

## АНОТАЦІЯ

*Сльяшов С.І. Характеристика механочутливих іонних каналів в гладеньком'язових клітинах детрузора сечового міхура щура. – Кваліфікаційна праця на правах рукопису на здобуття наукового ступеня доктора філософії біологічних наук; 091 – “Біологія”; НАН України, ін. фізіології ім. О.О. Богомольця; Київ, 2024.*

У дисертаційній роботі наведені нові результати щодо механочутливості гладеньком'язового шару (детрузора) сечового міхура (СМ) та внеску іонних каналів TREK-1, Piezo1 та TRPV4 у загальну механочутливість у гладеньком'язовій клітині (ГМК). Ці канали походять із різних родин, проте, мають спільну чутливість до механічної стимуляції, як то тиск, потік рідини або розтягнення, що є типовими подразненнями для СМ. Головними механорецепторами СМ є аферентні нейрони та вистилаючий внутрішню порожнину уротеліальний шар. Однак і сам детрузор, та, власне, ГМК також мають самостійну механочутливість, хоча робіт щодо цього не багато. Для дослідження механочутливості ізольованих міоцитів нами була сконструйована установка для створення гідродинамічної стимуляції клітинної мембрани вузьким потоком розчину. У цій роботі було вперше встановлено існування трьох популяцій ГМК за чутливістю до механічної стимуляції: перша (55%) електрофізіологічно нечутлива до механічного стимулу, друга (26%) генерує вхідний струм із  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -провідностями, третя (19%) має лише вихідний механоактивованій струм із  $\text{K}^{+}$ -провідністю. Методами ПЛР та імуноцитохімія встановили, що в детрузорі експресуються 3 механочутливі канали, а саме TREK-1, TRPV4 та Piezo1. Ми провели експерименти з прикладанням L-метіоніну (інгібітором TREK-1), чим заблокували 90% механоактивованого вихідного струму. Це доводить, що активність з 3-ї групи ГМК була спричинена саме активністю TREK-1, який є єдиним функціонально показаним у літературі механорецептором у ГМК детрузора. Крім цього, досліджуючи

природу неселективного механочутливого каналу з 2-ї групи ГМК нами було виявлено, що механічна стимуляція ГМК детрузора генерує збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Подальші дослідження ГМК детрузора показали, що збільшення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  не може бути пов'язаним з активністю TRPV4. Такий висновок був сформований на основі нечутливості ГМК до селективного активатора TRPV4 – GSK1016790A, показаної методами візуалізації кальцієвих сигналів  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливим барвником Fluo-4 та patch clamp. Крім цього, нами було вперше наведено докази функціональної присутності Piezo1 в ГМК детрузора. Yoda1 (селективний агоніст Piezo1) в ГМК детрузора та в нейронах ДКГ викликала канонічний Piezo1-опосередкований  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал. Однак, під час електрофізіологічних експериментів Yoda1 інгібувало вихідні струми, замість активації високопровідних вхідних струмів, характерних для Piezo1. Наступні дослідження показали, що ефект від Yoda1 перекривався глібенкламід-індукованим блокуванням АТР-чутливого калієвого каналу ( $\text{K}_{\text{АТР}}$ ). Це вказує на те, що Piezo1 може бути пов'язаний із регуляцією відкритого стану  $\text{K}_{\text{АТР}}$ , інгібуючи його активність через мобілізацію  $\text{Ca}^{2+}$  та пов'язане з ним подальше непряме сигналювання.

**Ключові слова:** механочутливі іонні канали, Piezo1, TREK-1, TRPV4, АТР-чутливі калієві канали, сечовий міхур, гладеньком'язова клітина, нейрони ДКГ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  сигналізація, калієві струми, patch clamp, ПЛР, мРНК, імуноцитохімія.

## ABSTRACT

*Yeliashov S.I. Properties of mechanosensitive ion channels in the smooth muscle cells of the rat urinary bladder detrusor – PhD thesis in Biology; 091 – “Biology ”; NAS Ukraine, Bogomoletz Institute of Physiology, Kyiv, 2024.*

This thesis presents new results about the mechanosensitivity of the smooth muscle layer (detrusor) of the urinary bladder and the contribution of TREK-1, Piezo1, and TRPV4 ion channels to the overall mechanosensitivity in the smooth muscle cell (SMC). This thesis presents new results about the mechanosensitivity of the smooth muscle layer (detrusor) of the urinary bladder and the contribution of TREK-1, Piezo1, and TRPV4 ion channels to the overall mechanosensitivity in the smooth muscle cell (SMC). These channels come from different families, but share a common sensitivity to mechanical stimulation, such as pressure, shear stress, or stretch, which are typical stimuli for the urinary bladder. The main mechanoreceptors of the urinary bladder are afferent neurons and the urothelial layer which covers the internal cavity. However, the detrusor, and the SMC itself, also have independent mechanosensitivity, although there are not many works about this. To study the mechanosensitivity of isolated myocytes, we designed a device for creating hydrodynamic stimulation of the cell membrane with a narrow stream of solution. This work shows for the first time the existence of three populations of SMC in terms of sensitivity to mechanical stimulation: the first (55%) is electrophysiologically insensitive to mechanical stimulation, the second (26%) generates an input current with  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$  conductance, the third (19%) has an output mechanoactivated current with  $\text{K}^{+}$  conductivity. Using PCR and immunocytochemistry methods, we have shown that three mechanosensitive ion channels, TREK-1, TRPV4, and Piezo1 are expressed in the detrusor. We performed experiments with the application of L-methionine (a TREK-1 inhibitor), which blocked 90% of the mechanoactivated output current. This proves that the activity from the 3rd group of SMC was caused precisely by the activity of TREK-1, the only mechanoreceptor in detrusor SMC, which was shown by functional methods in the literature. In addition, while investigating the nature of the non-selective mechanosensitive channel from the 2nd group of SMC, we found that mechanical stimulation of the detrusor SMC generates an increase in the intracellular concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  ions ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Further studies of the detrusor SMC showed that the increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  could not be related to TRPV4 activity. This conclusion was formed from the insensitivity of SMC to the selective

activator of TRPV4 – GSK1016790A, shown by visualization of calcium signals with the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive dye Fluo-4 and patch clamp. In addition, we provided evidence for the functional presence of Piezo1 in the SMC of detrusor for the first time. Yoda1 (selective Piezo1 agonist) in detrusor SMC and DRG neurons induced a canonical Piezo1-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  signal. However, in electrophysiological experiments, Yoda1 inhibited the outward currents, instead of activating the high-conductance inward currents typical for Piezo1. Further studies showed that the Yoda1-derived effect overlaps with glibenclamide-induced inhibition of the ATP-sensitive potassium channels ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ). This indicates that Piezo1 may be involved in regulation of the open state of  $\text{K}_{\text{ATP}}$ , inhibiting its activity through  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization and associated downstream signaling.

**Keywords:** *mechanosensitive, ion channels, Piezo1, TREK-1, TRPV4, ATP-sensitive potassium channels, urinary bladder, smooth muscle cell, DRG neurons,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  signaling, potassium currents, patch clamp, PCR, immunocytochemistry.*

## НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Philypov IB, Sotkis GV, Danshyna AO, **Yelyashov SI**, Sharopov BR, Shuba YM. Impairment of urinary bladder mechanical properties in rat model of type 2 diabetes. *Neurourol. Urodyn.* 2022;41(8):1670–8. [doi: 10.1016/j.bbadv.2022.100069](https://doi.org/10.1016/j.bbadv.2022.100069). *(Особистий внесок здобувача – участь у формуванні ідеї досліджу, цистометричні вимірювання, 30 % від проведеної роботи)*
2. **Єльяшов СІ**, Шаропов БР, Шуба ЯМ. Роль  $K^+$ -провідного каналу TREK-1 у механочутливості гладеньком'язових клітин детрузора сечового міхура щура. *Фізіол. журн.* 2024;70(2):43–50. <https://doi.org/10.15407/fz70.02.035>. *(Особистий внесок здобувача – формування тези, підготовка та проведення експериментів, обробка результатів та написання, 95 % від проведеної роботи)*
3. **S.I. Yeliashov**, B.R. Sharopov, Y.M. Shuba. Yoda1-associated inhibition of rest  $K^+$  currents may depend on Piezo1-derived  $Ca^{2+}$ -release in rat detrusor smooth muscle cells. *Fiziol. Zh.* 2024; 70(3):3–9. <https://doi.org/10.15407/fz70.03.003>. *(Особистий внесок здобувача – формування тези, підготовка та проведення експериментів, обробка результатів та написання, 95 % від проведеної роботи)*
4. **Єльяшов С**, Римар В. Експресія генів механочутливих рецепторів в детрузорі сечового міхура щура. *Вісник КНУ ім. Тараса Шевченка*, 2024, Т. 95, №4. С. 20-24. DOI: [10.17721/1728.2748.2023.95.20-23](https://doi.org/10.17721/1728.2748.2023.95.20-23). *(Особистий внесок здобувача – формування тези, підготовка та проведення експериментів, обробка результатів та написання, 90 % від проведеної роботи)*

## НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ

5. **Єльяшов СІ**. Механочутливість гладеньких міоцитів детрузора щура. VII з'їзд УБФТ, 29-31 жовтня, 2018. Київ.
6. **Yeliashov SI**, Philipov IB, Sharopov BR, Shuba YM. Intrinsic mechanical sensitivity of detrusor smooth muscle: trek1-like and piezo1/trpv4-like responses to shear stress and tension VIII congress UBPS, 12-15 November, 2019, Kyiv.
7. **Єльяшов СІ**, Шаропов БР, Даньшина АО, Шуба ЯМ. Механічна чутливість гладеньких міоцитів детрузора опосередкована функціонуванням Piezo1/TREK-1 але не TRPV4 каналів. II науково-практична конференція з міжнародною участю “Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології”. 22 листопада 2022.
8. **Yeliashov S**, Sharopov B, Danshina A, Shuba Y. “Mechanosensitivity of urinary bladder smooth muscles: the role of TREK-1/TRPV4/Piezo1 channels”. FENS. 9-13 July 2022. Paris, France. S04-186. Available from: <https://fensforum.org/wp-content/uploads/2023/01/FENS2022.pdf>
9. **Єльяшов СІ**, Шаропов БР, Даньшина АО, Шуба ЯМ. Специфічна активація механочутливого каналу Piezo1 викликає інгібування глібенкламід-чутливих  $K^+$  струмів в гладеньких міоцитах детрузора щурів. Всеукраїнська конференція з нейронаук 25-27 липня 2022 р. Фізіол. журн., 2022, Т. 68, № 3, додаток.
10. **Єльяшов СІ**, Шаропов БР, Шуба ЯМ.  $Ca^{2+}$ -опосередковане пригнічення АТФ-залежних  $K^+$ -струмів гладком'язових клітин сечового міхура щурів активатором механочутливого Piezo1-каналу Yoda1. IX з'їзд УБФТ, 30.10-02.11 2023. Київ. С.96-98.