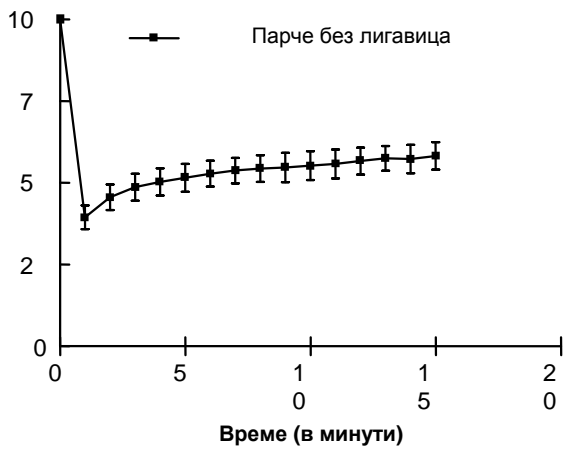
Ефекти на KCl и ATP върху детрузора

фигура 5: Графика, показваща контракцията на детрузора предизвикана от KCl и ATP при наличието на лигавица и без лигавица. $P < 0.01$ за двете вещества.

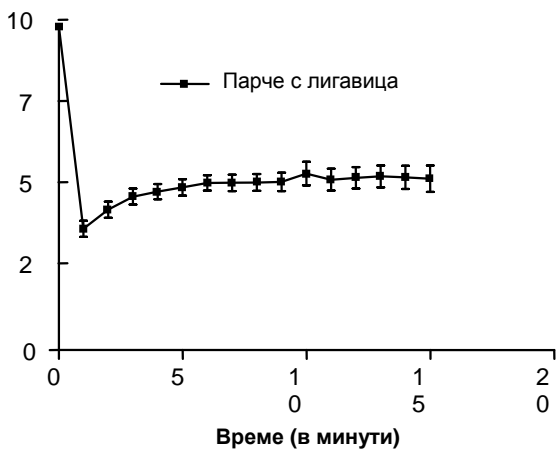
Тъканите се релаксираха бързо с около 50% в началото в 1-вата и 2-рата минута при двете групи с и без лигавица. След това те постепенно се релаксираха към базовата стойност. Този експеримент недвусмислено ни показва, че разтягането на детрузорната мускулатура не води до отделянето на инхибиращ фактор от лигавицата на пикочния мехур. На първо място, защото всички експерименти бяха направени със същото базово напрежение от 1.0 ± 0.1 г., и второ, нямаше никакви разлики между двете групи в релаксацията след внезапната им контракция (таб. 7, фиг. 10 и 11).

Таблица 7: Релаксационен отговор след внезапно разтягане на тъкан .

	релаксация	
	Без лигавица %	С лигавица %
1	39.4	37.5
2	45.6	43.5
3	48.6	47.5
15	58.2	53.0



Фиг.6



Фиг.7

Фиг. 6 и 7: графики показващи релаксационен отговор при внезапно разтягане на детрузорния мускул

2.5 Релаксационни криви на ензимните инхибитори върху детрузора:

Релаксационния ефект на ензимните инхибитори-Paraverine, IBMX, TPCK и Rolipram, върху преконтрахирани с KCl (50mM) детрузорния мускул без лигавица, показва, че те релаксират този мускул. Следователно тези ензимни инхибитори се намесват в цикличната нуклеотидна система и действат релаксиращо върху детрузора. EC_{50} стойности на Parverine и IBMX бяха съответно 53,4 μ M (40,9-69,6 μ M) и 55,9 μ M (47,8-65,4 μ M) (таблица 8) EC_{50} за TPCK и Rolipram бяха недоловими и са повече от 200 μ M.

Таблица 8: релаксационен ефект на Paraverine, IBMX, TPCK, и Rolipram към прекоontraхиранни тъкани от KCL 50 mM.

(* релаксационен отговор изразен като % от максимална

вещество	N	без лигавица	
		pEC ₅₀	релаксационен отговор %*
Parverine	4	4.27 ± 0.3	66.1 ± 4.7
IBMX	4	4.25 ± 0.21	69.4 ± 1.3
Rolipram	4	†N/d	28.8 ± 8.3
TPCK	6	† N/d	34.2 ± 5.1

контракция, †pEc50 стойности не могат да се определят, защото са много ниски.

2.6 Ефекти на ензимните инхибитори върху концентрационната крива, построена след въздействието на Carbachol

Всички ензимни инхибитори Paraverine, IBMX, TPCK, Rolipram и 2'5'DD-ado сигнификантно инхибираха контракцията, предизвикана от Carbachol в двете групи – с лигавица и без лигавица. Но не успяха да променят инхибиращата способност на ИФОУ, защото в групата на тъкани с и без лигавица, които бяха инкубирани предварително с ензимни инхибитори, наличието на лигавицата намали контракцията на детрузора спрямо ивица без лигавица, както това се случва и при контролната група с разликата, че максималните контракции бяха значително намалени в групата на ензимните инхибитори спрямо контроли. Промяната в стойностите на EC_{50} и pEC_{50} на Carbachol под въздействието на всички използвани медикаменти са показани на таблица 9. Всички експерименти явно показват увеличение на EC_{50} стойностите на Карбахол, поради присъствието на ензимни инхибитори, премествайки кривата в дясно.

След като бяха инхибирани с ензимен инхибитор Paraverine 100 μ M, максималната контракция бе $44.7 \pm 6.8\%$ при тъканите без лигавица и $32.3 \pm 8.4\%$ при тъканите с лигавица спрямо контроли (фигура 12-А). Въпреки всичко, разликата в контракцията остана сигнификантна между тъканите с и без лигавица третирани с Paraverine (таблица 9). Почти идентични резултати се получиха и при експерименти с ензимен

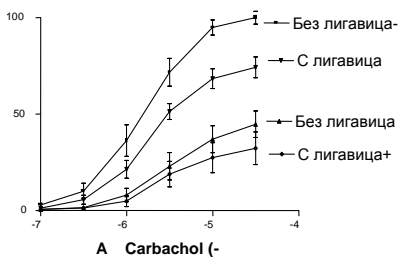
инхибитор IBMX, TPCK и 2'5' DD- ado (фигура 12-В,С и D, таблица 9)

Таблица 9: Ефекти на ензимните инхибитори върху контракцията, предизвикана от Carbachol. Процент от максимална контракция предизвикана от тъкан без лигавица, след инкубация в различни ензимни инхибитори.

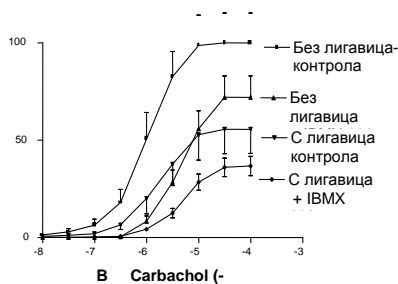
		без лигавица		с лигавица	
		контрола: ивица без лигавица и без инхибитори	след инкубация с инхибитор без лигавица	контрола с лигавица без инхибитори	след инкубация с инхибитор с лигавица
Papaverine	6	100 %	44.7±6.8%	74.23±5.3%	32.3 ±8.4%
IBMX	6	100 %	72.02±11.4%	55.6±12.5%	36.6 ±5.0%
TPCK	5	100 %	70.18±12.3 %	49.65± 9.7%	28.01± 6.8%
2'5'DDado	4	100 %	64.23±15.6%	47.0± 8.7%	34.2± 5.9%

Фигура 8: графики показващи контракции предизвикана от тъкан от пикочния мехур с и без лигавица, след инкубация с различни ензимни инхибитори. А- след инкубация с Papaverine, В- след инкубация с IBMX, С- след инкубация с TPCK и D- след инкубация с 2'5'DD-ado.

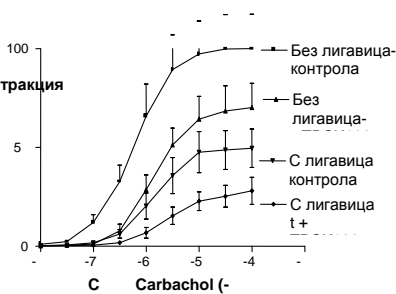
Контракция



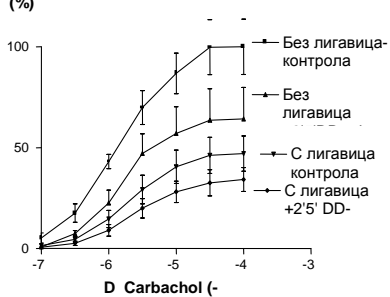
Контракция



Контракция (%)



Контракция (%)



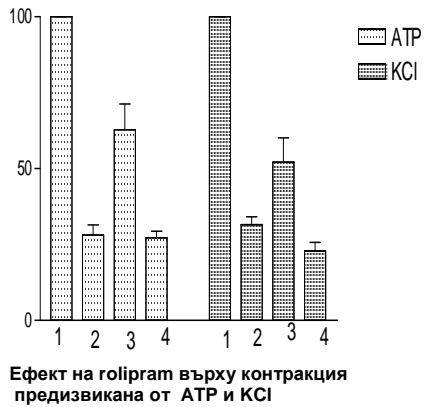
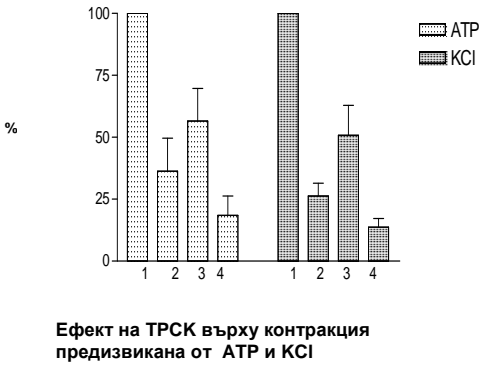
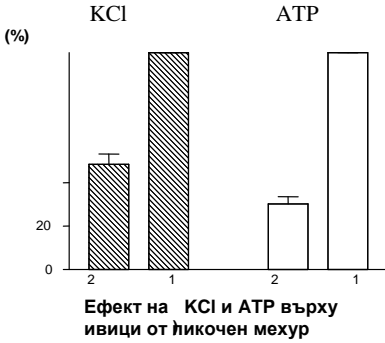
2.6 Ефекти на ензимните инхибитори върху контракции, предизвикани от KCl и АТР:

Подобно на инхибирането на контракцията предизвикана от Карбахол, всички тези ензимни инхибитори подтиснаха контракциите, предизвикани от KCl и АТР в сравнение с контролите. При наличие на лигавица обаче още повече се инхибира контракцията, предизвикана от тези два медикамента (фиг.13). Контракцията, предизвикана от KCl намаля до $48.5 \pm 4.8\%$, а от АТР до 30.27 ± 3.3 (таб.10), при наличието на лигавицата в сравнение с контроли. След инкубация с Papaverine максималната контракция предизвикана от KCl при тъкан без лигавица бе 41.8 ± 12.3 и с лигавица бе 12.3 ± 3.5 % от максималната контракция получена при контролни тъкани без лигавица и без инкубация с Papaverine взета като 100%. При контракция с АТР съответно 41.7 ± 11.9 и $15.11 \pm 5.1\%$, за без и с лигавица след инкубация с Papaverine . В групата на TPCK и rolipram резултатите бяха подобни (таблица 10). След инкубация с TPCK, контракцията предизвикана от KCl с лигавица бе само $18.4 \pm 7.7\%$, докато без лигавица бе $51.5 \pm 13.2\%$. При АТР $50.8 \pm 12.0\%$ и $13.7 \pm 3.5\%$ съответно при тъканите без и с лигавица след инкубация с TPCK. След инкубация с rolipram, KCl успя да контрахира тъканите без лигавица до $52.1 \pm 7.9\%$, а при наличието на лигавица, отделянето на ИФОУ инхибира контракцията до $22.9 \pm 2.7\%$. Подобна инхибиция се получи и при контракция с АТР при парчета с лигавица след инкубация с rolipram съответно 27.2 ± 2.1 и без лигавица 62.8 ± 8.4 грама (таблица 10, фигура 13).

Таблица 10: Ефекти на ензимните инхибитори върху контракцията, предизвикана от KCl и АТФ изразени като процент от максимална контракция предизвикана от тъкан без лигавица и без инкубация. .

		N	KCl 50 mM (n-23)		АТФ 1mM (n-10)	
			Без лигавица	С лигавица	Без лигавица	С лигавица
Контроли			100 %	48.5 ± 4.8 %	100 %	30.27 ± 3.3%
			Контроли		След инкубация	
	доза μM	6	Без лигавица %	С лигавица %	Без лигавица %	С лигавица %
Papaverine	100	АТФ	100	36.5± 8.5	41.7 ± 11.9	15.11 ± 5.2
		KCl	100	34.3 ±6.2	41.8 ± 12.3	12.3 ±3.5
TPCK	100	АТФ	100	26.3 ± 5.1	50.8 ± 12.0	13.7 ± 3.5
		KCl	100	36.3 ±13.3	56.5±13.2	18.5± 7
Rolipram	1	АТФ	100	28.1± 3.3	62.0 ±8.4	27.3 ±2.1
		KCl	100	31.5±2.6	52.1 ± 7.9	22.9 ± 2.7

Фигура 9: графики показващи контракции предизвикана от ATP и KCl върху тъкан от пикочния мехур с и без лигавица и след инкубация с различни



ензимни инхибитори. 1- контрола без лигавица 2- контрола с лигавица, 3- след инкубация без лигавица, 4- след инкубация с лигавица

1. Обсъждане :

1.1 Какви мускаринови рецепторни субтипове има в уротела?

Радиолигандното свързване на [³H]QNB в уротела и в детрузора бяха наситени и заместваеми с атропин, което доказва наличието на популация от мускаринови рецептори в двата типа тъкани. Плътността на мускариновите рецепторите в уротела се оказа по-голяма от тази на детрузора. Стойностите на B_{max} и K_D на детрузора, бяха установени в тези експерименти при прасета съответно 125 ± 19 fmoles mg prot.-1 и 0.47 ± 0.11 а в уротела 338.4 ± 22.4 и 0.05 ± 0.1 fmoles mg prot.-1. Подобни резултати бяха съобщени по-рано от Goepel M *et al* (1998). Плътността на мускариновите рецептори в уротела, която намерихме е доста по-различна от съобщено по-рано от Hawthorne *et al* (2000) 127.8 ± 7.7 fmole.mg protein⁻¹. Но, както в неговите съобщения уротелът има сигнификантно по-висока плътност– около 40% в сравнение с детрузора.

Един от основните проблеми при охарактеризирането на мускариновите рецепторни субтипове е липсата на селективни антагонисти. Мускариновите антагонисти са категоризирани като «селективни» и «неселективни». Pirenzepine, се смята за M₁ селективен рецептор. На практика обаче е само 2.5 пъти по-селективен за M₁ в сравнение с M₄ рецепторни субтипове (Moriya *et al*, 1999). За да се охарактеризира популацията от мускариновите рецептори в една тъкан се нуждаем от различни антагонисти, които да имат

различни pK_i стойности за всеки рецепторен субтип, за да бъдат експерименталните резултати достоверни.

Първият антагонист използван от нас е pirenzepine (M_1 селективен). На базата на наблюденията на Ruggieri *et al.* (1990) и хипотезата, че ако има M_1 рецептори в дадена тъкан, тогава ще има висок афинитет на pirenzepine. pK_i -стойността на pirenzepine, калкулирано в нашите експерименти бе 6.18, което не съвпада с очакваните граници между 7.8 – 8.5 за клонираните M_1 рецептори (Caulfield and Birdsall, 1998). Това елиминира наличието на M_1 субтипове в уротела.

Следващият антагонист methoctramine - M_2 'селективен' (Melchiorre *et al.*, 1987, Lazareno *et al.*, 1989) е използван с хипотезата, че ако има само M_1 субтипове в тъканта, тогава към methoctramine ще има нисък афинитет. Относително високия афинитет (7.73) на methoctramine доказва наличието на популация от M_2 субтипове на мускариновите рецептори.

Таблица 11: Сравнение на профил на афинитет на антагонисти към клонирани антитела по Dörje (1991). M – определени фармаколично, m – определени молекулярно с антитела.

Pirenzepine	$M_1 > M_3 \geq M_2$	$m1 \geq m4 \geq m5 \geq m3 \geq m2$
Methoctramine	$M_2 > M_1 > M_3$	$m2 \geq m4 \geq m1 \geq m5 \geq m3$
4-Damp	$M_1 \geq M_3 > M_2$	$m3 \approx m1 \geq m5 \approx m4 > m2$

4-DAMP, който има относително висок афинитет за M_1 и M_3 , но с нисък афинитет към M_2 субтипове. Този антагонист е

използван за откриване на наличието на M_3 субтипове (Brown *et al*, 1986). Данните от 4-DAMP в нашите експерименти показват наличието на две популации на мускаринови субтипове в уротела: места на високия афинитет със стойност 10.25 и места с нисък афинитет със стойност 7.13. Делът на местата с високия афинитет е < 20% и е незначителен.

Както знаем, 4-DAMP има висок афинитет за M_1 и M_3 субтипове и наличието на рецептори с висок афинитет доказва присъствието на M_1 и M_3 мускаринови рецепторни субтипове. Съответно 4-DAMP има нисък афинитет за M_2 и M_4 рецептори и намирането на рецепторните места с нисък афинитет означава наличието на M_2 .

Идентификацията на местата с нисък афинитет е по-комплицирана. След изключването на наличието на M_1 рецептори, използвайки pirenzepine, стигаме до извода, че има наличие на M_3 и/или M_5 рецептори. Високия афинитет на methoctramine означава наличието на M_2 рецептори, след като данните за methoctramine подсказват наличието на M_2 популация въпреки, че афинитетът на methoctramine за M_1 , M_2 и M_4 рецепторите варира и стойностите се припокриват (Caulfield and Birdsall, 1998; Eglon *et al*, 1996).

Получените до сега стойности на антагонистите показва 100% M_2 популация на рецепторите. Само в два експеримента на 4-DAMP (n=7) имаше фракция от M_3 рецептори. Болшинството от антагонистите имат сходни афинитети за M_3 и M_5 рецептори. Но, Oxubutynin има относително висок афинитет за M_3 (и M_1) и относително нисък афинитет към M_5 (и M_2) рецептори. Така oxubutynin се използва за откриването на разликата между M_3

и M_5 рецепторните популации. Oxubutynin показва места с нисък афинитет и с pK_i стойности 6.97, което показва наличието на M_5 или M_2 рецептори. Като се има предвид, че сме изключили наличието на M_1 рецептори, присъствието на места с нисък афинитет при този антагонист подсказва за наличието на M_2 рецептори. Относително високи стойности на pK_i на methoctramin, който е M_2 специфичен антагонист още веднъж потвърждава наличието на M_2 рецепторни субтипове.

4-DAMP има близки афинитети за M_3 и M_1 рецептори (съответно висок и нисък) като oxubutynin, но има определено висок афинитет за M_3 рецептори. Популация с висок афинитет по-малко от 20% в два от седемте експеримента на 4-DAMP дава основание да потвърдим, че уротела притежава малка популация от M_3 рецептори. Така всички данни доказват наличието на около 80% M_2 рецептори. За сравнение детрузорната мускулатура на човека има 70% M_2 и 30% M_3 рецептори.

Корелационните криви допълнително помагат за интерпретация на експерименталните резултати. Афинитета на основната популация корелира относително добре за M_2 рецептори ($r^2 = 0.87$ близо до единица). Hill Slope също е близо до единица и X- пресечена точка най близо до единица в сравнение с други рецепторни популации допълнително потвърждават за наличието на болшинство от M_2 рецепторни субтипове.

1. 2 Влияе ли уротела върху контракцията на детрузора ?

Досокоро уротела бе смятан за пасивна бариера без никаква специфична функция. Последните изследвания показват, че той играе особено важна роля в аферентния отговор при изпълване и разтягане на пикочния мехур.

В нашите експерименти инхибицията на детрузорната контракция бе индуцирана от присъствието на второ парче със запазен уротел. Наличието на второ парче без уротел бе причина да не се инхибира детрузорна контракция. Това доказва отделянето на инхибиращия фактор (инхибиращ фактор отделен от уротела- ИФОУ) от уротела , а не от детрузора. Това корелира с резултатите, получени от М.Нawthorn *et al* (2000).

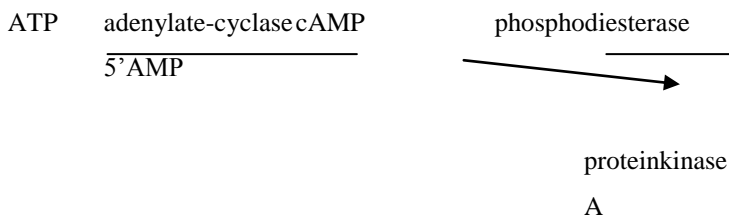
По-малките парчета тъкани, както и по-големите парчета, сигнификантно инхибираха максималния контрактилен отговор. Това показва че, обема и големината на повърхността на тъканите не играят съществена роля при отделянето на инхибиращия фактор. Контракциите бяха също така инхибирани сигнификантно от наличието на уротела, когато бяха контрахирани с KCl и АТР. Тези експерименти потвърждават отделянето на инхибиращия фактор от уротел, при стимулация с карбахол – мускаринов агонист. Подобно на пикочен мехур на прасета, човешкия пикочен мехур също показва, че наличието на уротела инхибира контракцията на детрузора.

Дисфункцията на уротелния механизъм е свързана с разстойството на функцията на пикочния мехур. Идентификацията на инхибиторен агент може да ни служи за познаване на евентуални нови рецептори, при което фармакологията би могла да се намеси за откриване на нови средства за лечение на хиперактивен мехур.

Азотния окис предизвиква релаксация чрез активиране на гуанилат циклаза, но изглежда, че той не се отделя от свински пикочен мехур. Това се доказва, чрез използването на инхибитор на синтеза на азотния окис L-NORG при което действително не се повлиява върху инхибиращото действие на уротела. Това потвърждава, че и азотния окис не е медиатор при отделянето на ИФОУ (M.Hawthorn *et al* 2000). Въпреки проучванията върху няколко от вероятните пътища за инхибиране, все още не е намерен инхибиращия фактор и механизма му на действие. Престой да бъде намерен този фактор и евентуалния месенджер на повлияване.

1.3 Нуклеотидната система играе ли роля при получаване на инхибиращ ефект от уротела?

cAMP е смятан за вторичен месенджер, участващи в регулацията на гладкомускулната контракция. Инхибиторите на ензима аденил циклаза блокират релаксацията на гладката мускулатура, а от друга страна инхибиторите на фосфодиестеразата потенцират релаксацията на гладката мускулатура (Truss *et al.* 1996).



Поради съществуването на неизвестен фактор, инхибиращ контракцията на детрузора при наличието на уротел, в нашите експеримирнти опитахме се да разберем дали цикличната нуклеотидна система е замесена като медиатор на този ефект, предизвикан от ИФОУ. При стимулацията на мускариновите рецептори *in vitro*, ние демонстрирахме чрез редица експерименти, че при блокирането на първата фаза на естествен целуларен отговор чрез действието на аденил циклазен инхибитор и блокирането на втората фаза, чрез фосфодиестеразните инхибитори не се променят инхибиращото действието на лигавицата.

Pinna et al (1992) съобщават, че инхибиращият фактор, зависим от NO (азотен окис) се отделя от уротела на хамстер и простагландините са замесени в този процес. Fovaeus et al. (1999) също достигнаха до извода, че фактор отделящ се от уротела влияе върху мускулатурата на аортата на мишката освободена от нейния ендотел, когато бива поставена близо до парче тъкан от пикочния мехур с лигавица и няма съществена разлика в тъканните концентрации на cAMP и cGMP в този експеримент и тези вторични месинджъри не посредничат инхибицията.

Papaverine като неспецифичен фосфодиестеразен инхибитор релаксира детрузорната мускулатура и неговият

EC₅₀ е повече от 50 милимоляр, което е подобно на резултатите получени от Truss et al.(1995), но не влияе върху инхибиторната роля на уротела при контракция на детрузора. Shimizu et al. (year)? демонстрираха в техните експерименти с пикочния мехур на морските свинчета, че количеството на cAMP се увеличава при действието на papaverine само при високата им концентрация (100mmol), но количеството на cGMP остава непроменено. В нашите експерименти също, само високата концентрация на papaverine (100 mmol), успя да релаксира детрузора. Контракцията на детрузора бе инхибирана сигнификантно при наличието на уротела. Това доказва отделянето на ИФОУ от лигавицата.

Papaverine, IBMX, TPCK, 2'5'DD-ado и Rolipram намесвайки се в нуклеотидната система в различните етапи на физиологичния клетъчен отговор успяха да инхибират контракцията на детрузора, предизвикана от мускариновата стимулация. Въпреки всичко, инкубирането на тъканите предварително с ензимните инхибитори не можа да повлияе по никакъв начин отделянето на ИФОУ от лигавицата на пикочния мехур със съответния му инхибиращ ефект.

В групата на Rolipram инхибицията на контракцията не бе сигнификантно във високите концентрации на Carbachol. Longhurst et al. (1997) стигнаха до извода ,че rolipram и forskolin потенцират карбахолен отговор във високите му концентрации при пикочния мехур на морските свинчета. (0,01 и 0,1м мол.) Те подсказаха ,че това би могло да е в резултат на стимулацията на двата основни рецептора (M₂ и M₃). Ниските концентрации на мускариновите агонисти

стимулират M_2 , а високите M_3 . Спирайки разпадането на базалните cAMP, Rolipram увеличава натрупването на cAMP и релаксира гладката мускулатура. С нарастването на концентрацията на Carbachol се стимулират M_3 рецептори и предизвиква PI хидролиза. Вероятно този ефект неутрализира инхибиращ ефект на лигавицата. В нашия опит не се получи потенциране на контракция при високи концентрации на Carbachol, което се обяснява с прекалено малката концентрация на ензимния инхибитор- Rolipram (1 μ m).

Наличието на уротела също така инхибира контрактилния отговор, получен от KCl и АТР съответно с 51% и 70% в сравнение с контролните групи. След като бяха инкубирани с различни ензимни инхибитори контрактилния отговор към двете вещества беше сигнификантно намален. И в тези експерименти наличието на уротела успя да инхибира контракциите в сравнение с детрузора без уротела след инкубация.

Блокирането на пътищата на азотния окис (NO), циклооксигеназната система, пуринергичните рецептори, бета адрено рецептори, K^+ помпа в клетките показва , че всички тези механизми нямат отношение към инхибиция на контракцията предизвикана от наличието на уротел (M.Hawthorn *et al* 2000).

2. Заключение:

В заключение можем да кажем, че уротелът на прасета притежава по-плътното разпределение на мускариновите рецептори от колкото детрузорната мускулатура. Тази

популация от мускариновите рецептори изглежда, че са M_2 субтипове и M_3 субтип в нищожни количества (< 20 %). До този извод се стигна чрез анализа на данните получени при конкурентното изместване на радиолигандното вещество $^3H[QNB]$ от редица мускариновите антагонисти - atropine, pirenzepine, methoctramine, 4-DAMP и oxybutynin. Тези анализи се правят, вземайки предвид относителните афинитети на антагонистите за петте рецепторни субтипове, формите на конкурентните криви и корелацията на афинитети с предварително публикувани стойности на клонирани човешки мускаринови рецептори.

Въпреки, че това изследване не дава достатъчна информация за функцията на намерените рецепторни субтипове, самото наличие на мускаринови рецептори може да играе важна роля в бъдеще, за разбиране на ролята на уротела за регулиране на детрузорния контрактилитет. Тези рецептори биха могли да бъдат използвани като бъдещи потенциални мишени за лечението на болестите на пикочния мехур като ХАМ, нестабилен мехур и неврогенен мехур.

Потвърждаваме отделянето на инхибиторен фактор от уротела и неговия дифузен характер и при човешки пикочен мехур. Детрузорната мускулатура е чувствителна на дифузно отделящия се инхибиторен фактор от уротела. Цикличния АМР не е медиатор на този отговор. Физиологичната значимост и условията, при които се отделя ИФОУ тепърва предстои да се установят. Химичната му структура в момента е неизвестна. Внезапното разтягане на мускулатурата не предизвиква отделянето на ИФОУ. Нуклеотидната система не играе ролята

на медиатор при отделянето на инхибиращия фактор отделен от уротел.

3. Изводи:

Резултати от настоящата работа позволяват да се приемат следните изводи.

1. Уротелът на прасетата съдържа M_2 мускаринови рецептори субтипове и не значително количество M_3 мускаринови рецептори, под 20%.
2. В уротела на прасетата се установява три пъти по-голяма плътност на мускариновите рецептори от колкото в детрузорната мускулатура
3. Лигавицата на пикочния мехур / уротел/ не само на прасета и човека *in vitro* отделя дифузно, неизвестен за сега фактор наречен “Инхибиращ Фактор Отделящ от Уротела”/ ИФОУ/, който инхибира контракцията на детрузора.
4. Този фактор се отделя при стимулация на детрузора с мускаринов агонист (Carbachol), Калиев Хлорид (KCl) както и Аденозин Три Фосфат(АТР)
5. сАМР не медира инхибиращия ефект на фактора отделен от уротела на прасетата при стимулация с мускаринови агонисти.
6. Нуклеотидната система като системата на клетъчния отговор на повечето клетки в организма не е замесена в отделянето на ИФОУ.

4. Приноси:

1. За първи път са идентифицирани субтипозите на мускариновите рецептори в лигавицата на пикочния мехур при прасетата, които биха могли да бъдат следваща мишена за повлияване при различни заболявания на пикочен мехур.
2. Доказа се, че и при човешки пикочен мехур *in vitro* лигавицата отделя инхибиращ фактор, потискащ контракцията на детрузора при стимулация с мускаринов агонист,
3. Ензимни инхибитори на аденоцикларната система са проучени за да се установи дали тази система е замесена в отделянето на инхибиращия фактор от лигавицата на пикочния мехур, който потиска контракцията на детрузорната мускулатура.
4. Още веднъж е доказано *in vitro* че, при прасетата наличието на лигавицата на пикочния мехур води до потискане на контракцията на детрузора.

Публикации свързани с десертационния труд:

1. Chess-Williams R, **Manandhar A**, Scott RL, Chapple CR – Which muscarinic receptors predominates in the urothelium? Part I – Fundamental and Clinical Pharmacology, vol. 18, supp. 1, pp 1.164 2004, p 03.15. Impact factor 1.17
2. **Manandhar A**, Chapple CR, Chess-Williams R-The role of Urothelium-Derived inhibitory factor(s) on pig detrusor contractility. The Journal of Society of Surgeons of Nepal, vol. 7, No. 1, April 2004, pp- 10-15.
3. **Манандхар Амар**, Чапъл Христов, Чес Уилиамс Ръсел. Ролята на сАМР система като медиатор на инхибиращ фактор отделен от уротела (ИФОУ) върху детрузорния контрактилитет. Българска урология, нефрология и трансплантология (Уронет). 2004, Том 1, брой 3, 26 – 32.
4. **Манандхар Амар**, Чапъл Христов, Чес Уилиамс Ръсел. Влиянието на уротела върху детрузорния контрактилитет *in vitro*. Българска урология, нефрология и трансплантология (Уронет). 2005, Том 1, брой 1, 8– 14.
5. Scott R., **Manandhar A.**, Chess Williams R., Chapple C - Which muscarinic receptor subtype predominates in the urothelium? (part II) – European Urology supplements, 2005,vol. 4, no. 3, abstract no. 223. impact factor 3.54.

Общ импакт фактор - 4.71

Презентациите свързани с десертационния труд:

1. **Manandhar A.K.**, Chapple C.R., Chess-Williams R: The role of the urothelium in bladder contractility (part I). XVIth European Association of urology (EAU) congress, Geneva April 7-10,2001.
2. **Manandhar A.K.**, Chapple C.R., Chess-Williams R: The role of the urothelium in bladder contractility (part II). XVIIth European Association of urology (EAU) congress, 23 -26 February 2002, Birmingham, UK.
3. **Manandhar A.K.** : The role of the Urothelium derived inhibitory factor on bladder contractility: ESU course in Urology at 3rd Balkan Congress of Urology, 26 Sept. 2002, Varna, Bulgaria
4. **Manandhar A.K.**, Chapple C.R., Chess-Williams R – Лигавица на пикочния мехур- нови мишени за лечение? – XIIти Варненски Урологични дни. Симпозиум по Урология, 16–18 Септември 2004.

Благодарности

Искам да благодаря най напред на Assoc. Prof. Tomonori Yamanishi от Dokkyo University, Япония, който ме научи на сложните процедури на експерименталната урология. Благодаря на Prof. Chris Chapple Hallamshire Hospital, Sheffield, UK за умелото ръководене на темата и важни идеи за осъществяване на целта. Dr. Russell Chess- Williams от Bond University, Queensland, Australia за интерпретация на много комплексни експериментални резултати и за отговор на моите тривиални въпроси.

Голяма благодарност към доц. Мария Желязкова- Савова, ръководител на Катедра по Фармакология, МУ –Варна за подробна редакция на работата ми и съвети. На края но не на последно място искам да благодаря на доц. Петкова за нейната подкрепа и безценни съвети за подготвянето на тази дисертация. Финансовата подкрепа е получена от European Urological Scholarship Programme (EUSP) във вид на стипендия за една година за работа в Urology Research, Royal Hallamshire Hospital Sheffield UK.