

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

*Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису*

УДК 577.35:576.33

Шаропов Біжан Рашидович

**ЕКСПРЕСІЯ ТА ФУНКЦІЯ КАПСАЇЦИНОВОГО РЕЦЕПТОРА TRPV1
У СЕЧОВОМУ МІХУРІ ЩУРА В НОРМІ ТА ПРИ ПАТОЛОГІЇ**

Спеціальність 03.00.02 – Біофізика

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело Шаропов Б.Р. _____

Науковий керівник:
д.б.н., проф., член-кор.
Я.М. Шуба

Київ – 2019

АНОТАЦІЯ

Шаропов Б.Р. Експресія та функція капсаїцинового рецептора TRPV1 у сечовому міхурі щура в нормі та при патології. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

У дисертаційній роботі представлено нові дані щодо функціонування іонного каналу *Transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV1) у тканинах сечового міхура. Цей канално-рецепторний мембранний білок, класично відомий як рецептор капсаїцину (КАПС) і термосенсор у периферичних ноцицепторах ссавців, у останнє десятиріччя привертає все більшу увагу як фізіологічно значущий полімодальний сенсор багатьох фізико-хімічних стимулів – пекучих температур ($>42^{\circ}\text{C}$), кислого рН, механічного напруження та низки ендогенних лігандів ліпідної природи, а також оксиду азоту (NO). В даній роботі вперше продемонстровано, що TRPV1 функціонально присутній в гладеньком'язових клітинах (ГМК) детрузора сечового міхура щура. Виявлено, що КАПС викликає збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) у 42% ізольованих ГМК, причому просторовий характер розповсюдження кальцієвого сигналу вказує на локалізацію TRPV1 у мембрані внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо (саркоплазматичному ретикулумі). Цей висновок підтверджується результатами електрофізіологічних вимірювань, за якими КАПС був не здатний викликати канонічний, TRPV1-опосередкований мембранний струм (I_{TRPV1}), а також даними флуоресцентної імуноцитохімії із використанням анти-TRPV1 антитіл. Прикладання селективних антагоністів TRPV1 – капсазепіну або ВСТС – до смужок гладеньких м'язів детрузора (ГМД) блокувало 20-40% скорочення, викликаного холіноміметиком карбахоліном, свідчаючи про участь TRPV1 у сигнальному каскаді холінергічного скорочення ГМД. Нами також вперше показано, що у сенсорних нейронах донори оксиду азоту можуть активувати макроскопічний I_{TRPV1} тільки за наявності сульфгідрил-вмісних реагентів

(напр. L-цистеїну), які пришвидшують вивільнення NO з молекул-донорів. При моделюванні діабету у щурів з допомогою стрептозотоцину вдалося встановити збільшення функціональної експресії TRPV1 в аферентних нейронах з одночасним послабленням локальних ефектів, пов'язаних з його активацією, на скоротливість ГМД. Це вказує, з одного боку, на посилення TRPV1-залежної аферентної ділянки рефлекторної дуги сечовиділення при діабеті, а з другого – на порушення відповідного пептидергічного сигналювання у стінці органа.

Ключові слова: TRPV1, сечовий міхур, детрузор, гладеньком'язова клітина, оксид азоту, діабетична дисфункція сечового міхура.

ABSTRACT

Sharopov B.R. Expression and function of the capsaicin receptor TRPV1 in the rat urinary bladder in the normal and pathological conditions. – Manuscript.

This dissertation provides the new data on the functioning of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel in the urinary bladder tissues. This channel-receptor membrane protein, classically known as capsaicin (CAPS) receptor and thermosensor in peripheral nociceptors of mammals, in the last decade has been attracting the increasing attention as a physiologically significant polymodal sensor of many physicochemical stimuli, i.e., burning temperatures ($> 42^{\circ} \text{C}$), sour pH, mechanical stress, and a number of endogenous ligands including some signal lipids, spermine, oxytocin, and nitric oxide (NO). In this work, for the first time, it was demonstrated that TRPV1 is functionally present in the smooth muscle cells (SMCs) of the rat bladder detrusor. The application of CAPS increased the intracellular concentration of Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) ions in 42% of isolated SMCs, and the spatial distribution of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ indicates the localization of

TRPV1 in the membranes of intracellular Ca^{2+} store, the endoplasmic reticulum. This conclusion was confirmed by the results of the electrophysiological recordings, in which CAPS was not able to trigger a classic, TRPV1-mediated membrane current (I_{TRPV1}). Likewise, the fluorescence immunocytochemistry using anti-TRPV1 antibodies showed that this ion channel was localized intracellularly. The application of TRPV1 selective antagonists – capsazepine and BCTC – onto the strips of detrusor smooth muscle (DSM) blocked 20-40% of contraction caused by cholinomimetic carbachol, indicating the participation of TRPV1 in the signaling cascade of cholinergic contraction of DSM. We also showed for the first time that NO donors can activate macroscopic I_{TRPV1} only in the presence of sulfhydryl-containing reagents (e.g., sodium nitroprusside) that accelerate the release of nitric oxide from donor molecules. In rats with streptozotocin-induced diabetes, the increase in the functional expression of TRPV1 in afferent neurons was observed. Still, the local effects of the CAPS onto DSM strips was found weakened. This indicates, on the one hand, the strengthening of the TRPV1-dependent afferent segment of the urination reflex arc during diabetes, and, on the other hand, the reduction of the contractile capacity of DSM in this pathology.

Keywords: TRPV1, urinary bladder, detrusor, smooth muscle cell, nitric oxide, diabetic urinary bladder dysfunction

НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Sharopov B.R.**, Gulak K.L., Philypov I.B., Sotkis A.V., Shuba Y.M. TRPV1 alterations in urinary bladder dysfunction in a rat model of STZ-induced diabetes // Life Sciences – 2018 – №15, Vol. 93 – P. 207-213.
2. **Sharop B.R.**, Boldyriev O.I., Batiuk M.Y., Shtefan N.L., Shuba Y.M. Compensatory reduction of Ca_v3.1 expression in thalamocortical neurons of juvenile rats of WAG/Rij model of absence epilepsy // Epilepsy Research – 2016 – Vol. 119 – P. 10-12.
3. Nekrasov K.A., Vikarchuk M.V., Rudenko E.E., Ivanitskiy I.V., Grygorenko V.M., Danylets R.O., Kondratov A.G., Stoliar L.A., **Bizhan R. Sharopov**, Kashuba V.I. The 6-gene promoter methylation assay is potentially applicable for prostate cancer clinical staging based on urine collection following prostatic massage // Oncology Letters – 2019 – V18. – P. 1018-1027.
4. **Б.Р. Шаропов**, Я.М. Шуба. Наявність сульфгідрилвмісної речовини є необхідною умовою активації TRPV1 донорами оксиду азоту // Фізіологічний Журнал – 2017 – Т. 63, № 2 – С. 3-10.
5. **Б.Р. Шаропов**, Ю.Б. Дискіна, С.І. Єльяшов, А.Ю. Алексєєва. Ca²⁺-мобілізація у гладеньких міоцитах сечового міхура щура у відповідь на прикладання капсаїцину // Вісник Львівського Університету (серія біологічна) – 2019 – Т. 80 – С. 177-182.

НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Sharopov B.R.**, Gulak K.L., Philypov B.I., Sotkis A.V., Shuba Ya.M. Dissecting local and systemic effects of TRPV1 on urinary bladder

- contractility in diabetes // 61st Biophysical Society Congress, New Orleans, USA, February 11-15, 2017.
2. **Sharopov B.R.**, Shuba Ya.M. Capsaicin- and heat-activated ion channel TRPV1 in the urinary bladder is expressed in the afferent fibers but not in detrusor myocytes // 3rd International Symposium «Smooth Muscle Physiology, Biophysics & Pharmacology: From genes and molecules to functions, disorders and their novel treatment opportunities», Kiev, Lutsk, Ukraine, September 18 – 22, 2017.
 3. **Sharopov B.R.**, Gulak K.L., Sotkis A.V., Shuba Ya.M. The role of TRPV1 ion channel in urinary bladder dysfunction at diabetes mellitus // International scientific conference of undergraduate and PhD students «Youth and progress of biology X», Kyiv, Ukraine, April 16-19, 2013.
 4. **Б.Р. Шаропов**, Ю.Б. Дискіна, С.І. Єльяшов, А.Ю. Алексєєва, Насібян Л.С. Іонний канал TRPV1 у гладеньком'язових клітинах сечового міхура відіграє роль ланки в холіроцепторному сигнальному каскаді // VII З'їзд Українського біофізичного товариства, м. Київ, м. Луцьк, Україна, 29 жовтня – 2 листопада 2018 р.
 5. Болдирєв О.І., **Шаропов Б.Р.**, Штефан Н.Л., Шуба Я.М. Онтогенетична динаміка і нейрон-специфічна експресія кальцієвих каналів Т-типу в таламусі щура // XI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», м. Львів, Україна, 20–23 квітня 2015 р.
 6. **Шаропов Б. Р.**, Болдирєв О. І., Батюк М. Ю., Штефан Н. Л., Шуба Я.М. Абсансна епілепсія та Ca²⁺-канали Т-типу в нейронах таламуса // Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології IX», м. Львів, Україна, 3-6 квітня 2012 р.
 7. **Шаропов Б.Р.**, Болдирєв О.І., Батюк М.Ю., Штефан Н.Л., Шуба Я.М. Зміни рівня експресії кальцієвих каналів Т-типу у латерально-дорзальному ядрі таламуса у нормі та за умов абсанс-епілепсії // «Фізіологія: від молекул до організму», м. Київ, 20-21 жовтня 2011 р.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	10
ВСТУП.....	11
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	18
1.1. Сечовий міхур як головний компонент сечовидільної системи.	18
1.1.1. Анатомічна будова та біомеханічні принципи роботи сечового міхура.	19
1.1.2. Гістологічна структура стінки СМ.....	22
1.1.3. Локальний контроль сечовиділення.	27
1.1.4. Електрофізіологічна характеристика ГМК детрузора	29
1.2. Іонний канал TRPV1.....	32
1.2.1. Будова молекули TRPV1	33
1.2.2. Біофізичні властивості та ендogenousні агоністи капсаїцинового рецептора	35
1.2.3. TRPV1 у клітинному контексті.	39
1.3. Діабетична дисфункція сечового міхура.	41
1.3.1. Пошкоджувальні фактори при ЦД.....	41
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	44
2.1. Піддослідні тварини.....	44
2.2. Приготування препаратів гостроізолюваних клітин.	44
2.2.1. Ізолювання гладеньком'язових клітин детрузора	44
2.2.2. Ізолювання аферентних нейронів ДКГ	46
2.3. Електрофізіологічні вимірювання.....	47
2.4. Визначення фактичної або кількісної експресії генів.	50
2.4.1. Екстракція тотальної РНК.....	50
2.4.2. Зворотна транскрипція і синтез кДНК	50

2.4.3. ПЛР та агарозний гель-електрофорез	51
2.5. Ретроградне флуоресцентне мічення нейронів.....	52
2.5.1. Хірургічна операція та введення барвника у СМ.....	52
2.5.2. Флуоресцентна мікроскопія ізольованих нейронів ДКГ	53
2.6. Стрептозотоцинова модель цукрового діабету.	54
2.7. Тензометрія на гладеньком'язових смужках.	55
2.8. Реєстрація Ca^{2+} -залежної флуоресценції.	56
2.9. Розчини та фармакологічні агенти.....	58
2.10. Статистичні методи.	59
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	60
3.1. Експресія гена <i>Trpv1</i> у різних тканинах СМ.....	60
3.2. Функціональна присутність TRPV1 у гладеньких міоцитах детрузора та СМ-специфічних нейронах ДКГ	64
3.2.1. КАПС-активовані трансмембранні струми в СМ-специфічних нейронах ДКГ	64
3.2.2. Електрофізіологічна характеристика детрузорних гладеньких міоцитів	67
3.2.3. Відсутність TRPV1-опосередкованих струмів у ГМК детрузора....	71
3.2.4. Мобілізація іонів Ca^{2+} з саркоплазматичного ретикулуму ГМК детрузора після прикладання КАПС.....	72
3.2.5. Імуноцитохімічні докази наявності TRPV1 у СР гладеньких міоцитів детрузора.....	77
3.3. TRPV1 як ланка у холінорецепторному сигнальному каскаді ГМК детрузора.....	79
3.4. Активація макроскопічного I_{TRPV1} донором оксиду азоту в суміші з сульфгідрил-вмісним реагентом.....	84
3.4.1. Відсутність ефекту при прикладанні донора оксиду азоту до TRPV1-позитивних нейронів ДКГ	85

3.4.2. Активація I_{TRPV1} ко-аплікацією донора NO та сульфідрил-вмісного реагента	87
3.5. Внесок іонного каналу TRPV1 у діабетичну дисфункцію сечового міхура	91
3.5.1. Зміна загальних параметрів СМ при STZ-індукованому діабеті.....	91
3.5.2. Посилення I_{TRPV1} у СМ-специфічних нейронах ДКГ при цукровому діабеті	95
3.5.3. Збільшення експресії гена <i>Trpv1</i> у спінальних гангліях діабетичних тварин	99
3.5.4. Послаблення КАПС-індукованих скорочень м'язових смужок СМ при цукровому діабеті	101
ВИСНОВКИ	108
ВИКОРИСТАНІ ДЖЕРЕЛА.....	110

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АНС	– автономна нервова система
АФК	– активні форми кисню
ВАХ	– вольт-амперна характеристика
ГБШ	– гексозаміновий біосинтетичний шлях
ГМК	– гладеньком'язова клітина
ДДСМ	– діабетична дисфункція сечового міхура
ДКГ	– дорзальний корінцевий ганглії
ЕТЛ	– електрон-транспортний ланцюг
ІКК	– інтерстиціальна клітина Кахаля
КАПС	– капсаїцин
НП-Na	– нітропрурид натрію
ПД	– потенціал дії
СЕР	– стимуляція електричним полем
СМ	– сечовий міхур
СР	– саркоплазматичний ретикулум
ЦД	– цукровий діабет
АCh	– ацетилхолін
СCh	– карбахол
СРZ	– капсазепін
ІР₃	– інозитол-3-фосфат
L-Cys	– L-цистеїн
NE	– норепінефрин
NO	– оксид азоту
PKC	– протеїнкіназа C
PLC	– фосфоліпаза C
TRPV1	– іонний канал <u>T</u> ransient <u>r</u> eceptor <u>p</u> otential <u>v</u> anilloid <u>1</u>

ВСТУП

Актуальність теми. Порушення сечовидільної функції належить до числа найбільш розповсюджених медичних проблем і вражає біля 1/6 дорослого населення світу [1]. Хоча захворювання сечовидільної системи є здебільшого нелетальними, вони нерідко суттєво погіршують якість життя людини, причому ступінь цього погіршення в деяких найтяжчих випадках здатна знижувати щоденну діяльність пацієнта до мінімуму. Урологічні патології можуть виявлятися у вигляді гіпер- або гіпоактивності сечового міхура (СМ) як міогенної, так і нейрогенної природи (57%), інтерстиціального циститу (16%), інфекцій сечостатевого тракту (13%), раку сечового міхура (1%), а також низки фізичних й анатомічних змін в нижніх сечостатевих шляхах через їх обструкцію каменями або ж внаслідок гіперплазії передміхурової залози (13%) [2]. Групою особливого ризику є хворі на цукровий діабет (ЦД), яких у самій лише Україні налічується ~1,2 млн. За даними різних досліджень, 43-87% з них мають проблеми із сечовиділенням [3].

Не дивлячись на важливість зазначеної проблеми, арсенал засобів корекції урологічних порушень є досі доволі обмеженим. Основним засобом фармакологічного впливу на СМ лишаються препарати, націлені на холінергічну та адренергічну системи його автономної регуляції, які викликають численні побічні ефекти [4]. У багатьох випадках хворим також прописується т.зв. “тренування” сечового міхура, складання розкладу актів сечовипускання тощо, що також свідчить про недосконалість наявних шляхів терапії вищезазначених захворювань. У той же час, біомедичною спільнотою активно ведеться пошук нових молекулярних мішеней, які могли б бути використані для розробки урологічних лікарських препаратів нових поколінь.

Наприкінці 1980-х років було помічено, що суттєвий вплив на активність СМ справляє капсаїцин (КАПС), активна речовина з червоного перцю з роду *Capsicum*. Було виявлено, що ця сполука здатна

десенситизувати аферентні нервові волокна, які інервують сечовий міхур, знижуючи таким чином його рефлекторні скорочення [5]. Деякий час робилися спроби використати цю речовину в клінічній практиці у формі інстиляцій, проте через побічні больові ефекти, низьку біологічну стабільність КАПС і невідомий механізм його дії широкого вжитку цей підхід не набув. Пізніше з'ясувалося, що рецептором КАПС у організмі виступає TRPV1 – неселективний катіонний канал, експресований переважно у сенсорних нейронах, але різною мірою присутній також у багатьох інших тканинах. Особливістю цього білка є його виключна полімодальність і чутливість до широкого спектру подразників: тепла ($>42^{\circ}$), нефізіологічного рН ($6.0 < \text{pH} < 8.5$), оксиду азоту (NO), окситоцину, анандаміду та низки інших вторинних посередників ліпідного походження [6].

Було показано, що нокаутні за геном *Trpv1* миші виявляють суттєву дисфункцію сечовиділення [7]. Експресія цього білка була продемонстрована у аферентних волокнах стінки СМ, що є аксонами нейронів дорзальних корінцевих гангліїв (ДКГ), причому було також встановлено, що КАПС-чутливі аксони відіграють у цьому органі “еферентну” роль, виділяючи низку сигнальних пептидів з модуляторною дією на СМ, таких як тахікініни й CGRP. Разом із тим, наявність TRPV1 у інших структурах нижніх сечостатевих шляхів, зокрема в гладеньком'язових клітинах (ГМК) детрузора, епітеліальних клітинах уротелію та інтерстиціальних клітинах Кахаля була показана лише непрямыми методами й неодноразово ставилася під сумнів багатьма дослідницькими групами [8]. Таким чином, не дивлячись на значний терапевтичний потенціал TRPV1 як мішені для лікування урологічних хвороб, його експресія та функціональне значення у СМ залишається незрозумілими.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження виконувались у рамках планів науково-дослідних робіт Відділу нервово-м'язової фізіології Інституту фізіології ім. акад. О.О. Богомольця НАН України, а саме за темами «Клітинні сигнальні системи в нормі та

патології» (номер державної реєстрації – 0113U007273) і «Тканиноспецифічна експресія іонних каналів-рецепторів фізико-хімічних впливів» (номер державної реєстрації – 0116U006611). Крім того, роботи провадились за наступними цільовими програмами: «Геном», а саме за темою «Біофізичні та молекулярно-генетичні механізми регуляції фізіологічних та патологічних процесів» (номер державної реєстрації – 0116U004470) за розділом «Термо-TRP у м'язовій тканині»; «Біотехнологія», а саме за темою «Механорецептори в патофізіології сечостатевої системи» (номер державної реєстрації – 0115U003634).

Мета та завдання роботи. Метою дослідження було дослідити різні гістологічні структури сечового міхура – гладенькі м'язи детрузора, уротелій та аферентні нервові закінчення – на предмет наявності в них функціонального іонного каналу TRPV1, встановити його функціональне значення у цих структурах та з'ясувати його зміни в цьому органі, що супроводжують цукровий діабет.

Завдання, поставлені задля реалізації цієї мети, полягали в наступному:

1. Дослідити на наявність транскриптів гена *Trpv1* основні тканини сечового міхура, а саме уротелій та детрузор, а також дорзальні корінцеві ганглії L6-S1, що іннервують зазначений орган.
2. Ідентифікувати в тотальних препаратах нейронів дорзальних корінцевих гангліях L6-S1 специфічну субпопуляцію клітин, що аферентує сечовий міхур, і зареєструвати в ній TRPV1-опосередкований струм.
3. З'ясувати, чи виявляють гладеньком'язові клітини детрузора ознаки присутності TRPV1 у формі відповідного струму (I_{TRPV1}) або капсаїцин-індукованого Ca^{2+} -сигналу та встановити субклітинну локалізацію цього іонного каналу.
4. Встановити, чи бере участь гладеньком'язовий TRPV1 у скоротливій активності сечового міхура, зокрема в холінергічному сигнальному каскаді.
5. Визначити експериментальні умови, за яких оксид азоту, який може вивільнюватися із уротелію у відповідь на розтягнення сечового міхура,

здатен активувати макроскопічний струм I_{TRPV1} у сенсорних нейронах дорзальних корінцевих гангліїв L6-S1.

6. Дослідити внесок експресованого в аферентних нейронах TRPV1 у діабетичну дисфункцію сечового міхура у моделі стрептозотоцин-індукованого діабету у щурів.

Об'єкт дослідження: іонний канал TRPV1, експресований у міхур-специфічних соматосенсорних нейронах і гладеньком'язових клітинах детрузора.

Предмет дослідження: експресія та функціональність іонного каналу TRPV1 у аферентних нейронах і міоцитах сечового міхура, а також пов'язані з ним зміни під дією донорів оксиду азоту та в умовах цукрового діабету.

Методи дослідження: клітинно-біологічні – ферментативно-механічне ізолювання нейронів ДКГ та ГМК детрузора, мічення СМ-специфічних нейронів ДКГ за допомогою ліпофільних флуорофорів; електрофізіологічні – петч-клемп у конфігурації «ціла клітина»; молекулярно-генетичні – ПЛР зі зворотною транскрипцією із подальшою візуалізацією за допомогою агарозного гель-електрофорезу, кількісна ПЛР у реальному часі (RT); флуоресцентно-мікроскопічні – візуалізація внутрішньоклітинного кальцію за допомогою кальцій-чутливих флуоресцентних барвників; загально-фізіологічні – тензометрія на смужках ГМД, цистометрія *ex vivo*; модельно-патофізіологічні - індукування експериментального цукрового діабету за допомогою стрептозотоцину; статистичні – непараметричний критерій Манна-Уїтні.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі вперше запропонована й експериментально обґрунтована гіпотеза щодо участі іонного каналу TRPV1 у функціонуванні гладеньком'язових клітин детрузора в якості ланки, що пов'язує сприйняття холінергічного сигналу із скороченням. Наведено відсутні раніше функціональні свідчення щодо присутності TRPV1 у ГМК детрузора, що проявлялося у вигляді індукованої капсаїцином Ca^{2+} -мобілізації з саркоплазматичного ретикулуму цих клітин.

Разом із тим, показана відсутність відповідного струму (I_{TRPV1}) у плазматичних мембранах зазначених ГМК, що також раніше не було продемонстровано. Ці результати разом вказують на неканонічну субклітинну локалізацію TRPV1 у міоцитах детрузора, а саме про його наявність у мембрані внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо, принципова можливість чого раніше була постульована лише для поперечносмугастих м'язів. Крім того, у роботі вперше виявлені експериментальні умови, за яких донори NO дозволяють викликати макроскопічний I_{TRPV1} , а саме те, що для цього необхідна ко-аплікація сульфгідрил-вмісних реагентів. Також вперше досліджено зміни в експресії та функціонуванні TRPV1 за умов ЦД, які можуть бути частиною патофізіологічного механізму діабетичної дисфункції сечового міхура. Зокрема, у СМ-специфічних сенсорних нейронах ДКТ виявлено збільшення рівня транскрипції гена *Trpv1* та амплітуди I_{TRPV1} , а також продемонстровано несподіване зниження КАПС-викликаних скорочень ізольованих багатоклітинних препаратів детрузорного м'яза.

Практичне значення одержаних результатів. Експериментальні дані, наведені в роботі, вказують на більш широку експресію TRPV1 у тканинах сечового міхура, аніж вважалося раніше. Зокрема, ознаки присутності цього іонного каналу виявляються не лише у аферентних нервових закінченнях, а й у скоротливих клітинах і, згідно з непрямыми даними, в клітинах уротелію. Оскільки на сьогодні TRPV1 є предметом пильного інтересу наукової та фармакологічної спільноти як потенційна нова мішень для корекції урологічних порушень, отримані результати суттєво підвищують його цінність у зазначеній якості, позаяк його ширша розповсюдженість означає і суттєвіший вплив на функціональний стан органа. З іншого боку, з цих даних випливає необхідність більш обережного використання новітніх TRPV1-спрямованих ліків, які наразі розробляються низкою фармакологічних компаній і проходять останні стадії доклінічних випробувань, оскільки їхня дія на СМ може виявитись менш специфічною і передбачуваною, аніж вважалося дотепер. Крім того, показана в роботі участь цього каналу в

розвитку діабетичної дисфункції сечового міхура дає підстави для першочергових випробувань зазначених препаратів з метою терапії цього захворювання.

Особистий внесок здобувача. Безпосередньо автором зібрано всі результати, отримані методом петч-клемп як на ГМК детрузора, так і на тотальних і СМ-специфічних, флуоресцентно-мічених препаратах нейронів ДКГ. Автором здійснювалося налагодження протоколів ізолювання усіх типів клітин, що вивчалися у цій роботі, та проводилися відповідні препаративні роботи в дослідах з імунохімічного фарбування та Ca^{2+} -залежної флуоресценції. Також автором самостійно здійснено частину роботи з виділення ДНК з тканин сечового міхура, постановки ПЛР і кальцієвої візуалізації. Автор брав участь у більшості дослідів з тензометрії, індукування цукрового діабету за допомогою стрептозотоцину та флуоресцентного мічення СМ-специфічних нейронів ДКГ. Усі дослідження стосовно міоцитарного TRPV1 у міоцитах детрузора, його функцій та субклітинної локалізації, а також індукції I_{TRPV1} донорами NO запропоновані й частково здійснені автором. Оформлення всіх рисунків, статистична обробка, написання усіх статей та супутній аналіз спеціальної літератури здійснено автором.

Апробація результатів дисертації. Отримані в ході досліджень дані було представлено дисертантом на 61-ому з'їзді Біофізичного товариства (Новий Орлеан, США, 2017 р.), VII тематичному з'їзді Українського біофізичного товариства (Київ, 2018 р.), симпозіумі «Smooth Muscle Physiology, Biophysics and Pharmacology» (Київ, 2017 р.), двох конференціях для молодих учених «Молодь і поступ біології» (Львів, 2012 і 2013 рр.) та конференції для молодих учених «Фізіологія: від молекули до організму» (Київ, 2011). Крім того, результати доповідалися на низці семінарів Інституту фізіології ім. акад. О.О. Богомольця НАН України.

Публікації. Представлені в дисертаційній праці результати були представлені в науковій пресі у вигляді 11 публікацій, зокрема в 5-ти статтях

у фахових журналах (з яких 3 – у міжнародних й 2 – у національних), а також у 6-ти збірниках тез конференцій та симпозіумів, з яких один – закордонний (США) і 5 – українських.

Структура та обсяг праці. Дисертація складається із розділів «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали та методи», «Результати та їх обговорення», «Узагальнення результатів», «Висновки» та «Список використаних джерел». Результати проілюстровано 34 рисунками та схемами. Загальний обсяг роботи складає 125 сторінок. У дисертації містяться посилання на 180 найменувань спеціальної літератури.

Розділ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Сечовий міхур як головний компонент сечовидільної системи.

СМ є єдиним органом у системі видалення сечі з тіла ссавця, який виконує в ній активну роль, у той час як решта її структур, таких як сечівники та сечовід, здійснюють лише провідну функцію. Значення СМ для організму є двоїстим і полягає, по-перше, в накопиченні вторинної, “остаточної” сечі й, по-друге, у виведенні її в довколишнє середовище [9, 10]. Хоча на перший погляд перша з цих задач ввижається позбавленою фізіологічного сенсу – адже урина містить лише зайві для підтримання гомеостазу речовини, такі як продукти білкового метаболізму – а проте насправді ця задача є напроцуд важливою для захисту організму сухопутної тварини від інфільтрації мікроорганізмами. У людини сеча має осмолярність у межах від 50 до 1200 мОсм/кг, рН від 4,5 до 8 і збагачена багатьма мінеральними солями та органічними сполуками, що загалом являє собою досить сприятливе середовище для росту патогенних бактерій, протист та грибів [11]. Показово, що хімічні параметри сечі не раз ставали предметом біомедичних досліджень як фактор ризику розвитку урогенітальних інфекцій [12]. Отже, треба думати, загально-фізіологічний сенс існування СМ полягає в тому, що сеча має бути накопичена у великій кількості без експозиції до зовнішнього середовища, аби не стати «водним каналом» для проникнення паразитарних мікроорганізмів досередини, а потім видалена з тіла під великим тиском, що знову-ж таки унеможливить проникнення до нього інфекційних агентів. Якщо у риб практично немає високодиференційованої структури на кшталт сечового міхура, позаяк їхні сечовидільні отвори постійно омиваються довколишнім водним середовищем, то у сухопутних хребетних СМ розповсюджений серед багатьох видів усіх класів, а у ссавців, найбільш розвиненого з них, присутній у кожного виду [13].

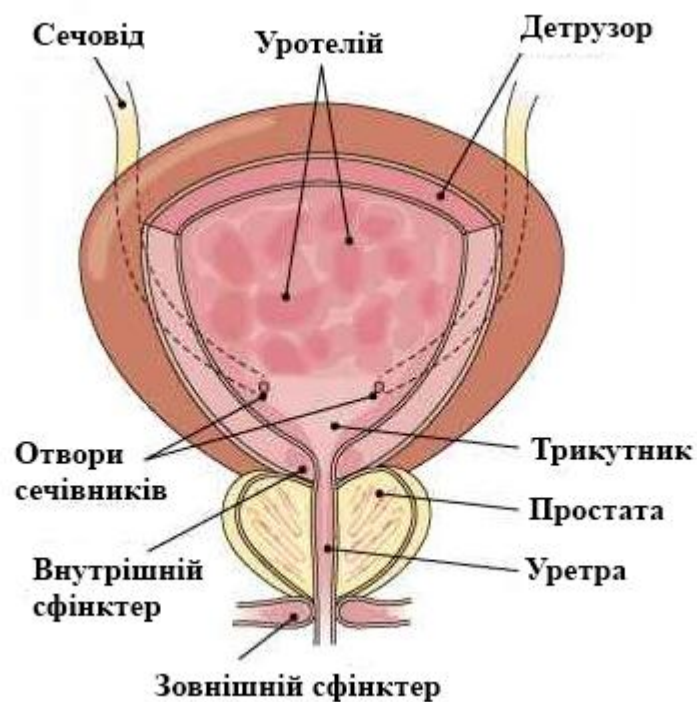


Рис. 1.1. Анатомічна будова нижніх сечовивідних шляхів людини. Модифіковано з [9].

1.1.1. Анатомічна будова та біомеханічні принципи роботи сечового міхура. Сечовий міхур є порожнистим скоротливим органом, що в людини здатен вміщувати до 0,25 – 0,75 л сечі. Функціонально його можна поділити на дві частини, верхню та нижню, які мають назви, відповідно, склепіння та трикутника (Рис. 1.1.). Як буде видно з подальшого викладу, ці дві скоротливі структури працюють як м'язи-антагоністи, забезпечуючи правильне проходження двох фаз активності СМ – накопичення та випорожнення [14]. Хоча анатомічно ці частини слабо відокремлені одна від одної, їхніми зовнішніми ознаками є характер епітеліальної вистилки (уротелію) зсередини органа в розслабленому стані: в трикутника – гладенький, в той час як у склепіння – вкритий численними складками, що також має своє адаптивне пояснення у світлі функцій цих утворень, позаяк трикутник практично не розтягується в процесі роботи сечового міхура [15]. Порожнина сечового міхура з'єднана з нирками через два сечівника, а з довколишнім простором – через уретру. Ці три трубкоподібні структури

розташовуються на кінцях трикутника СМ. Довкола витоку з сечового міхура розташовується кільцеве гладеньком'язове утворення, що має назву внутрішнього сфінктера, яке дехто з дослідників відносять до структур уретри й називають внутрішнім уретральним (Рис. 1.1). З іншого кінця сечоводу розміщений ще один сфінктер, який має назву зовнішнього, і має, навпаки, поперечно-смугасту природу [16].

Як уже зазначалося, СМ працює у двох режимах, накопичення сечі та її випускання через уретральний канал. Частота актів сечовипускання в здорової людини складає зазвичай 4-10 разів на день і триває впродовж 10-20 с [17]. Таким чином, загальна тривалість усіх фаз випорожнення СМ складає всього 0,1% – 0,2% доби, у той час як решта 99,9% – 99,9% часу припадає на фазу накопичення. Цікаво, що в дрібних ссавців, наприклад, у щурів, які часто використовуються як модельні в фізіологічних дослідженнях, здійснення сечовидільної функції відбувається набагато частіше та в середньому відбувається кожні 8 хв. у денний період та кожні 3 хв. у нічний (тобто 200-400 разів на добу) [18]. Це пояснює значні видові відмінності, які існують у роботі сечового міхура людини та найширше вживаних експериментальних моделей і які значно утруднюють дослідження у цій галузі. У той же час, показано, що у всіх ссавців із масою тіла більше 3 кг тривалість сечовидільного акту є напрочуд стабільною та складає 20 ± 13 с незалежно від їхньої ваги [6].

Фаза накопичення підтримується симпатичною нервовою системою, яка іннервує СМ через підчеревний (*hypogastricus*) нерв, які походять з люмбосакральних симпатичних гангліїв [19]. У цей час з варикозних розширень автономних нервових волокон виділяється норепінефрин (NE), який має протилежну дію на різні функціональні структури органа. Зокрема, NE викликає розслаблення м'язової тканини, яка в цьому органі має назву детрузора, у ділянці склепіння, завдяки чому міхур може безперешкодно накопичувати рідину, збільшуючись у об'ємі в кілька разів завдяки своїй значній еластичності [17, 20]. В той же час NE спричиняє констрикцію

внутрішнього сфінктера й ділянки детрузора в зоні трикутника, що допомагає утримувати сечу від передчасного вивільнення. Ймовірно, отвори сечівників також розташовуються на вершинах трикутника з тих міркувань, щоб його напруження допомагало їм розкриватися й вільно пропускати рідину з нирок [14]. У цей час, доки триває наповнення СМ, первинно- або вторинно-механочутливі нервові волокна, які походять від нейронів дорзальних корінцевих гангліїв (ДКГ), передають сигнали про міру наповненості органа по спинному мозку в центр контролю сечовипускання, який розміщується в Варолієвому мості стовбура мозку [21, 22]. Якщо сечі накопичена достатня кількість, орган переходить у режим скорочення.

Фаза випорожнення, навпаки, активується парасимпатичною гілкою автономної нервової системи (АНС), прегангліонарні нейрони якої прямують до СМ по тазовому (*pelvicus*) нерву і замикаються на інтрамуральних гангліях [23]. При вивільненні медіатора ацетилхоліну (ACh) відбувається скорочення м'язової тканини склепіння й розслаблення міоцитів трикутника й внутрішнього сфінктера [19]. У цей час ссавець відчуває гостру спонуку до сечовиділення, але може стримати її завдяки напруженню зовнішнього сфінктера, який відноситься до соматичних м'язів і перебуває під контролем сигналів з церебральної кори [24]. Якщо ж центрального блокування акту не відбувається, сеча вивільнюється через уретральний канал у зовнішнє середовище. При цьому не допускається ретроградного току рідини вгору по сечівниках до нирок, що може пошкодити їх за рахунок надмірного тиску, осмотичного шоку або інфікування інтравезикальною мікрофлорою. Деякі дослідники приписують тут головну роль інтрамуральним сегментам сечівників, чия порожнина перед злиттям з порожниною СМ деякий час прямує паралельно стінці органа, залягаючи між детрузором та уротелієм. Таким чином, при напруженні сечового міхура відбувається затискання цієї ділянки зазначеного трубчастого органу [25]. Інші автори вважають, що основна роль у запобіганні зворотному току сечі належить сечівниковому клапану й взагалі здатності сечівника до перистальтичного руху з частотою

2-6 разів/хв [19, 26]. Після завершення фази випорожнення в люмені органа залишається частина рідини, об'єм якої відомий як залишковий і в здорової людини не перевищує 50-100 мл [27].

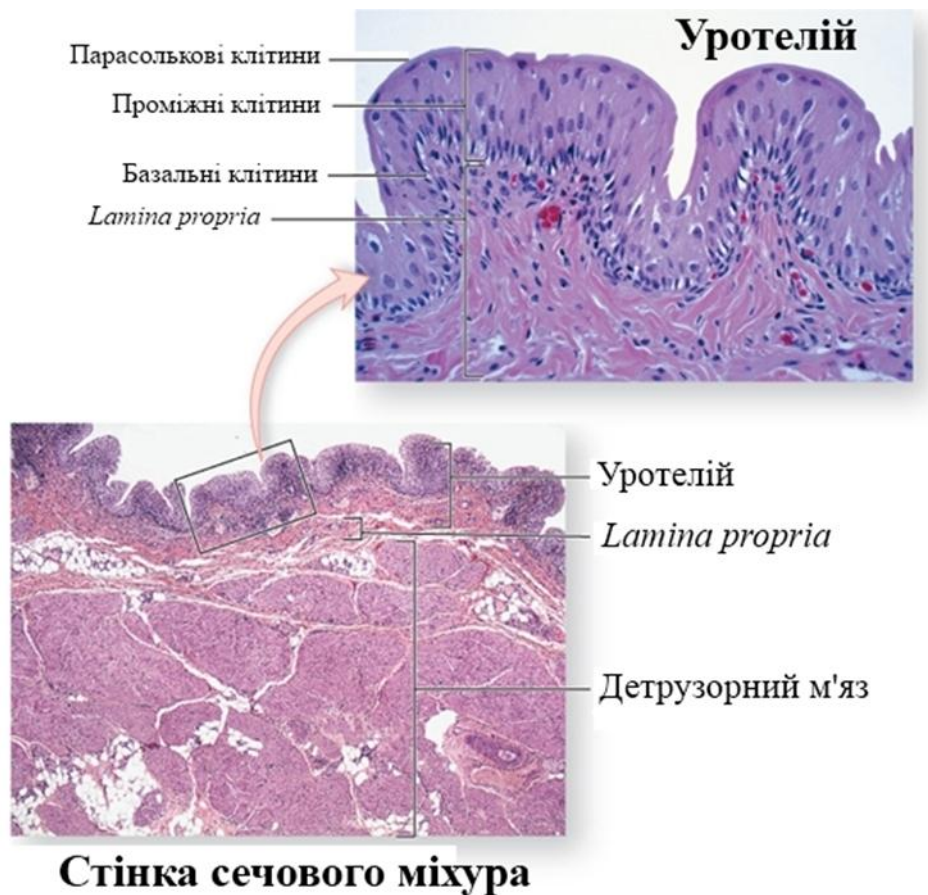


Рис. 1.2. Тканинна організація стінки сечового міхура. Забарвлення гематоксиліном/еозином. Модифіковано з [19].

1.1.2. Гістологічна структура стінки СМ. У поперечному розрізі (Рис. 1.2) сечовий міхур демонструє будову, типову для порожнистих вісцеральних органів. З боку люмену він вистелений багат шаровим щільним бар'єром з клітин уротелію, які є досить різноманітними за морфологією і відіграють, окрім усього, ще й сигнальну роль [28]. Під уротелієм залягає вузька, збіднена на клітини й заповнена, головним чином, міжклітинним матриксом зона, яка має назву *lamina propria*. Найтовщим шаром стінки СМ у розслабленому стані є детрузор, який є сукупністю поздовжніх, поперечних та спіральних тяжів гладеньких міоцитів, що забезпечують скоротливу

функцію органа [17]. З боку черевної порожнини орган вкритий тонкою серозною оболонкою, яка щільно прилягає до детрузора .

Уротелій є досить унікальним типом епітеліальної тканини, яка володіє значною здатністю до рецепції натягнення [28]. Як буде видно з подальшого викладу, у відповідь на механічну стимуляцію він демонструє властивість виділяти низку фізіологічно активних речовин з розслаблювальною дією, перш за все АТФ і оксид азоту (NO), беручи, таким чином, участь у регуляції скоротливості детрузора. З боку порожнини СМ уротелій вкритий шаром глікозаміногліканів, який відіграє ключову роль у запобіганні проникненню крізь цей шар солей, макромолекулярних сполук та інфекційних агентів [29]. Було показано, що його видалення за допомогою розведеної HCl призводить, окрім загибелі впродовж ~24 год. апікального шару епітеліальних клітин, до виникнення проникності уротелію для іонів K^+ і початку запальних процесів, у той час як відновлення цього шару за допомогою екзогенного прикладання глікозаміногліканів повертає уротелію його бар'єрні властивості [30]. Нижче починається зона епітеліальних клітин, які залягають у 4-8 шарів при розслабленому стані СМ і морфологічно поділяються на наступні типи. Проксимально до глікозаміногліканового покриву розташовуються найбільш диференційовані, найбільш здатні до рецепції механічних стимулів та скріплені щільними контактами парасолькові клітини. Під ними кількома шарами розміщуються напівдиференційовані проміжні клітини, які, ймовірно, є свого роду “швидким резервом” для відновлення уротелію в разі злущування верхнього шару. Ще нижче в гістологічних препаратах виявляються базальні клітини, які репрезентують популяцію стовбурових клітин уротелію. Лише цей тип клітин з усієї вистилки СМ має здатність до поділу [31-33].

Як видно з Рис. 1.2., сполучнотканинний шар, який підстилає уротелій, або lamina propria, характеризується невисокою щільністю й наявністю великої кількості порожнин. Ймовірно, доцільність його існування полягає у тому, щоб забезпечити простір для функціонування другого ешелону захисту

СМ від проникнення чужорідних біологічних та хімічних агентів, розміщення щільної мережі нервових волокон і синцитію міофібробластів, а також щоб дозволити цій тканині утворювати складки [34]. У цій ділянці залягають антиген-презентуючі тлісті клітини, розміщуються Т-лімфоцити і здійснюють свою патрульну функцію макрофаги [19]. Колагенові та інші сполучнотканинні волокна продукуються кількома типами фібробластів. Крім того, в субуротеліальному просторі залягають окремі субпопуляції аферентних чутливих волокон, зокрема і TRPV1-позитивні [9].

Головним компонентом детрузора, скоротливої частини стінки СМ, є збудливі гладеньком'язові клітини (ГМК). Як і інші клітини цього типу, вони здійснюють свою констрикторну функцію за рахунок збільшення концентрації іонів Ca^{2+} у своєму цитозолі за рахунок трансмембранного входу або ж вивільнення з внутрішньоклітинних кальцієвих депо, перш за все саркоплазматичного ретикулуму (СР) [35]. У подальшому Ca^{2+} активує актин-міозиновий скоротливий апарат, який у ГМК, на відміну від поперечно-посмугованих та серцевих міоцитів, залягає не паралельними щодо плазмалемі і щільно розміщеними фібрилами, а поодинокими діагональними тяжами, що зумовлює особливий характер їхнього скорочення [36]. Відомо також, що клітини детрузора поєднані між собою численними щільними контактами, складеними кількома типами конексинів, перш за все Сх43 та Сх45, і тому з функціональної точки зору утворюють електричний синцитій [37, 38]. Крім того, показано, що детрузорні ГМК здатні до генерації потенціалів дії, причому, за умов відсутності на їхніх плазматичних мембранах потенціал-керованих натрієвих каналів (Na_v), природа цих спайків є суто кальцієвою й опосередковується потенціал-керованими каналами з родини Ca_v [39, 40]. Цей ефект було показано для багатьох видів ссавців включно з людиною, хоча, як буде видно з наших результатів, обов'язковість цього правила для всіх організмів може бути поставлена під сумнів.

Важливою, хоч і відносно мало дослідженою особливістю гістології СМ є наявність у ньому інтерстиціальних клітин Кахаля (ІКК), аналогічних до відповідних клітин з кишковика [41, 42]. Хоча в останньому з цих органів, як було неодноразово продемонстровано, вони є пейсмейкерними клітинами, здатними до спонтанної електричної активності, у СМ виконання ними цієї функції є неочевидним і не раз ставилося під сумнів різними дослідницькими групами, позаяк сечовий міхур не здійснює перистальтичних рухів [42]. З іншого боку, відомо, що сечовий міхур здатний до автономних спонтанних скорочень під час фази наповнення, що, цілком можливо, опосередковується саме цими клітинами [43]. Наявність у сечовому міхурі ІКК з основними їхніми діагностичними ознаками, такими як експресія регуляторного білка c-kit і зірчаста морфологія, була показано в багатьох роботах [44]. Цікаво, що загальний пул інтерстиціальних клітин Кахаля у СМ поділяється щонайменше на дві субпопуляції: детрузорну, де поодинокі ІКК розташовуються здебільшого на межі тяжів з міоцитів, і субуротеліальну, яка утворює синцитій у *lamina propria*; ця група клітин часто називається міофібробластами [45]. Важливою рисою останніх є наявність фібронексусів – особливих структур, які являють собою пучки мікрофіламентів та фібронектину, які сходяться з обох сторін плазматичної мембрани до одного якірного трансмембранного білкового комплексу. Як уже зазначалося, функціональна значущість ІКК у сечовому міхурі залишається незрозумілою. Показано, що міоцитарні тяжі здатні до генерації спонтанних Ca^{2+} -хвиль, які згодом розповсюджуються на сусідні тяжі і що могли б якраз спричинятися активністю інтерстиціальних клітин, проте детальні дослідження спростували те, що ці сигнали починаються саме з ІКК [41]. Деякі автори припускають, що основна роль цих клітин може полягати суто в розповсюдженні цих Ca^{2+} -хвиль, а не у власне їх генерації. У контексті нашої роботи важливо зазначити, що ІКК є чутливими до стимуляції активатором TRPV1 капсаїцином, а також є чутливими до пуринергічних та холінергічних сигналів [42].

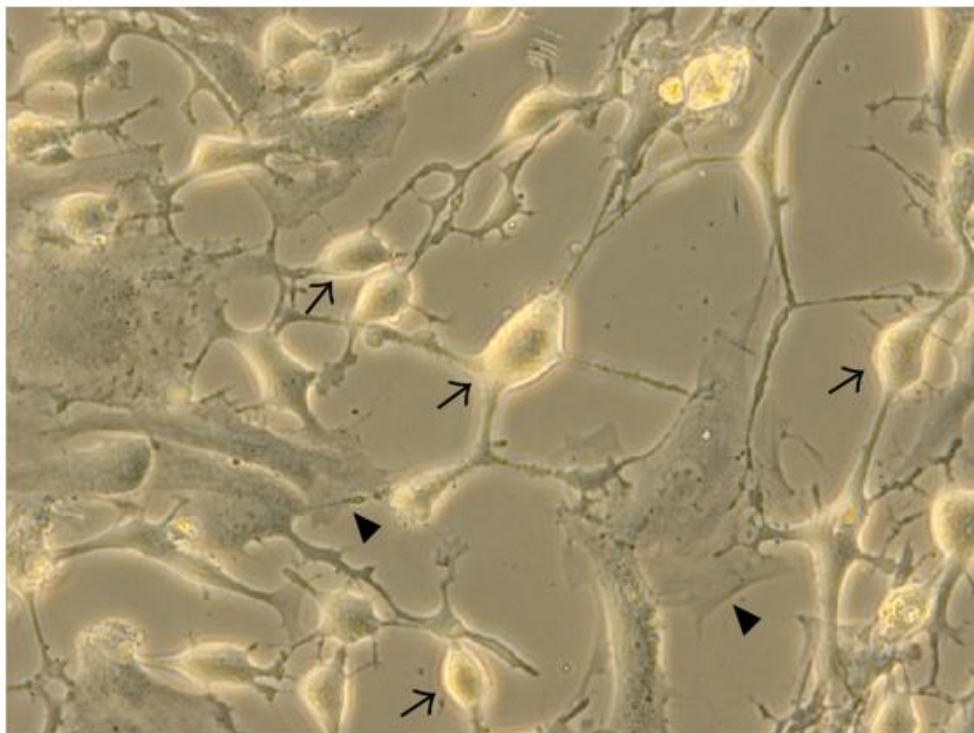


Рис. 1.3. *Культура клітин детрузора, у якій виявляються інтерстиціальні клітини Кахаля (→) та ГМК (►). Модифіковано з [46].*

Нервовий контроль скоротливої активності детрузора здійснюється еферентними автономними волокнами, що, як і всюди у вісцеральних органах, не утворюють класичних нервово-м'язових синапсів, а вивільнюють свої нейротрансмітери паракринно, з варикозистих розширень, розсіяних на відстані 2-10 мкм вздовж нервового закінчення [9, 20]. Скорочення викликається активацією парасимпатичних волокон, які, окрім канонічного їхнього посередника ацетилхоліну (ACh), виділяють також оксид азоту (NO) та аденозин-3'-фосфат (АТФ) [47]. Соми нейронів, від яких походять ці структури, розташовуються частково безпосередньо в стінці СМ, у складі численних невеликих (100-200 мкм у діаметрі) інтрамуральних гангліїв, а частково – у складі окремих тазових гангліїв [9, 48]. Прегангліонарні нейрони, що іннервують ці кінцеві еферентні клітини, локалізуються в сакральному парасимпатичному ядрі на рівні S2-S4 й посиляють свої волокна через тазовий нерв. Навпаки, розслаблення СМ ініціюється

симпатичними нервовими клітинами, які використовують у якості нейротрансмітера нореінефрин та нейропептид Y. Вони розташовуються у симпатичному нервовому стовбурі на рівні L1-L2 й іннервують орган через підшлункові ганглії та нерви [49]. Крім того, сечовий міхур пронизаний аферентними волокнами, що відносяться до мієлінозаних типу Aδ та немієлінізованих C [21]. Вважається, що перші з них є власне механочутливими аферентами, що реагують на розтягнення СМ, у той час як другі є “тихими” структурами, які активуються лише під час запалення, хоча щодо останнього в спеціальній літературі досі точаться суперечки. Вищий нервовий контроль сечовиділення здійснюється мостовим центром сечовиділення, що локалізується у Варолієвому мості стовбура головного мозку, а також, у випадку зовнішнього уретрального сфінктера, церебральною корою [9].

1.1.3. Локальний контроль сечовиділення. До середини 80-х років минулого сторіччя класична модель регуляції скорочення СМ, згідно з якою воно повністю здійснюється симпатичними та парасимпатичними нервовими закінченнями АНС, вважалася остаточною й вичерпною. Проте вже тоді стали виявлятися експериментальні факти, які ставили під сумнів її повноту. Так, наприклад, було помічено, що при прикладанні до ізольованого детрузорного м'яза капсаїцину, активної речовини з плодів червоного перцю роду *Capsicum*, виникає двофазний ефект, який полягає в початковому сильному скороченні препарату, а потім у послабленні його базального тону, причому ці явища не опосередковуються через автономну нервову систему [50, 51]. Також було показано, що видалення уротелію спричиняє значні зміни в скоротливості м'язової смужки. Виявилося, що уротелій виділяє невідомої природи розслаблюючий фактор, подібно до клітин судинного ендотелію [52]. Таким чином, стало зрозуміло, що, окрім центрального контролю сечовидільної функції через рефлекторні дуги, які замикаються через спинний мозок та Вароліїв міст головного мозку, існують

численні механізми тонкої регуляції СМ, які локалізуються безпосередньо у тканинах цього органа.

Як уже зазначалося, серед усіх аферентів, які пронизують стінку сечового міхура, переважають тонкі мієлінізовані волокна типу Аδ і немієлінізовані типу С. Було виявлено, що зазначений вище ефект КАПС опосередковується через ці чутливі волокна, здебільшого С-типу, і може бути заблокований за допомогою антагоністів тахікінінових рецепторів, головним чином, до субстанції Р (SP) та нейрокініну А (NKA) [53, 54]. Таким чином, було сформульовано, що TRPV1-позитивні волокна, хоча і є на позір аферентними, виконують у той же час і певну “еферентну” функцію, а саме виділяють при активації низку сигнальних пептидів, які модулюють скоротливість сечового міхура [53, 55]. Отже, сигнальна петля в цьому випадку замикається всередині індивідуального аксона, на якому розміщується і рецептор, і ефектор. Вплив описаного механізму на роботу СМ виявився настільки значним, що низкою авторів уже здійснювалися спроби коригувати через його посередництво порушення сечовидільної функції. Зокрема, проводилися експерименти із встановленням у порожнині сечового міхура постійного джерела КАПС, які дали певні позитивні результати, проте були припинені через значні больові ефекти, які спричиняли подібні терапевтичні процедури, позаяк TRPV1 є також одним з ключових ноцицепторів у організмі ссавця [56]. Крім того, деякі дослідницькі групи вивчали можливість використання капсаїцину як ексайтотоксину, який дозволив би здійснювати абляцію TRPV1-позитивних чутливих волокон для корекції гіперфункціональності СМ, але ці дослідження також не отримали продовження через схожі причини, а також через незворотність запропонованих змін у фізіології органа [57].

СМ також здатен реагувати на ступінь свого розтягнення автономно, незалежно від того, чи є рефлекторні петлі його центрального контролю інтактними чи орган перебуває в ізолюваному стані. Найважливішу роль у цьому приписують уротелію [28]. Показано, що у відповідь на розтягнення у

його епітеліальних клітинах спостерігається підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} , внаслідок чого відбувається викид NO та АТФ, причому ці нейротрансмітери справляють розслаблювальну дію на детрузор [31, 52]. Загальноприйнята модель полягає в тому, що це інгібування необхідне для забезпечення безперешкодного проходження фази наповнення: хоча аференти типу Аδ під час накопичення сечі посиляють у мозок сигнали, які б мали призвести до негайного випорожнення органа, скоротлива активність детрузора в цей час пригнічується гальмівними сигнальними речовинами з уротелію; коли ж СМ розтягується до певного значного об'єму, сила активувальних сигналів з рефлекторної дуги починає переважати над силою інгібувальних сигналів з уротеліальних клітин, і відбувається перехід до фази сечовипускання [5]. Крім того, несподівано було виявлено, що і самі ГМК детрузора теж мають здатність до рецепції розтягнення. Було показано, що цей ефект опосередковується через механочутливий двопородоменний K^+ -канал TREK-1 [58]. Фізіологічне значення цього ще одного механізму сприйняття ступеня наповненості СМ залишається незрозумілим.

Необхідно також зазначити, що сечовий міхур під час фази наповнення виявляє здатність до генерації спонтанних транзйєнтних скорочень, які можуть бути детектовані як на ізольованих м'язових смужках, так і під час здійснення тензометричного дослідження [59-61]. Лишається невідомим, чи має така особливість СМ певне значення для його функціонування чи є певного роду побічним наслідком механочутливості органа [43].

1.1.4. Електрофізіологічна характеристика ГМК детрузора.

Детрузорний міоцит, виконуючи свою центральну функцію – забезпечувати скорочення СМ – використовує у якості вихідного сигналу збільшення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} . Ці сигнальні іони можуть як надходити з позаклітинного середовища, так і мобілізуватися із саркоплазматичного ретикулуму, причому між обидвома процесами,

найімовірніше, існує позитивний зворотний зв'язок [62, 63]. У спеціальній літературі досі немає згоди щодо того, який саме з цих двох механізмів є первинним і більш фізіологічно значущим у нормальній роботі міоцита.

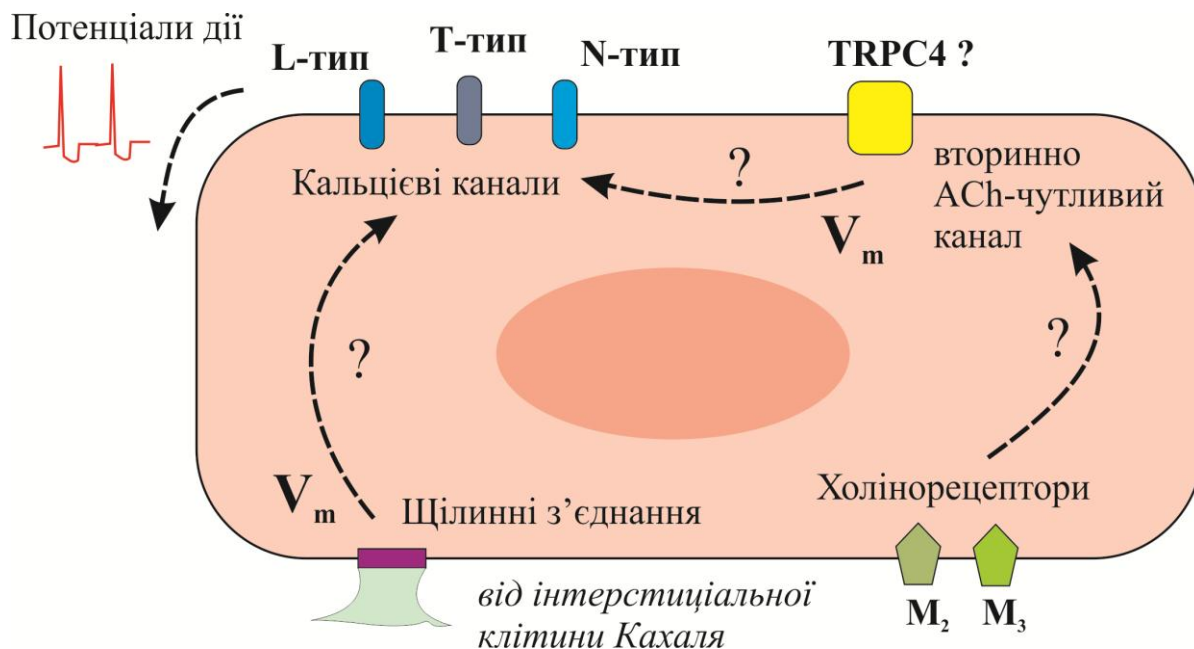


Рис. 1.3. Гіпотетичні моделі активації потенціалів дії у ГМК детрузора. За аналогією з міоцитами кишкового вважається, що активація холінорецепторів може викликати вторинний мускариновий катіонний струм (mI_{cat}), який може опосередковуватися через TRPC4, хоча електрофізіологічних доказів щодо цього немає [64, 65]. З іншого боку, деполяризація може приходити з інших клітин синцитію по щілинних контактах, наприклад, від ІКК.

Пул калієвих каналів у детрузорних міоцитах представлений білками родин K_v , K_{Ca} , K_{ir} та K_{2P} [58, 66]. Вважається, що найбільшу фізіологічну значущість з-поміж них мають Ca^{2+} -залежні канали з групи K_{Ca} , а саме їхній тип ВК, тобто K^+ -канали великої провідності в межах 122-244 пСм, хоча ці клітини також експресують іонні канали середньої (ІК) та малої (СК) провідності. Ці білки активуються у відповідь на збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} , який може мати як позаклітинне, так і депо-пов'язане походження – наприклад, надходити через

кальцієві канали L-типу або ж ріанодиновий рецептор RyR. Таким чином, вони зменшують загальну збудливість міоцита й сприяють розслабленню органа. K_{Ca} беруть участь у реполяризаційній фазі потенціалу дії ГМК, позаяк їхня блокада суттєво збільшує його тривалість і амплітуду. Крім того, ці білки беруть участь і у підтримці потенціалу спокою, оскільки, як показали електрофізіологічні дослідження, пригнічення ВК-каналів суттєво підвищує потенціал спокою м'язової клітини СМ, який у нормі складає $-30\ldots-50$ мВ. Показано, що регуляторний статус ВК-каналів змінюється в бік більшої активності внаслідок надходження норепінефрину з симпатичних нервових волокон. Цікаво також, що низка цитологічних досліджень встановили їхню кластеризацію в місцях, де саркоплазматичний ретикулум (СР) близько підходить до мембрани. ВК-канали також беруть участь у регулюванні “кальцієвих іскор” – тобто локальних підвищень концентрації іонів Ca^{2+} , в яких вони відіграють роль обривання процесу [67, 68]. Решта калієвих каналів виконують у детрузорних ГМК свої канонічні функції: двопородоменні фонові канали K_{2P} опосередковують K^+ -провідність у стані спокою для підтримання V_m у деполяризованому стані, K_v забезпечують швидке припинення потенціалу дії, а АФТ-залежні канали внутрішнього випрямлення K_{ir} гіперполяризують клітину в випадку нестачі поживних речовин [66].

Вхідні збуджувальні струми в детрузорних міоцитах, як і в будь-яких ГМК взагалі, опосередковуються виключно Ca^{2+} -каналами без жодної участі Na_v [69]. Потенціал-керовані кальцієві канали в цих клітинах представлені як високопороговою групою L-типу, так і низькопороговою Т-типу, а також Ca_v з групи N [70]. Показано, що спонтанна активність у міоцитах детрузора опосередковується саме L-каналами, у той час як блокування Т-каналів іонами Ni^{2+} не справляє на неї значного ефекту [40]. Ефектом від активації кальцієвих каналів є деполяризація плазмалеми та запуск скорочення, а також додатковий викид Ca^{2+} через RyR, хоча окремі ролі різних типів цих у цьому процесі білків залишаються неясними. Цікавим і досі невирішеним

питанням є, які саме білки викликають початкову деполяризацію мембрани у відповідь на надходження ACh, що дозволило б відкриватися і потенціал-керованим каналами (Рис. 1.4). В одному з досліджень було виявлено, що прикладання карбахолу (CCh), більш стабільного аналога ацетилхоліну, викликає два невеликі за амплітудою (20-50 пА) струми, транзйєнтний та повільний, хоча молекулярні детермінанти цих струмів лишаються невідомими (Рис. 1.4) [71]. У іншій роботі було показано, що блокування TRPC4 – йонного каналу, який опосередковує мускариновий катйонний струм (mI_{cat}) у мйюцитах кишківника – пригнйчує холйнергйчне скорочення майже повністю, проте мускариновий струм у цих клйтинах вйдсутній [65]. Крім того, в ГМК детрузора також наявні депо-залежні канали, що забезпечують надходження кальцйю в клйтину в випадку спустошення CP [72].

1.2. Йонний канал TRPV1.

Бйлок Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) є одним з тих вйдносно нещодавно вйдкритих йонних каналйв, якй, на вйдмйну вйд “класичних” потенціал-керованих каналйв, виконують не одну якусь специфйчну функцйю, а вйдйграють радше роль унйверсального функцйонального елемента, вбудованого у найрйзноманйтнйші сигнальнй каскади по всьому органйзму ссавця. Перш за все, вйн є виключно полймодальним: його активують й висока температура ($>42^{\circ}C$), й кислий pH (близько 5.0 – 6.0), й рйзноманйтнй ендогеннй лйпйди, якй об’єднується пйд назвою “ендованйлойдй”, такй анандамйд й низка продуктйв ензимйв-лйпоксигеназ [6]. Крім того, TRPV1 експресується у багатьох локацйях органйзму, куди входять нервовй, епйтелйальнй та м’язовй структури. З функцйональної точки зору, як вважається, вйн вйдйграє роль йнтегратора рйзноманйтних чинникйв, вйдповйдаючи на йхню появу пропусканням йонйв Ca^{2+} як через плазматичну мембрану, так й з внутрйшньоклйтинних депо, а також деполяризацйєю мембрани [6]. Цйкавою його рисою є також здатнйсть

до десенситизації, тобто переходу після відкривання у “тихий” стан, з якого він не може негайно вийти в стан активації і потребує періоду відновлення [73]. Хоча функціональне значення цієї здатності TRPV1, наскільки нам відомо, розглядалося в літературі відносно мало, деякими дослідниками висловлюється думка, що принаймні у аферентних нейронах дорзальних корінцевих гангліїв, де цей іонний канал виконує роль опікового ноцицептора, десенситизація допомагає швидко припиняти больовий сигнал для уникнення больового шоку й загибелі клітин внаслідок ексайтотоксичності [74]. Таким чином, TRPV1 відіграє роль сенсорного іонного каналу, який інтегрує велику кількість різноманітних стимулів і стимулює клітинну відповідь на них через Ca^{2+} -інфлюкси та електрофізіологічні механізми.

Хоча TRPV1 належить до родини іонних каналів TRP, відкритий він був окремо й вже після клонування віднесений до них з причини гомологічної подібності. Вперше цей канал був охарактеризований у ДКГ щура, де його ідентифікували як рецептор капсаїцину, пекучої активної речовини з плодів червоного перцю (*Capsicum*), за допомогою стратегії функціонального скринінгу з-поміж фрагментів-кандидатів кДНК [75]. З історією відкриття пов'язано і те, що спершу основну роль TRPV1 вбачали у рецепції високої температури у чутливих волокнах шкіри, хоча згодом список його функцій був суттєво розширений, у т.ч. і нашими роботами.

1.2.1. Будова молекули TRPV1. Як протеїн, канонічний TRPV1 являє собою гомотетрамер, тобто складається з чотирьох поліпептидів, що є продуктами одного гена. Цей іонний канал є досить великим: молекулярна вага кожної субодиниці складає 96 кДа при довжині 838 а.к. Кожен поліпептидний ланцюг наскрізь пронизує мембрану 6 разів, утворюючи в цих регіонах збагачені на гідрофобні амінокислоти α -спіралі. Крім того, між 5-м і 6-м трансмембранними регіонами (ТМ) міститься частково занурена в

біліпідний шар ділянка, яка має назву Р-петлі. Обидві крайні ділянки TRPV1, N- і С-кінцевий домени, звернені у цитозоль [76, 77].

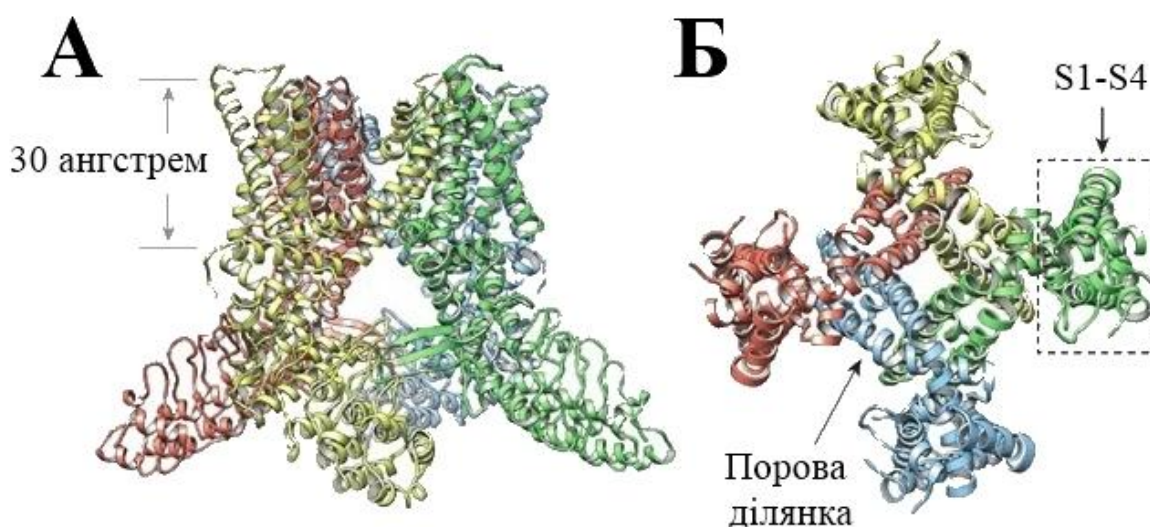


Рис. 1.5. Стрічкова діаграма, що відображає будову молекули TRPV1 у закритому стані у латеральній (А) та поздовжній (Б) проекціях. Чотири ідентичні субодиниці зафарбовані різними кольорами. Модифіковано з [77].

Просторово TRPV1 має форму глечика, звуженого посередині, з розширеними позаклітинним та особливо внутрішньоклітинним доменами (Рис. 1.5). Його іонна пора утворена амінокислотами, розташованими між ТМ-ділянками 5 і 6, а також Р-петлею [76]. Селективний фільтр, який визначає її катіонну проникність, утворений сайтами G643–D646, які звернені в позаклітинний простір [78]. Під селективним фільтром знаходиться заповнена водою порожнина, яка нижче закінчується воротами каналу. Ділянки S1-S4 мають властивості, подібні до сенсора V_m у потенціалкерованих каналів і, відповідно, задають чутливість TRPV1 до потенціалу. Реагування на високу температуру задається С-кінцевим доменом. Цікаво, що створення химерної конструкції, у якій ця ділянка TRPV1 замінена на відповідну ділянку холод-чутливого іонного каналу TRPM8, надає першому здатності активуватися у відповідь на низьку температуру – і навпаки [79]. Сайт зв'язування з капсаїцином розташовується з цитозольного боку [80, 81].

1.2.2. Біофізичні властивості та ендogenousні агоністи капсайцинового рецептора. TRPV1 утворює у мембрані пору, неселективно проникну для катіонів, найважливішими з яких є Na^+ , K^+ і Ca^{2+} . Втім, його можна вважати здебільшого кальцієвим каналом, оскільки його проникність щодо іонів Ca^{2+} на порядок перевищує відповідну величину для Na^+ ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \approx 10$), а проникність щодо іонів K^+ приблизно дорівнює такій для Na^+ ($P_{\text{K}}/P_{\text{Na}} \approx 0,96$) [78]. Електрична провідність цього іонного каналу різними авторами оцінювалася у величину від 35 до 80 пСм, що є доволі посереднім значенням з-поміж інших TRP, електрична провідність яких варіює від 16 пСм (TRPC1) до 300 пСм (TRPP5) [82]. Вольт-амперна характеристика TRPV1 відповідає його неселективній проникності для катіонів, пролягає через 0 мВ (потенціал реверсії, V_{rev}) і в певних умовах демонструє виражене вихідне випрямлення.

Найпотужнішим чинником, що активує TRPV1, є температура: за умов потенціалу спокою та фізіологічного pH 7,4 термічний поріг відкривання каналу (T_a) становить 43°C . За цією властивістю ванілоїдний рецептор 1 відноситься до групи термочутливих TRP-каналів, до якої також відносять TRPA1, TRPM8 та TRPV2-4 [82, 83]. Деякі з представників цієї групи (TRPM8, TRPV3 та TRPV4) сприймають температуру в нормальному діапазоні $20\text{--}33^\circ \text{C}$ й опосередковують відчуття прохолоди або тепла, в той час як решта відповідають за больові реакції на надмірне охолодження нижче 15°C (TRPA1) або нагрівання вище 43°C (TRPV2 та власне TRPV1). Функцію термічного сенсора в TRP-каналах, чутливих до температури, виконує С-кінцевий домен. Цікаво, що заміна зазначеної частини молекули TRPV1 на відповідну структуру TRPM8 ($T_a < 20^\circ \text{C}$) за допомогою генно-інженерних методів надає ванілоїдному рецептору 1 властивостей холодового сенсора (зокрема, $T_a < 25^\circ \text{C}$) і, навпаки, TRPM8 з С-кінцевим доменом від TRPV1 починає відповідати на високі температури ($T_a > 45^\circ \text{C}$) [79]. Варто також зазначити, що і нижчі температури, починаючи з температури тіла, здатні відкривати поодинокі TRPV1, що може бути важливим у контексті його функціонування у внутрішніх органах, у т.ч. і СМ.

TRPV1 може відкриватися у відповідь на деполяризацію, але його потенціал-залежні властивості є досить невиразними [84, 85]. Крива залежності провідності (g) цього іонного каналу від V_m є майже горизонтальною. Величина V_m , за якої досягається $\frac{1}{2}$ максимального струму через ванілоїдний рецептор 1, є далекою від тієї, що зустрічається в природних умовах та становить близько 150 мВ. Така слабка чутливість TRPV1 до мембранного потенціалу пояснюється малою величиною його воротного заряду (z), яка дорівнює 0,6-0,8 (для порівняння, в родини K_v , що можуть вважатися класичним прикладом потенціал-залежних іонних каналів, величина z становить 13), а також його делокалізованістю. [83]. Втім, вплив V_m на відкривання TRPV1 сильно залежить від температури й суттєво підвищується за її збільшення. Було показано, що зі збільшенням оточуючої t° відбувається зсув вольт-амперної характеристики праворуч, у бік нижчих потенціалів активації [86].

Значний вплив на роботу TRPV1 справляє кислотність навколишнього середовища [87]. Варто зазначити, що, як і у випадку з температурою, іони H^+ самі по собі не викликають зміни конформаційного стану іонного каналу, але суттєво зміщують криву залежності струму від активуючих чинників – капсаїцину та високої температури [88]. Зокрема, за певних експериментальних умов рН 5,2 знижує термічний поріг активації ванілоїдного рецептора 1 до кімнатної температури [89]. Це має велике значення при виникненні TRPV1-опосередкованого больового відчуття при запальних процесах, які зазвичай супроводжуються ацидозом – закисленням міжклітинної рідини [90].

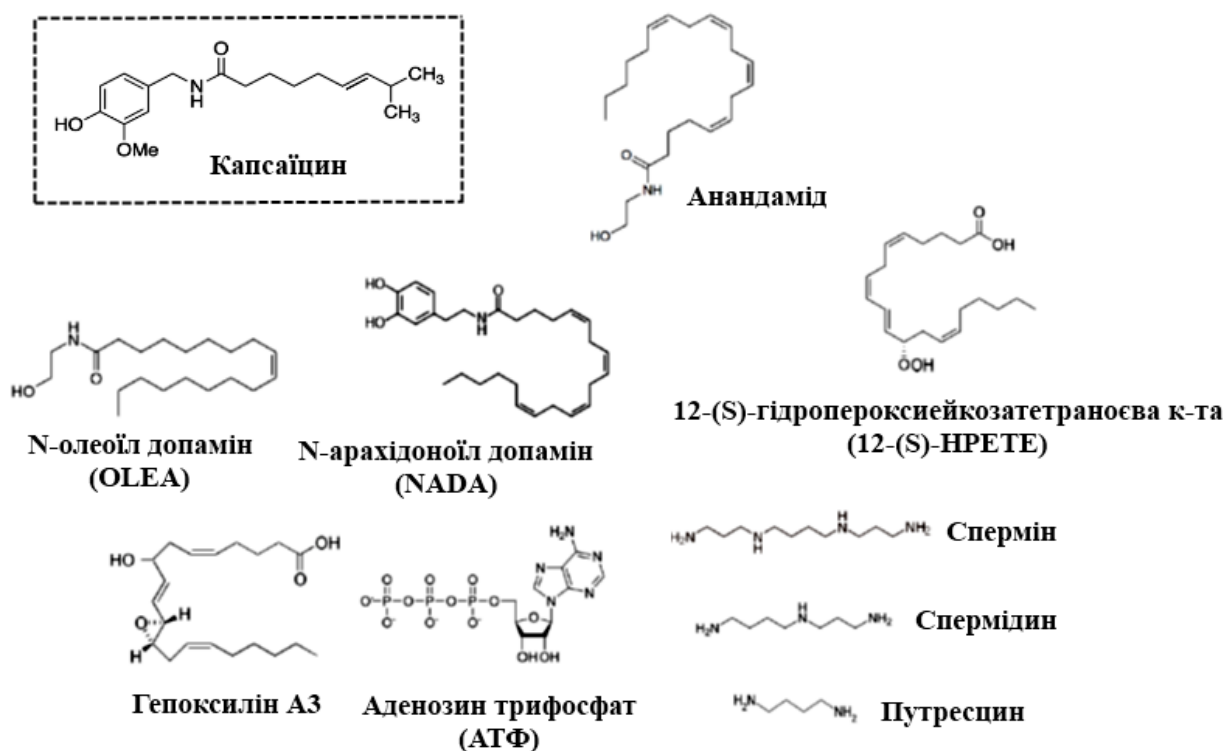


Рис. 1.6. Хімічна структура деяких з ендогенних агоністів та потенціаторів TRPV1. Формула капсаїцину наведена для порівняння. Модифіковано з [91].

Хоча, як уже зазначалося вище, TRPV1 першопочатково вважався, головним чином, рецептором високої температури в соматичних аферентах, подальші дослідження виявили цілу низку ендогенних агоністів цього іонного каналу, які здатні чинити його пряму й фізіологічно релевантну активацію (Рис. 1.6) [92]. Об'єднує їх те, що всі ці сигнальні сполуки, як і екзогенний активатор TRPV1 капсаїцин, мають ліпідну природу і здебільшого, на відміну від найкраще досліджених ліпофільних вторинних месенджерів на кшталт IP_3 , є доволі неканонічними [93]. Проте, необхідно зазначити, що через розгалуженість шляхів біосинтезу ліпідних речовин у клітині в більшості випадків лишається доволі неясним, як саме вони пов'язують активацію TRPV1 із макроскопічними процесами в організмі, хоча й висловлюється думка, що цей зв'язок має бути ретельно контрольованим, тобто стимул-залежним і швидко пригнічуваним [94, 95]. В будь-якому разі, ванілоїдний рецептор 1 може вважатися ліганд-керованим

іонним каналом, який інтегрує сигнали від внутрішньоклітинних сигнальних ліпідів.

Найбільш відомим із зазначених сполук є анандамід (N-арахідоноїлетаноламін) який раніше широко досліджувався як активатор канабіноїдних рецепторів CB₁ та CB₂. Виявлено, що анандамід використовує в якості сайту зв'язування з молекулою TRPV1 ту саму ділянку, що і КАПС. Втім, потентність цього ліганда значно поступається такій КАПС і є в 5-10 разів нижчою [96]. Було показано, що функціональне значення цього механізму може полягати в тому, що TRPV1 запускає концентраційне залежне захоплення анандамиду клітинами ендотелію [97, 98]. Анандамід є похідним арахідонової кислоти і в людини може синтезуватися кількома шляхами, які включають ензими фосфоліпазу A2, фосфоліпазу C і NAPE-PLD (N-арахідоноїл фосфатидилетаноламін фосфоліпазу D) [99]. Така значна розгалуженість цих сигнальних шляхів може свідчити про те, що інтегральна роль TRPV1 виходить за рамки власне особливостей самого іонного каналу. Цікаво, що набагато сильніший ефект на TRPV1 справляє інше похідне арахідонату, N-арахідоноїл допамін (NADA), який є еквіпотентним щодо КАПС агоністом цього іонного каналу [100].

TRPV1 може активуватися і низкою інших похідних арахідонової кислоти, які синтезуються ензимами ліпоксигеназами (ALOX). Цими речовинами є 5-(S), 8-(S), 12-(S) та 15-(S)-гідропероксиейкозатетраноеві кислоти (відповідно, 5-(S), 8-(S), 12-(S) та 15-(S)-HPETE) [101, 102]. Показано, що серед цих ліпоксигеназних продуктів саме 12-(S)-HPETE має найбільшу потентність щодо цього іонного каналу. Більше того, подальше перетворення цієї сполуки призводить до синтезу гепоксилінів A3 та B3, щодо яких також є непрямі свідчення на користь агонізму до TRPV1 [103].

Варто також зазначити, що докази на користь функціонування описаних вище ліпідних сполук як активаторів TRPV1 не обмежуються лише демонстрацією їхнього агонізму *in vitro*, тобто методами петч-клемп або кальцієвої візуалізації. Низка робіт свідчить, що введення деяких із цих

речовин піддослідним тваринам, перитонеально або в лапку, викликають характерні TRPV1-опосередковані відповіді, такі як температурна алодинія або больова поведінка, причому цей ефект знімається одночасним введенням блокаторів зазначеного іонного каналу або використанням *Trpv1*^{-/-}-мишей.

Крім того, декілька інших ендогенно продукованих вторинних посередників можуть призводити до потенціації TRPV1 [104]. Лишається незрозумілим, наскільки такі ефекти є значущими у живій клітині, оскільки, як уже зазначалося, межа між потенціацією та активацією щодо TRPV1 є доволі розмитою, позаяк пусковим фактором у будь-якому разі є потенціал мембрани.

1.2.3. TRPV1 у клітинному контексті. Ванілоїдний рецептор може впливати на функціонування клітини кількома шляхами. При своїй значній електричній провідності й створюваних ним струмах у 1-2 нА він може відігравати роль основного фактора, який запускає потенціали дії (ПД) [84, 105]. Показано, що в умовах електрофізіологічного експерименту аплікація його агоніста КАПС у субмаксимальній концентрації 1 мкМ здатна викликати серію ПД у аферентному нейроні [106]. Таким чином, TRPV1 може слугувати тригерним іонним каналом, який викликає в клітині події, що відбуваються за принципом “все або нічого”. Цікаво, що така “динамічна” роль цього білка була показана не лише для нейронів ДКГ, а й для деяких інших термочутливих структур, зокрема для супраоптичних магноцелюлярних нейросекреторних нейронів [107]. Втім, невідомо, чи може TRPV1 слугувати таким самим тригером у рецепції будь-яких своїх активувальних факторів, окрім температури. Одним зі свідчень на користь цього може бути те, що, як було показано, при культивуванні нейронів ДКГ у присутності фактора росту нервів (NGF) у цих клітинах можуть виникати спонтанні ПД, які блокуються антагоністами TRPV1 капсазепіном та ВСТС [108].

З іншого боку, у багатьох випадках TRPV1 може функціонувати радше як “пермісивний” компонент сигнального шляху, не зазнаючи масової активації у відповідь на надходження стимулу, а натомість полегшуючи виконання тригерної функції для інших іонних каналів шляхом зсуву V_m ближче до порогу їхньої активації. Зокрема, відомо, що окремі канали цього типу транзйєтно переходять у відкритий стан навіть за фізіологічних температур у 37° С [109]. Кількість таких поодиноких відкриттів може змйєнуватися в залежності від наявності численних активаторів капсаїцинового рецептора, що може слугувати важелем тонкої регуляції клітиною своєї активності. До функцій, які можуть здійснюватися TRPV1 за цим принципом, можуть належати контроль дозрівання кардіоміоцитів або ж модуляція активності синапсів [110, 111].

Важливою стороною впливу TRPV1 на клітину є його значна проникність для іонів Ca^{2+} . Було продемонстровано, що зміни кальцій-залежної флуоресценції у відповідь на прикладання КАПС у різних типах клітин можуть мати характер швидкого пікоподібного стрибка із тривалістю 30-50 мсек, градуального наростання із подальшим спадом впродовж 1000-2000 мсек або навіть повільного збйєшення з виходом на плато, що, очевидно, залежить від кількості TRPV1, експресованого у клітині, та його регуляторного статусу [112-114]. Донедавна вважалося, що TRPV1 може виконувати свою роль провідника Ca^{2+} , лише пропускаючи цей іон через плазмалему з позаклітинного середовища, але дослідження останнього десятиріччя показали можливість його локалізації у внутрішньоклітинних кальцієвих депо, наприклад, у скелетних м’язах[115]. Бйєльше того, було отримано непрямі дані, що TRPV1 може в певних випадках локалізуватися в мітохондріях, зокрема в мікроглії головного мозку[116].

1.3. Діабетична дисфункція сечового міхура.

1.3.1. Пошкоджувальні фактори при ЦД. Глюкоза сама по собі не є токсином у тому сенсі, що вона не зв'язується з певними конкретними білками, такими як ензими “домашнього господарства” чи іонні канали, блокуючи протікання життєво важливих процесів, як це роблять найбільш широко відомі отрути – ціаніди, оксид вуглецю II, кураре тощо. Проте у великих концентраціях вона таки набуває токсичних властивостей, викликаючи найбільш важкі з симптомів ЦД, які в спеціальній літературі називаються “вторинними ускладненнями” і до яких відносяться ретинопатія з подальшою сліпотою, кардіоміопатія з подальшими збоями в роботі серця, васкулопатія з подальшим порушенням кровопостачання кінцівок і широким некрозом, що приводить до їхньої втрати тощо. Механізми глюкотоксичності розмаїті й включають неферментативне глікування, надпродукція гексозамінового біосинтетичного шляху, надмірний синтез диацилгліцеролу (ДАГ), гіперактивність поліолового шляху й електрон-транспортного ланцюга, кетоацидоз (Рис. 1.7).

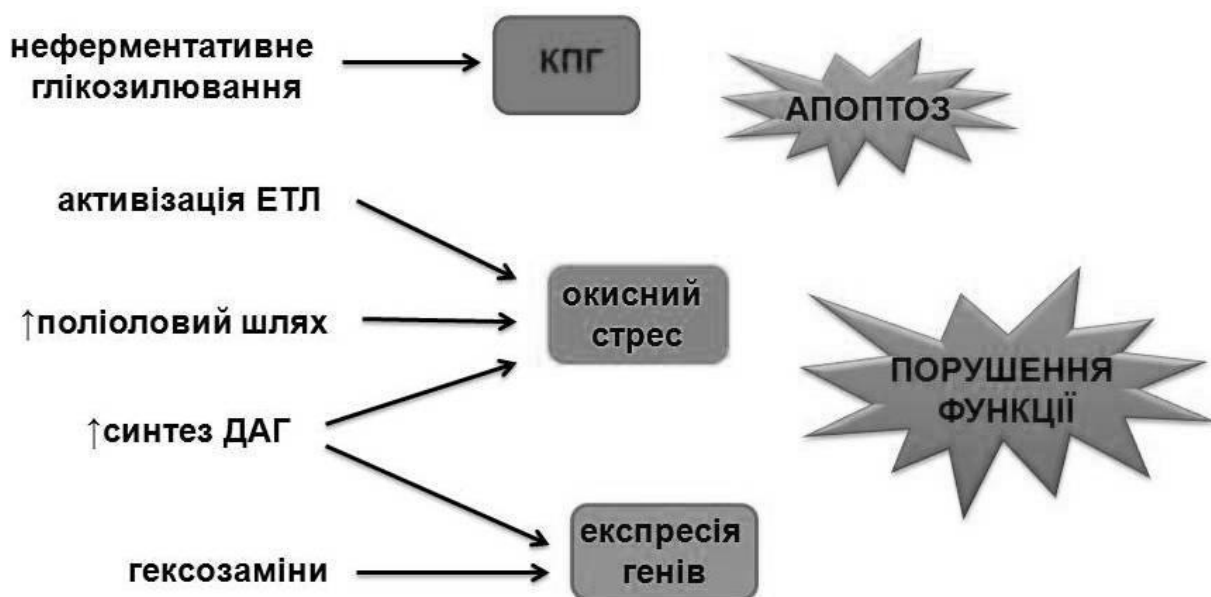


Рис. 1.7. Фактори, які спричиняють вторинні ефекти гіперглікемії при ЦД.

Неферментативне глікування відбувається у зв'язку зі значною реакційною здатністю глюкози як хімічної сполуки, яка містить у своєму складі п'ять спиртових ($-OH$) груп. Ковалентно зв'язуючись із найрізноманітнішими білками, вона викликає порушення їхньої конформації та, як наслідок, дисфункцію, причому процес цей є цілком стохастичним, непередбачуваним та масштабним. Іншим фактором, що спричиняє масове порушення нормальної роботи білків при ЦД, є надлишкова активність гексозамінового біосинтетичного шляху (ГБШ). Цей ензиматичний каскад перетворює глюкозу на низку проміжних продуктів, які необхідні для посттрансляційної модифікації протеїнів, такої як глікозилювання, а також беруть участь у синтезі низки складних сполук – гліколіпідів, протеогліканів тощо. Таким чином, збільшення концентрації субстрату ГБШ і його продуктів спричиняє збої в регуляції різноманітних білків. Підвищення синтезу ДАГ пов'язане з тим, що ця сигнальна молекула синтезується з дигідроксиацетонфосфату – проміжного продукту гліколізу. Найголовнішим наслідком такого ефекту є гіперфункція протеїнкінази С (РКС), через що найрізноманітніші білки зазнають фосфорилування й різноспрямованих функціональних альтерацій. Зокрема, гіперфункція НАД(Ф)Н-оксидази через дію РКС робить внесок у окисний стрес, який є одним із головним механізмів глюкотоксичності. Проте головним фактором, який спричинює надпродукцію активних форм кисню (АФК), є викликана гіперглікемією надмірна робота електрон-транспортного ланцюга (ЕТЛ), що збільшує окисне навантаження на клітину, виснаження її антиоксидантних систем та пошкодження білків і ДНК. Ще одним механізмом глюкотоксичності є поліоловий шлях – ензиматичний каскад, що здійснює синтез фруктози. Було показано, що за умов ЦД продукція цього шляху зростає не лише через власне збільшення концентрації його субстрату – глюкози, а й через гіперфункцію одного з ключових ензимів каскаду – альдозоредуктази, внаслідок чого частка глюкози, яка спрямовується по поліоловому шляху, зростає від нормальних кількох відсотків до 11-33%. Через ці ефекти

виснажуються клітинні резерви НАДФН, що також сприяє погіршенню окисного стресу. Нарешті, кетоацидоз викликаний утворенням низки кетонових сполук, що підвищують осмотичність тканинних рідин до >320 мОсм та зменшують їхній рН до 7,3-7,0, що саме по собі є вкрай несприятливими умовами для виживання будь-яких клітинних типів.

Крім цих впливів, які є прямим наслідком гіперглікемії, діабетичні альтерації в роботі клітин викликаються безпосередньо їхнім енергетичним голодуванням. При обох типах ЦД спостерігається парадоксальна ситуація, коли підвищений рівень глюкози в тканинних рідинах супроводжується її низьким надходженням безпосередньо в цитозоль клітин-споживачів, причому при діабеті I типу це викликано порушенням у “позаклітинному” компоненті інсулінового сигнального шляху, а при цій же хворобі II типу – гіпофункція його “внутрішньоклітинного” компоненту.

Таким чином, низка біохімічних порушень при ЦД призводять до окисного стресу, масового збою в функціонуванні сигнальних і робочих білків, апоптозу найбільш чутливих клітин і порушень у роботі більшості органів.

Розділ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Піддослідні тварини. Для усіх досліджень, представлених у роботі, було використано загалом 127 щурів лінії Wistar, самців віком 3 міс. і масою тіла 200-250 г. Всі експериментальні процедури проводились у відповідності до Директиви ЄС 2010/63/EU «Стосовно захисту тварин, що використовуються у наукових цілях» і вказівок інститутського біотичного комітету (дозвіл №1/13 від 15.03.2013). Тварини утримувались у віварії Інституту фізіології ім. Богомольця на стандартному кормі й водогінній воді, доступ до яких вони мали *ad libitum*. Присипляння щурів проводилося інгаляторним методом за допомогою CO₂-збагаченої атмосфери або діетилового ефіру, після чого здійснювалося їхнє забивання шляхом декапітації за допомогою гільйотини.

2.2. Приготування препаратів гостроізолюваних клітин.

2.2.1. Ізолювання гладеньком'язових клітин детрузора. Після присипляння та декапітації з піддослідної тварини ретельно зливалася кров, яка інакше утруднювала б пошук СМ у черевній порожнині. Щур фіксувався на пінопластовій підложці шприцевими голками за кінцівки, черевом догори. Спершу за допомогою хірургічних ножиць і пінцета видалявся хутрянний шар, аби уникнути забруднення клітинного препарату волосками, після чого м'язовий шар також вирізався, щоб відкрити доступ до внутрішніх органів. Необхідно зазначити, що, позаяк сечовий міхур є безколірним органом і його ідентифікація на фоні довколишньої жирової тканини інколи може бути проблематичною, його пошук здійснювався з орієнтацією на сполучнотканинну зв'язку, якою він приєднаний безпосередньо до передньої

черевної стінки. СМ вирізався за допомогою мікрохірургічних інструментів і поміщався в охолоджений безкальцієвий Glu-розчин.

Для очистки від уротеліального шару й залишків сполучної тканини СМ розрізався поздовжньо й фіксувався за допомогою ентомологічних голок на восковій підложці. Уротелій та кровоносні судини на внутрішній стінці ретельно видалялися за допомогою мікрохірургічних ножиць під контролем стереоскопічного мікроскопа МБС-9 (ЛОМО), після чого детрузор розрізався на квадратні шматочки розміром 0,5-1 мм для полегшення доступу протеаз при подальшій ензиматичній обробці.

Розпорошування м'язової тканини на окремі гладеньком'язові клітини (ГМК) здійснювався у два етапи. На першому шматочки детрузора піддавалися дії наступних реагентів: 1 мг/мл папаїну, який є відносно слабкою протеазою, 1 мг/мл дитіотреїтолу (ДТТ), що має сильні відновні властивості й руйнує S-S містки в білках, та 1 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну (БСА), який виконує в даному випадку цитопротекторну функцію. Обробка тканини цією сумішшю здійснювалася впродовж 25 хв. при 37° С у безкальцієвому Glu-розчині при постійному перемішуванні на магнітному шейкері. Після цього тканина піддавалася м'якому піпетуванню, в результаті якого розпад на окремі ГМК не відбувався, проте вона набувала явного «пухнастого» вигляду, що свідчило про початок руйнування міжклітинного матриксу. Для очистки від відпрацьованого ензиматичного розчину тканина центрифугувалася при 200 g протягом 4 хв., після чого супернатант зливався. На другому етапі шматочки детрузора оброблялися наступними реагентами: 0,5 мг/мл колагенази II, яка володіє відносно великою протеолітичною активністю, 0,5 мг/мл інгібітора трипсину, що послаблював цитотоксичну дію протеази, та 1 мг/мл БСА. Тканина оброблялася цією сумішшю протягом 20 хв. при 37° С у Glu-розчині, який містив 100 мікроМ CaCl_2 . Останнє було зроблено з тих міркувань, що, по-перше, колагеназа II є кальцій-залежним ферментом і її активність у повністю безкальцієвих розчинах суттєво падає і, по-друге, з метою поступового підвищення $[\text{Ca}^{2+}]$ у позаклітинному

середовищі, аби уникнути кальцієвого шоку в досліджуваних ГМК при переносі в розчин Тіроде. Після ретельного піпетування більша частина тканини розпадалася на окремі клітини, критерієм чого було характерне помутніння розчину. Припинення дії протеази досягалося центрифугуванням клітинної суспензії при 200 g впродовж 4 хв., зливанням супернатанта і заміною його на свіжий Glu-розчин зі 100 μ M CaCl_2 . Робоча суспензія зберігалася за температури 4° C не більше ніж 4-6 год і забиралася в експеримент порціями по 200-300 мкл.

2.2.2. Ізолювання аферентних нейронів ДКГ. Після наркотизації, декапітації та якомога ретельнішого зливання крові піддослідна тварина фіксувалася на пінопластовій підложці за допомогою шприцевих голок, якими протикалися кінцівки, спиною догори. Слід зазначити, що при виділенні цього типу тканинного матеріалу заливання робочої області залишковою кров'ю особливо утруднює подальшу процедуру, тому пінопластова підложка виготовлялася з ніжками, які забезпечували її нахил відносно поверхні столу на $\sim 20^\circ$. Таким чином залишкова кров з щура, який фіксувався завжди шиєю донизу, відтікала від спинномозкового каналу й не заливала робочу область. Хутряний покрив видалявся з усієї спини, аби не допустити контамінації клітинного препарату волосинами, після чого м'язовий шар також надрізувався з обох боків від хребта за допомогою скальпеля. Доступ до дорзальних корінцевих гангліїв, що локалізовані у стінках хребців, забезпечувався розсіченням хребта за допомогою хірургічних ножиць, причому при роботі з СМ-специфічними нейронами розрізання починалося з лумбарного відділу, орієнтуючись на грудну клітку, а при роботі з тотальними препаратами нейронів ДКГ – безпосередньо з отвору, який залишився після відсічення голови. Ідентифікація гангліїв L6 і S1, що містять нервові клітини, які іннервують сечовий міхур, проводилася шляхом відрахунку від останнього торакального хребця, ознакою якого вважалася наявність прикріпленого до нього ребра. ДКГ видалялися зі своїх

гнізд за допомогою мікрохірургічних пінцета й ножиць, поміщувалися в охолоджений безкальцієвий розчин Тіроде, очищалися від залишків нервів та сполучної тканини, після чого розрізалися кожен на 2-4 частини для кращого доступу протеаз при подальшій ензиматичній обробці.

Нервова тканина розпорошувалася на окремі клітини за допомогою колагенази Ia у концентрації 1 мг/мл та трипсину у концентрації 2 мг/мл, що розчинялися у стандартному розчині Тіроде. Ензиматична обробка тривала 27 хв. і проводилася при 37° при постійному перемішуванні на магнітному шейкері. Після цього тканина піпетувалася, що забезпечувало її майже повний розпад на окремі нейрони, і протеази видалялися шляхом подвійного центрифугування при 200 g із подальшим зливанням розчину й заміною його на свіжий. Отримана клітинна суспензія зберігалася при 4° C не більше ніж 4-6 год. після виділення і забиралася в експеримент порціями по 100-200 мкл.

2.3. Електрофізіологічні вимірювання. Реєстрація електричних явищ на плазмалемі, зокрема інтегральних макроскопічних трансмембранних струмів (I_{Σ}), TRPV1-опосередкованих струмів (I_{TRPV1}) та мембранного потенціалу (V_m), здійснювалася за допомогою методу петч-клемп у конфігурації «ціла клітина». Для цього використовувалася електрофізіологічна установка, що складалася з підсилювача PC-ONE з аналогово-цифровим перетворювачем DigiData 1200 (Dagan Instruments), інвертованого світлового мікроскопа з фазовим контрастом IX71 (Olympus), моторизованого п'єзоелектричного мікроманіпулятора MP-225 (Sutter Instrument), проточної аплікаційної системи та камери Фарадея. Збір та первинна обробка результатів здійснювалася у програмному забезпеченні pClamp 8.0 (Axon Instruments). Мікропіпетки для вимірювань виготовлялися з боросилікатних скляних капілярів з внутрішнім діаметром 0,86 мм та зовнішнім діаметром 1,5 мм, оснащених внутрішнім філаментом і з попередньо оплавленими кінцями для захисту AgCl_2 -покриття електрода від пошкодження при фіксації мікропіпетки (WPI або Sutter Instrument).

Виготовлення мікропіпеток здійснювалося за допомогою пулера Р-97 (Sutter Instrument). Для покращення адгезії до клітинної мембрани робочі кінці мікропіпеток піддавалися додатковій термічній обробці (fire-polishing) за допомогою розжареного платинового дроту. Після заповнення внутрішньоклітинним розчином мікропіпетки демонстрували опір 3-5 МΩ.

Впродовж експерименту клітини утримувалися в розчині Тіроде при кімнатній температурі в 18-22° С на круглих покривних скельцях, зафіксованих у вимірювальній камері, або на кришках від пластикових чашок Петрі. Варто зазначити, що кришкам була надана перевага перед самими чашками Петрі через їхні низькі бортики, що спрощувало доступ до клітин вимірювальним мікроелектродом. Після занурення вимірювального мікроелектрода у перфузійний розчин здійснювалася компенсація дифузійного потенціалу, робочий кінчик мікропіпетки приводився у контакт із плазмалею досліджуваної клітини та наданням негативного тиску встановлювався гігаомний контакт. Згодом проводилася компенсація ємнісних транзієнтів, прорив клітинної мембрани та компенсація до 80% послідовного опору.

Після встановлення окресленої експериментальної конфігурації здійснювалася реєстрація I_{Σ} , що проводилась у режимі фіксації потенціалу за допомогою електрофізіологічного протоколу типу «епізодична стимуляція». Кожен епізод стимуляції мав тривалість 300 мс і був відділений від наступного 2-секундним періодом відновлення, за якого V_m підтримувався на значенні -60 мВ, що є близьким до фізіологічного потенціалу спокою. Електрофізіологічний протокол мав три фази і був складений таким чином, аби забезпечити майже одночасне вимірювання амплітуди I_{Σ} при стаціонарних значеннях командного потенціалу (V_{comm}) +50 і -100 мВ та побудову вольт-амперної характеристики (ВАХ) досліджуваного іонного каналу. Для цього він включав деполяризаційну фазу типу «сходінка», за якої V_{comm} підтримувався на значенні +50 мВ впродовж 100 мс, далі фазу типу «низхідна лінійна рампа», за якої мембранний потенціал монотонно

знижувався від +50 мВ до -100 мВ впродовж 100 мс, і кінцеву гіперполяризаційну фазу типу «сходінка», за якої V_{comm} підтримувався на значенні -100 мВ впродовж 100 мс. Збір даних від однієї клітини зазвичай тривав протягом 30-50 епізодів стимуляції, включаючи стадії прикладання фармакологічних агентів та відмивки. У окремих випадках описаний протокол використовувався у інвертованому вигляді.

Для прикладання фармакологічних агентів вивідна трубка аплікаційної системи підводилася у безпосередню близькість (бл. 50-100 мкм) до досліджуваної клітини, після чого здійснювалася контрольне прикладання розчину Тіроде впродовж 3-5 епізодів стимуляції. Цей етап був необхідний для того, аби виключити з кінцевих результатів можливі механоактивовані струми, які могли б виникнути через дію на клітину потоку рідини з аплікаційної трубки, а також артефакти, пов'язані з можливим порушенням гігаомного контакту і виникненням струму витічки (I_{leak}) у місці адгезії мікропіпетки й плазмалеми. Аплікація будь-яких активаторів чи інгібіторів починалася негайно після зазначеної передпромивки й тривала до отримання максимальної відповіді клітини на фармакологічний агент. У експериментах з двома фармакологічними агентами (напр. НП-Na та L-цистеїну) їхнє прикладання здійснювалося одночасно, з двох різних ємностей, але з меншим тиском порівняно до ємності з контрольним розчином Тіроде. Специфічний компонент струму (напр. I_{TRPV1}), викликаний фармакологічним агентом, отримувався шляхом віднімання значень I_{Σ} , отриманих під час контрольного прикладання розчину Тіроде, від відповідних значень I_{Σ} при аплікації цього фармакологічного агента.

Для уникнення впливу фактору розміру клітини на кінцевий результат всі значення I_{Σ} та I_{TRPV1} нормалізувалися на ємність клітинної мембрани (C_m) і представлялися як щільність струму (пА/пФ), при цьому експериментальне вимірювання C_m проводилося виходячи з наближення сферичного конденсатора. Побудова ВАХ іонного каналу TRPV1 здійснювалася простим співставленням значень V_{comm} та I_{TRPV1} , отриманими під час рампової фази

електрофізіологічного протоколу, за допомогою програмного забезпечення Origin 8.5.

2.4. Визначення фактичної або кількісної експресії генів. Для визначення наявності транскриптів *Trpv1* у досліджуваних тканинах або вимірювання його рівня експресії були використані, відповідно, методи канонічної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з подальшою візуалізацією агарозним електрофорезом та ПЛР у реальному часі (RT).

2.4.1. Екстракція тотальної РНК. Зразки тканин масою 30-60 мг відбиралися за допомогою торсійних терезів та хірургічних інструментів, попередньо стерилізованих автоклавуванням, після чого гомогенізувалися шляхом заморожування у рідкому азоті з подальшим ретельним розтиранням за допомогою фарфорових ступки й товкачика. Отриманий гомогенат негайно змішувався із комерційною сумішшю для екстракції РНК RNeasy[®] RT (Qiagen) у розрахунку 1 мл на 100 мг тканини. Осадження тотальної РНК здійснювалося шляхом додавання ізопропанолу у пропорції 1:1 з подальшим центрифугуванням на 12,000 g протягом 10 хв. Преципітат РНК додатково двічі промивався 75% етанолом для очищення від залишків клітинного дебрису із центрифугуваннями на 4000 g протягом 2 хв. і розчинявся у вільній від РНКаз деіонізованій воді. Наявність РНК, її чистота та концентрація вимірювалися за допомогою спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

2.4.2. Зворотна транскрипція і синтез кДНК. Екстрагована тотальна РНК використовувалася для синтезу на її матриці кДНК для подальшого аналізу. Для зворотної транскрипції був застосований комерційний набір RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific). Коротко, з кожного зразка відбирався об'єм, який відповідав 600 нг тотальної РНК, і змішувався з розчином оліго-(dT)₁₈ та випадкових гексамерів. Обидва

типи праймерів були використані одночасно для збільшення ефективності зворотної транскрипції. Синтез першого ланцюга забезпечувався додаванням до реакційної суміші ревертази M-MuLV і розчину з чотирма дНТФ, а також низки допоміжних реагентів, таких як інгібітор РНКаз RiboLock та реакційний буфер, після чого суміш інкубувалася впродовж 60 хв. при 42° С. Завершення реакції досягалося інкубацією суміші при 70° протягом 5 хв., що забезпечувало термічне руйнування ревертази. Отримана кДНК в подальшому використовувалася для ампліфікації.

2.4.3. ПЛР та агарозний гель-електрофорез. Для встановлення фактичної експресії гена *Trpv1* у досліджуваних тканинах був застосований метод ПЛР із візуалізацією у агарозному гелі. Первинна розробка праймерів була здійснена за допомогою програмного забезпечення NCBI/Primer-BLAST, а їхня додаткова валідація була проведена із використанням програми FastPCR 4.0.13 таким чином, щоб параметр “Primer quality” був не нижче за значення 70. Послідовності праймерів для ампліфікації цільових фрагментів *Trpv1* та рефересного гена *Actb* представлені у Табл. 1. Необхідно зазначити, що ген *Actb*, що кодує β-актин, був обраний в якості рефересного на основі наших попередніх досліджень стосовно стабільності експресії генів за умов цукрового діабету (дані не опубліковано) з чотирьох генів-кандидатів (*Actb*, *Rpl13a*, *Gapdh* та *Tbp*). Реакційна суміш для проведення ПЛР складалася з 10x Taq-буфера, 5 од. акт. ДНК-полімерази Taq, 10 пкмоль кожного праймера, 0,2 мМ дНТФ та 2,5 мМ MgCl₂ (всі реагенти отримані від Thermo Fisher Scientific), а також кДНК. Ампліфікація здійснювалася за допомогою термоциклера T-CY (Creacon) згідно з наступним протоколом: «гарячий старт» ДНК-полімерази при 95° С протягом 15 хв., далі 45 циклів, протягом яких впродовж 31 с при 95° С відбувалася денатурація ДНК, потім впродовж 31 с при 61,5° С здійснювалася гібридизація праймерів, потім протягом 31 с при 72° С проводилася елонгація, після чого проходила фінальна стадія при 72° С впродовж 7 хв. Для візуалізації результатів ПЛР в

лунки 2,5%-агарозного гелю з бромистим етидієм в TBE-буфері вносили суміш ДНК з комерційним 6-кратним буфером для завантажування (Thermo Fisher Scientific), прикладали напругу 5-10 В/см та, після електрофоретичного розділення фрагментів ДНК, спостерігали отримані амплікони в УФ-променях за допомогою трансільюмінатора.

2.5. Ретроградне флуоресцентне мічення нейронів. Оскільки дорзальні корінцеві ганглії L6-S1, як відомо, іннервують не лише сечовий міхур, а й низку інших внутрішніх органів та соматичних структур [ref], для дослідження СМ-специфічних соматосенсорних нейронів було застосовано підхід ретроградного мічення ліпофільними флуорофорами. Цей метод полягає в тому, що флуоресцентний барвник гідрофобної природи вводиться безпосередньо в орган інтересу, одразу включаючись, завдяки своїй гідрофобності, у клітинні мембрани оточуючих клітин та дистантних клітинних структур (напр. аксонів нейронів, соми яких розташовані поза межами досліджуваної тканини). Дифундуючи вздовж нервових закінчень впродовж, зазвичай, декількох днів або тижнів, флуорофор досягає соми нейрона і зафарбовує її, таким чином даючи змогу ідентифікувати його з-поміж інших клітин за допомогою флуоресцентної мікроскопії. У нашому дослідженні було використано протокол, модифікований на основі праць Dang et al. [ref] і заснований на використанні барвника 1,1'-діоктадецил-3,3,3',3'-тетраметиліндокарбоцианінперхлорату (DiI-C18(3)).

2.5.1. Хірургічна операція та введення барвника у СМ. Діабетичних і контрольних піддослідних тварин, які попередньо голодували впродовж доби, піддавали глибокій наркотизації сумішшю кетаміну (76 мг/кг маси тіла, Фармак) та комбістресу (0,1 мг/кг маси тіла, Фармак), що її вводили інтраперитонеально. Щурів іммобілізували на пінопластовій підложці, розтягуючи за кінцівки ниткою, фіксованою на шприцевих голках. З міркувань асептичності всі подальші маніпуляції проводили під витяжною

шафою, попередньо стерилізованою за допомогою УФ-лампи, яку вмикали впродовж ночі перед здійсненням хірургічної операції. Доступ до СМ досягався проведенням нижньої лапаратомії по білій лінії, причому довжина розрізу не перевищувала ~1 см задля подальшого скорішого одужання піддослідної тварини. Хірургічні інструменти стерилізувалися УФ-променями і, додатково, триманням у полум'ї спиртового пальника безпосередньо перед використанням. За допомогою мікрошприця Гамільтона з голкою калібру 26 безпосередньо в стінку сечового міхура вводився розчин DiI-C18(3) (Life Technologies) у чистому ДМСО у концентрації 50 мг/мл. Ін'єкція здійснювалася у 5-8 різних точок порціями по 1 мкл, а всі видимі витічки флуоресцентного барвника негайно прибиралися ватним тампоном. Розрізи черевної стінки і хутряного шару ретельно зашивалися косметичним прихованим швом для уникнення його розгризання щуром, після чого додатково оброблялися 5% йодним розчином Люголя для запобігання ранового сепсису. Піддослідні тварини одужували 2-3 тижні на дієті, збагаченій білком, після чого забивалися для виділення і електрофізіологічного дослідження нейронів ДКГ.

2.5.2. Флуоресцентна мікроскопія ізольованих нейронів ДКГ.

Відомо, що пікова довжина хвилі, на якій відбувається збудження флуорохрому DiI-C18(3), складає 549 нм, в той час як найбільша сила випромінювання припадає на 565 нм. Повна спектральна діаграма щодо абсорбції та емісії цього барвника, надана виробником, відображена на Рис. 1. Відповідно до неї був підібраний набір з двох фільтрів, оранжевого та зеленого кольорів, та дихроїчного дзеркала. Для збудження флуоресценції використовувалася ртутна лампа потужністю 100 Вт з джерелом живлення U-RFL-T (Olympus).

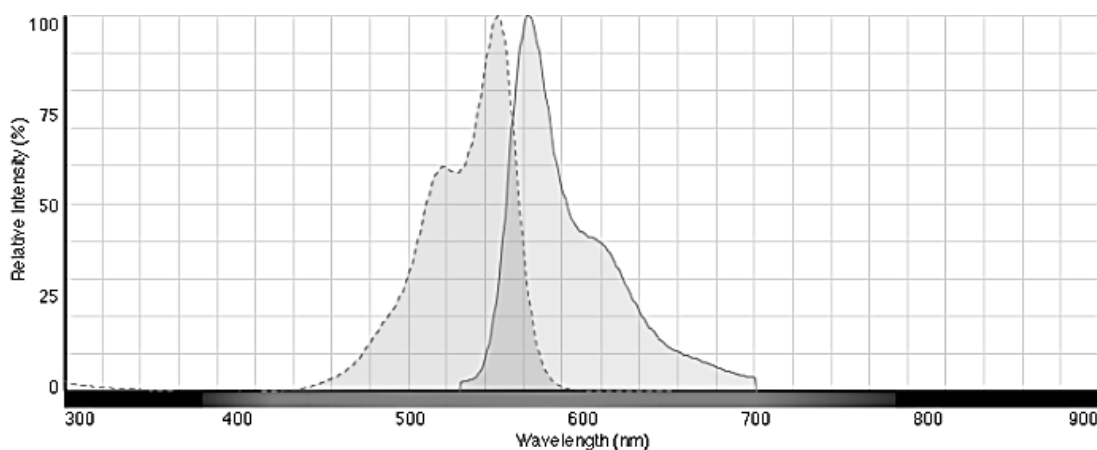


Рис. 2.1. Довжини хвиль поглинання й випромінювання трейсера DiI-C18(3).

2.6. Стрептозотоцинова модель цукрового діабету. Для створення експериментального цукрового діабету у піддослідних тварин був використаний стрептозотонин (STZ), який є специфічно токсичним для інсулін-продукуючих β -клітин підшлункової залози через наявність на їхніх мембранах значної кількості глюкозних транспортерів GLUT-2, які також опосередковують проникнення і самого STZ у цитозоль клітини. Таким чином, гіперглікемія та її численні наслідки, які й складають клінічну картину ЦД, у стрептозотоциновій моделі первинно викликаються саме нестачею інсуліну, а не резистентністю тканин до його дії, через що багатьма авторами ця модель вважається відтворенням I типу цього захворювання. Проте, на нашу думку, цей погляд є некоректним: незважаючи на те, що етіологія інсулін-залежного ЦД лишається нез'ясованою, відомо, що в людини він є автоімунним захворюванням, при якому руйнування β -клітин острівців Лангерганса спричиняється атакою на них з боку власної імунної системи організму, а не токсичною дією екзогенних чинників. У той же час, первинні симптоми та вторинні ускладнення, що супроводжують як I, так і II тип цієї хвороби, викликаються саме підвищеним рівнем глюкози в крові й тканинних рідинах, а не власне факторами, що лежать у основі цих двох синдромів. Виходячи з цього, ми схильні вважати STZ-індукований діабет

моделлю патофізіології вторинних ускладнень ЦД, а не якогось конкретного типу цього захворювання.

Щурі лінії Wistar віком 3 міс. з масою тіла 200-250 г випадковим чином розподілялись на дві дослідні групи ($n = 26$ у групі з ЦД і $n = 14$ у контрольній групі). Робочий розчин STZ з концентрацією 10 мМ готувався *ex tempore* на основі 100 мМ охолодженого ацетатного буфера із рН 4.5. Необхідність використання кислого розчину пояснюється тим, що введення стрептозотоцину, розчиненого у воді, з нез'ясованих причин є летальним для тварин [Kandimalla, персональне повідомлення]. Використання ж щораз свіжого й охолодженого розчину пов'язане з тим, що STZ є нестійким у середовищах з кислим рН і швидко розкладається із вивільненням NO. Інтраперитонеальне введення стрептозотоцину здійснювалося разово у розрахунку 42 мкг/кг маси тіла, при чому тварини перед ін'єкцією піддавалися голодуванню впродовж доби. Контрольна група отримувала ін'єкцію відповідного об'єму ацетатного буфера. Ефективність індукції ЦД перевірялася через 3 доби після введення STZ за допомогою глюкометра Rightest GM110 (Biomine), кров для чого забиралася у піддослідних тварин шляхом зрізання кінчика хвоста. Критерієм початку діабету вважався рівень глюкози у крові не нижчий за 16 ммоль/л. У експеримент тварини забиралися між 4-м і 12-м тижнями після ін'єкції STZ.

2.7. Тензометрія на гладеньком'язових смужках. Після ізолювання з тіла забитої тварини СМ поміщався у нагрітий до 37° С і карбогенізований розчин Кребса й поздовжньо розрізався від шийки органа до його склепіння, після чого з нього виготовлялися гладеньком'язові смужки завдовжки ~7 мм і завширшки ~2 мм (у розслабленому, але не розтягнутому стані). Отримані препарати піддавалися очищенню від уротелію під контролем стереоскопічного мікроскопа МБС-9 (ЛОМО), яке в цьому випадку здійснювалося вже після нарізання смужок для збільшення ефективності цієї процедури, позаяк залишки епітеліальної тканини з її здатністю до

механорецепції та вивільнення АТФ і оксиду азоту могли внести суттєві артефакти в подальші вимірювання скоротливості. Смужки м'язової тканини поміщалися в тензометричний пристрій, причому один їхній кінець був закріплений нерухомо, а другий приєднувався до ємнісного силового сенсора з базовим навантаженням 3 мН, і їхня скоротлива активність реєструвалася в ізометричному режимі. Під час експерименту препарати промивалися постійним потоком карбогенізованого розчину Кребса, спочатку стандартного, а потім із додаванням відповідних фармакологічних агентів, за фізіологічної температури 37° С, яка підтримувалася із використанням водного циркуляторного насоса. Для активації суто нервово-опосередкованого скорочення м'язової смужки застосовувалася стимуляція електричним полем (СЕР), яке прикладався перпендикулярно поздовжній осі препарату для уникнення активації м'язово-опосередкованого компоненту через наявність на кінцях ГМК конексонів, і являла собою 10-секундну серію зі 100 імпульсів з амплітудою 100 В, частотою 10 Гц і тривалістю окремого імпульсу 0,5 мс. Відділення суто м'язово-опосередкованого скорочення здійснювалося шляхом виготовлення м'язових смужок меншої товщини (>1 мм), відсутність нервів у яких перевірялася за допомогою СЕР. Під час експериментів на препаратах від діабетичних тварин і відповідних контролів перфузійний розчин також містив атропін (1 мкМ) і фентоламін (1 мкМ) для пригнічення $\alpha 1$ -адренергічного та m-холінергічного компонентів скорочення, які могли б внести артефакти у результати вимірювання.

2.8. Реєстрація Ca^{2+} -залежної флуоресценції. Спостереження за динамікою змін внутрішньоклітинного рівня Ca^{2+} проводилося із використанням високоафінного ($K_d = 390 \text{ нМ}$) кальцій-чутливого флуоресцентного барвника Fluo-3 AM. Для цього також застосовувався конфокальний комплекс LSM 5 PASCAL на основі інвертованого мікроскопа Axiovert 200M (Zeiss). Збудження флуорохрому здійснювалося на довжині

хвилі 488 нм за допомогою аргонного лазера, а реєстрація сигналу проводилася на довжині хвилі 510 нм із використанням полосного (505-550 нм) фільтра емісії, ПЗС-матриці Zeiss AxioCam та програмного забезпечення LSM5 PASCAL. Зазначене обладнання сполучалося із комп'ютером через інтерфейс SCSI.

Суспензія гостроізолювантх ГМК у кількості 100-200 мкл наносилася на квадратні покривні скельця, на яких за допомогою вакуумної змазки закріплювалися гумові бортики для попередження розтікання перфузійного розчину, і клітини пасивно осаджувалися впродовж 30 хв. Після цього препарат заливався 1 мл розчину Кребса, до нього прикладався Fluo-3 AM таким чином, щоб забезпечити робочу концентрацію у 2 мкМ (стоковий розчин 50 мкг / 50 мкл абсолютного ДМСО, аліквотований по 5 мкл), і у темряві відбувалося проникнення естерифікованої гідрофобної форми барвника у клітини впродовж 20 хв. Далі розчин з флуорохромом відбирався і реєстраційні камери заливалися свіжим розчином Кребса для повної відмивки недеестерифікованого Fluo-3 AM протягом 40 хв., після чого скельця переносилися на предметний столик мікроскопа.

При проведенні вимірювань обиралося поле зору, яке вміщувало 3-5 клітин, для збільшення кількості даних, які можна було б збирати одночасно. Аплікація фармакологічних агентів, таких як 10 мкл КАПС та 10 мкл CCh, проводилася простим додаванням у реєстраційну камеру стокового розчину, чия концентрація була розрахована таким чином, аби після змішування клітини омивалися агоністом у робочій концентрації. Предметне скельце, на яке вже було здійснене прикладання КАПС, замінювалося одразу після проведення одиничного вимірювання, аби уникнути десенситизації TRPV1. Відповіді клітин на фармакологічну стимуляцію записувалися у вигляді графіків, які відображали Ca^{2+} -залежну флуоресценцію, та мікрофотографій, які знімалися до, під час та після прикладання агоністів.

2.9. Розчини та фармакологічні агенти. Усі реагенти були придбані в Sigma Aldrich, якщо не зазначено інше. Всі розчини виготовлялися на основі деіонізованої води із опором не менше 16 МΩ/см. Для проведення електрофізіологічних вимірювань та реєстрації Ca^{2+} -залежної флуоресценції клітини перфузувалися у стандартному розчині Тіроде, який відтворював приблизний іонний склад тканинних рідин, наступного складу (у мМ): NaCl – 135, KCl – 5, CaCl_2 – 2, MgCl_2 – 1, декстроза – 5, HEPES – 10 (pH 7,4, осмолярність 304 мОсм). Піпетки при реєстраціях трансмембранних струмів і V_m заповнювалися внутрішнім розчином, який містив (у мМ) KCl – 20, К-глюконат – 108, EGTA – 8, CaCl_2 – 4, MgCl_2 – 1, Mg-АТФ – 1, HEPES – 10 (pH 7,4, осмолярність 287 мОсм). Ці два розчини виготовлялися з ретельним контролем осмолярності й перевірялися на значення цього параметру із застосуванням осмометра, що пов'язано з критичною важливістю забезпечення різниці в ~20 мОсм між ними для успішного вимірювання методом петч-клемп. При виділенні нейронів ДКГ використовувався розчин Тіроде, позбавлений двовалентних катіонів, Ca^{2+} і Mg^{2+} , для сповільнення апоптичних процесів під час ізолювання. Він мав наступний склад (у мМ): NaCl – 144, KCl – 5, декстроза – 5, HEPES – 10 (pH 7,4, осмолярність 313 мОсм). При виділенні детрузорних ГМК застосовувався розчин Тіроде, модифікований Petkov et al. із додаванням глутамату (Glu-розчин) [ref]. Необхідність його використання пов'язана з тим, що гладеньком'язові клітини сечового міхура є напрочуд чутливими до Ca^{2+} -шоку й гинуть при перенесенні з безкальцієвого в експериментальний розчин впродовж ~30 хв., у той час як наявність глутамату в розчині для виділення з невідомих причин блокує цей небажаний процес і дозволяє працювати з зазначеними ГМК впродовж багатьох годин. Glu-розчин містив наступне (у мМ): NaCl – 80, глутамат – 40, KCl – 5, HEPES – 10, декстроза – 5 (pH 7.4 за допомогою NaOH, осмолярність 275 мОсм). При проведенні тензометричних вимірювань м'язові смужки перфузувалися у розчині Кребса, який характеризувався наявністю аніонів PO_4^{3-} та використанням карбонатного буферу для

максимізації фізіологічності дослідження, і мав наступний склад (у мМ): NaCl – 120, KCl - 5,9, NaHCO₃ - 15,5, NaH₂PO₄ – 1,2, MgCl₂ – 1,2, CaCl₂ - 2,5, декстроза – 11,5.

Для активації TRPV1-опосередкованих ефектів використовувався його природний селективний агоніст капсаїцин (КАПС), активна речовина з плодів червоного перцю роду *Capsicum*. Для інгібування TRPV1-опосередкованих ефектів прикладався синтетичний аналог КАПС. З цією ж метою застосовувався ВСТС, нещодавно винайдений блокатор TRPV1, який відрізняється більшою специфічністю щодо зазначеного іонного каналу. Для ініціювання цукрового діабету в піддослідних тварин вводився стрептозотоцин (STZ), токсична речовина зі значною вибірковістю щодо інсулін-продукуючих β-клітин острівців Лангерганса в підшлунковій залозі. У якості донора оксиду азоту аплікувався нітропрусид натрію (НП-Na), нестабільна речовина, яка швидко розпадається на світлі із вивільненням NO. Для пришвидшення його розпаду застосовувався L-цистеїн, сульфур-вмісна амінокислота зі значними відновними властивостями. Як агоніст M₂/M₃-холінорецепторів використовувався карбамоїлхолін, також знаний як карбахол (CCh), синтетичний аналог ацетилхоліну, який відрізняється від останнього резистентністю до холінестераз і, як наслідок, більшою стабільністю в організмі. У частині тензометричних експериментів препарати перфузувалися з атропіном та фентоламіном, блокаторами m-холінорецепторів та α1-адренорецепторів, наявними в сечовому міхурі.

2.10. Статистичні методи. Для аналізу результатів та їх графічного представлення використовувалося програмне забезпечення Origin 8.5. При побудові стовпчикових діаграм, які відображають усереднення експериментальних значень та їх розкид, виводилися середнє арифметичне по групі ± стандартна похибка середнього (S.E.M.). Порівняння груп, через відносно невеликі вибірки й неможливість їх перевірки на нормальність розподілу, здійснювалося за допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Експресія гена *Trpv1* у різних тканинах СМ.

Для визначення місця, яке посідає TRPV1 у нормальній фізіології сечового міхура, необхідне встановлення точної локалізації цього іонного каналу в органі аж до типів клітин, які його експресують. Для вирішення цієї задачі ми спершу скористалися методами молекулярної генетики, а саме ПЛР із зворотною транскрипцією.

Необхідно зазначити, що сечовий міхур, хоч і є доволі простим органом з точки зору анатомічної будови, має досить складну організацію на тканинному та клітинному рівнях [16]. У першому наближенні він може бути розглянутий з гістологічної точки зору як функціональний комплекс із трьох тканин: м'язової, епітеліальної та нервової [9, 28]. М'язова тканина СМ представлена детрузором, шаром гладеньких міоцитів, які здійснюють механічну роботу при випорожненні органа [17]. Епітеліальна тканина, або уротелій, являє собою багат шарову вистилку його порожнини і виконує, окрім суто бар'єрних, виражені сигнальні функції [28]. Нервова тканина СМ представлена різноманітними нервовими волокнами, аферентними та автономними еферентними, що пронизують стінку органа [21].

Наявність транскриптів гена *Trpv1* у трьох зазначених типах тканин була перевірена методом ПЛР із подальшою візуалізацією ампліконів за допомогою агарозного гель-електрофорезу. Оскільки досі не існує підходів, які б дозволяли відділити нервові волокна від оточуючих тканин, для дослідження наявності TRPV1 у аферентних нейронах були взяті ДКГ *per se*, які містять у собі соми цих нервових клітин. Було виявлено, що найбільшим рівнем експресії гена *Trpv1* відрізнявся саме цей тип вивченого матеріалу (Рис. 3.1). Напівкількісна оцінка співвідношення між рівнями транскриптів

TRPV1 і гена *Gapdh* за допомогою програмного забезпечення ImageJ показала, що ген інтересу експресується у ДКГ на ~85% інтенсивніше за референсний ген, що є досить високим показником як для іонного каналу. У той же час в уротелії ознак транскрипції *Trpv1* не було виявлено, а амплікон зі зразка детрузора проявився на гелі лише як слабка смужка, що може свідчити про низький рівень експресії цього гена в зазначеній гістологічній структурі (Рис. 3.1).

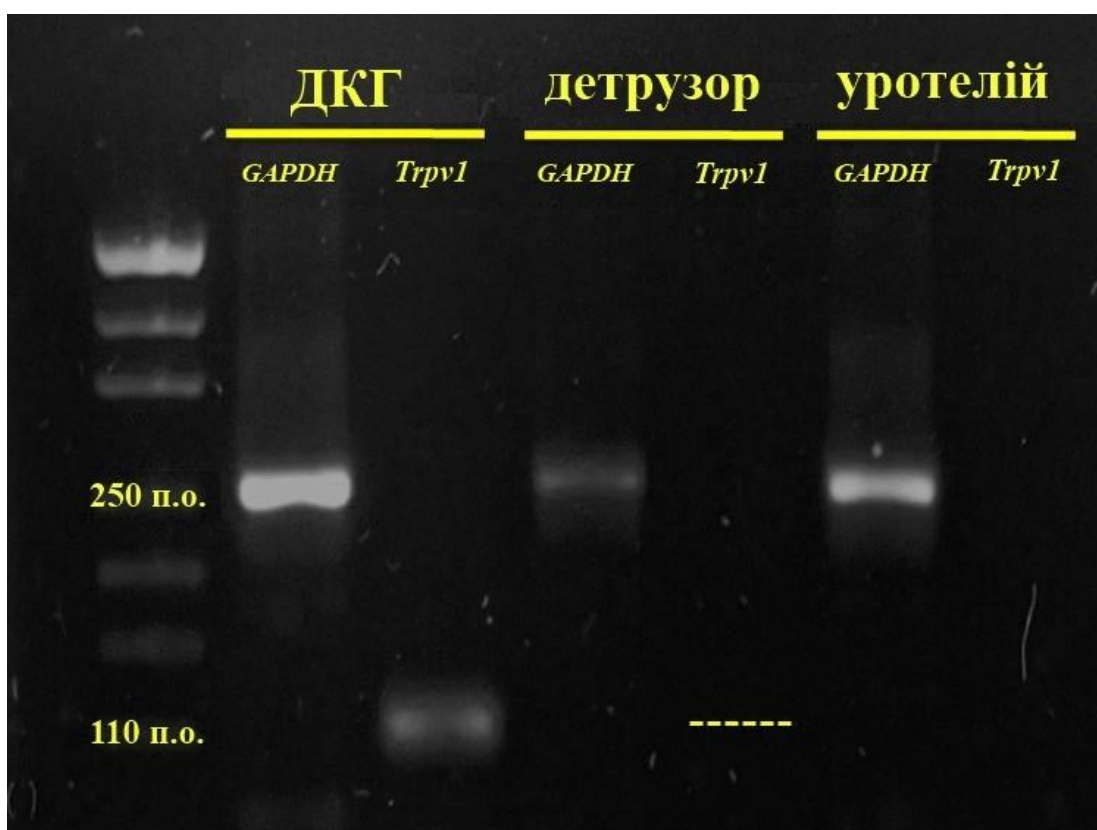


Рис. 3.1. Експресія гена *Trpv1* у трьох основних гістологічних компонентах СМ. Амплікони, отримані після зворотної транскрипції та ПЛР, візуалізовані за допомогою агарозного гель-електрофорезу. У якості референсного використаний ген «домашнього господарства» гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназа (*Gapdh*).

Для більш точної оцінки рівня транскриптів *Trpv1* у м'язовій та епітеліальній тканинах СМ було проведено ще одне ПЛР-дослідження з використанням іншого референсного гена, а саме *Actb*. Було виявлено, що, як і

у випадку з *Gapdh*, експресія TRPV1 у дорзальних корінцевих гангліях є інтенсивнішою за таку референсного гена на ~28% (Рис. 3.2). Амплікони зі зразків детрузора та уротелія також були детектовані на агарозному гелі, але їхній обсяг становив лише, відповідно, 7% і 21% від рівня експресії *Actb* (відповідно, у ~20 і ~6 разів менше за рівень експресії гена *Trpv1* у ДКГ). Отже, наші дані дозволяють стверджувати, що ген *Trpv1* транскрибується із високою інтенсивністю у нейронах ДКГ, у той час як експресія його в гладеньких міоцитах та епітеліальних клітинах СМ незначна або ж взагалі відсутня – якщо взяти до уваги, що слабкі смужки на гелі можуть походити від продуктів неспецифічної ампліфікації або ж контамінації окремими клітинами з інших гістологічних структур [117]. З іншого боку, низький рівень мРНК не завжди призводить до малої ж кількості білка чи малої функціональної значимості його для роботи клітин [118].

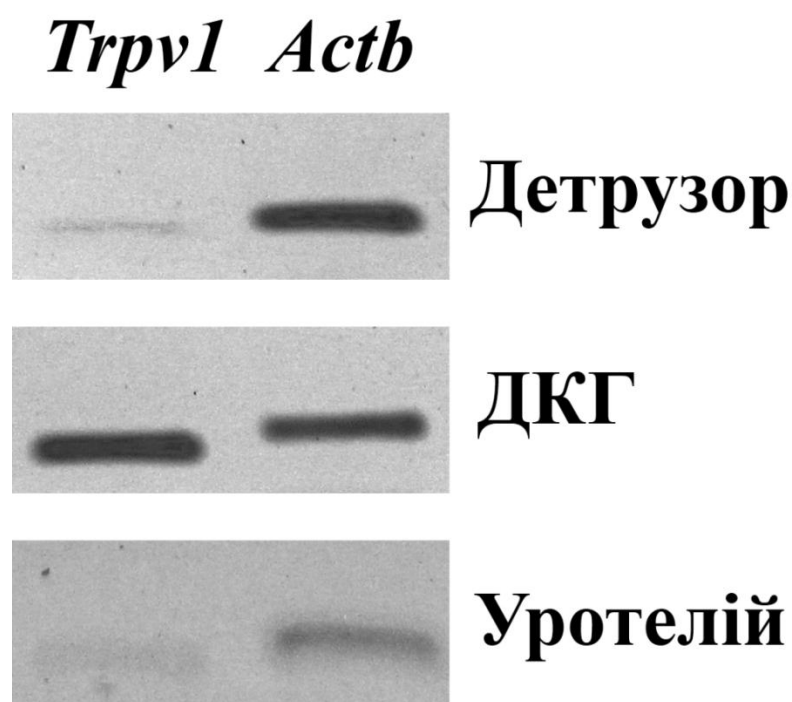


Рис. 3.2. Експресія гена *Trpv1* у трьох основних гістологічних компонентах СМ. Амплікони, отримані після зворотної транскрипції та ПЛР, візуалізовані за допомогою агарозного гель-електрофорезу. У якості референсного використаний ген «домашнього господарства» актин (*Actb*).

Наші дані ще раз підтверджують добре відому тезу щодо наявності TRPV1 у нейронах ДКГ [75]. Оскільки і сам по собі цей білок вперше був охарактеризований у цих клітинах у 1997 році Catherina et al., отримані нами дані можна розглядати як позитивний контроль, що засвідчує функціональність підібраних для проведення ПЛР праймерів.

У той же час, експресія гена *Trpv1* гладенькими міоцитами детрузора висвітлена у спеціальній літературі відносно мало. Наскільки нам відомо, молекулярно-генетичні дані щодо наявності мРНК TRPV1 у гладеньких м'язах СМ були отримані лише в одній опублікованій праці [119]. Цікаво, що, згідно результатів цього дослідження, експресія гена *Trpv1* у детрузорі є досить значною і майже дорівнює експресії референсного гена *Gapdh*, що суперечить даним, отриманим нами в цій роботі. Ця розбіжність може бути пояснена видовими відмінностями, позаяк Stein et al. досліджували людський сечовий міхур, або ж існуванням різних сплайс-форм досліджуваного іонного каналу, які можуть детектуватися на різному рівні за допомогою різних праймерів. Крім того, TRPV1 декілька разів спостерігався у детрузорних ГМК із використанням антитіл з подальшою візуалізацією світловою або флуоресцентною мікроскопією [120, 121]. Таким чином, ми схильні вважати, що отримані нами і декількома іншими групами результати свідчать про те, що ген *Trpv1* дійсно експресується зазначеними клітинами, хоча остаточне підтвердження цього вимагає проведення функціональних досліджень, позаяк низка інших груп отримала протилежні результати [122], про що йтиметься далі.

Що ж стосується наявності TRPV1 у клітинах уротелію, то це питання досі є предметом широкої дискусії у літературі. Низка авторів доповідала про позитивні результати, отримані як молекулярно-біологічними, так і функціональними методами, хоч у останньому випадку в якості об'єкта використовувалися не гостроізовані клітини, а їхні культуральні лінії [121, 123]. З іншого боку, декілька груп отримали дані, які заперечують тезу щодо експресії TRPV1 клітинами уротелію [8, 124]. Цікавим є дослідження, у

якому автори виготовили генетичну конструкцію із геном-репортером, контрольованим промотором гена *Trpv1*, з використанням якої отримали негативні результати щодо зазначеного питання [125]. Таким чином, питання щодо наявності досліджуваного іонного каналу в уротелії досі лишається відкритим [124].

Треба також зазначити, що перелік необхідних для функції сечовиділення структур, які були розглянуті нами в цій роботі на предмет наявності в них транскриптів *Trpv1*, є неповним. Зокрема, не було досліджено сфінктери СМ. Особливий інтерес для дослідження може становити зовнішній, який є поперечно-смугастим м'язом і може експресувати TRPV1, як було показано для багатьох інших соматичних м'язів, причому зазначені дані дозволяють припустити його внутрішньоклітинну локалізацію [115]. Також важливим залишається питання можливої наявності цього каналу в інтерстиціальних клітинах Кахаля [4].

3.2. Функціональна присутність TRPV1 у гладеньких м'язцях детрузора та СМ-специфічних нейронах ДКГ.

3.2.1. КАПС-активовані трансмембранні струми в СМ-специфічних нейронах ДКГ. Відомо, що аферентні нейрони, що іннервують сечовий міхур, локалізуються в щура у двох парах дорзальних корінцевих гангліїв, а саме в парі 6-ого люмбарного та 1-ого сакрального, причому зазначені ДКГ містять, окрім СМ-специфічної, ще декілька клітинних субпопуляцій, які іннервують інші органи [126]. Для того, аби провести електрофізіологічне дослідження саме тих нейронів, які посилають свої аксони в сечовий міхур, ми здійснили їхнє ретроградне флуоресцентне мічення шляхом вколювання ліпофільного флуорохрому DiI-C18(3) у стінку СМ за 2-3 тижні перед виготовленням клітинного препарату.

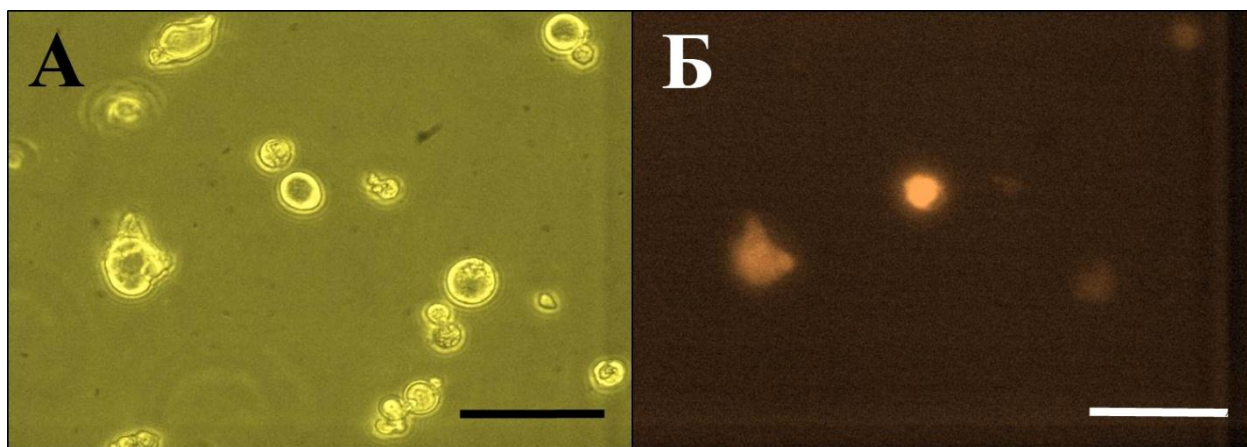


Рис. 3.3. Репрезентативна мікрофотографія препарату нейронів ДКТ, що відображає результати ретроградного флуоресцентного мічення, А – тотальна популяція клітин у прохідному світлі, Б – субпопуляція СМ-специфічних нейронів, мічена трасером DiI-C18(3), яка виявляється у режимі флуоресцентної мікроскопії. Масштабна планка 100 мкм.

При спостереженні клітинного препарату в прохідному світлі виявлялися клітини округлої форми й варіабельного в межах 15-40 мкм діаметру, що являли собою соми нейронів ДКТ, що втратили свої центральні й периферичні термінали внаслідок обробки протеазами й піпетування. Сигнал від ретроградного трасера при переключенні в режим флуоресцентної мікроскопії виявлявся лише у частині з цих клітин (Рис. 3.3). Подальші електрофізіологічні вимірювання проводилися виключно на цих СМ-специфічних нейронах. Аплікація 10 μM капсаїцину викликала в більшій частині досліджуваних клітин струм, який характеризувався вихідним напрямом при потенціалі +50 мВ, вхідним напрямом при V_m -100 мВ і потенціалом реверсії (V_{rev}) близько 0 мВ (Рис. 3.4). Ці риси є канонічними для TRPV1 як для неселективного катіонного каналу. Щільність I_{TRPV1} складала 59 ± 8 пА/пФ і -73 ± 14 пА/пФ при, відповідно, V_{comm} +50 мВ і -100 мВ ($n=8$). Таким чином, наші дані дозволяють стверджувати, що TRPV1 присутній як функціональний іонний канал у СМ-специфічних нейронах ДКТ.

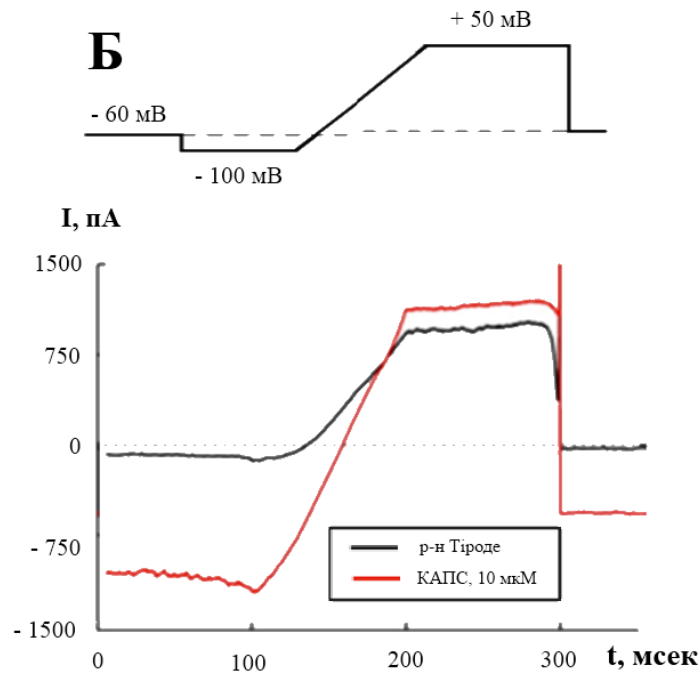


Рис. 3.4. Репрезентативний запис трансмембранних струмів у СМ-специфічних нейронах ДКГ за умов перфузії в чистому розчині Тіроде (чорний графік) та при прикладанні КАПС (червоний графік).

Необхідно зазначити, що наші дані є лише підтвердженням тези про наявність TRPV1 у аферентах сечового міхура, оскільки схожі з нашим дослідження були вже здійснені раніше багатьма авторами [75, 127, 128]. Згідно з працею Dang et al. [126], СМ-специфічні нейрони ДКГ L6-S1 відповідають на стимуляцію КАПС у 98-100% випадків, тобто навіть із більшою частотою, аніж характерна для тотальних препаратів клітин цього типу [75]. Щільність I_{TRPV1} , яка спостерігалася цією групою, незначно відрізнялася від отриманої нами й складала 130 ± 17 пА/пФ. Крім того, численні тензометричні дослідження свідчать, що прикладання блокаторів TRPV1 на ізольовану смужку СМ пригнічує частину СЕП-викликаного скорочення, яке, як відомо, опосередковується через нервові механізми [129]. Все це свідчить на користь того, що досліджуваний нами іонний канал дійсно міститься у мембранах чутливих нервових закінчень СМ, хоча залишається

незрозумілим, які саме фізіологічні стимули спричиняють його активацію там.

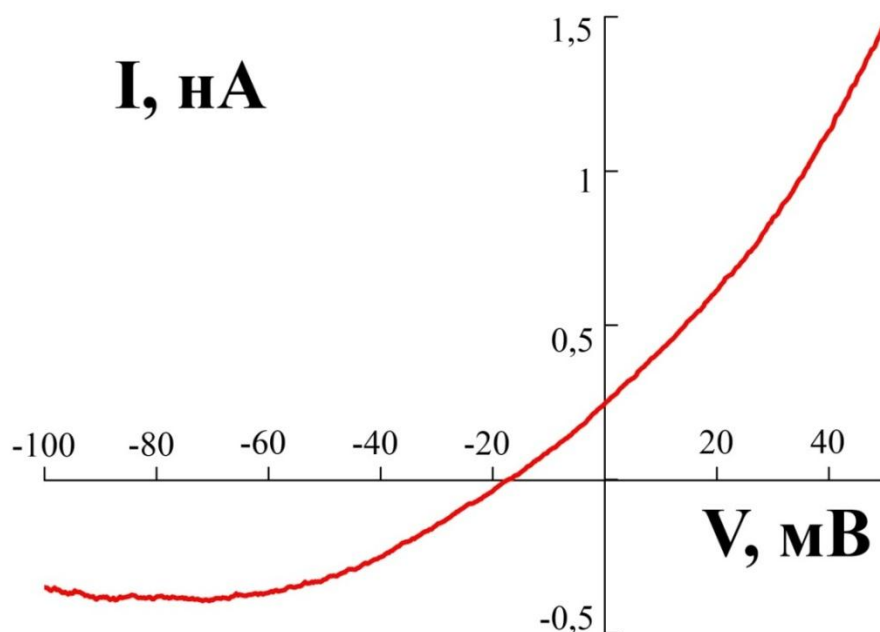


Рис. 3.5. Репрезентативна вольт-амперна характеристика I_{TRPV1} , записана з аферентного нейрона ДКТ, який іннервує сечовий міхур. Чітко виражене вихідне випрямлення є однією з характерних ознак TRPV1.

3.2.2. Електрофізіологічна характеристика детрузорних гладеньких міоцитів. Для того, аби встановити, чи дійсно досліджуваний іонний канал експресується у гладеньком'язових клітинах СМ, ми спершу провели електрофізіологічні вимірювання методом петч-клемп. У препараті гостроізолюваних ГМК спостерігалися клітини різної морфології, зокрема округлі та довгасті (Рис. 3.6). Вірогідно, перший тип репрезентував епітеліальні клітини уротелію, які не відділилися від детрузора при хірургічній очистці, а другі являли собою власне міоцити [28]. Варто також зазначити, що деякі ГМК в препараті зазнавали скорочення, через що їхні мембрани набували характерних ребристих країв, тоді як інші були в розслабленому стані.

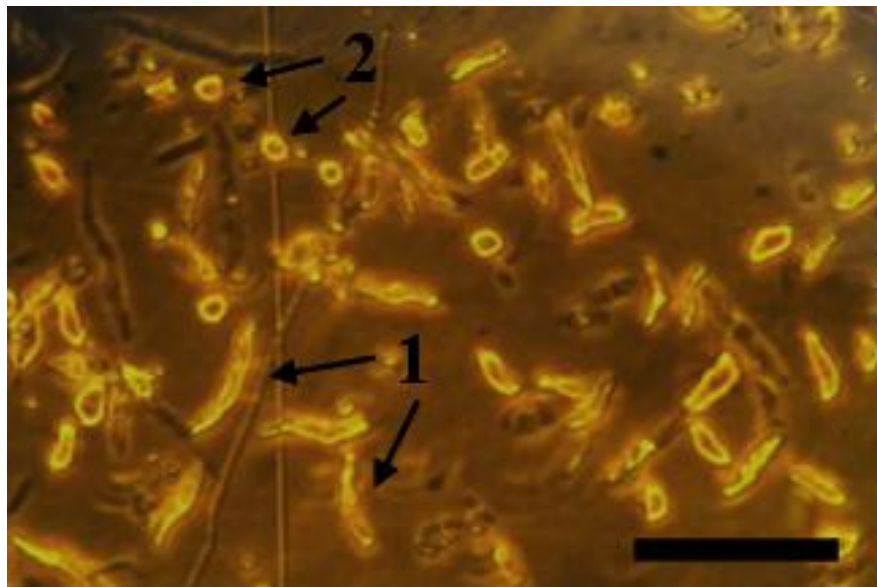


Рис. 3.6. Препарат гостроізолюваних ГМК сечового міхура. 1 – гладенький міоцит детрузора, 2 – клітини уротелію. Масштабна планка 100 мкм.

Після встановлення експериментальної конфігурації ГМК стимулювалися за стандартним електрофізіологічним протоколом, який дозволяв розрізнити низку струмів, притаманних цьому типу клітин (Рис. 3.6). Зокрема, при встановленні V_{comm} на рівні -100 мВ спостерігалися слабкі, амплітудою в -19 ± 2 пА ($n=28$), вхідні струми, що ймовірно опосередковувалися фоновими двопородоменними K^+ -каналами. На рамповій фазі на рівні V_{comm} близько -30 мВ виявлялися вхідні струми, створювані, вірогідно, потенціал-керованими кальцієвими каналами, що у цих клітинах є основним типом білків, що відповідають за вхід іонів Ca^{2+} з позаклітинного середовища при активації [39]. Під час деполяризаційної фази, коли V_{comm} сягав $+50$ мВ, спостерігалися сильні вихідні струми амплітудою 213 ± 32 пА ($n=28$), характерні для потенціал-керіваних K^+ -каналів, які часто супроводжувані шумоподібними флуктуаціями I_{Σ} в межах $12-45$ пА, опосередковуваним, імовірно, кальцій-залежними калієвими ВК-каналами (дані не представлено) [66].

Цікаво, що в наших побічних експериментах ініціювати потенціали дії (ПД) в детрузорних ГМК щура не вдалося. Для проведення такого вимірювання електрофізіологічний підсилювач перемикався у режим фіксації

струму (current clamp, I_{clamp}), і на плазматичну мембрану досліджуваної клітини подавалися короткі, завдовжки 30 мсек імпульси сили, яка збільшувалася на 10 пА на кожному наступному епізоді стимуляції (всього 12 стимулів, амплітуда першого 0 пА, амплітуда останнього 120 пА). У гладеньких міоцитах ця стимуляція викликала лише електротонічні відповіді ($n=3$) (Рис. 3.7А). Для того, аби пересвідчитися в дієвості нашого електрофізіологічного протоколу й розчинів щодо можливості виклику ПД, ми провели контрольні вимірювання на нейронах ДКГ. У цьому типі клітин описані умови експерименту, навпаки, дозволили ініціювати потенціали дії на останніх епізодах стимуляції ($n=7$), коли амплітуда імпульсів сягала 100-120 пА (Рис. 3.7Б).

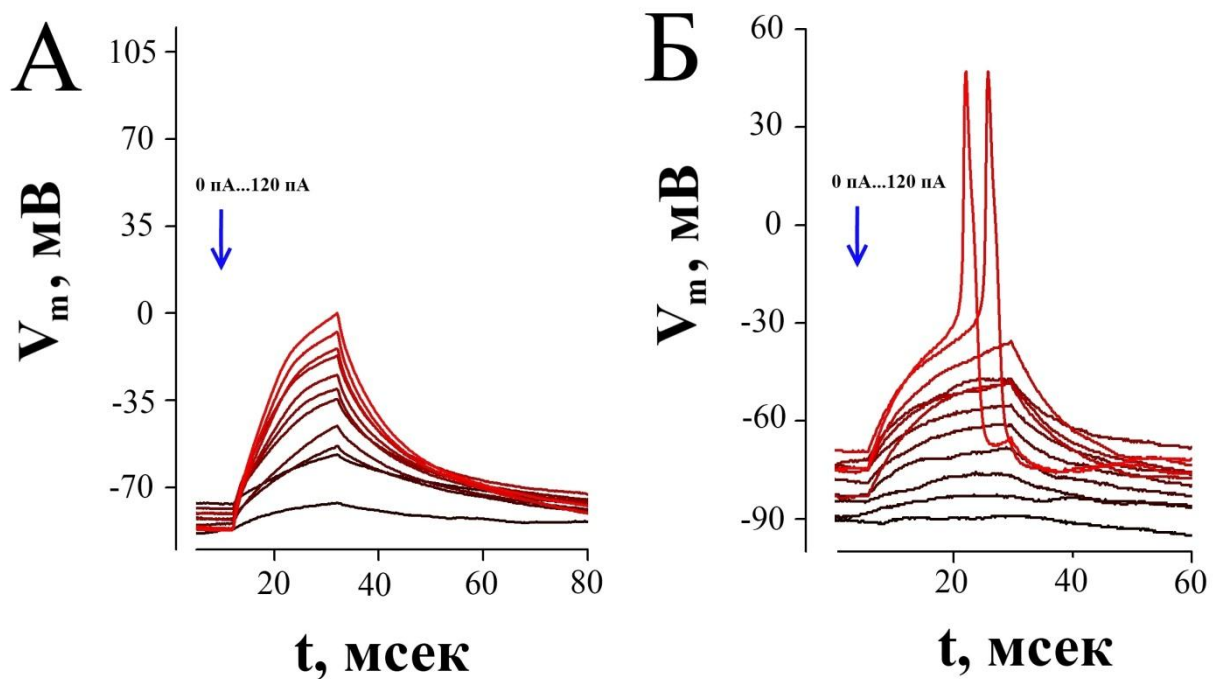


Рис. 3.7. Репрезентативні записи змін V_m у відповідь на стимуляцію прямокутними імпульсами струму, які виявили нездатність детрузорних міоцитів до генерації ПД (А) та відповідну здатність нейронів ДКГ, досліджених у якості контролю (Б). Як видно з результатів реєстрації, стимуляція ГМК викликала лише електротонічні відповіді.

Втім, отриманий негативний результат щодо можливості ініціювання ПД у ГМК детрузора міг бути обумовлений недостатньою силою стимуляції або ж її малою тривалістю. Для перевірки цього припущення нами були проведені вимірювання із використанням іншого протоколу, де час, впродовж якого імпульс прикладався до клітини, був збільшений до 1 сек, а амплітуда варіювала від -100 пА до +280 пА. Треба зазначити, що негативні значення імпульсу прикладалися з тих міркувань, що для деяких типів іонних каналів (напр. кальцієвих каналів Т-типу, Ca_v3) необхідною умовою активації є попередня де-інактивація низькими, до -60...-80 мВ, значеннями V_m . У той же час, відомо, що у гладеньком'язових клітинах саме кальцієві, а не натрієві, канали опосередковують утворення ПД, причому Т-підродина складає їхню істотну частку [130]. Проте навіть після усіх зазначених змін у електрофізіологічному протоколі потенціалу дії у детрузорних ГМК викликати не вдалося ($n=4$) (Рис. 3.8).

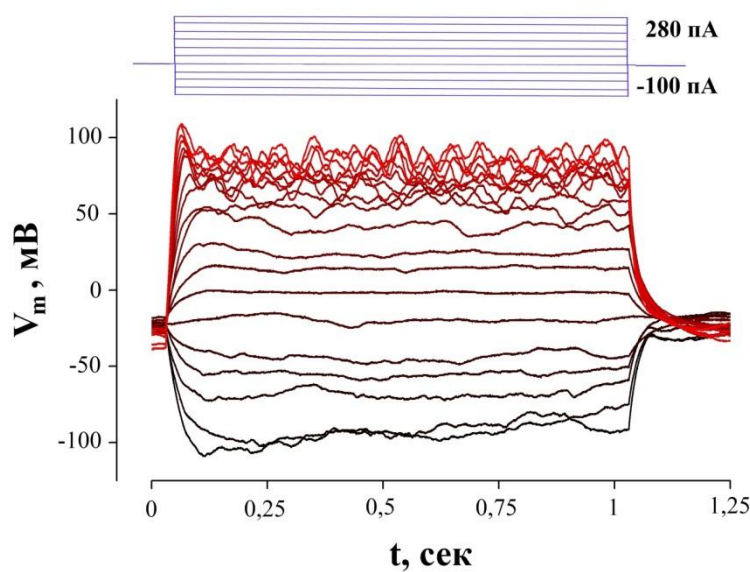


Рис. 3.8. Репрезентативні записи змін V_m у детрузорній ГМК у відповідь на стимуляцію прямокутними імпульсами струму, збільшеними за амплітудою та тривалістю порівняно із попереднім експериментом. Як видно з результатів реєстрації, ГМК не генерували ПД навіть у відповідь на таку значно посилену стимуляцію.

Отримані результати є цікавими з тієї точки зору, що можливість ініціювання ПД була раніше продемонстрована для детрузорних ГМК багатьох видів, включно з мурчаком, мишею і людиною, але ніколи не була показана для відповідних клітин щура [131-133]. У той же час, згідно з класичними уявленнями, здатність до генерації потенціалів дії є аж ніяк не загальною рисою усіх гладеньких міоцитів: якщо в певних їхніх підтипах відповіді за принципом “все або нічого” можна викликати за стандартних умов (такі м’язи у спеціальній літературі отримали назву “фазних”), то в інших для отримання ПД необхідною є одночасна блокада K^+ -каналів за допомогою тетраетиламонію (ТЕА) або заміни іонів калію на Cs^+ (м’язи з такими властивостями були названі “тонічними”) [134]. Варто також додати, що, якщо раніше вважалося, що поділ на фазні й тонічні ГМК стосується лише їхньої тканинної локалізації, то з наших даних може впливати, що навіть міоцити з одного органу можуть відноситися до різних функціональних типів у залежності від виду, з якого вони були ізольовані.

3.2.3. Відсутність TRPV1-опосередкованих струмів у ГМК детрузора. Електрофізіологічні вимірювання з метою детекції I_{TRPV1} у гладеньких міоцитах сечового міхура проводилися за тим самим протоколом, що і у випадку СМ-специфічних нейронів ДКГ. Аплікація 10 μM капсаїцину не призводила до жодних змін у провідності мембрани досліджуваної клітини ($n=28$), з чого було зроблено висновок, що іонного каналу TRPV1 вона не містить (Рис. 3.9). Варто зазначити, що наша робота є, наскільки нам відомо, першою спробою зареєструвати I_{TRPV1} у ГМК детрузора. Позитивним контролем, який би засвідчив дієвість нашого протоколу й реагентів, може послужити I_{TRPV1} , який спостерігався нами у нейронах ДКГ.

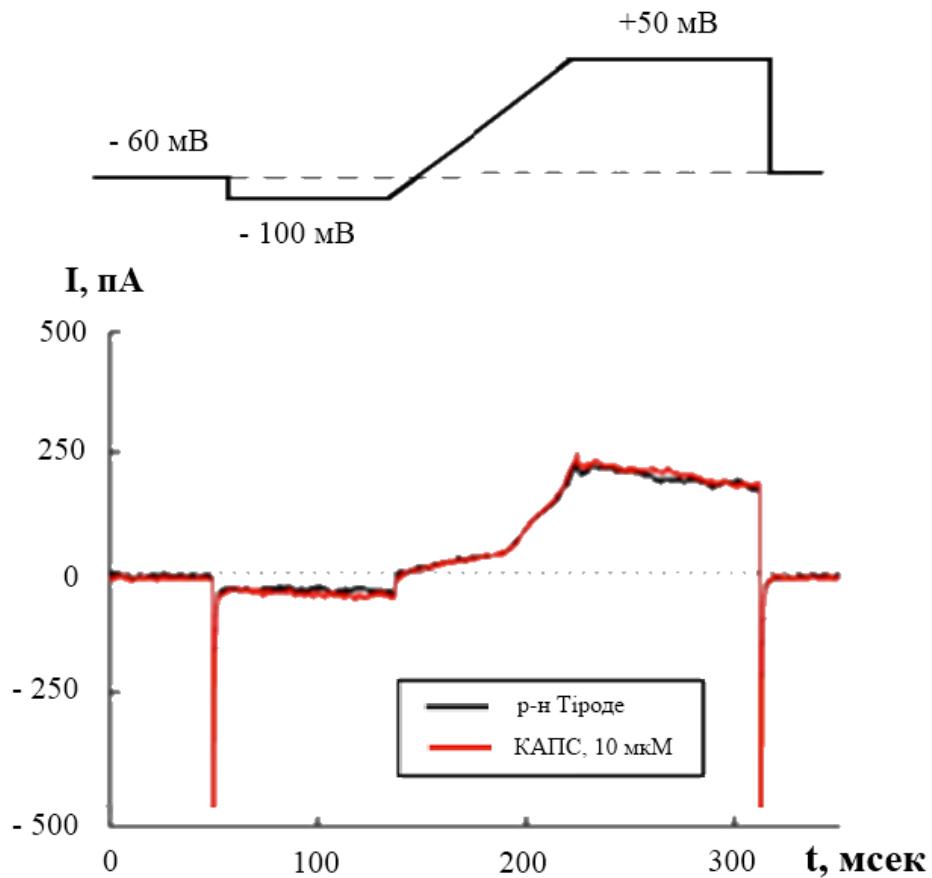


Рис. 3.9. Репрезентативний запис трансмембранних струмів у ГМК детрузора за умов перфузії в чистому розчині Тіроде (чорний графік) та при прикладанні КАПС (червоний графік). Як видно з реєстрації, жодних змін мембранної провідності при аплікації агоніста TRPV1 не відбувається.

3.2.4. Мобілізація іонів Ca^{2+} з саркоплазматичного ретикулуму ГМК детрузора після прикладання КАПС. Хоча за результатами вимірювань методом петч-клемп було виявлено, що гладенькі міоцити сечового міхура не відповідають на стимуляцію активатором TRPV1 капсаїцином, ці дані не можна вважати остаточною відповіддю на питання наявності цього іонного каналу в досліджуваному типі клітин. При проведенні реєстрації у конфігурації «ціла клітина» струми, що спостерігаються між вимірювальним та референсним електродами, долають лише опір плазмалемі R_m і оминають решту клітинних мембран [135]. Отже, для вивчення іонних каналів, локалізованих у внутрішньоклітинних

органелах, необхідно було застосувати інакший метод. Для перевірки припущення про наявність TRPV1 у внутрішніх кальцієвих депо ГМК детрузора нами був використаний метод кальциметрії з використанням флуоресцентних Ca^{2+} -чутливих барвника Fluo-3 AM.

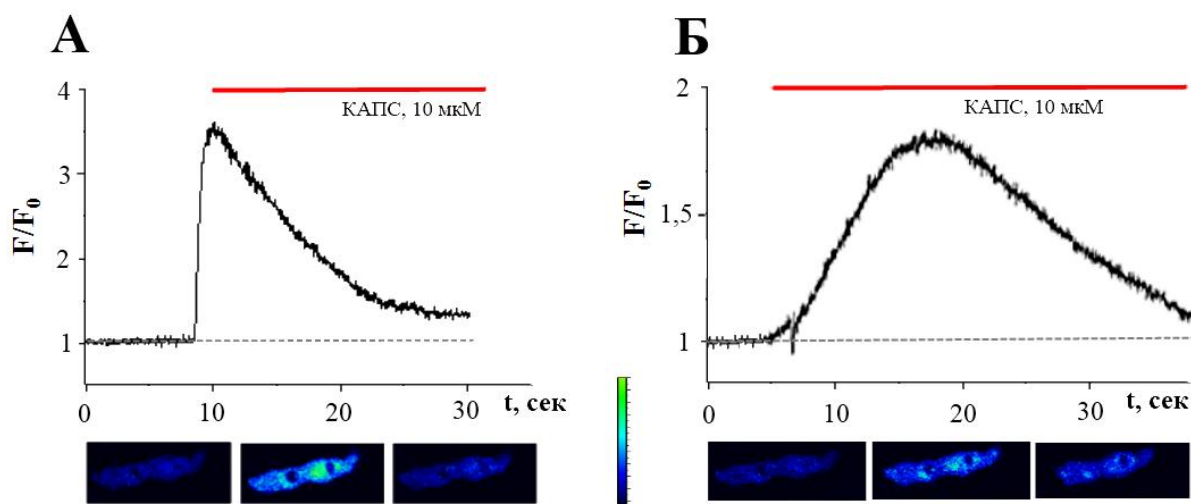


Рис. 3.10. Два типи відповідей на прикладання КАПС у гостроізовльованих детрузорних міоцитах. Клітини з швидкою відповіддю (А) досягали максимальної Ca^{2+} -залежної флуоресценції за ~ 1 сек, у той час як більшість ГМК розвивали її поступово в межах десятків секунд (Б). В обох випадках відповідь спонтанно пригнічувалась із плином часу, ймовірно, у зв'язку з десенситизацією TRPV1.

Після аплікації активатора у частині клітин ($n=14$ з 33 перевірених) спостерігалось суттєве підвищення внутрішньоклітинного рівня Ca^{2+} , що може свідчити про наявність у них досліджуваного іонного каналу (Рис. 3.10). Ратіометрична оцінка абсолютного підвищення концентрації кальцію не проводилася, але відносна зміна кальцій-залежної флуоресценції відносно початкового рівня (F/F_0) була в межах 1,5 – 4 разів. Варто зазначити, що динаміка розвитку Ca^{2+} -сигналу була варіативною. У поодиноких клітинах ($n=2$) вона мала характер різкого підвищення протягом ~ 1 сек з подальшим повільним спаданням, яке тривало кілька десят секунд

(Рис. 3.10А). У більшості ж КАПС-чутливих клітин ($n=12$) зростання кальцій-залежної флуоресценції було набагато більш градуальним і сягало пікових значень лише за 10-20 сек (Рис. 3.10Б), хоча динаміка спадання не відрізнялася від такої в ГМК зі швидкою відповіддю на прикладання капсаїцину. Ймовірно, такі відмінності в характері розвитку Ca^{2+} -сигналу пояснюються різною кількістю іонного каналу TRPV1 у досліджуваних гладеньких міоцитів СМ, які взагалі є досить поліморфними клітинами за цілою низкою фізіологічних особливостей, таких як форма потенціалу дії, ансамбль експресованих рецепторів тощо [133, 136]. Спонтанне затухання кальцій-залежної флуоресценції скоріш за все пояснюється швидкою десенситизацією TRPV1 і відновленням концентрації Ca^{2+} до рівня стану спокою [75].

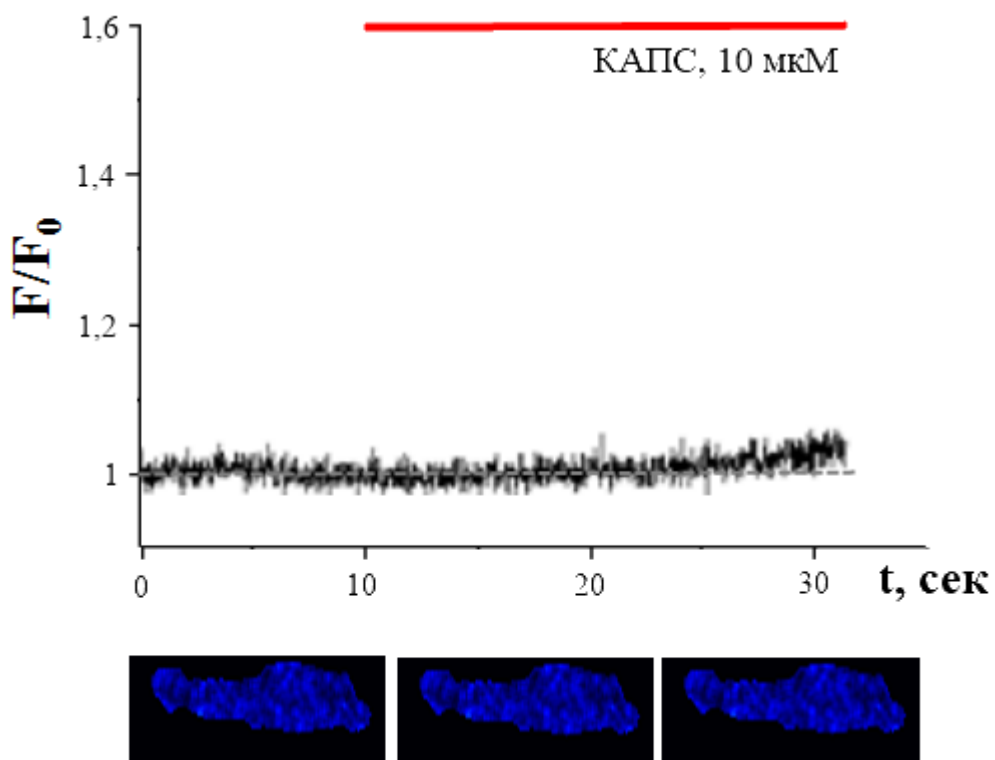


Рис. 3.11. Репрезентативний запис Ca^{2+} -залежної флуоресценції у КАПС-нечутливих детрузорних ГМК. Як видно з графіку та мікрофотографій, ця субпопуляція міоцитів не відповідала на стимуляцію КАПС жодним чином.

У той же час, частина клітин (n=19 з 33 досліджених) не відповідала на прикладання КАПС підвищенням рівня Ca^{2+} (Рис. 3.11). Очевидно, це пояснюється відсутністю TRPV1 у будь-яких мембранах цих клітин, як плазматичній, так і саркоплазматичній. Співвідношення між субпопуляціями ГМК, чутливих і нечутливих до стимуляції КАПС, складало, відповідно, 42% vs. 58% (Рис. 3.12).

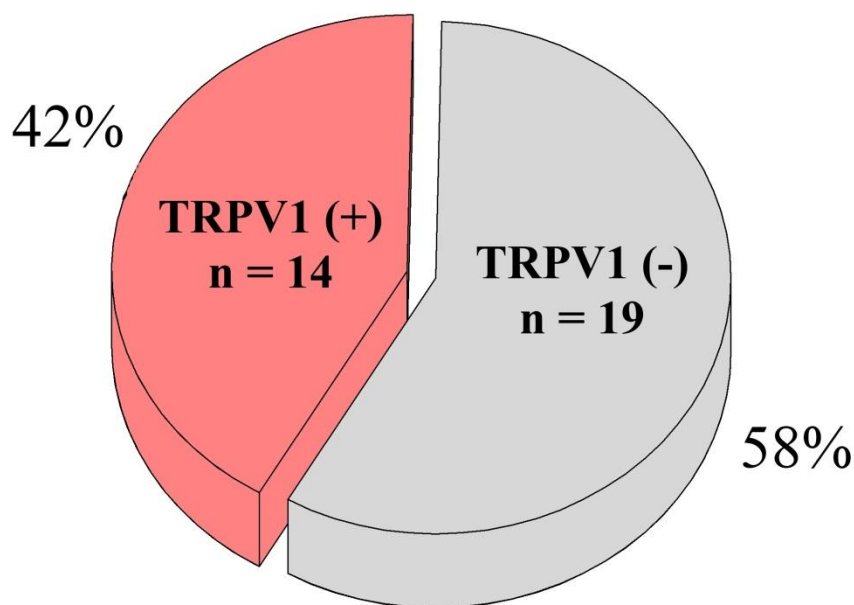


Рис. 3.12. Співвідношення між субпопуляціями КАПС-чутливих та КАПС-нечутливих міоцитів у тотальному препараті гостроізолюваних детрузорних ГМК.

Серед причин, через які частина детрузорних міоцитів не виявляла жодної чутливості до КАПС, могла бути й недостатня якість препарату й загибель деяких ГМК під час процедури виділення. Аби перевірити, чи не вплинув зазначений артефакт на наші висновки, ми провели тестування життєздатності досліджуваних клітин з використанням карбахолу, стабільного аналога природнього активатора скорочення цих клітин, ацетилхоліну. Як видно з Рис. 3.13., відсутність Ca^{2+} сигналу в деяких міоцитах сечового міхура не може бути пояснена їхнім нефункціональним станом. У обох субпопуляціях CSh у концентрації 10 мМ викликав різкий пікоподібний стрибок кальцій-залежної флуоресценції, який розвивався й

закінчувався впродовж 2-3 сек ($n=5$ у кожній групі). Аплікації CCh передувало прикладання КАПС, метою якого було віднесення досліджуваного міоцита або до TRPV1-позитивної (Рис. 3.13А), або до TRPV1-негативної (Рис 3.13Б) груп.

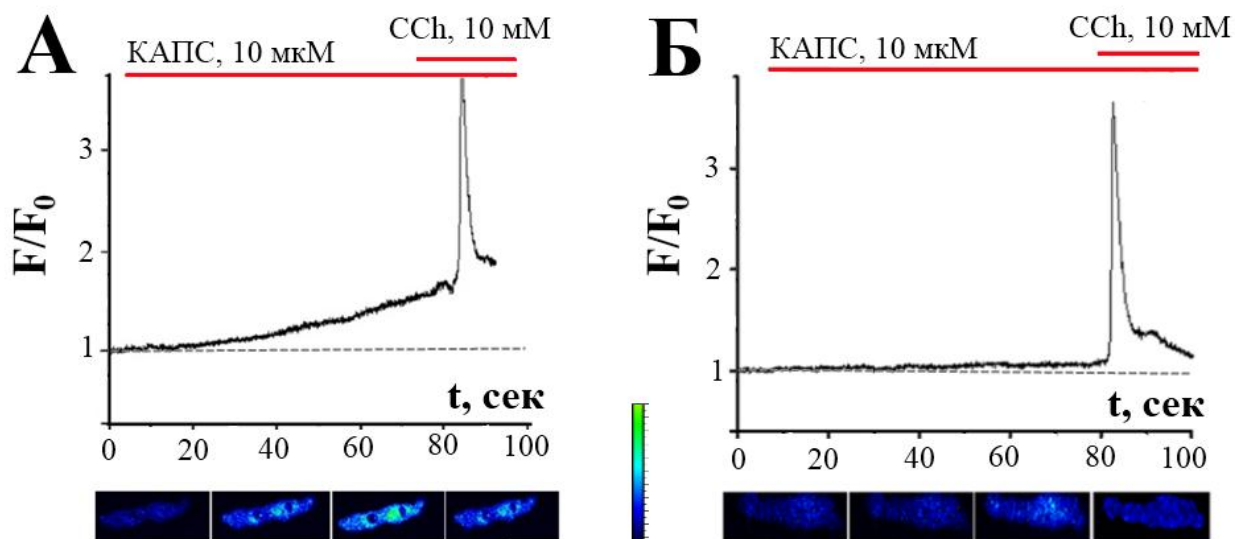


Рис. 3.13. Перевірка життєздатності ізолюваних ГМК детрузора. Як видно з графіків кальцій-залежної флуоресценції та мікрофотографій, як КАПС-чутливі (А), так і КАПС-нечутливі нейрони демонструють відповіді на прикладання контрольної речовини, холіноміметика карбахолу (CCh). Це свідчить про те, що субпопуляція клітин, які не відповідали на стимуляцію капсаїцином, є життєздатною і дані стосовно її нечутливості до КАПС є валідними.

Необхідно зазначити, що флуоресцентно-мікроскопічне дослідження проводилося при малій просторовій роздільній здатності, аби натомість максимізувати часову роздільну здатність. Це було зроблено для того, аби ідентифікувати джерело розповсюдження Ca^{2+} -сигналу при аплікації КАПС. Оскільки електрофізіологічні експерименти не виявили жодних ознак I_{TRPV1} у гладеньком'язових детрузорних клітинах, у той час як спостереження за кальцій-залежною флуоресценцією у цих клітинах підтвердило наявність TRPV1, припущення про його локалізацію у мембрані СР стало доволі

вірогідним. При аналізі одержаних серій мікрофотографій виявилось, що збільшення концентрації іонів Ca^{2+} починалося з перинуклеарних і внутрішньоцитоплазматичних регіонів клітини, у той час як у підмембранних областях флуоресцентний сигнал виникав у останню чергу (Рис. 3.14). Таким чином, результати наших експериментів з кальцій-чутливим барвником дозволяють зробити висновок не лише про фактичну експресію TRPV1 у 42% детрузорних міоцитів, а й про їхню субклітинну локалізацію у внутрішніх депо іонів Ca^{2+} цих клітин.

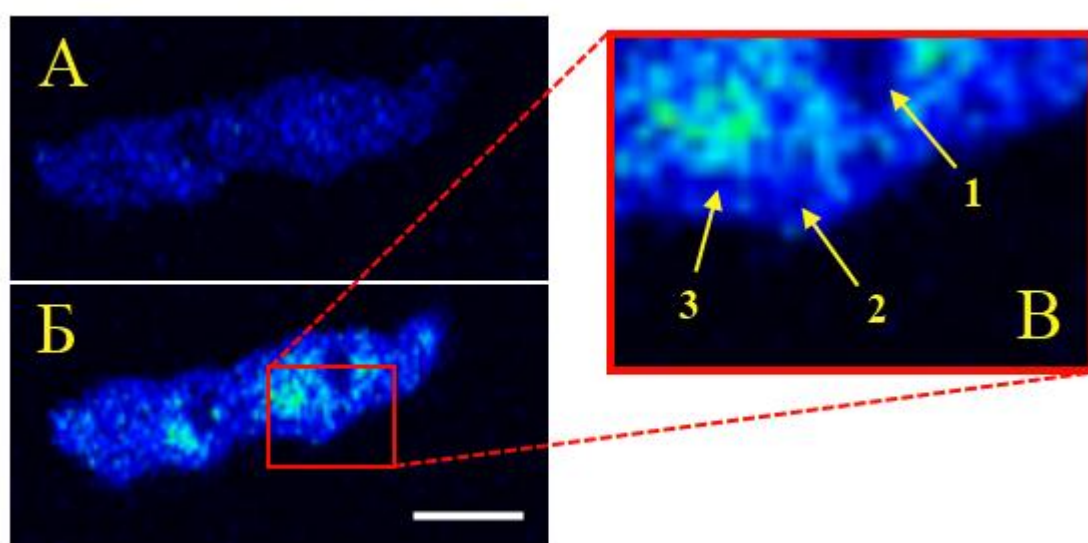


Рис. 3.14. Просторовий аспект розповсюдження кальцієвого сигналу в ГМК детрузора у відповідь на прикладання 10 мкМ КАПС. Рівномірно низька $[\text{Ca}^{2+}]$ у клітині до аплікації агоніста (А) починає змінюватись після початку його дії (Б) зсередини цитоплазми. При збільшенні (В) видно, що спершу концентрація іонів Ca^{2+} зростає в перинуклеарному просторі (1), що свідчить про локалізацію TRPV1 у саркоплазматичному ретикулумі (3). Натомість в підмембранній області (2) сигнал спочатку не розвивається. Масштабна планка 10 мкм.

3.2.5. Імуноцитохімічні докази наявності TRPV1 у СР гладеньких міоцитів детрузора. Для того, аби додатково перевірити наявність досліджуваного іонного каналу в ГМК на білковому рівні, було застосовано

метод мічення антитілами з подальшою візуалізацією флуоресцентною мікроскопією з використанням флуорофора Alexa Fluor 647. Було виявлено, що ГМК, плазмалема яких не була попередньо перфорована під час виготовлення препарату, не демонстрували позитивного сигналу (дані не представлено). З іншого боку, гладенькі міоцити, які були піддані пермеабілізації для доступу антитіл до внутрішньоклітинних мембран, виявляли ознаки присутності TRPV1. Розподіл флуоресцентної мітки мав нерівномірний характер, що також може свідчити на користь локалізації цього іонного каналу саме у внутрішніх Ca^{2+} -депо, які, як відомо, мають форму невеликих цистерн, розподілених по всій цитоплазмі (Рис. 3.15).

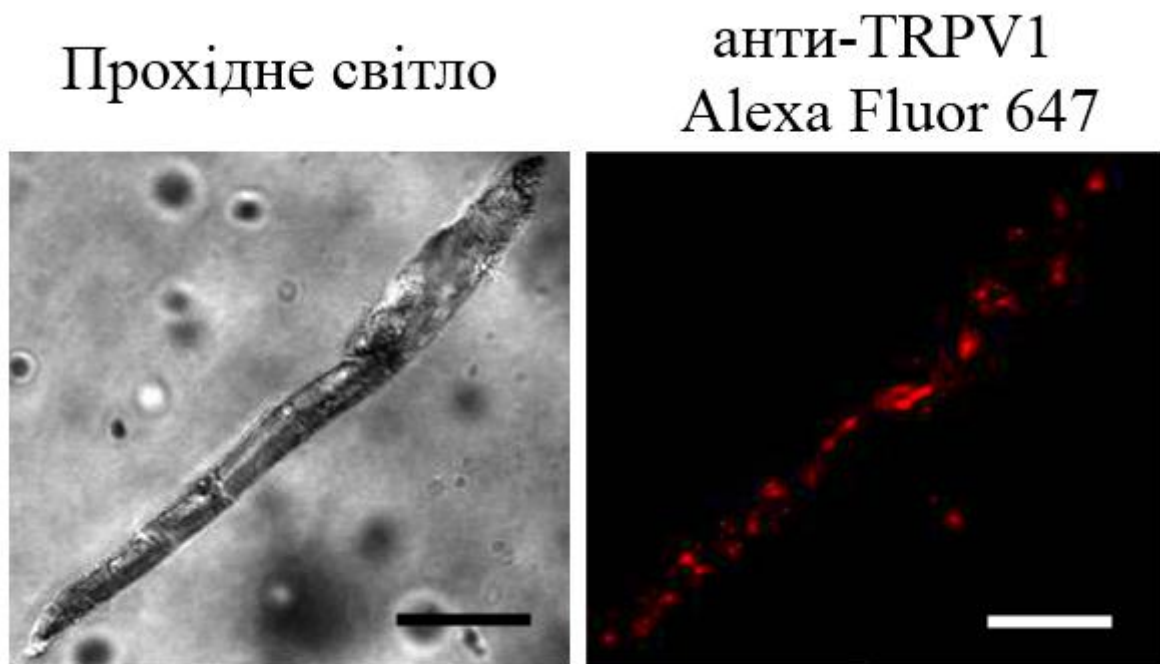


Рис. 3.15. Репрезентативна мікрофотографія гладенького детрузорного міоцита, що демонструє наявність у ньому TRPV1. Клітина була фіксована, пермеабілізована та мічена антитілом проти досліджуваного іонного каналу, кон'югованим з флуорохромом Alexa Fluor 647. Масштабні планки 10 мкм.

Дані літератури щодо імунопозитивності ГМК детрузора стосовно TRPV1 є досить суперечливими. Більшість авторів, що працювали в цьому

напрямку, не проводило експериментів з ізольованими клітинами, а робило імуногістохімічні дослідження, спрямовані на детекцію цього іонного каналу в усіх тканинах СМ, як методами класичного імунного мічення, так і флуоресцентного. Частина з них доповіла про відсутність TRPV1-імунореактивності у детрузорних міоцитах, натомість стверджуючи, що цей білок локалізований виключно в чутливих аферентах органа або ж уротелії [122, 137-139]. Натомість деяким з них вдалося отримати позитивний сигнал у детрузорі, хоча через поліклональність використовуваних ними антитіл та відсутність нокаутних контролів ці результати могли бути поставлені під сумнів [8, 120, 121]. Отримані нами дані співпадають з тими, що отримані другою групою авторів і свідчать на користь присутності TRPV1 у саркоплазматичному ретикулумі детрузорних міоцитів.

3.3. TRPV1 як ланка у холінорецепторному сигнальному каскаді ГМК детрузора.

Тривалий час, за аналогією з гладенькими міоцитами тонкого кишковика – свого роду модельного об'єкту будь-яких ГМК – вважалося, що у детрузорних гладеньком'язових клітинах механізм спряження між збудженням і скороченням полягає у активації ACh-рецепторів типів M_2 і M_3 із подальшою активацією фосфоліпази C та вивільненням іонів Ca^{2+} з саркоплазматичного ретикулуму через IP_3 -рецептор, що завершується кальцій-залежною активацією актин-міозинового скоротливого апарату [140, 141]. Втім, дослідження останніх років поставили релевантність цієї моделі саме для ГМК сечового міхура під сумнів, позаяк інгібітори PLC у низці експериментів не перешкоджали холінергічному скороченню [142-144]. У зв'язку з цим ми припустили, що TRPV1, локалізований у СР цих клітин, може виконувати роль, яку раніше приписували рецептору IP_3 , а саме вивільнювати іони Ca^{2+} у відповідь на активацію холінорецепторів. Для перевірки цієї гіпотези було використано підхід тензометрії на м'язових

смушках СМ. Для ініціювання холінергічного скорочення використовувався холіноміметик карбахол у концентрації 10 μM . Прикладання ССh у концентрації 10 мкМ викликало характерну скоротливу активність м'язової смужки з чітко розділеними фазним і тонічним компонентами (Рис. 3.9). Її амплітуда складала $3 \pm 0,7$ мН, тривалість фазного компонента дорівнювала $6 \pm 1,8$ хв., а тонічного – $15 \pm 5,6$ хв ($n=10$). Аплікація карбахолу повторювалася двічі, аби впевнитись у стереотиповості відповіді м'язової смужки на холінергічну стимуляцію. Після ретельної відмивки впродовж 40-50 хв. починалося прикладання блокатора TRPV1 капсазепіну у концентрації 10 μM , на фоні якого через 5 хв. відбувалася третя аплікація ССh. Ця передпромивка пригнічувала карбахол-викликане скорочення на 10% - 41% у різних препаратах (усереднене значення $21 \pm 6\%$, $n=5$, $p<0.05$, Рис. 3.16). Відмивка CPZ впродовж ~ 1 год. повертала амплітуду карбахол-викликаного скорочення майже до початкової.

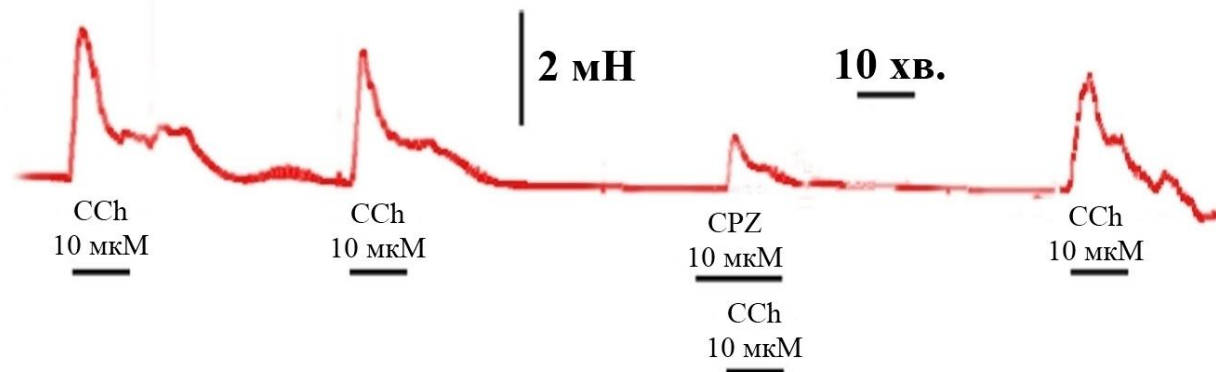


Рис. 3.16. Репрезентативний тензометричний запис скоротливої активності м'язової смужки при повторних аплікаціях холіноміметика карбахолу (CCh) самого по собі, а також після передпромивки блокатором TRPV1 капсазепіном (CPZ). З реєстрації видно, що амплітуди як фазних, так і тонічних компонентів трьох CCh-викликаних скорочень (двох перших і останнього) варіюють незначно, в той час як після попереднього прикладання CPZ обидва компоненти суттєво пригнічуються.

Проблемою у інтерпретації проведеного експерименту є те, що TRPV1 міститься не лише в детрузорних ГМК, як показано нами в цій роботі, а й у аферентних волокнах, які пронизують м'язовий шар органа і можуть впливати на скоротливу активність СМ через виділення модуляторних пептидів [129]. Отже, можна було б припустити, що пригнічення ССh-викликаного скорочення блокуванням досліджуваного іонного каналу опосередковується не лише через власне TRPV1 у міоцитах, а й через нього ж у аксонах нейронів ДКГ. Аргументом на противагу цьому може слугувати те, що аплікація CPZ самого по собі не впливала на базальний тонус м'язової смужки (Рис. 3.16). Це свідчить про те, що TRPV1-позитивні нервові волокна в ізольованій м'язовій смужці СМ знаходяться у сплячому стані й не могли вплинути на результат експерименту. Втім, залишається ймовірність, що сам ССh якимсь чином, прямим або непрямым, може активувати потенціали дії в аферентах і призвести до виділення тахікінінів.

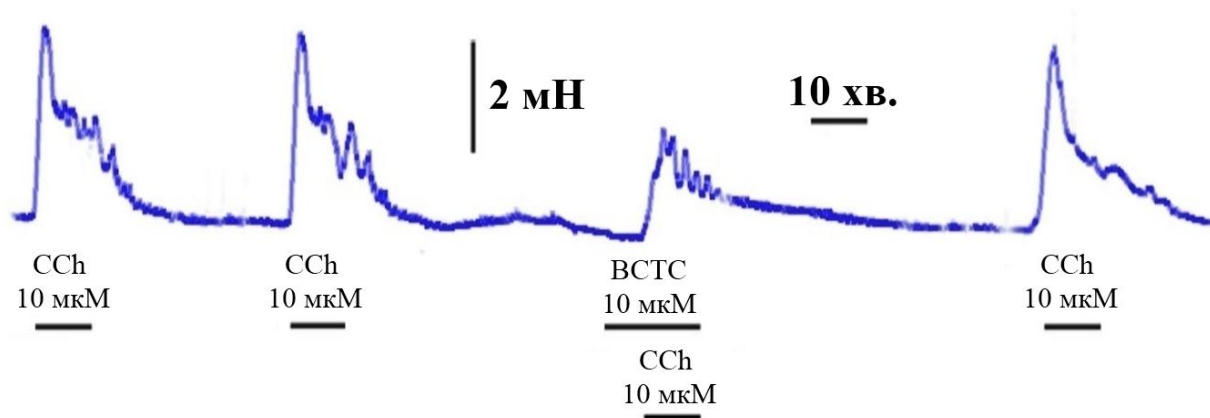


Рис. 3.17. Репрезентативний тензометричний запис скоротливої активності м'язової смужки при аплікації холіноміметика карбахолу (CCh) самого по собі, а також після передпромивки BCTC, блокатором TRPV1 великої специфічності. З реєстрації видно, що амплітуди як фазних, так і тонічних компонентів трьох ССh-викликаних скорочень (двох перших і останнього) варіюють незначно, в той час як після попереднього прикладання BCTC обидва компоненти суттєво пригнічуються.

Крім того, отриманий результат міг бути пов'язаний не з блокуванням власне TRPV1, а з побічним впливом CPZ на інші білки. Раніше було показано, що його прикладання до нейронів ДКГ викликає значне блокування струмів, опосередкованих кальцієвими потенціал-керованими каналами (Ca_v) [145]. Не дивлячись на те, що суттєва роль кальцієвих каналів у ініціюванні CCh-викликаного скорочення є неочевидною [146], ми вирішили додатково перевірити своє припущення із використанням більш специфічного блокатора досліджуваного каналу – ВСТС. Несподівано, пригнічення CCh-викликаного скорочення відтворилося навіть із більшою величиною (Рис. 3.17). Порівняно з прикладанням 10 мкМ карбахолу самого по собі, після передпромивки 10 мкМ ВСТС амплітуда сили ізометричного скорочення падала на 16% – 64% (усереднене значення $42 \pm 10\%$, $n=4$, $p<0.05$, Рис. 3.18). Таким чином, використання більш специфічного блокатора TRPV1 підтвердило наші попередні дані щодо певної ролі досліджуваного іонного каналу як медіатора дії холінорецепторів M_2/M_3 . Варто також додати, що ці експерименти непрямо підтверджують і те, що ефект пригнічення CCh-викликаного скорочення антагоністами досліджуваного іонного каналу опосередковується через вплив на міоцити, а не на TRPV1-позитивні аференти: згідно зі специфікаціями виробника, ВСТС впливає на гладенькі м'язи, оминаючи нерви, хоча природа цього явища є незрозумілою.

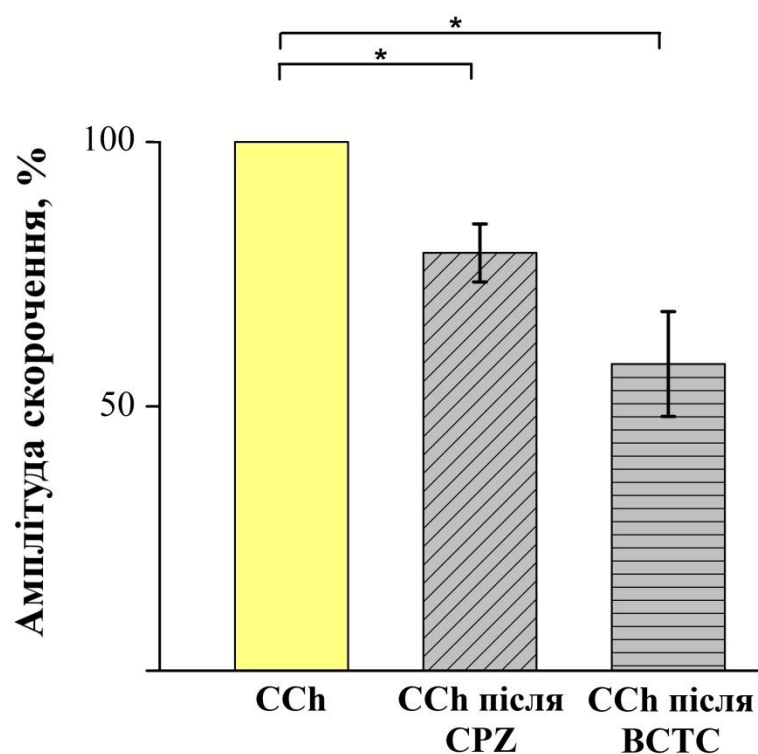


Рис. 3.18. Зміна скоротливої сили, яку розвиває м'язів препарат СМ у відповідь на прикладання карбахолу в присутності двох блокаторів TRPV1.

Таким чином, згідно з нашими даними, блокування TRPV1 зменшує холінергічне скорочення приблизно на 20% – 40%. Це може свідчити про те, що зазначений білок, локалізований у внутрішньоклітинних кальцієвих депо детрузорних ГМК, виконує там роль ліганд-керованого іонного каналу, який вивільнює іони Ca^{2+} у відповідь на надходження вторинних месенджерів внаслідок активації холінорецепторів у плазматичній мембрані (Рис. 3.19). Точний механізм цього залишається незрозумілим. Виходячи з наявних даних про активатори TRPV1 та сигнальні шляхи AChR типів M_2 і M_3 , можна припустити, що посередниками у цьому процесі є фосфоліпаза A_2 , яка активується холінорецепторами і продукує арахідонову кислоту (АК), та низка ліпоксигеназ, які виробляють з АК прямі агоністи TRPV1, а саме 5-НЕТЕ, 12- і 15-НРЕТЕ, а також лейкотрієн B_4 [147-149]. Втім, доведення фізіологічної релевантності цього гіпотетичного сигнального шляху вимагає проведення подальших досліджень із використанням специфічних антагоністів зазначених ензимів.

Гладенький міоцит детрузора

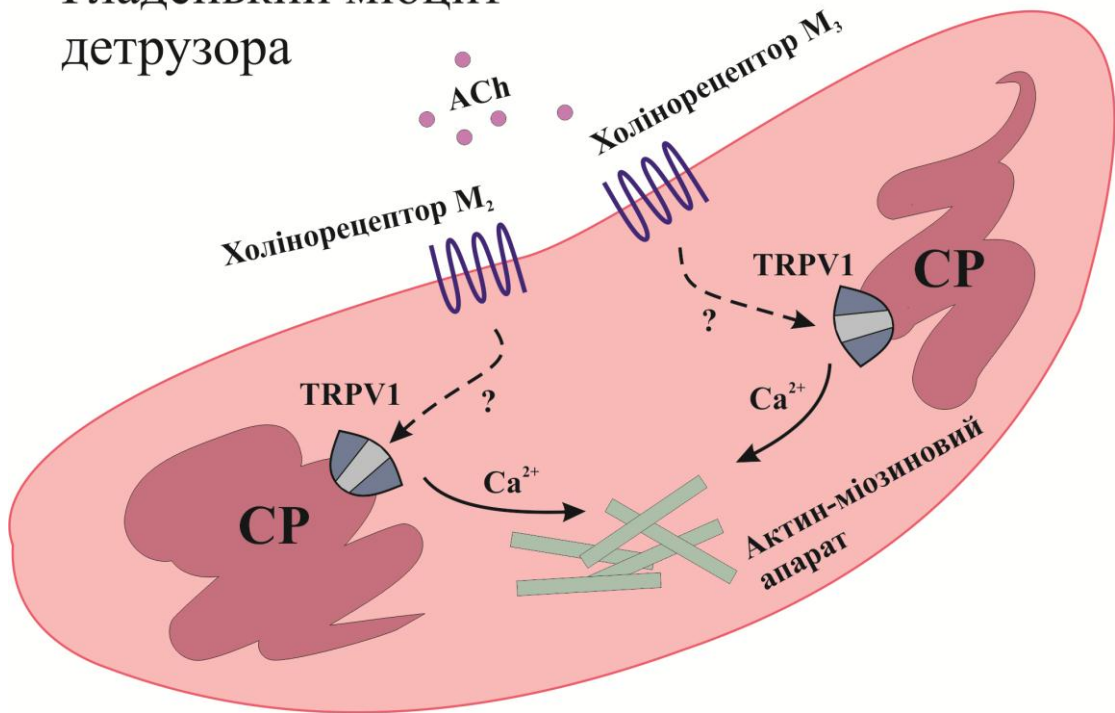


Рис. 3.19. Модель спряження холінергічного сигналу й скорочення детрузорної ГМК через TRPV1. Ацетилхолінові рецептори M_2 і M_3 , які присутні в міоцитах цього типу [150], через вторинні посередники невідомої поки природи активують зазначений іонний канал, у відповідь на що він опосередковує вихід іонів Ca^{2+} з саркоплазматичного ретикулу та ініціацію скорочення.

3.4. Активація макроскопічного I_{TRPV1} донором оксиду азоту в суміші з сульфгідрил-вмісним реагентом.

Хоча фактична наявність TRPV1 була показана для багатьох органів і тканин, чимало з цих досліджень не дали відповіді на питання його функції у цих структурах, позаяк залишилося незрозумілим, які саме фактори призводять до його активації [6, 151]. І навпаки, значна кількість робіт, у яких автори продемонстрували агонізм щодо TRPV1 з боку різноманітних ендогенних сполук, були виконані *in vitro* у виключно штучних умовах, що

ставить під сумнів фізіологічну релевантність показаних ефектів [6, 152]. Одним з таких явищ є активація TRPV1 оксидом азоту (NO), сигнальною молекулою паракринної, “близької” дії, час напівжиття якої у плазмі крові складає лише декілька секунд [153]. У роботах Miyamoto et al. та Yoshida et al. було продемонстровано, що прикладання донорів NO – особливої форми доставки цього первинного посередника, чиє застосування є неунікним через газову природу оксиду азоту – можна зареєструвати відкриття поодиноких каналів TRPV1, працюючи в конфігурації “single channel” [105, 154]. Хоча докази щодо цього ефекту були представлені досить ґрунтовні й авторам навіть вдалося встановити механізм, за яким відбувається активація досліджуваного іонного каналу – а саме шляхом ковалентного неферментативного нітрозилування в сайтах Cys616 і Cys621 – але отримати макроскопічний I_{TRPV1} з незрозумілих причин їм не вдалося. У своїй роботі ми спробували вирішити цю останню задачу, посиливши вивільнення NO з донора реакцією з сульфгідрил-вмісним реагентом.

3.4.1. Відсутність ефекту при прикладанні донора оксиду азоту до TRPV1-позитивних нейронів ДКГ. У тотальному препараті гостроізолюваних аферентних нейронів обиралися клітини малого діаметру, що, як відомо, є здебільшого термо- і ноцицепторами, що експресують TRPV1 [91]. Після встановлення робочої електрофізіологічної конфігурації до нейрона прикладався КАПС у концентрації насичення 10 мкМ для підтвердження наявності у його плазмалемі досліджуваного іонного каналу. Зазначена аплікація тривала 2-3 епізоди стимуляції, лише до того моменту, коли дія активатора ставала очевидною, після чого одразу ж припинялася для уникнення десенситизації TRPV1. Варто зазначити, що за таких умов вплив десенситизації мав бути незначним, оскільки за постійного прикладання 10 мкМ КАПС спад відповіді починався не раніше ~20 епізодів стимуляції, або 40 с прикладання. Після відмивки агоніста впродовж 5-10 епізодів стимуляції клітина перфузувалася розчином донора NO нітропрусидом натрію (НП-Na)

протягом 10-20 с, після чого зазначена речовина відмивалася чистим розчином Тіроде. Реєстрація відповіді клітини проводилася за стаціонарних значень V_{comm} +50 і -100 мВ.

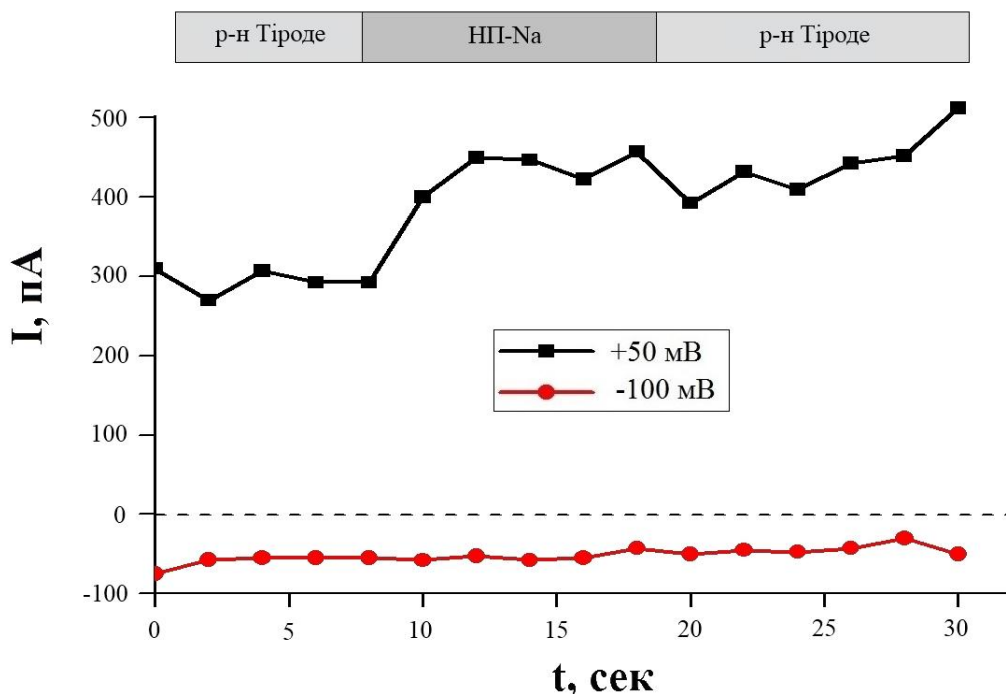


Рис. 3.20. Репрезентативний запис впливу донора оксиду азоту НП-Na на тотальні трансмембранні струми нейрона ДКГ за V_{comm} +50 і -100 мВ. З реєстрації видно, що на негативних потенціалах I_{Σ} не спричинював взагалі ніяких ефектів, а на позитивних викликав активацію вихідних струмів, причому цей ефект не знімався подальшою відмивкою НП-Na. Зазначена дія донора не може бути опосередкована TRPV1, позаяк за активації останнього зміни струму спостерігаються на обох значеннях стаціонарного V_{comm} .

Після прикладання НП-Na спостерігалися ефекти, які відрізнялися від клітини до клітини. У одному випадку жодного впливу аплікації на I_{Σ} не реєструвалося (дані не представлено, $n=4$). У іншому випадку ($n=8$) відбувалося незначне збільшення вихідного трансмембранного струму на V_{comm} +50 мВ, але не -100 мВ, що могло б свідчити про відкриття калієвих потенціал-керованих каналів, але не TRPV1, оскільки при активації

останнього зростають як вихідні струми при позитивних значеннях V_m , так і вхідні – на негативних (Рис. 3.20). Таким чином, наші дані підтвердили висновки, до яких раніше прийшли інші дослідницькі групи [105, 154], а саме що простою аплікацією донора NO досягти відкриття TRPV1 неможливо.

3.4.2. Активація I_{TRPV1} ко-аплікацією донора NO та сульфідрил-вмісного реагента. Відомо, що введення донорів оксиду азоту викликає виражені й сильні ефекти при системному введенні, що було показано у великій кількості робіт, виконаних на ізольованих органах або цілих піддослідних тваринах [155, 156]. У той же час, кількість досліджень з цієї проблематики, що були проведені на препаратах ізольованих клітин, порівняно обмежена. Ми припустили, що неможливість викликати макроскопічний I_{TRPV1} простою аплікацією донора пов'язана саме з відмінностями у зазначених типах препаратів. Раніше було показано, що вивільнення NO з молекул-донорів, хоч і є процесом спонтанним, може значно прискорюватися у присутності речовин, що містять у своєму складі тіолову групу. Зокрема, в одному з досліджень повна конверсія НП-На за контрольних умов відбувалася за декілька діб, у той час як у присутності сульфідрил-вмісних реагентів глутатіону та L-цистеїну цей час скорочувався до ~30 хв. [157]. Таким чином, можна висувати, що швидкість і сила реакції на системне введення донорів NO пов'язана із їхньою взаємодією із SH-групами ендогенних речовин, у той час у препаратах ізольованих клітин цю взаємодію можна лише моделювати, прикладаючи донор оксиду азоту одночасно з відповідними екзогенними сполуками.

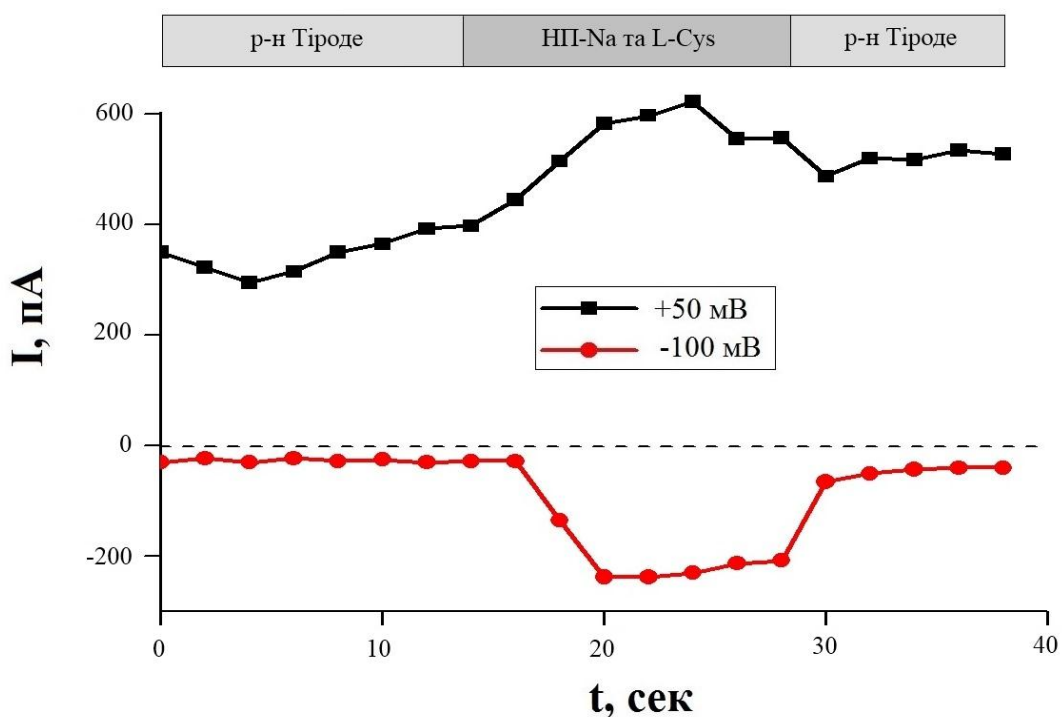


Рис. 3.21. Репрезентативний запис впливу суміші НП-На і сульфгідрил-вмісного реагента L-цистеїну на тотальні трансмембранні струми нейрона ДКГ за $V_{comm} +50$ і -100 мВ. З реєстрації видно, що прикладання суміші спричинювало різноспрямоване збільшення I_{Σ} як за негативного, так і за позитивного мембранного потенціалу, що може свідчити про активацію TRPV1.

У якості сульфгідрил-вмісного реагента нами була використана амінокислота L-цистеїн (L-Cys). Необхідно сказати, що подача обох реагентів проводилася з окремих ємностей, щоб уникнути передчасного розпаду НП-На із вивільненням NO, причому потік з кожної ємності регулювався таким чином, щоб приблизно дорівнювати потоку контрольного розчину Тіроде. Останнє робилося для того, щоб уникнути ймовірних ефектів з боку механочутливих іонних каналів або ж виникнення I_{leak} . При аплікації L-Cys до аферентного нейрона ($n=6$) одночасно з НП-На спостерігалися різнонаправлена зміна струмів на обох реєстрованих V_{comm} (Рис. 3.21). Ефект, що спостерігався, може бути пояснений відкриттям TRPV1, оскільки, як неселективний катіонний канал із V_{rev} близько 0 мВ, він

опосередковує вхідні струми за позитивних потенціалів та вихідні – за негативних. Для підтвердження того, що виявлений ефект опосередковувався саме через TRPV1, було використано його селективний блокатор капсазепін. При його прикладанні разом із сумішшю НІІ-Na та L-Cys відповідь на чисту суміш поступово знижувалася ($n=3$) (Рис. 3.22). Таким чином, наші дані свідчать, що збільшення швидкості конверсії донора NO може спричинити виникнення макроскопічного TRPV1-опосередкованого струму. Методом такого пришвидшення може стати введення в перфузійний розчин екзогенного сульфгідрил-вмісного реагента (Рис. 3.23).

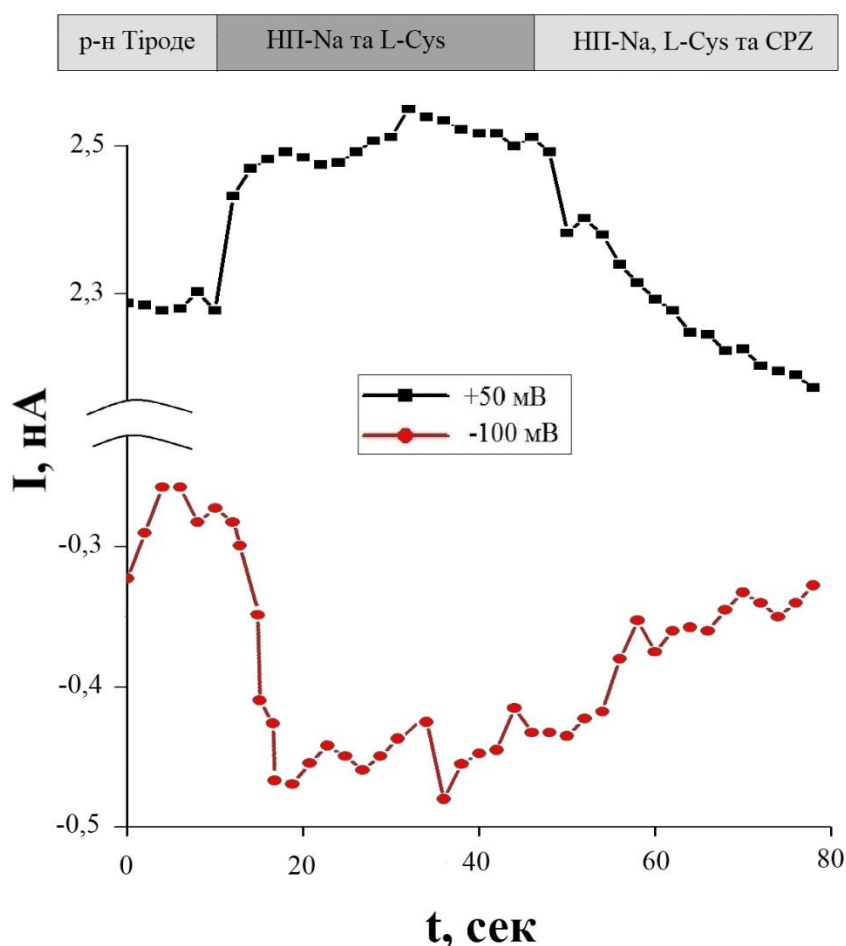


Рис. 3.22. Репрезентативний запис блокування ефекту суміші НІІ-Na та L-Cys антагоністом TRPV1 капсазепіном. З реєстрації видно, що після вираженого збільшення I_{Σ} внаслідок вивільнення NO донором відбувалося його пригнічення, спричинене присутністю CPZ.

Дослідницькі групи, які вперше виявили агонізм NO щодо TRPV1, такі як Miyamoto et al., пояснювали невдачу при спробі активувати його макроскопічний електрофізіологічний прояв тим, що NO при вивільненні з молекули-донора в недостатній кількості проникає через плазматичну мембрану [154]. Проте, на нашу думку, таке пояснення є незадовільним, позаяк раніше була продемонстрована проникність ліпідних мембран як для самого оксиду азоту, так і для його найбільш широко вживаних донорів [158, 159].

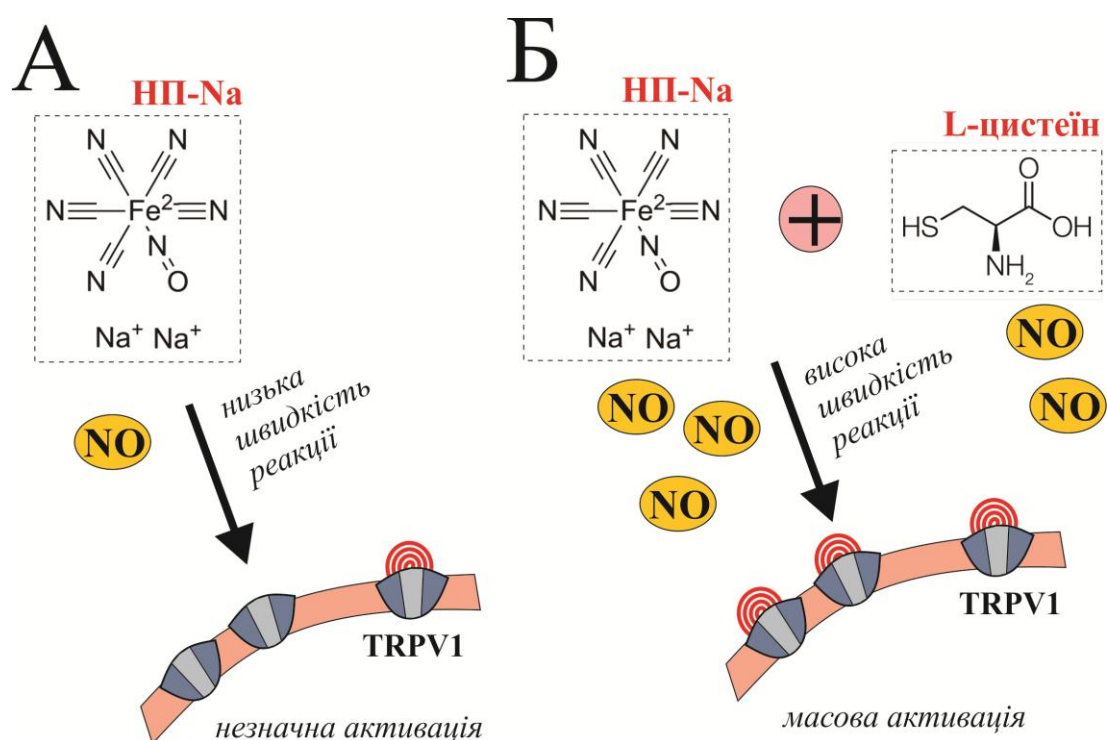


Рис. 3.23. Модель, яка ілюструє гіпотетичну причину неможливості отримання макроскопічного I_{TRPV1} при аплікації донора NO самого по собі (А) та механізм його ініціювання при прикладанні НП-Na разом із сульфгідрил-вмісним реагентом (Б).

Втім, отримані нами дані не дають змоги зробити висновків щодо того, чи дійсно TRPV1 може працювати як рецептор ендogenous NO у інтактному організмі. Відомо, що концентрація, у якій оксид азоту вивільняється з різноманітних NOS-позитивних структур, варіює від 2 до 2000 нМ [160].

Проблему поглиблює ще й те, що, оскільки газові трансмітери не можуть бути доставлені до клітин-мішеней у своїй природній формі через свою леткість й прикладаються у вигляді сполук-донорів [161], у більшості експериментів невідомою залишається концентрація NO, яка фактично діє на досліджувані біологічні об'єкти. Таким чином, питання про можливість активації TRPV1 оксидом азоту в природніх умовах лишається непроясненим і вимагає проведення подальших досліджень.

3.5. Внесок іонного каналу TRPV1 у діабетичну дисфункцію сечового міхура.

3.5.1. Зміна загальних параметрів СМ при STZ-індукованому діабеті. На 8-й тиждень після введення стрептозотоцину в піддослідних тварин розвивався ЦД, головною ознакою якого було патологічно високий рівень глюкози в крові. У діабетичної групи він сягав 26.24 ± 5.72 ммоль/л, що більш ніж в п'ять разів перевищувало відповідне значення у контрольної групи (5.01 ± 0.29 ммоль/л). Позаяк цей стан був викликаний недостатністю β -клітин підшлункової залози, що патофізіологічно нагадує діабет I типу [162], гіперглікемія супроводжувалась втратою ваги до 186 ± 26 г, у той час як контрольні тварини важили 284 ± 28 г. Крім того, додатковими ознаками цукрового діабету був розвиток катаракт і видиме погіршення стану хутра (дані не представлено) [163].

СМ піддослідних щурів також зазнавали змін, помітних уже на анатомічному та загально-фізіологічному рівні. При зважуванні після ізолювання з забитих тварин виявилось, що в контрольної групи маса сечових міхурів складала 40 ± 7 мг, а в діабетичної вона статистично достовірно зросла вдвічі й сягнула 86 ± 16 мг ($n=10$ в кожній групі, $p<0.05$, Рис. 3.24). Ймовірно, ця гіпертрофія мала адаптивний характер і була викликана одним з найбільш ранніх проявів ЦД, поліурією – збільшенням добового діурезу, пов'язаного з надмірним споживанням води через

гіперосмолярність крові [164]. Схожі результати були отримані раніше іншою дослідницькою групою, причому такого самого підвищення маси СМ, як і при діабеті, авторам вдалося досягти шляхом додавання в питну воду сахарози, відтак збільшивши її споживання піддослідною твариною [165].

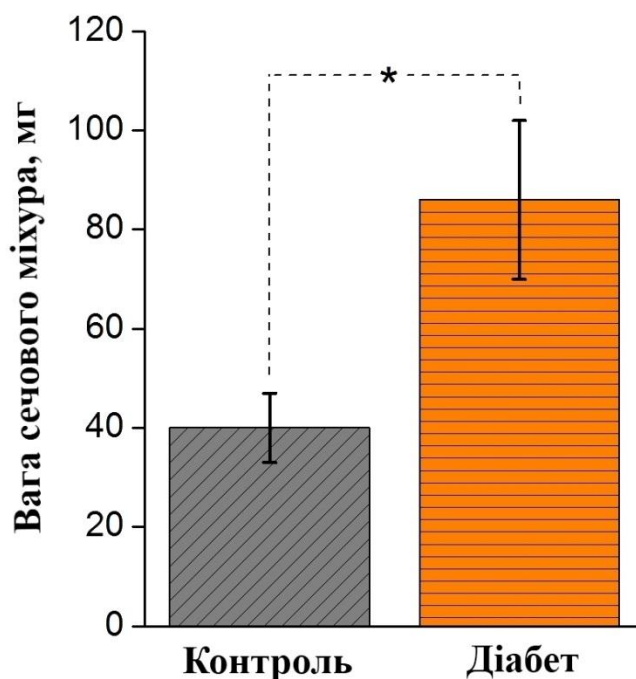


Рис. 3.24. Порівняння маси ізольованих СМ у контрольних щурів та у тварин з STZ-індукованим діабетом, $n=10$ в кожній групі, $p<0.05$.

Об'єм при максимальному заповненні (ОМЗ), виміряний шляхом цистометрії *ex vivo*, складав у діабетичній групі 0.80 ± 0.05 мл, у той час як у контролів цей параметр дорівнював лише 0.44 ± 0.04 мл ($n=10$ в кожній групі, $p<0.05$, Рис. 3.25). Незрозуміло, чи таке збільшення ОМЗ майже у два рази було також пов'язано з гіпетрофією сечового міхура чи мало інші причини, наприклад, зміну співвідношення між м'язовим і сполучним компонентами органу чи послаблення його скоротливих властивостей. Іншою дослідницькою групою було показано, що внаслідок поліурії відбувається відповідне потовщення м'язового шару, хоча вплив на механічні властивості органа ними не досліджувався [165].

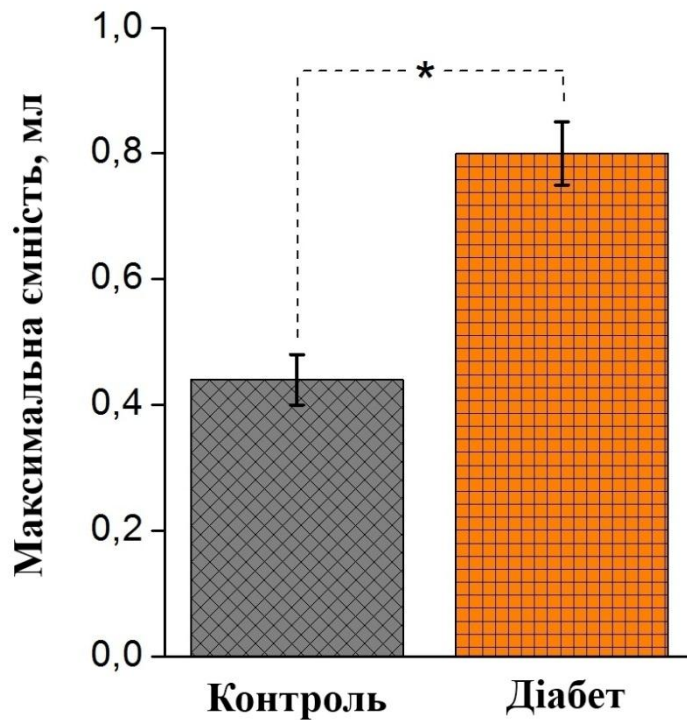


Рис. 3.25. Порівняння об'єму СМ при максимальному заповненні у контрольних щурів та у тварин з STZ-індукованим діабетом, $n=10$ в кожній групі, $p<0.05$.

Останнє припущення видається доволі вірогідним, позаяк скоротлива сила, яку при граничному заповненні розвивав СМ, суттєво послабилась у діабетиків порівняно з контрольними щурами (Рис. 3.26). У діабетичних щурів інтравезикальний тиск при максимальному заповненні (ІВТ-ПЗ) сягав лише 7.83 ± 0.42 ммНг, а в контрольних піддослідних тварин склав 15.77 ± 0.41 ммНг ($n=10$ в кожній групі, $p<0.05$, Рис. 3.26). Цей результат не може бути пояснений пасивними фізичними властивостями СМ як сферичної ємності, не дивлячись на те, що його об'єм при діабеті, як показав попередній експеримент, зріс у два рази. Відомо, що тиск будь-якої рідини не залежить від її ваги, об'єму чи форми ємності, а визначається за формулою

$$p = g \cdot \rho \cdot h \quad (3.1)$$

де p – тиск, ρ – густина, h – висота, g – прискорення вільного падіння.

Оскільки жодна з величин, представлених у формулі 3.1, не змінювалася від експерименту до експерименту, то пояснення зменшення інтравезикального тиску в діабетичній групі можливе лише з точки зору активних властивостей СМ як скоротливого органа. Можлива також така інтерпретація, що, оскільки рідини практично не стискаються, то інтегральна сила, з якою детрузор діяв на заповнюючий його розчин Кребса, передавалася на мембрану манометра так, неначе була прикладена напряду. З цієї точки зору видається очевидним, що зменшення ІВТ-ПЗ було пов'язане у обговорюваному експерименті саме з біологічними властивостями препарату.

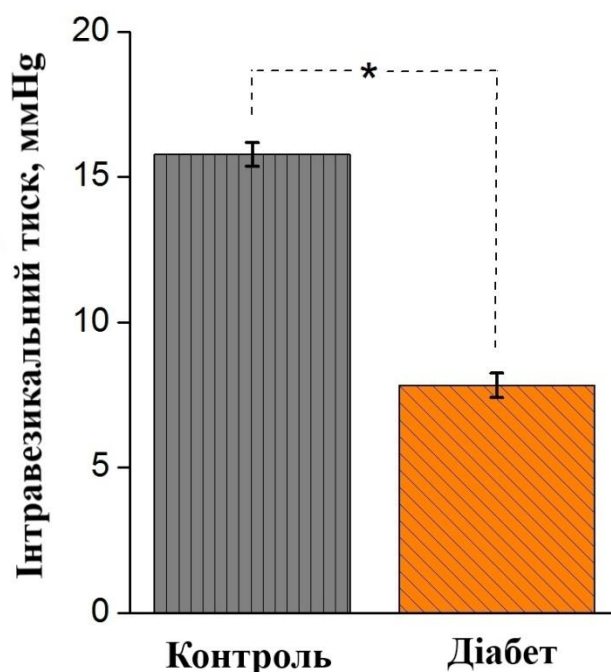


Рис. 3.26. Порівняння тиску, який створює СМ при максимальному заповненні, у контрольних щурів та у тварин з STZ-індукованим діабетом, $n=10$ в кожній групі, $p<0.05$.

Пояснити зменшення інтравезикального тиску у діабетичних тварин порівняно з контрольними можливо кількома шляхами. Унаслідок дії пошкоджувальних факторів, які супроводжують ЦД, а саме окисного стресу, масового неферментативного глікозилювання білків, активації поліолового шляху тощо [166] скоротливий апарат ГМК може переходити в дефектний

нефункціональний стан, через що скорочення за участі будь-яких механізмів будуть пригнічені. На користь цього говорить те, що, як було показано Daneshgari et al., відповідь м'язових смужок СМ на стимуляцію хлористим калієм – універсальним активатором, який викликає деполяризацію плазматичної мембрани – зменшується на певному етапі перебігу діабету й триває до кінця життя піддослідних тварин [167]. З іншого боку, за умов ЦД можуть виникати аберації в механосенсорних структурах сечового міхура, наприклад, у роботі механочутливих іонних каналів Piezo та TREK-1 [58, 168]. Нарешті, можливе й те, що досліджуване захворювання може порушувати механізми спряження між сприйняттям розтягнення органу й скоротливою відповіддю на нього, яке здійснюється за посередництва численних іонних каналів та вторинних медіатор [49]. Остаточне з'ясування цього питання вимагає додаткових досліджень.

3.5.2. Посилення I_{TRPV1} у СМ-специфічних нейронах ДКГ при цукровому діабеті. Зміни функціонального профілю TRPV1 у чутливих волокнах сечового міхура, викликані STZ-індукованим ЦД, були досліджені за допомогою того самого підходу, який був раніше застосований для перевірки принципової наявності цього іонного каналу в нейронах ДКГ, що іннервують зазначений орган. Піддослідні шурі, яким у стінку СМ за 14-21 днів до електрофізіологічного дослідження був введений ретроградний трасер DiI-C18(3), були забиті й піддані процедурі виділення аферентних нейронів зі спінальних гангліїв L6-S1. Реєстрація проводилася лише в клітинах, які виявляли позитивний сигнал при спостереженні в режимі флуоресцентної мікроскопії, що розумілося як критерій СМ-специфічності. Більша частина таких клітин відповідала на стимуляцію КАПС у концентрації 10 мкМ збільшенням I_{Σ} , з якого шляхом віднімання вичленовувався TRPV1-залежний компонент (Рис. 3.27).

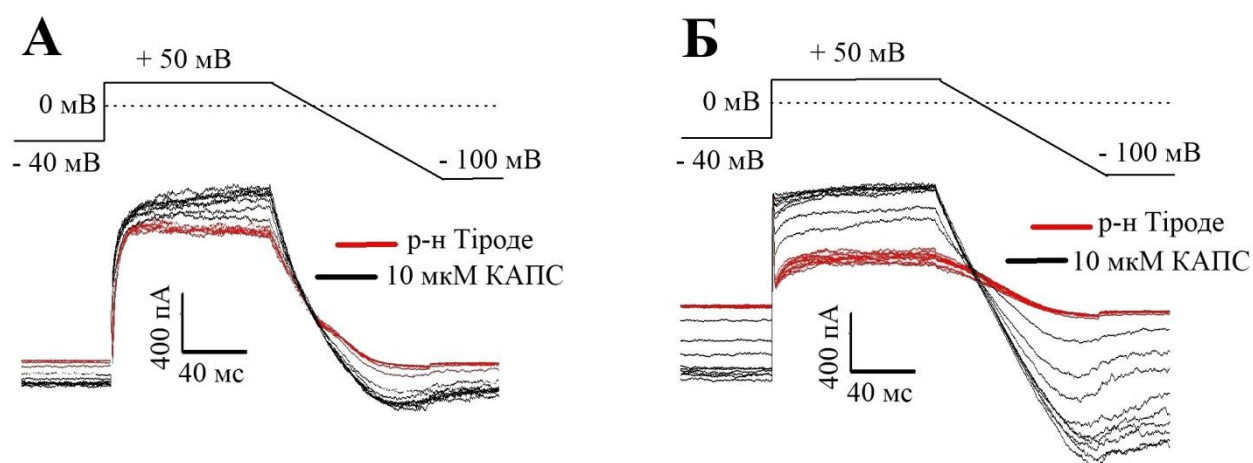


Рис. 3.27. Репрезентативні записи трансмембранних струмів СМ-специфічних нейронів ДКГ з контрольних (А) та діабетичних (Б) тварин. Передпромивка контрольним розчином Тіроде (чорні графіки) тривала 5-10 епізодів стимуляції, далі впродовж 10-15 епізодів проводилася аплікація розчину капсаїцину (КАПС, червоні графіки), після чого відбувалася відмивка, яка призводила до повернення до вихідного електрофізіологічного профілю клітини. З реєстрацій видно, що нейрони від ЦД-позитивних тварин відрізнялися більшою амплітудою I_{TRPV1} .

Вольт-амперні характеристики I_{TRPV1} у контрольній та діабетичній групах майже не відрізнялися за формою, виявляючи типові для досліджуваного іонного каналу V_{rev} близько 0 мВ і виражене вихідне випрямлення (Рис. 3.28). З цього випливає, що будь-які зміни в сигнальних системах клітини, викликані ЦД, не впливають на властивості TRPV1 таким чином, щоб він змінив свої базові біофізичні властивості. З іншого боку, нахил усередненої вольт-амперної характеристики, отриманої з нейронів діабетичних тварин, був суттєво збільшений, що свідчить про потенціацію I_{TRPV1} у зазначених клітинах. Цей ефект може бути пояснений кількома шляхами, а саме ймовірним підвищенням рівня експресії гена *Trpv1*, можливою більш інтенсивною транскрипцією його мРНК, гіпотетичним пришвидшенням трафікінгу TRPV1 з внутрішньоклітинних мембран до

плазмалеми і вздовж нервового волокна або ж потенційною зміною його регуляторного статусу в бік гіперфункції (Рис. 3.29).

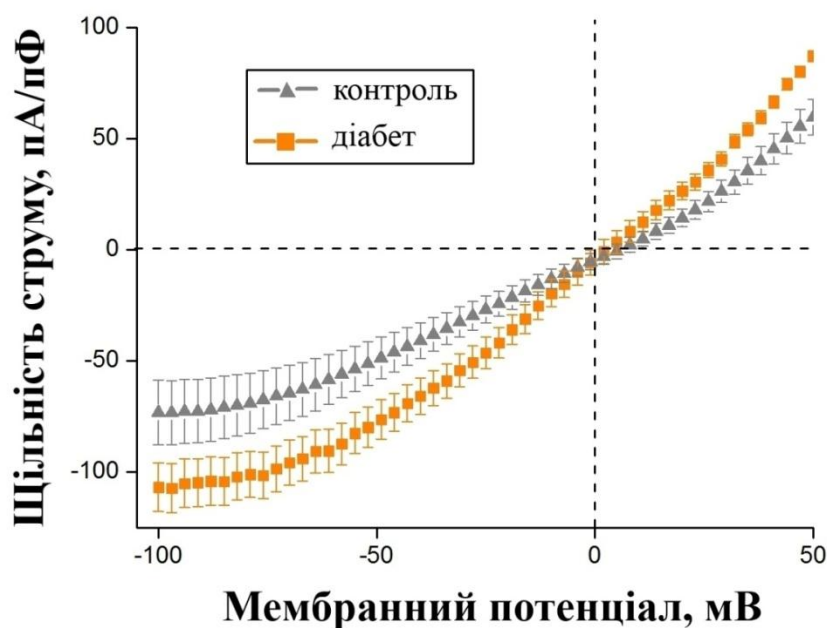


Рис. 3.28. Усереднені вольт-амперні характеристики I_{TRPV1} з аферентних нейронів контрольних (сірий графік) та діабетичних (оранжевий графік) тварин.

Кількісна оцінка виявленого посилення TRPV1-опосередкованого струму була проведена шляхом порівняння його щільності на стаціонарних значеннях V_{comm} між двома експериментальними групами. При мембранному потенціалі +50 мВ аферентні нейрони від STZ-проколотої групи виявляли I_{TRPV1} щільності $+85 \pm 5$ пА/пФ, у той час як у контролів цей параметр дорівнював $+59 \pm 8$ пА/пФ ($n=9$ у першій групі й $n=8$ у другій групі, $p < 0.05$, Рис. 3.22). У випадку ж фіксації V_m на -100 мВ щільність досліджуваних струмів у діабетичних щурів була -104 ± 11 пА/пФ, а в контрольних тварин сягала лише -73 ± 14 пА/пФ ($n=9$ у першій групі й $n=8$ у другій групі, $p < 0.05$, Рис. 3.22). Таким чином, збільшення I_{TRPV1} склало 42-44% у діабетиків порівняно з контролем.

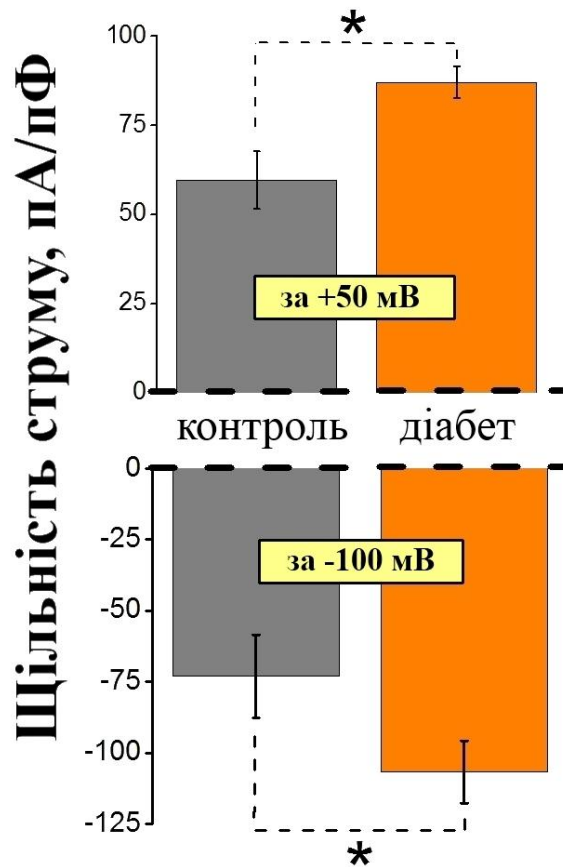


Рис. 3.29. Порівняння КАПС-індукованих струмів на двох рівнях V_{comm} між контрольною та діабетичною групою. Розмір вибірки, відповідно, $n=8$ та $n=9$, $p < 0.05$.

Хоча електрофізіологічне дослідження діабетичних змін I_{TRPV1} саме у СМ-специфічній субпопуляції нейронів ДКГ проведено нами вперше, інші автори раніше приходили до подібних висновків, вимірюючи відповідні струми в тотальних препаратах зазначених клітин. У трьох таких працях, у яких обговорювалася зниження больового порогу щодо термічних стимулів при ЦД, було виявлено, що щільність TRPV1-опосередкованого струму збільшувалася на 40-90% [127, 128, 169]. Таким чином, можна вважати, що в обидва ці патологічні стани – ДДСМ і діабетична термічна гіпералгезія – бодай частково викликаються одним і тим самим фактором. Втім, необхідно зазначити, що існують певні розбіжності, отримані нами й зазначеними авторами. Зокрема, якщо Hong et al., як і ми, спостерігав одноманітне збільшення I_{TRPV1} у STZ-проколотих щурів, то Pabbidy et al. та Khomula et al.

доповіли про розщеплення своїх експериментальних груп на гіпо-, норм- і гіпералгезивну, з відповідними зрушеннями у струмах крізь TRPV1. Такі суперечності можуть бути обумовлені тим, що різними дослідницькими групами використовувалися різної концентрації розчину STZ, а діабетичні тварини на різних стадіях прогресування захворювання, оскільки патогенез ДДСМ, як було виявлено Daneshgari et al., розвивається за двофазним принципом [170].

3.5.3. Збільшення експресії гена *Trpv1* у спінальних гангліях діабетичних тварин. Оскільки причина потенціації TRPV1-опосередкованих струмів майже у півтора рази у ДКГ діабетичних тварин лишалася неясною ані виходячи з наших даних, ані виходячи з результатів інших авторів, ми припустили, що вона полягає у порушенні на найнижчому рівні, а саме в генетичній експресії. Для перевірки цієї гіпотези нами був застосований підхід RT-ПЛР. При кількісній оцінці транскриптів гена *Trpv1* у зазначених структурах виявилось, що при діабеті відбувається збільшення експресії досліджуваного гена більш ніж наполовину. На 8-й тиждень після введення STZ щурі демонстрували підвищення рівня мРНК TRPV1 на 63%: у діабетиків відносний пороговий цикл складав 4.52 ± 0.4 ($n = 14$), у той час як у контролів ΔC_t дорівнював 2.87 ± 0.5 ($n = 21$) ($p < 0.05$, Рис. 3.30). Таким чином, посилення I_{TRPV1} у нейронах ДКГ за умов експериментального ЦД може бути пояснене через збільшення експресії відповідного гена.

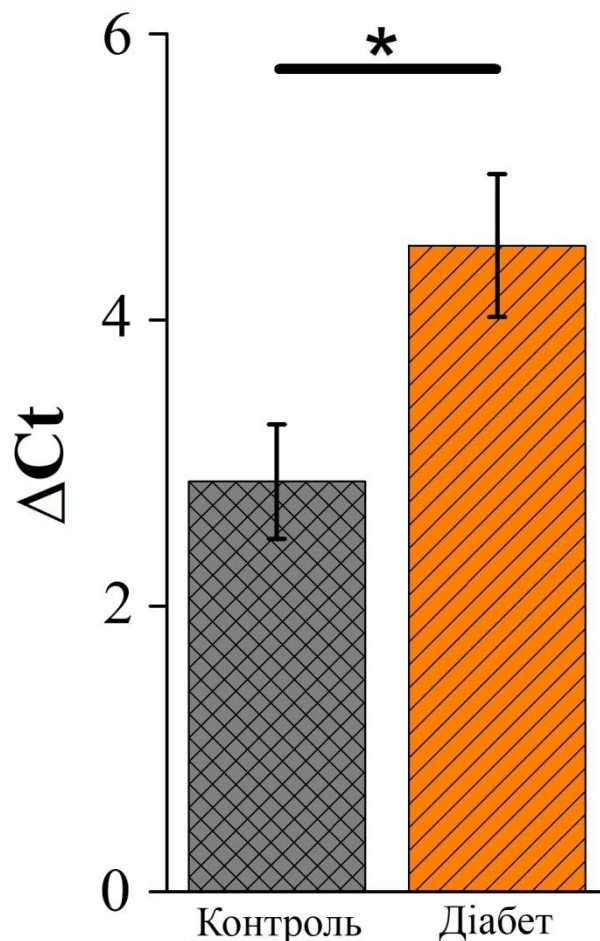


Рис. 3.30. Порівняння рівня транскрипції гена *Trpv1* у дорзальних корінцевих гангліях STZ-проколотих і контрольних піддослідних щурів. Розмір вибірки, відповідно, $n = 14$ та $n = 21$, $p < 0.05$.

Наскільки нам відомо, до цього дослідження спроби виміряти генетичну експресію TRPV1 при діабеті методом кількісної ПЛР не проводилися. Лише одна робота торкалася цього питання, використовуючи підхід повнотранскриптомного дослідження з використанням ДНК-мікрочіпів, але жодних змін у рівні транскриптів *Trpv1* у нейронах ДКТ виявлено не було [171]. Така розбіжність між нашими результатами і даними, отриманими Yamazaki et al. може бути пояснена тим, що вони використовували піддослідних тварин на 1-4 тижень після проколу STZ, у той час як наші дані отримані з більш пізніх стадій, а саме 4-12 тижня після індукції ЦД. Варто також додати, що в зазначеній роботі автори спостерігали, з плином розвитку захворювання, експоненціальне збільшення

кількості генів, чий рівень експресії був порушений. Можна припустити, що порушення транскрипції *Trpv1* є одним з середньо- або довготермінових дефектів у патогенезі діабету. Крім того, необхідно зазначити, що застосований нами метод RT-ПЛР є більш специфічним та захищеним від хибно-негативних результатів, аніж масові дослідження за допомогою ДНК-мікрочіпів.

Залишається достеменно не з'ясованим, чому саме при цукровому діабеті відбувається збільшення рівня транскрипції гена *Trpv1*. Показано, що він має подвійний промотор, який в числі іншого є мішенню для транскрипційного фактора Sp1 [172, 173]. У свою чергу, SP1 в умовах цукрового діабету піддається глікозилюванню й через це посилює свою активність, що може пояснити і відповідну гіперфункцію TRPV1 [174]. Що ж стосується інших відомих транскрипційних факторів, що регулюють експресію досліджуваного іонного каналу, таких як Sp4, Runx1 та C/EBP β , то альтерації їхнього функціонального статусу при ЦД лишаються недослідженими [175]. На вищому рівні транскрипція гена *Trpv1* регулюється фактором росту нервів (NGF), чия продукція та ретроградний транспорт вздовж аксонів порушуються при діабеті [173, 176]. Більше того, на моделі лінії нейробластоми SH-SY5Y було показано, що інсулін та інсуліноподібний фактор росту I типу (IGF-I) позитивно регулюють рівень експресії досліджуваного іонного каналу, отже, за протилежних умов недостатності β -клітин при STZ-індукованому діабеті він, ймовірно, буде знижений [177]. Таким чином, жодне з відомих діабетичних порушень на рівні первинних позаклітинних медіаторів не пояснює посилення експресії гена *Trpv1*, яке нами спостерігалось. З цього випливає необхідність подальших досліджень у цьому напрямку.

3.5.4. Послаблення КАПС-індукованих скорочень м'язових смужок СМ при цукровому діабеті. Для того, аби дослідити функціонування TRPV1 у контексті всієї тканини при ЦД, нами був застосований метод тензометрії

на м'язових смужках сечового міхура. Аплікація капсаїцину в обох групах викликала збільшення базального тону м'яза, яке тривало близько 10 хв., після чого наступала релаксація до початкового рівня за постійної присутності зазначеного агоніста (Рис. 3.31). Крива “доза-ефект”, побудована на основі наших тензометричних вимірювань, показала майже монотонний спад зі збільшенням концентрації з 0,1 до 10 мкМ. Такий результат може бути пояснений тахіфілаксом, що є макроскопічним відображенням швидкої десенситизації TRPV1 за високих концентрацій КАПС і за умов довгого часу експозиції м'язових препаратів до дії агоніста в експериментах на м'язових смужках [178].

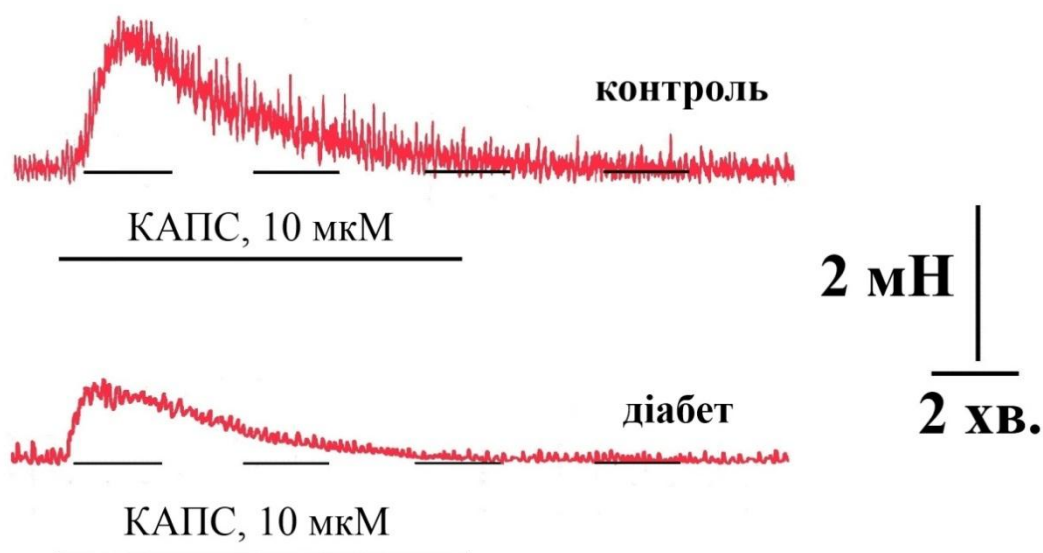


Рис. 3.31. Репрезентативні записи скоротливої активності м'язових смужок СМ у контрольних і STZ-проколотих щурів. З реєстрацій видно, що при цукровому діабеті амплітуда КАПС-індукованого скорочення зменшується. Крім того, падає також амплітуда спонтанної активності.

Необхідно зазначити, що такий на позір парадоксальний ефект був очікуваним, позаяк багато які з каналів з властивістю десенситизації демонструють двофазну, дзвоноподібну криву “доза-ефект”. Окрім як щодо TRPV1 це було продемонстровано, наприклад, щодо АТФ-керованих каналів на м'язових детрузорних смужках [179]. Хоча відносно високі концентрації

КАПС (0,1 – 10 мкМ), які використовувалися у наших експериментах, не дозволили побачити саме двофазну криву, висхідна її частина була раніше показана в інших роботах із ширшим діапазоном концентрацій агоніста [180]. Цікаво, що для деяких інших TRPV1-залежних параметрів, зокрема споживання кисню, також були продемонстрована двофазна залежність від концентрації КАПС [181].

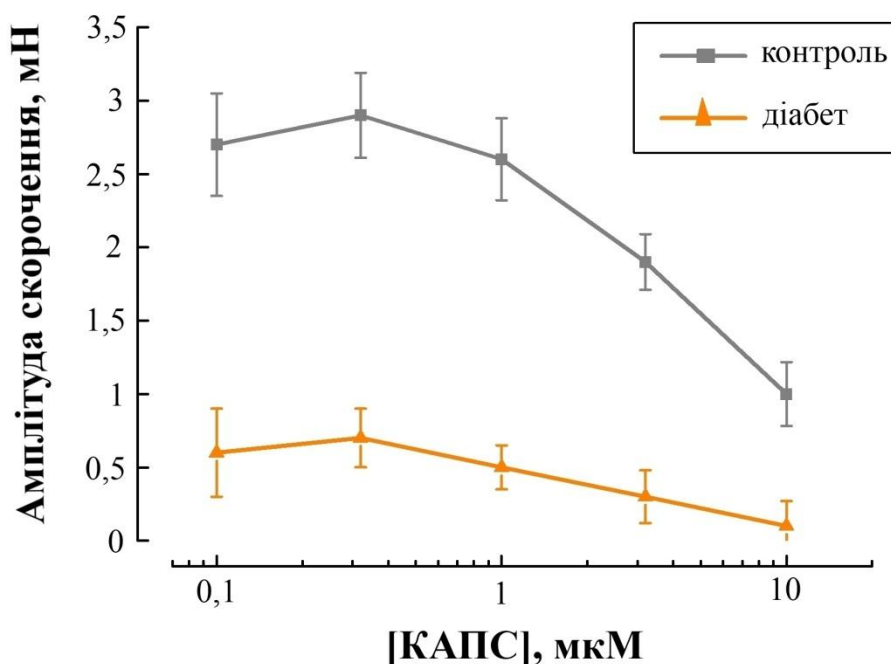


Рис. 3.32. Криві “доза-ефект”, що відображають залежність амплітуди КАПС-індукованих скорочень від концентрації агоніста в контрольних і діабетичних щурів. Відповіді на капсаїцин зменшувалися при ЦД за всіх перевірених концентрацій.

Варто зазначити, що подальше відновлення КАПС-індукованих скорочень з початковою амплітудою вимагало пролонгованої відмивки стандартним розчином Кребса впродовж не менш ніж 90 хв. (дані не представлено), що також пов’язано із десенситизацією TRPV1.

Несподівано виявилось, що амплітуда скорочення м’язових смужок є суттєво слабшою у діабетичній групі аніж у контрольній, причому цей ефект спостерігався за всіх перевірених концентрацій КАПС (Рис. 3.32). Різниця

між групами зростала майже монотонно від 77% до 90% за концентрацій, відповідно, від 100 нМ до 10 мкМ.

Можливою причиною такої розбіжності між нашими, з одного боку, електрофізіологічними та молекулярно-генетичними дослідженнями та, з іншого боку, тензометричними вимірюваннями могла бути дегенерація аксонів за умов ЦД. Відомо, що одним із найбільш розповсюджених й ранніх наслідків персистентної гіперглікемії є невропатія, яка виявляється у дегенерації нервових волокон та патологічних змінах у їхніх функціональних елементах [182, 183]. Було показано, що діабет викликає загибель окремих нейронів ДКГ, причому співвідношення між їхніми субпопуляціями також змінюється. Також ЦД спричинює у них збільшення експресії проапоптичних ензимів каспаз, зміну провідних властивостей аксонів та зменшення числа нервових волокон у периферичних нервах.

Для перевірки цієї гіпотези ми використали підхід тензометрії зі стимуляцією електричним полем (СЕР). Відомо, що при прикладанні СЕР певної амплітуди й перпендикулярно до поздовжньої осі препарату активуються лише нервові волокна, локалізовані в товщі органа, а не самі ГМК, позаяк останні є менш чутливими до електричних імпульсів і не здатні до розповсюдження такого роду подразнення по електричному синцитію – оскільки той пов'язаний, головним чином, конексонами, локалізованими між кінчиками міоцитів. Таким чином, СЕР-індуковане скорочення є вторинним і може бути інтерпретоване як опосередковане виключно через нейрональну активність.

У наших експериментах виявилось, що суттєвої дегенерації аксонів у нашій моделі ЦД не відбувалося (Рис. 3.33): у контрольних препаратах сила СЕР-індукованого скорочення складала 8.1 ± 0.61 мН, у той час як у діабетичних вона дорівнювала 7.2 ± 0.3 мН. Таким чином, зменшення скоротливих відповідей на СЕР складало лише 11% і не мало статистичної значущості, причому воно було значно менше за різкий спад чутливості м'язових смужок до КАПС (від 3 до 7 разів). Таким чином, наші дані

засвідчили, що внесок дегенерації аксонів у зниження чутливості препаратів до СЕП, якщо і був присутній, не був вирішальним на цій стадії діабету.

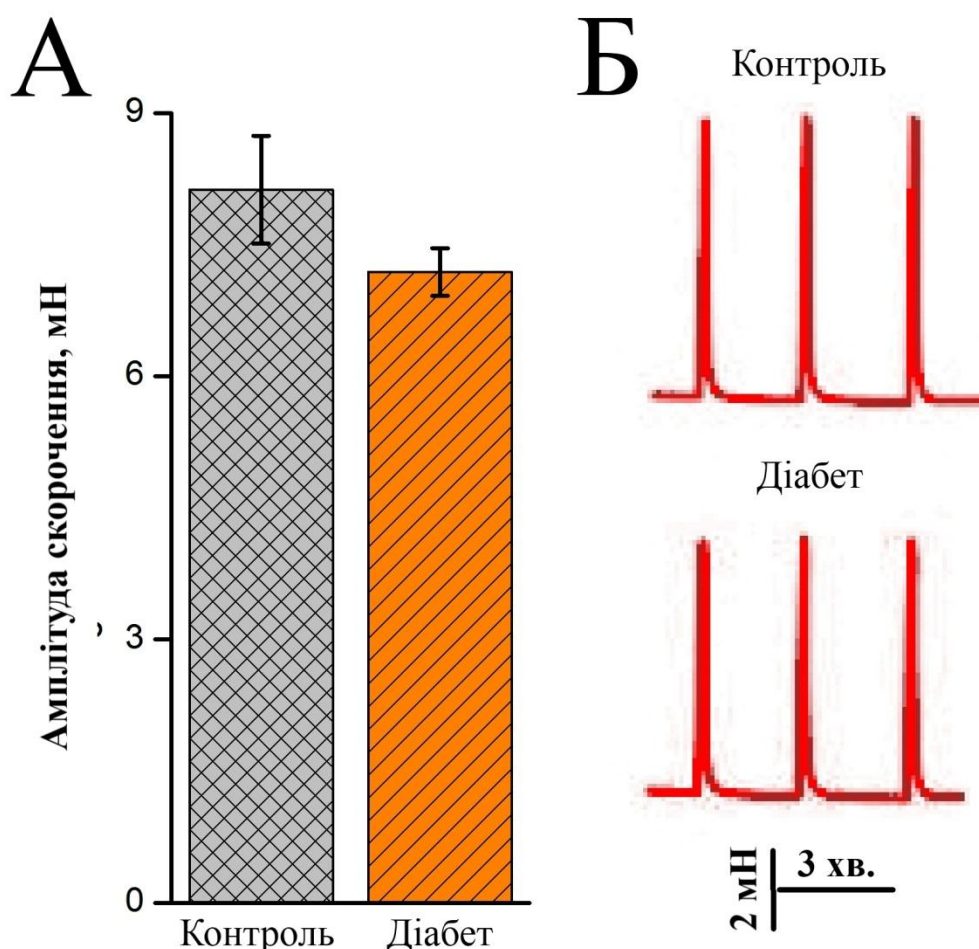


Рис. 3.33. Порівняння амплітуди СЕП-індукованих скорочень у контрольних і діабетичних щурів (А) та репрезентативні записи цих скорочень (Б). Як видно з діаграми, статистично значущого спаду в цих відповідях при ЦД не відбувалося, що свідчить про відносну інтактність нервів на 8-ому тижні після проколу тварин STZ та лише початкову стадію аксональної дегенерації.

Отже, наші результати демонструють, що ЦД викликає різноспрямовані альтерації в TRPV1-залежному сигналюванні, які полягають у збільшенні експресії гена *Trpv1* та підвищенні амплітуди I_{TRPV1} у сомах СМ-специфічних нейронів ДКГ, але водночас і зменшенні КАПС-індукованих відповідей у

м'язових смужках детрузора, причому останній ефект не пов'язаний із дегенерацією нервових волокон. Треба думати, ця розбіжність виникає через непрямі альтерації в TRPV1-залежному сигналюванні (Рис. 3.34). Зокрема, по-перше, порушення може виникати в системах синтезу, вивільнення та рецепції тахікінінів та пептида, спряженого з геном кальцитоніну (CGRP), що виділяються з капсаїцин-чутливих волокон і опосередковують КАПС-індуковане скорочення детрузора [129]. Наскільки нам відомо, жодних досліджень, присвячених таким змінам за ЦД, досі не опубліковано. По-друге, можуть відбуватися локальні порушення в регуляції TRPV1. Хоча експресія каналу підвищується, що було показано нами в сомах нейронів ДКГ, у самій детрузорній тканині він може перебувати під пригнічувальним впливом місцевих медіаторів або ж переходити в гіпофункціональний статус внаслідок внутрішньоклітинної регуляції в нервовому волокні [184]. По-третє, може відбуватися порушення в трафікінгу TRPV1, що було показано для STZ-проколотих щурів Hong & Wiley [128]. Хоча зазначені автори спостерігали лише порушення транспорту каналу з внутрішньоклітинних мембран до плазмалеми аферентного нейрона, можна припустити й порушення його дистального транспорту вздовж нервового волокна. В будь-якому разі, встановлення конкретного механізму зниження чутливості м'язових препаратів до КАПС у діабетичних тварин вимагає подальших молекулярно-біологічних та біохімічних досліджень, хоча вони й утруднені на сьогодні низькою специфічністю комерційно доступних антитіл.

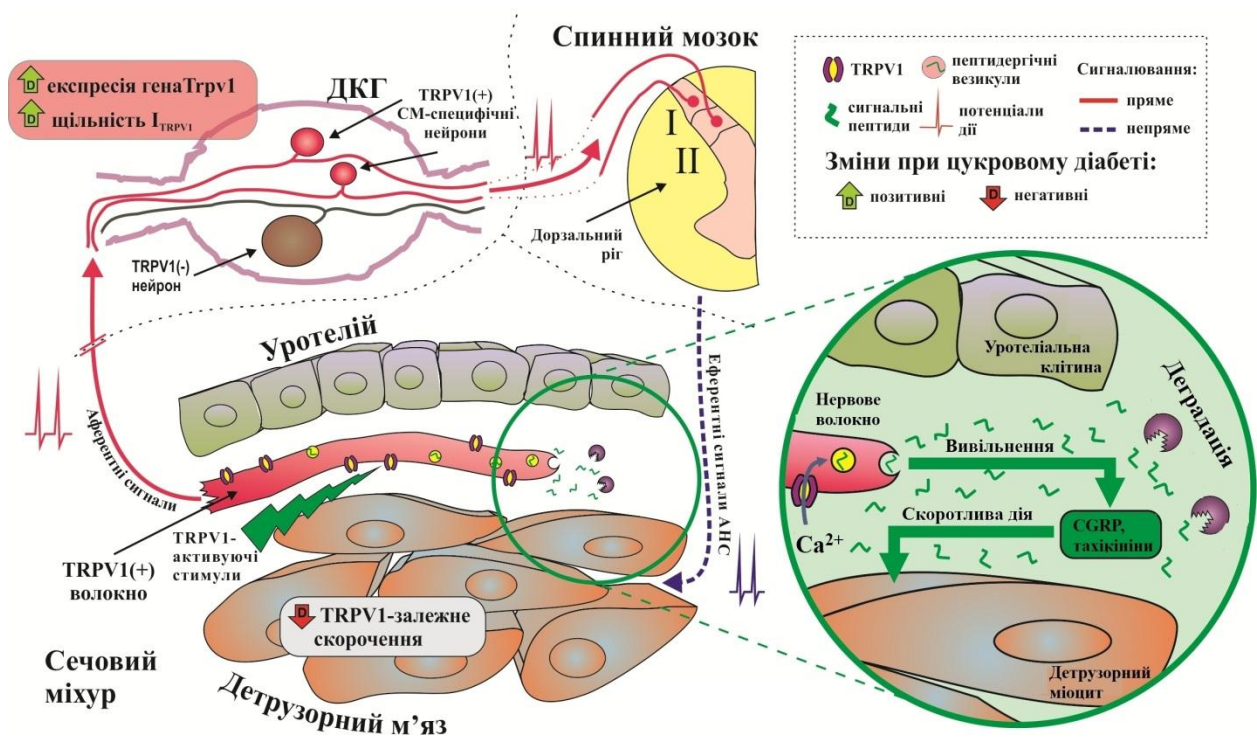


Рис. 3.34. Модель порушень у TRPV1-залежному сигналюванні в СМ при цукровому діабеті. Як видно зі схеми, цей іонний канал бере участь у локальному контролі сечовиділення, оскільки опосередковує виділення регуляторних пептидів з аферентних волокон, таких як тахікініни та CGRP [129]. Хоча експресія його гена і амплітуда створюваної ним іонної провідності в нейронах ДКГ підвищується в умовах ЦД, відповідного ефекту на локальному рівні не спостерігається, позаяк КАПС-індуковані скоротливі відповіді детрузора суттєво знижуються. Гіпотетично, це може відбуватися через порушення системи секреції та рецепції регуляторних пептидів, місцевого регуляторного пригнічення TRPV1 або ж абераціях у його трафікінгу.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі досліджено експресію, біофізичні параметри та фізіологічне значення іонного каналу TRPV1 у аферентних нейронах дорзальних корінцевих гангліїв відділів L6-S1 і гладеньком'язових клітинах детрузора. Розглянуто питання його наявності в зазначених клітинах на рівні генетичної експресії, електрофізіологічного проявлення, субклітинної локалізації та участі в молекулярних сигнальних каскадах. Крім того, показані патофізіологічні зміни в роботі TRPV1, пов'язані з діабетичною дисфункцією сечовипускання.

1. В уротелії та детрузорі сечового міхура щурів транскрипти гена *Trpv1* виявляються на відносно слабкому рівні у порівнянні із сенсорними нейронами дорзальних корінцевих гангліїв.
2. Функціональний іонний канал TRPV1, здатний генерувати трансмембранний струм (I_{TRPV1}) у відповідь на прикладання його агоністу капсаїцину, наявний у більшості сенсорних нейронів відділів L6-S1, які іннервують сечовий міхур.
3. Частина (42%) гладеньком'язових клітин детрузора реагують на прикладання капсаїцину підвищенням цитозольної концентрації кальцію завдяки його вивільненню із внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо цих клітин.
4. Білок TRPV1 локалізується у внутрішньоклітинних компартментах міоцитів детрузора, позаяк жодних ознак наявності як білка TRPV1 у плазматичній мембрані зазначених клітин, так і I_{TRPV1} у них у відповідь на капсаїцин виявлено не було.
5. Іонний канал TRPV1 у детрузорі сечового міхура є ланкою в сигнальному каскаді метаботропних мускаринових ацетилхолінових

рецепторів і опосередковує 20-40% скорочувального ефекту на детрузор карбахолу, агоністу зазначених рецепторів.

6. Макроскопічний I_{TRPV1} неможливо викликати донорами оксиду азоту при прикладанні їх *per se* на препарат ізольованих сенсорних нейронів. Активація TRPV1 на рівні цілої клітини вимагає аплікації донорів разом із сульфгідрил-вмісними реагентами, такими як L-цистеїн, які пришвидшуватимуть їхній розпад із вивільненням оксиду азоту.
7. Іонний канал TRPV1, локалізований у чутливих нервових волокнах сечового міхура з “еферентною” пептидергічною функцією, бере участь у патогенезі діабетичної дисфункції сечового міхура. При діабеті I_{TRPV1} і експресія гена *Trpv1* у нейронах ДКГ посилюються наполовину, в той час як капсаїцин-індуковані скорочення м’язових смужок послаблюються у 2-5 разів. Такі різноспрямовані зміни можуть частково пояснити різноманіття симптомів, яким характеризується це ускладнення діабету.

ВИКОРИСТАНІ ДЖЕРЕЛА

1. *Reynolds WS, Fowke J, Dmochowski R.* The Burden of Overactive Bladder on US Public Health. *Curr Bladder Dysfunct Rep.* 2016; 11: 8-13.
2. *Sims J, Browning C, Lundgren-Lindquist B, Kendig H.* Urinary incontinence in a community sample of older adults: prevalence and impact on quality of life. *Disabil Rehabil.* 2011; 33: 1389-98.
3. *Daneshgari F, Liu G, Birder L, Hanna-Mitchell AT, Chacko S.* Diabetic bladder dysfunction: current translational knowledge. *J Urol.* 2009; 182: S18-26.
4. *Kubota Y, Kojima Y, Shibata Y, Imura M, Sasaki S, Kohri K.* Role of KIT-Positive Interstitial Cells of Cajal in the Urinary Bladder and Possible Therapeutic Target for Overactive Bladder. *Adv Urol.* 2011; 2011: 816342.
5. *Maggi CA, Santicioli P, Giuliani S, Furio M, Meli A.* The capsaicin-sensitive innervation of the rat urinary bladder: further studies on mechanisms regulating micturition threshold. *J Urol.* 1986; 136: 696-700.
6. *Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR.* The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6: 357-72.
7. *Birder LA, Nakamura Y, Kiss S, Nealen ML, Barrick S, Kanai AJ, et al.* Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nat Neurosci.* 2002; 5: 856-60.
8. *Everaerts W, Sepulveda MR, Gevaert T, Roskams T, Nilius B, De Ridder D.* Where is TRPV1 expressed in the bladder, do we see the real channel? *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2009; 379: 421-5.
9. *de Groat WC, Griffiths D, Yoshimura N.* Neural control of the lower urinary tract. *Compr Physiol.* 2015; 5: 327-96.
10. *Fry CH, Sadananda P, Wood DN, Thiruchelvam N, Jabr RI, Clayton R.* Modeling the urinary tract-computational, physical, and biological methods. *Neurourol Urodyn.* 2011; 30: 692-9.

11. *Asscher AW, Sussman M, Waters WE, Davis RH, Chick S.* Urine as a medium for bacterial growth. *Lancet.* 1966; 2: 1037-41.
12. *Hull RA, Hull SI.* Nutritional requirements for growth of uropathogenic *Escherichia coli* in human urine. *Infect Immun.* 1997; 65: 1960-1.
13. *Hicks RM.* The mammalian urinary bladder: an accommodating organ. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1975; 50: 215-46.
14. *Templeman L, Chapple CR, Chess-Williams R.* Urothelium derived inhibitory factor and cross-talk among receptors in the trigone of the bladder of the pig. *J Urol.* 2002; 167: 742-5.
15. *Woodburne RT.* The Ureter, Ureterovesical Junction, and Vesical Trigone. *Anat Rec.* 1965; 151: 243-9.
16. *Andersson KE, Arner A.* Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2004; 84: 935-86.
17. *Fry CH, Meng E, Young JS.* The physiological function of lower urinary tract smooth muscle. *Auton Neurosci.* 2010; 154: 3-13.
18. *Herrera GM, Meredith AL.* Diurnal variation in urodynamics of rat. *PLoS One.* 2010; 5: e12298.
19. *Hill WG.* Control of urinary drainage and voiding. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015; 10: 480-92.
20. *Benarroch EE.* Neural control of the bladder: recent advances and neurologic implications. *Neurology.* 2010; 75: 1839-46.
21. *Kanai AJ.* Afferent mechanism in the urinary tract. *Handb Exp Pharmacol.* 2011: 171-205.
22. *Araki I, Du S, Kobayashi H, Sawada N, Mochizuki T, Zakoji H, et al.* Roles of mechanosensitive ion channels in bladder sensory transduction and overactive bladder. *Int J Urol.* 2008; 15: 681-7.
23. *Dixon JS, Jen PY, Gosling JA.* A double-label immunohistochemical study of intramural ganglia from the human male urinary bladder neck. *J Anat.* 1997; 190 (Pt 1): 125-34.

24. *Jung J, Ahn HK, Huh Y.* Clinical and functional anatomy of the urethral sphincter. *Int Neurourol J.* 2012; 16: 102-6.
25. *Viana R, Batourina E, Huang H, Dressler GR, Kobayashi A, Behringer RR, et al.* The development of the bladder trigone, the center of the anti-reflux mechanism. *Development.* 2007; 134: 3763-9.
26. *Routh JC, Bogaert GA, Kaefer M, Manzoni G, Park JM, Retik AB, et al.* Vesicoureteral reflux: current trends in diagnosis, screening, and treatment. *Eur Urol.* 2012; 61: 773-82.
27. *Elmissiry MM, Ali AG, Abulfotooh A, Moussa AA, Ali GA.* Factors determining the amount of residual urine in men with bladder outlet obstruction: Could it be a predictor for bladder contractility? *Arab J Urol.* 2014; 12: 214-8.
28. *Birder LA.* Urothelial signaling. *Auton Neurosci.* 2010; 153: 33-40.
29. *Klingler CH.* Glycosaminoglycans: how much do we know about their role in the bladder? *Urologia.* 2016; 83 Suppl 1: 11-4.
30. *Kyker KD, Coffman J, Hurst RE.* Exogenous glycosaminoglycans coat damaged bladder surfaces in experimentally damaged mouse bladder. *BMC Urol.* 2005; 5: 4.
31. *Arrighi S.* The urothelium: anatomy, review of the literature, perspectives for veterinary medicine. *Ann Anat.* 2015; 198: 73-82.
32. *Winder M, Tobin G, Zupancic D, Romih R.* Signalling molecules in the urothelium. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 297295.
33. *Lazzeri M.* The physiological function of the urothelium--more than a simple barrier. *Urol Int.* 2006; 76: 289-95.
34. *Andersson KE, McCloskey KD.* Lamina propria: the functional center of the bladder? *Neurourol Urodyn.* 2014; 33: 9-16.
35. *Christ GJ, Hodges S.* Molecular mechanisms of detrusor and corporal myocyte contraction: identifying targets for pharmacotherapy of bladder and erectile dysfunction. *Br J Pharmacol.* 2006; 147 Suppl 2: S41-55.

36. Hashimoto N, Kiyono T, Saitow F, Asada M, Yoshida M. Reversible differentiation of immortalized human bladder smooth muscle cells accompanied by actin bundle reorganization. *PLoS One*. 2017; 12: e0186584.
37. Haferkamp A, Mundhenk J, Bastian PJ, Reitz A, Dorsam J, Pannek J, *et al*. Increased expression of connexin 43 in the overactive neurogenic detrusor. *Eur Urol*. 2004; 46: 799-805.
38. Wang HZ, Brink PR, Christ GJ. Gap junction channel activity in short-term cultured human detrusor myocyte cell pairs: gating and unitary conductances. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006; 291: C1366-76.
39. Sui GP, Wu C, Fry CH. A description of Ca²⁺ channels in human detrusor smooth muscle. *BJU Int*. 2003; 92: 476-82.
40. Andersson KE, Forman A. Effects of calcium channel blockers on urinary tract smooth muscle. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1986; 58 Suppl 2: 193-200.
41. Drumm BT, Koh SD, Andersson KE, Ward SM. Calcium signalling in Cajal-like interstitial cells of the lower urinary tract. *Nat Rev Urol*. 2014; 11: 555-64.
42. McCloskey KD. Interstitial cells in the urinary bladder--localization and function. *Neurourol Urodyn*. 2010; 29: 82-7.
43. Drake MJ, Fry CH, Hashitani H, Kirschner-Hermanns R, Rahnema'i MS, Speich JE, *et al*. What are the origins and relevance of spontaneous bladder contractions? ICI-RS 2017. *Neurourol Urodyn*. 2018; 37: S13-S9.
44. McCloskey KD, Gurney AM. Kit positive cells in the guinea pig bladder. *J Urol*. 2002; 168: 832-6.
45. Rasmussen H, Rumessen JJ, Hansen A, Smedts F, Horn T. Ultrastructure of Cajal-like interstitial cells in the human detrusor. *Cell Tissue Res*. 2009; 335: 517-27.
46. Feng QF, Hou YH, Hou WG, Lin ZX, Tang KM, Chen YL. The effects of acupuncture on bladder interstitial cells of cajal excitability in rats with overactive bladder. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013; 2013: 261217.

47. Zhou J, Luan GD, Ren LM, Wu ZG, Wang X, Zhao Y. Pharmacologic characteristics of bladder micturition function in anesthetized mice. *Comp Med*. 2010; 60: 436-42.
48. Dixon JS, Gilpin SA, Gilpin CJ, Gosling JA. Intramural ganglia of the human urinary bladder. *Br J Urol*. 1983; 55: 195-8.
49. Yoshimura N, Ogawa T, Miyazato M, Kitta T, Furuta A, Chancellor MB, et al. Neural mechanisms underlying lower urinary tract dysfunction. *Korean J Urol*. 2014; 55: 81-90.
50. Ahmed S, Yuan J. Experimental study of the effect of capsaicin on the urinary bladder function in rats. *J Tongji Med Univ*. 2000; 20: 116-9.
51. Andersen OK, Felsby S, Nicolaisen L, Bjerring P, Jensen TS, Arendt-Nielsen L. The effect of Ketamine on stimulation of primary and secondary hyperalgesic areas induced by capsaicin--a double-blind, placebo-controlled, human experimental study. *Pain*. 1996; 66: 51-62.
52. Hawthorn MH, Chapple CR, Cock M, Chess-Williams R. Urothelium-derived inhibitory factor(s) influences on detrusor muscle contractility in vitro. *Br J Pharmacol*. 2000; 129: 416-9.
53. Lecci A, Maggi CA. Tachykinins as modulators of the micturition reflex in the central and peripheral nervous system. *Regul Pept*. 2001; 101: 1-18.
54. Grundy L, Chess-Williams R, Brierley SM, Mills K, Moore KH, Mansfield K, et al. NKA enhances bladder-afferent mechanosensitivity via urothelial and detrusor activation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018; 315: F1174-F85.
55. Maggi CA, Bevan S, Walpole CS, Rang HP, Giuliani S. A comparison of capsazepine and ruthenium red as capsaicin antagonists in the rat isolated urinary bladder and vas deferens. *Br J Pharmacol*. 1993; 108: 801-5.
56. de Seze M, Wiart L, Ferriere J, de Seze MP, Joseph P, Barat M. Intravesical instillation of capsaicin in urology: A review of the literature. *Eur Urol*. 1999; 36: 267-77.

57. *Fattori V, Hohmann MS, Rossaneis AC, Pinho-Ribeiro FA, Verri WA.* Capsaicin: Current Understanding of Its Mechanisms and Therapy of Pain and Other Pre-Clinical and Clinical Uses. *Molecules*. 2016; 21.
58. *Lei Q, Pan XQ, Chang S, Malkowicz SB, Guzzo TJ, Malykhina AP.* Response of the human detrusor to stretch is regulated by TREK-1, a two-pore-domain (K2P) mechano-gated potassium channel. *J Physiol*. 2014; 592: 3013-30.
59. *Meng E, Young JS, Brading AF.* Spontaneous activity of mouse detrusor smooth muscle and the effects of the urothelium. *Neurourol Urodyn*. 2008; 27: 79-87.
60. *Brading AF.* Spontaneous activity of lower urinary tract smooth muscles: correlation between ion channels and tissue function. *J Physiol*. 2006; 570: 13-22.
61. *Kushida N, Fry CH.* On the origin of spontaneous activity in the bladder. *BJU Int*. 2016; 117: 982-92.
62. *Hashitani H, Brading AF, Suzuki H.* Correlation between spontaneous electrical, calcium and mechanical activity in detrusor smooth muscle of the guinea-pig bladder. *Br J Pharmacol*. 2004; 141: 183-93.
63. *Brading AF, Brain KL.* Ion channel modulators and urinary tract function. *Handb Exp Pharmacol*. 2011: 375-93.
64. *Griffin CS, Thornbury KD, Hollywood MA, Sergeant GP.* Muscarinic receptor-induced contractions of the detrusor are impaired in TRPC4 deficient mice. *Sci Rep*. 2018; 8: 9264.
65. *Griffin CS, Bradley E, Dudem S, Hollywood MA, McHale NG, Thornbury KD, et al.* Muscarinic Receptor Induced Contractions of the Detrusor are Mediated by Activation of TRPC4 Channels. *J Urol*. 2016; 196: 1796-808.
66. *Petkov GV.* Role of potassium ion channels in detrusor smooth muscle function and dysfunction. *Nat Rev Urol*. 2011; 9: 30-40.
67. *Wein AJ.* Re: Central Role of the BK Channel in Urinary Bladder Smooth Muscle Physiology and Pathophysiology. *J Urol*. 2016; 195: 421-2.

68. *Petkov GV*. Central role of the BK channel in urinary bladder smooth muscle physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014; 307: R571-84.
69. *Uchida W, Masuda N, Shirai Y, Shibasaki K, Satoh N, Takenada T*. The role of extracellular Ca^{2+} in carbachol-induced tonic contraction of the pig detrusor smooth muscle. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1994; 350: 398-402.
70. *Chow KY, Wu C, Sui GP, Fry CH*. Role of the T-type Ca^{2+} current on the contractile performance of guinea pig detrusor smooth muscle. *Neurourol Urodyn*. 2003; 22: 77-82.
71. *Yamamoto M, Unno T, Matsuyama H, Kohda M, Masuda N, Nishimura M, et al*. Two types of cation channel activated by stimulation of muscarinic receptors in guinea-pig urinary bladder smooth muscle. *J Pharmacol Sci*. 2008; 108: 248-57.
72. *Luptak J, Kocmalova M, Franova S, Sutovsky J, Grendar M, Svihra J, et al*. Involvement of calcium regulating ion channels in contractility of human isolated urinary bladder. *Gen Physiol Biophys*. 2018; 37: 391-8.
73. *Touska F, Marsakova L, Teisinger J, Vlachova V*. A "cute" desensitization of TRPV1. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011; 12: 122-9.
74. *Jara-Oseguera A, Simon SA, Rosenbaum T*. TRPV1: on the road to pain relief. *Curr Mol Pharmacol*. 2008; 1: 255-69.
75. *Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D*. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997; 389: 816-24.
76. *Cao E, Liao M, Cheng Y, Julius D*. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature*. 2013; 504: 113-8.
77. *Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y*. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*. 2013; 504: 107-12.
78. *Jorgensen C, Furini S, Domene C*. Energetics of Ion Permeation in an Open-Activated TRPV1 Channel. *Biophys J*. 2016; 111: 1214-22.

79. *Brauchi S, Orta G, Salazar M, Rosenmann E, Latorre R.* A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. *J Neurosci.* 2006; 26: 4835-40.
80. *Darre L, Domene C.* Binding of Capsaicin to the TRPV1 Ion Channel. *Mol Pharm.* 2015; 12: 4454-65.
81. *Yang F, Xiao X, Cheng W, Yang W, Yu P, Song Z, et al.* Structural mechanism underlying capsaicin binding and activation of the TRPV1 ion channel. *Nat Chem Biol.* 2015; 11: 518-24.
82. *Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B.* Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol.* 2006; 68: 685-717.
83. *Zheng J.* Molecular mechanism of TRP channels. *Compr Physiol.* 2013; 3: 221-42.
84. *Zhu MX.* Understanding the role of voltage gating of polymodal TRP channels. *J Physiol.* 2007; 585: 321-2.
85. *Nilius B, Talavera K, Owsianik G, Prenen J, Droogmans G, Voets T.* Gating of TRP channels: a voltage connection? *J Physiol.* 2005; 567: 35-44.
86. *Clapham DE, Miller C.* A thermodynamic framework for understanding temperature sensing by transient receptor potential (TRP) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108: 19492-7.
87. *Dhaka A, Uzzell V, Dubin AE, Mathur J, Petrus M, Bandell M, et al.* TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. *J Neurosci.* 2009; 29: 153-8.
88. *Aneiros E, Cao L, Papakosta M, Stevens EB, Phillips S, Grimm C.* The biophysical and molecular basis of TRPV1 proton gating. *EMBO J.* 2011; 30: 994-1002.
89. *Holzer P.* Acid-sensitive ion channels and receptors. *Handb Exp Pharmacol.* 2009: 283-332.
90. *Brain SD.* TRPV1 and TRPA1 channels in inflammatory pain: elucidating mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* 2011; 1245: 36-7.
91. *Brito R, Sheth S, Mukherjea D, Rybak LP, Ramkumar V.* TRPV1: A Potential Drug Target for Treating Various Diseases. *Cells.* 2014; 3: 517-45.

92. *Senning EN, Collins MD, Stratiievska A, Ufret-Vincenty CA, Gordon SE.* Regulation of TRPV1 ion channel by phosphoinositide (4,5)-bisphosphate: the role of membrane asymmetry. *J Biol Chem.* 2014; 289: 10999-1006.
93. *De Petrocellis L, Di Marzo V.* Lipids as regulators of the activity of transient receptor potential type V1 (TRPV1) channels. *Life Sci.* 2005; 77: 1651-66.
94. *Hanna VS, Hafez EAA.* Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. *J Adv Res.* 2018; 11: 23-32.
95. *Maccarrone M.* Metabolism of the Endocannabinoid Anandamide: Open Questions after 25 Years. *Front Mol Neurosci.* 2017; 10: 166.
96. *Toth A, Blumberg PM, Boczan J.* Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV1). *Vitam Horm.* 2009; 81: 389-419.
97. *Glaser ST, Kaczocha M, Deutsch DG.* Anandamide transport: a critical review. *Life Sci.* 2005; 77: 1584-604.
98. *Hofmann NA, Barth S, Waldeck-Weiermair M, Klec C, Strunk D, Malli R, et al.* TRPV1 mediates cellular uptake of anandamide and thus promotes endothelial cell proliferation and network-formation. *Biol Open.* 2014; 3: 1164-72.
99. *Martin Gimenez VM, Noriega SE, Kassuha DE, Fuentes LB, Manucha W.* Anandamide and endocannabinoid system: an attractive therapeutic approach for cardiovascular disease. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2018; 12: 177-90.
100. *Lawton SK, Xu F, Tran A, Wong E, Prakash A, Schumacher M, et al.* N-Arachidonoyl Dopamine Modulates Acute Systemic Inflammation via Nonhematopoietic TRPV1. *J Immunol.* 2017; 199: 1465-75.
101. *Wen H, Ostman J, Bubb KJ, Panayiotou C, Priestley JV, Baker MD, et al.* 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) is a novel activator of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channel. *J Biol Chem.* 2012; 287: 13868-76.
102. *Zhang X, El Demerdash N, Falck JR, Munnuri S, Koehler RC, Yang ZJ.* The contribution of TRPV1 channel to 20-HETE-Aggravated ischemic neuronal injury. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2018; 137: 63-8.

103. *Hakimizadeh E, Oryan S, Hajizadeh Moghaddam A, Shamsizadeh A, Roohbakhsh A.* Endocannabinoid System and TRPV1 Receptors in the Dorsal Hippocampus of the Rats Modulate Anxiety-like Behaviors. *Iran J Basic Med Sci.* 2012; 15: 795-802.
104. *Taberner FJ, Fernandez-Ballester G, Fernandez-Carvajal A, Ferrer-Montiel A.* TRP channels interaction with lipids and its implications in disease. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1848: 1818-27.
105. *Yoshida T, Inoue R, Morii T, Takahashi N, Yamamoto S, Hara Y, et al.* Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nat Chem Biol.* 2006; 2: 596-607.
106. *Premkumar LS, Sikand P.* TRPV1: a target for next generation analgesics. *Curr Neuropharmacol.* 2008; 6: 151-63.
107. *Sudbury JR, Ciura S, Sharif-Naeini R, Bourque CW.* Osmotic and thermal control of magnocellular neurosecretory neurons--role of an N-terminal variant of trpv1. *Eur J Neurosci.* 2010; 32: 2022-30.
108. *Kitamura N, Nagami E, Matsushita Y, Kayano T, Shibuya I.* Constitutive activity of transient receptor potential vanilloid type 1 triggers spontaneous firing in nerve growth factor-treated dorsal root ganglion neurons of rats. *IBRO Rep.* 2018; 5: 33-42.
109. *Cui Y, Yang F, Cao X, Yarov-Yarovoy V, Wang K, Zheng J.* Selective disruption of high sensitivity heat activation but not capsaicin activation of TRPV1 channels by pore turret mutations. *J Gen Physiol.* 2012; 139: 273-83.
110. *Qi Y, Qi Z, Li Z, Wong CK, So C, Lo IC, et al.* Role of TRPV1 in the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells into Cardiomyocytes. *PLoS One.* 2015; 10: e0133211.
111. *Goswami C, Rademacher N, Smalla KH, Kalscheuer V, Ropers HH, Gundelfinger ED, et al.* TRPV1 acts as a synaptic protein and regulates vesicle recycling. *J Cell Sci.* 2010; 123: 2045-57.

112. *Kimball C, Luo J, Yin S, Hu H, Dhaka A.* The Pore Loop Domain of TRPV1 Is Required for Its Activation by the Volatile Anesthetics Chloroform and Isoflurane. *Mol Pharmacol.* 2015; 88: 131-8.
113. *Kim SJ, Park GH, Kim D, Lee J, Min H, Wall E, et al.* Analysis of cellular and behavioral responses to imiquimod reveals a unique itch pathway in transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)-expressing neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108: 3371-6.
114. *Simonetti M, Fabbro A, D'Arco M, Zweyer M, Nistri A, Giniatullin R, et al.* Comparison of P2X and TRPV1 receptors in ganglia or primary culture of trigeminal neurons and their modulation by NGF or serotonin. *Mol Pain.* 2006; 2: 11.
115. *Lotteau S, Ducreux S, Romestaing C, Legrand C, Van Coppenolle F.* Characterization of functional TRPV1 channels in the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle. *PLoS One.* 2013; 8: e58673.
116. *Miyake T, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S.* Activation of mitochondrial transient receptor potential vanilloid 1 channel contributes to microglial migration. *Glia.* 2015; 63: 1870-82.
117. *Ruiz-Villalba A, van Pelt-Verkuil E, Gunst QD, Ruijter JM, van den Hoff MJ.* Amplification of nonspecific products in quantitative polymerase chain reactions (qPCR). *Biomol Detect Quantif.* 2017; 14: 7-18.
118. *Koussounadis A, Langdon SP, Um IH, Harrison DJ, Smith VA.* Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Sci Rep.* 2015; 5: 10775.
119. *Stein RJ, Santos S, Nagatomi J, Hayashi Y, Minnery BS, Xavier M, et al.* Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract. *J Urol.* 2004; 172: 1175-8.
120. *Ost D, Roskams T, Van Der Aa F, De Ridder D.* Topography of the vanilloid receptor in the human bladder: more than just the nerve fibers. *J Urol.* 2002; 168: 293-7.

121. *Lazzeri M, Vannucchi MG, Zardo C, Spinelli M, Beneforti P, Turini D, et al.* Immunohistochemical evidence of vanilloid receptor 1 in normal human urinary bladder. *Eur Urol.* 2004; 46: 792-8.
122. *Avelino A, Cruz C, Nagy I, Cruz F.* Vanilloid receptor 1 expression in the rat urinary tract. *Neuroscience.* 2002; 109: 787-98.
123. *Charrua A, Reguenga C, Cordeiro JM, Correia-de-Sa P, Paule C, Nagy I, et al.* Functional transient receptor potential vanilloid 1 is expressed in human urothelial cells. *J Urol.* 2009; 182: 2944-50.
124. *Boudes M, De Ridder D.* Urothelial TRPV1: TRPV1-Reporter Mice, a Way to Clarify the Debate? *Front Physiol.* 2012; 3: 130.
125. *Cavanaugh DJ, Chesler AT, Jackson AC, Sigal YM, Yamanaka H, Grant R, et al.* Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *J Neurosci.* 2011; 31: 5067-77.
126. *Dang K, Bielefeldt K, Gebhart GF.* Differential responses of bladder lumbosacral and thoracolumbar dorsal root ganglion neurons to purinergic agonists, protons, and capsaicin. *J Neurosci.* 2005; 25: 3973-84.
127. *Khomula EV, Viatchenko-Karpinski VY, Borisyuk AL, Duzhy DE, Belan PV, Voitenko NV.* Specific functioning of Cav3.2 T-type calcium and TRPV1 channels under different types of STZ-diabetic neuropathy. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1832: 636-49.
128. *Hong S, Wiley JW.* Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in the expression and function of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem.* 2005; 280: 618-27.
129. *Meini S, Maggi CA.* Evidence for a capsaicin-sensitive, tachykinin-mediated, component in the NANC contraction of the rat urinary bladder to nerve stimulation. *Br J Pharmacol.* 1994; 112: 1123-31.
130. *Li L, Jiang C, Hao P, Li W, Fan L, Zhou Z, et al.* Changes in T-type calcium channel and its subtypes in overactive detrusor of the rats with partial bladder outflow obstruction. *Neurourol Urodyn.* 2007; 26: 870-8.

131. *Hashitani H, Brading AF*. Electrical properties of detrusor smooth muscles from the pig and human urinary bladder. *Br J Pharmacol*. 2003; 140: 146-58.
132. *Hashitani H, Fukuta H, Takano H, Klemm MF, Suzuki H*. Origin and propagation of spontaneous excitation in smooth muscle of the guinea-pig urinary bladder. *J Physiol*. 2001; 530: 273-86.
133. *Padmakumar M, Brain KL, Young JS, Manchanda R*. A four-component model of the action potential in mouse detrusor smooth muscle cell. *PLoS One*. 2018; 13: e0190016.
134. *Ozaki H, Karaki H*. Different Ca^{2+} -sensitivity in phasic and tonic types of smooth muscles. *Biol Signals*. 1993; 2: 253-62.
135. *Sakmann B, Neher E*. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol*. 1984; 46: 455-72.
136. *Grundy L, Caldwell A, Brierley SM*. Mechanisms Underlying Overactive Bladder and Interstitial Cystitis/Painful Bladder Syndrome. *Front Neurosci*. 2018; 12: 931.
137. *Avelino A, Cruz F*. Peptide immunoreactivity and ultrastructure of rat urinary bladder nerve fibers after topical desensitization by capsaicin or resiniferatoxin. *Auton Neurosci*. 2000; 86: 37-46.
138. *Yamada T, Ugawa S, Ueda T, Ishida Y, Kajita K, Shimada S*. Differential localizations of the transient receptor potential channels TRPV4 and TRPV1 in the mouse urinary bladder. *J Histochem Cytochem*. 2009; 57: 277-87.
139. *Yiangou Y, Facer P, Ford A, Brady C, Wiseman O, Fowler CJ, et al*. Capsaicin receptor VR1 and ATP-gated ion channel P2X3 in human urinary bladder. *BJU Int*. 2001; 87: 774-9.
140. *Okamoto H, Unno T, Arima D, Suzuki M, Yan HD, Matsuyama H, et al*. Phospholipase C involvement in activation of the muscarinic receptor-operated cationic current in Guinea pig ileal smooth muscle cells. *J Pharmacol Sci*. 2004; 95: 203-13.

141. *Frei E, Hofmann F, Wegener JW.* Phospholipase C mediated Ca²⁺ signals in murine urinary bladder smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 2009; 610: 106-9.
142. *Schneider T, Fetscher C, Krege S, Michel MC.* Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of human urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 309: 1148-53.
143. *Fleischman M, Schneider T, Fetscher C, Michel MC.* Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of rat urinary bladder. II. Protein kinases. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 308: 54-8.
144. *Schneider T, Hein P, Michel MC.* Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of rat urinary bladder. I. Phospholipases and Ca²⁺ sources. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 308: 47-53.
145. *Docherty RJ, Yeats JC, Piper AS.* Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture. *Br J Pharmacol.* 1997; 121: 1461-7.
146. *An JY, Yun HS, Lee YP, Yang SJ, Shim JO, Jeong JH, et al.* The intracellular pathway of the acetylcholine-induced contraction in cat detrusor muscle cells. *Br J Pharmacol.* 2002; 137: 1001-10.
147. *Burke JE, Dennis EA.* Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res.* 2009; 50 Suppl: S237-42.
148. *Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, et al.* Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 6155-60.
149. *Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, et al.* Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature.* 1999; 400: 452-7.
150. *Mansfield KJ, Liu L, Moore KH, Vaux KJ, Millard RJ, Burcher E.* Molecular characterization of M₂ and M₃ muscarinic receptor expression in bladder from women with refractory idiopathic detrusor overactivity. *BJU Int.* 2007; 99: 1433-8.

151. *Everaerts W, Gevaert T, Nilius B, De Ridder D.* On the origin of bladder sensing: Tr(i)ps in urology. *Neurourol Urodyn.* 2008; 27: 264-73.
152. *Song MY, Yuan JX.* Introduction to TRP channels: structure, function, and regulation. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 661: 99-108.
153. *Hakim TS, Sugimori K, Camporesi EM, Anderson G.* Half-life of nitric oxide in aqueous solutions with and without haemoglobin. *Physiol Meas.* 1996; 17: 267-77.
154. *Miyamoto T, Dubin AE, Petrus MJ, Patapoutian A.* TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. *PLoS One.* 2009; 4: e7596.
155. *Grievink H, Zeltzer G, Drenger B, Berenshtein E, Chevion M.* Protection by Nitric Oxide Donors of Isolated Rat Hearts Is Associated with Activation of Redox Metabolism and Ferritin Accumulation. *PLoS One.* 2016; 11: e0159951.
156. *Zheng J, Zhai K, Chen Y, Zhang X, Miao L, Wei B, et al.* Nitric oxide mediates stretch-induced Ca²⁺ oscillation in smooth muscle. *J Cell Sci.* 2016; 129: 2430-7.
157. *Grossi L, D'Angelo S.* Sodium nitroprusside: mechanism of NO release mediated by sulfhydryl-containing molecules. *J Med Chem.* 2005; 48: 2622-6.
158. *Subczynski WK, Lomnicka M, Hyde JS.* Permeability of nitric oxide through lipid bilayer membranes. *Free Radic Res.* 1996; 24: 343-9.
159. *Huang KT, Huang Z, Kim-Shapiro DB.* Nitric oxide red blood cell membrane permeability at high and low oxygen tension. *Nitric Oxide.* 2007; 16: 209-16.
160. *Kelm M.* Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1411: 273-89.
161. *Miller MR, Megson IL.* Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br J Pharmacol.* 2007; 151: 305-21.

162. *Damasceno DC, Netto AO, Iessi IL, Gallego FQ, Corvino SB, Dallaqua B, et al.* Streptozotocin-induced diabetes models: pathophysiological mechanisms and fetal outcomes. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 819065.
163. *Bahmani F, Bathaie SZ, Aldavood SJ, Ghahghaei A.* Glycine therapy inhibits the progression of cataract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Vis.* 2012; 18: 439-48.
164. *Fathollahi A, Daneshgari F, Hanna-Mitchell AT.* Effect of Polyuria on Bladder Function in Diabetics versus Non-Diabetics: An Article Review. *Curr Urol.* 2015; 8: 119-25.
165. *Xiao N, Wang Z, Huang Y, Daneshgari F, Liu G.* Roles of polyuria and hyperglycemia in bladder dysfunction in diabetes. *J Urol.* 2013; 189: 1130-6.
166. *Brownlee M.* The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005; 54: 1615-25.
167. *Liu G, Daneshgari F.* Diabetic bladder dysfunction. *Chin Med J (Engl).* 2014; 127: 1357-64.
168. *Bagriantsev SN, Gracheva EO, Gallagher PG.* Piezo proteins: regulators of mechanosensation and other cellular processes. *J Biol Chem.* 2014; 289: 31673-81.
169. *Pabbidi RM, Yu SQ, Peng S, Khardori R, Pauza ME, Premkumar LS.* Influence of TRPV1 on diabetes-induced alterations in thermal pain sensitivity. *Mol Pain.* 2008; 4: 9.
170. *Daneshgari F, Liu G, Imrey PB.* Time dependent changes in diabetic cystopathy in rats include compensated and decompensated bladder function. *J Urol.* 2006; 176: 380-6.
171. *Yamazaki S, Yamaji T, Murai N, Yamamoto H, Matsuda T, Price RD, et al.* FK1706, a novel non-immunosuppressive immunophilin ligand, modifies gene expression in the dorsal root ganglia during painful diabetic neuropathy. *Neurol Res.* 2012; 34: 469-77.

172. *Chu C, Zavala K, Fahimi A, Lee J, Xue Q, Eilers H, et al.* Transcription factors Sp1 and Sp4 regulate TRPV1 gene expression in rat sensory neurons. *Mol Pain*. 2011; 7: 44.
173. *Xue Q, Jong B, Chen T, Schumacher MA.* Transcription of rat TRPV1 utilizes a dual promoter system that is positively regulated by nerve growth factor. *J Neurochem*. 2007; 101: 212-22.
174. *Brownlee M.* Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414: 813-20.
175. *Ugarte GD, Diaz E, Biscaia M, Stehberg J, Montecino M, van Zundert B.* Transcription of the pain-related TRPV1 gene requires Runx1 and C/EBPbeta factors. *J Cell Physiol*. 2013; 228: 860-70.
176. *Golbidi S, Laher I.* Bladder dysfunction in diabetes mellitus. *Front Pharmacol*. 2010; 1: 136.
177. *Lilja J, Laulund F, Forsby A.* Insulin and insulin-like growth factor type-I up-regulate the vanilloid receptor-1 (TRPV1) in stably TRPV1-expressing SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurosci Res*. 2007; 85: 1413-9.
178. *Dong F, Du YR, Xie W, Strong JA, He XJ, Zhang JM.* Increased function of the TRPV1 channel in small sensory neurons after local inflammation or in vitro exposure to the pro-inflammatory cytokine GRO/KC. *Neurosci Bull*. 2012; 28: 155-64.
179. *Benko R, Lazar Z, Porszasz R, Somogyi GT, Bartho L.* Effect of experimental diabetes on cholinergic, purinergic and peptidergic motor responses of the isolated rat bladder to electrical field stimulation or capsaicin. *Eur J Pharmacol*. 2003; 478: 73-80.
180. *Saitoh C, Kitada C, Uchida W, Chancellor MB, de Groat WC, Yoshimura N.* The differential contractile responses to capsaicin and anandamide in muscle strips isolated from the rat urinary bladder. *Eur J Pharmacol*. 2007; 570: 182-7.
181. *Griffiths CD, Eldershaw TP, Geraghty DP, Hall JL, Colquhoun EQ.* Capsaicin-induced biphasic oxygen uptake in rat muscle: antagonism by

capsazepine and ruthenium red provides further evidence for peripheral vanilloid receptor subtypes (VN1/VN2). *Life Sci.* 1996; 59: 105-17.

182. *Kamiya H, Murakawa Y, Zhang W, Sima AA.* Unmyelinated fiber sensory neuropathy differs in type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2005; 21: 448-58.

183. *Schmeichel AM, Schmelzer JD, Low PA.* Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes.* 2003; 52: 165-71.

184. *Jin Y, Kim J, Kwak J.* Activation of the cGMP/Protein Kinase G Pathway by Nitric Oxide Can Decrease TRPV1 Activity in Cultured Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2012; 16: 211-7.