


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

Шаропов Біжан Рашидович

УДК 577.35:576.33

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

03.00. 02 – Біофізика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі нервово-м'язової фізіології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України

Шуба Ярослав Михайлович

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, завідувач відділу нервово-м'язової фізіології.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор

Жолос Олександр Вікторович

ІНЦ «Інститут біології та медицини» КНУ ім. Тараса Шевченка, завідувач кафедри біофізики та медичної інформатики.

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

Шатурський Олег Ярославович

Інститут біохімії ім. О.В. Паладіна НАН України, провідний науковий співробітник відділу нейрохімії.

Захист відбудеться «__» _____ 2019 р. о 14:00 на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ-24, вул. Богомольця, 4

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України та на сайті:

http://biph.kiev.ua/en/Specialized_Scientific_Council.

Автореферат розісланий «__» _____ 2019 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради,

к.б.н. Любанова О.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Порушення сечовидільної функції належить до числа найбільш розповсюджених медичних проблем і вражає біля 1/6 дорослого населення світу (Reynolds, 2016). 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%) (Miller, 2010). Групою особливого ризику є хворі на цукровий діабет (ЦД), яких у самій лише Україні налічується ~1,2 млн (Зелінська, 2013). За даними різних досліджень, 43-87% з них мають проблеми із сечовиділенням (Daneshgari, 2009).

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 (Kubota, 2011). 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

(Maggi, 1990). 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 (Szallasi, 2007).

Було показано, що нокаутні за геном *Trpv1* миші виявляють суттєву дисфункцію сечовиділення (Birder, 2002). 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 (Everaerts, 2009). 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 стрептозотоксин-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 гел-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 ретикулуку 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 ДКГ 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 дослідях 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.), симпозиумі «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 симпозиумів, 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У розділі **Огляд літератури** розглянуті сучасні уявлення про фізіологію сечового міхура, його загальну анатомічну будову, біомеханічні принципи роботи, гістологічну структуру та основні типи клітин, важливих для його функціонування.

Розглянуто білок TRPV1 як полімодальний іонотропний рецептор багатьох стимулів фізичної та хімічної природи, його молекулярну будову та ролі, які він відіграє у організмі. Крім того, зроблено огляд основних відомостей щодо діабетичної дисфункції сечового міхура.

Розділ **Матеріали і методи** містить опис експериментальних підходів, які були застосовані в цій роботі. Всі досліді були виконані на щурах-самцях лінії Wistar 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).

Ізолювання гладеньком'язових клітин (ГМК) детрузора та нейронів дорзальних корінцевих гангліїв (ДКГ) здійснювалося ферментативним методом, із використанням у першому випадку двоциклової обробки 1 мг/мл папаїну, 0,5 мг/мл колагенази II та низки допоміжних реагентів, а в другому – колагенази Ia у концентрації 1 мг/мл та трипсину у концентрації 2 мг/мл.

Електрофізіологічні вимірювання проводилися 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. 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.

*Вивчення експресії гена *Trpv1** у досліджуваних тканинах здійснювалося методами полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з подальшою візуалізацією агарозним електрофорезом та ПЛР у реальному часі (RT).

Ретроградне флуоресцентне мічення нейронів ДКГ проводилося шляхом лапаротомічної експозиції СМ та вколювання ліпофільного флуорохрому DiI-C18(3)

у його стінку. Візуалізація результатів мічення здійснювалася через 2-3 тижні після проведення операції за допомогою флуоресцентного мікроскопа на довжині хвилі 565 нм.

Тензометричні вимірювання виконувалися на гладеньком'язових смужках СМ, причому один їхній кінець був закріплений нерухомо, а другий приєднувався до емісного силового сенсора з базовим навантаженням 3 мН.

Реєстрація Ca^{2+} -залежної флуоресценції проводилося із використанням високоафінного ($K_d = 390$ нМ) кальцій-чутливого флуоресцентного барвника Fluo-3 АМ. Для цього також застосовувався конфокальний комплекс LSM 5 PASCAL на основі інвертованого мікроскопа Axiovert 200M (Zeiss).

Імунохімічні дослідження здійснювалися за допомогою TRPV1-специфічних антитіл, візуалізованих вторинними антитілами, кон'югованими із барвником Alexa Fluor 647.

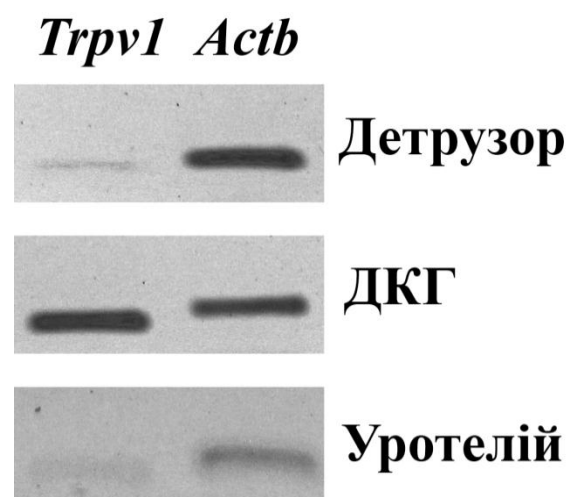
Аналізу результатів та їх графічного представлення здійснювалося за допомогою програмного забезпечення Origin 8.5. При побудові стовпчикових діаграм, які відображають усереднення експериментальних значень та їх розкид, виводилися середнє арифметичне по групі \pm стандартна похибка середнього (S.E.M.).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

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

1. Експресія гена *Trpv1* у різних тканинах СМ. Наявність транскриптів TRPV1 у трьох основних структурах сечового міхура, а саме уротелії (епітеліальний шар), детрузорі (м'язовий шар) та дорзальних корінцевих гангліях (ДКГ, нервовий аферентний компонент) рівня L6-S1, була перевірена методом ПЛР із подальшою візуалізацією ампліконів за допомогою агарозного гель-електрофорезу. Було виявлено, що експресія TRPV1 у ДКГ є інтенсивнішою за таку референсного гена на ~28% (Рис. 1). 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 відносно незначна.

Рис. 1. Експресія гена *Trpv1* спостерігається у всіх трьох гістологічних структурах СМ, проте в уротелії та детрузорі її рівень виявляється суттєво нижчим, аніж у ДКГ. Референсний ген – *Actb* (актин).



2. Функціональна присутність TRPV1 у СМ-специфічних нейронах ДКГ та гладеньких міоцитах детрузора. Для того, аби провести електрофізіологічне дослідження саме тих нейронів ДКГ, які посилають свої аксони в сечовий міхур, ми здійснили їхнє ретроградне флуоресцентне мічення шляхом вколювання ліпофільного флуорохрому DiI-C18(3) у стінку СМ. При спостереженні препарату зазначених нервових клітин в прохідному світлі виявлялися клітини округлої форми й варіабельного в межах 15-40 мкм діаметру, причому сигнал від ретроградного трасера при переключенні в режим флуоресцентної мікроскопії виявлявся лише у частині з нейронів (Рис. 2). Подальші електрофізіологічні вимірювання проводилися виключно на цих СМ-специфічних нервових клітинах.

Аплікація 10 μ M капсаїцину викликала в більшій частині досліджуваних нейронів 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. 2). 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 ДКГ.

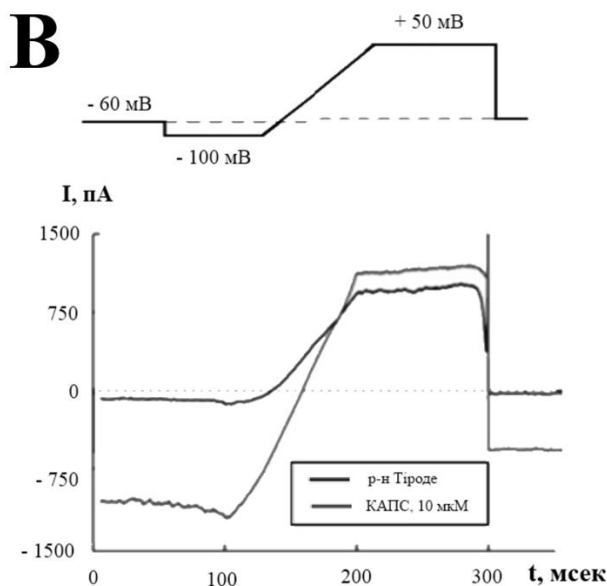
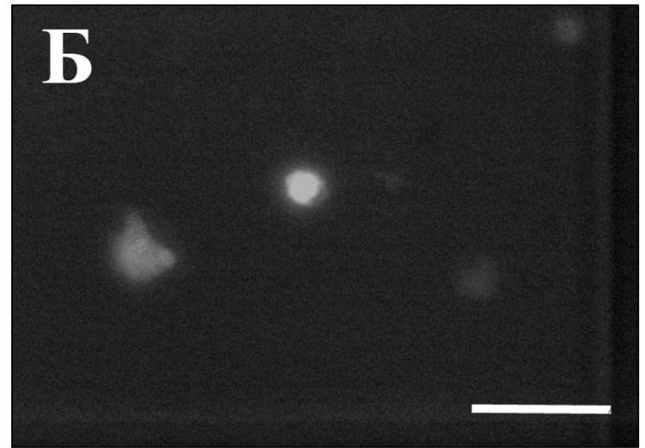
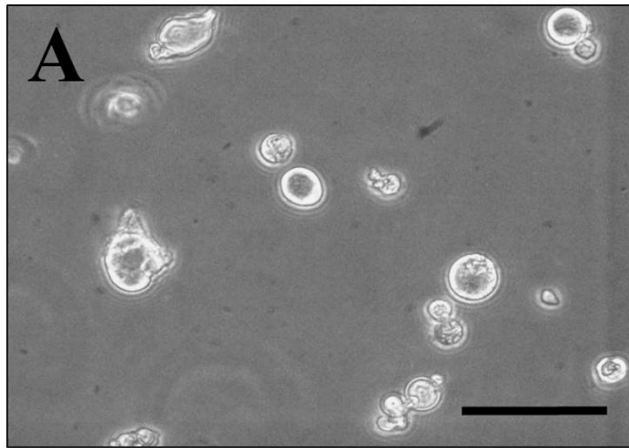


Рис. 2. Прикладання агоніста ванілоїдного рецептора викликає I_{TRPV1} у СМ-специфічних нейронах ДКГ. **А** – тотальна популяція нейронів у прохідному світлі, **Б** – субпопуляція СМ-специфічних нейронів, мічена трасером DiI-C18(3). Масштабні планки 100 мкм. **В** – виникнення I_{TRPV1} за умов прикладання 10 мкМ КАПС.

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 μ М 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). Цей висновок також підтверджувався відсутністю впливу аплікації КАПС на V_m досліджуваних клітин, реєстрованих у режимі фіксації струму (дані не представлено).

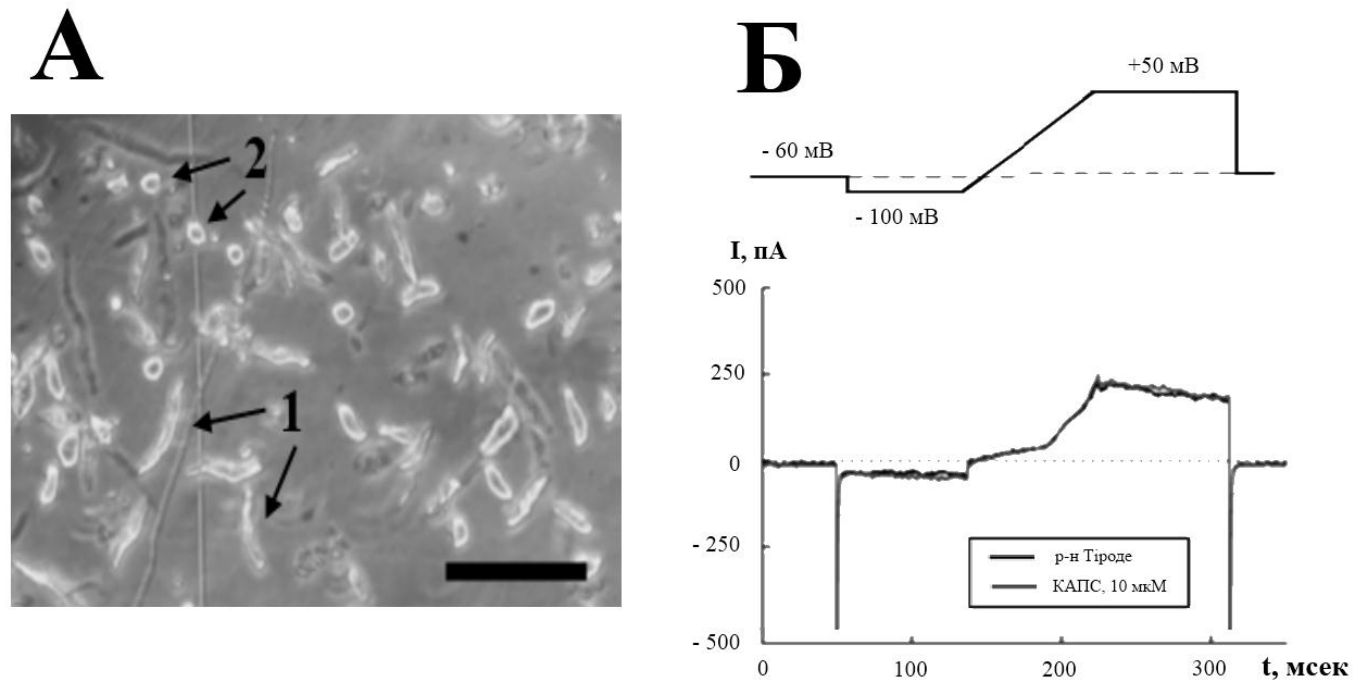


Рис. 3. Аплікація активатора TRPV1 не індукує I_{TRPV1} у гладеньких міоцитах детрузора. А – препарат гостроізованих ГМК сечового міхура, 1 – гладеньком'язові клітини, 2 – клітини уротелію. Масштабна планка 100 мкм. Б – запис трансмембранних струмів у ГМК сечового міхура до і після прикладання 10 мкМ КАПС.

3. Мобілізація іонів Ca^{2+} з саркоплазматичного ретикулуму ГМК детрузора після прикладання КАПС. Для перевірки припущення про наявність TRPV1 у внутрішніх кальцієвих депо ГМК детрузора нами був використаний метод кальциметрії з використанням флуоресцентного Ca^{2+} -чутливого барвника Fluo-3 AM. Після аплікації активатора у частині клітин ($n=14$ з 33 перевірених) спостерігалось суттєве підвищення $[Ca^{2+}]_i$, що може свідчити про наявність у них досліджуваного іонного каналу (Рис. 4, А). Кальцій-залежна флуоресценція відносно початкового рівня (F/F_0) змінювалася в межах 1,5 – 4 разів. У той же час, частина клітин ($n=19$ з 33 досліджених) не відповідала на прикладання КАПС жодним підвищенням рівня Ca^{2+} (Рис. 4, Б). Співвідношення між субпопуляціями ГМК, чутливих і нечутливих до стимуляції КАПС, складало, відповідно, 42% vs. 58% (Рис. 4, В).

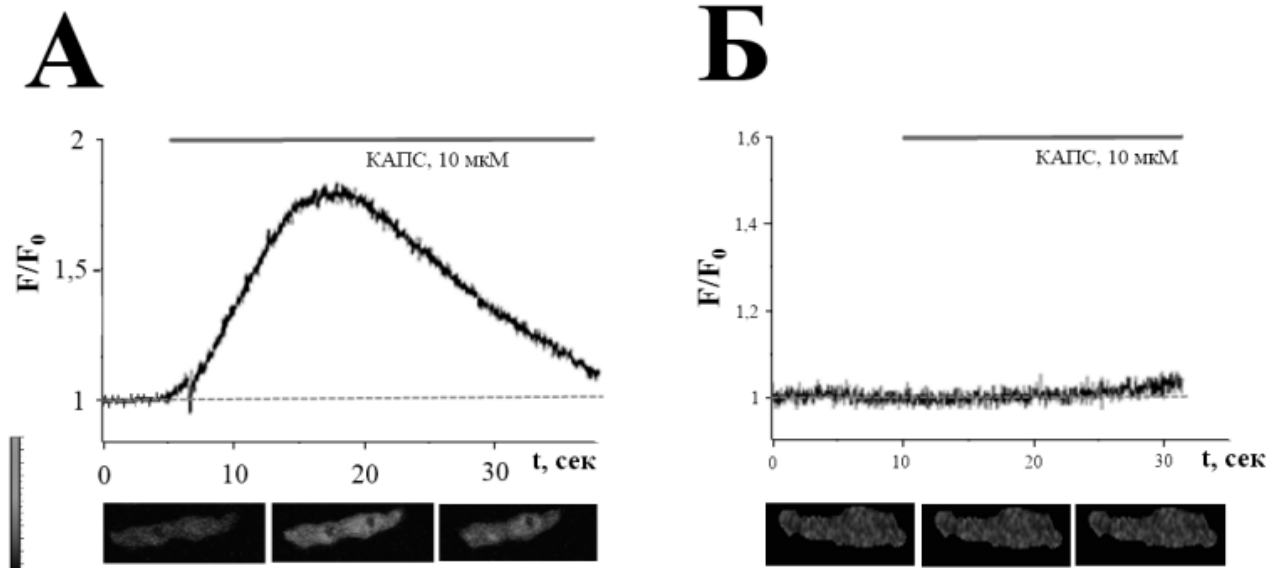
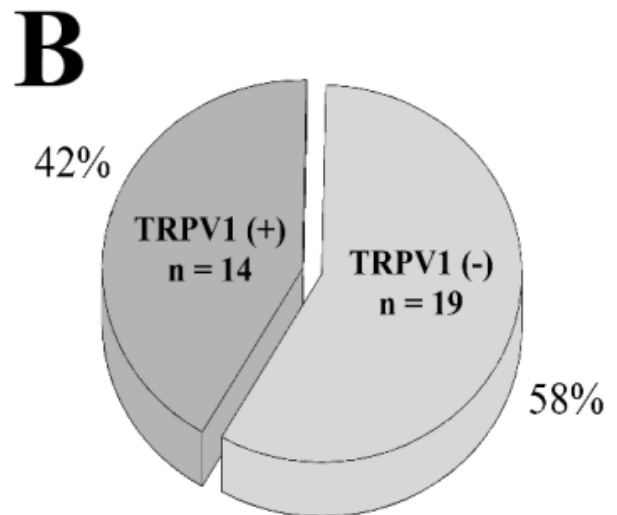


Рис. 4. Активація *TRPV1* викликає суттєве підвищення $[Ca^{2+}]_i$ у частині ГМК детрузора (А), проте деякі з цих клітин жодної відповіді на капсаїцин не демонструють (Б). В – співвідношення між КАПС-чутливою та КАПС-нечутливою субпопуляціями ГМК детрузора.



4. Субклітинна локалізація *TRPV1* у ГМК детрузора. При аналізі одержаних серій мікрофотографій виявилось, що збільшення $[Ca^{2+}]_i$ починалося з перинуклеарних регіонів клітини, у той час як у підмембранних областях флуоресцентний сигнал виникав у останню чергу (Рис. 5). Таким чином, дані експериментів з кальцій-чутливими барвниками, а також негативні результати електрофізіологічних вимірювань разом дозволяють зробити висновок про локалізацію *TRPV1* у саркоплазматичному ретикулумі (СР) цих клітин або ж у будь-яких інших структурах, які відносяться до внутрішньоклітинних депо іонів кальцію.

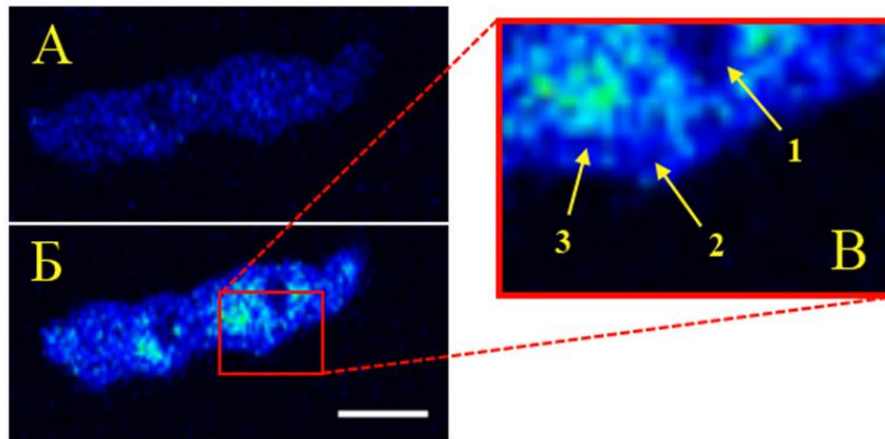
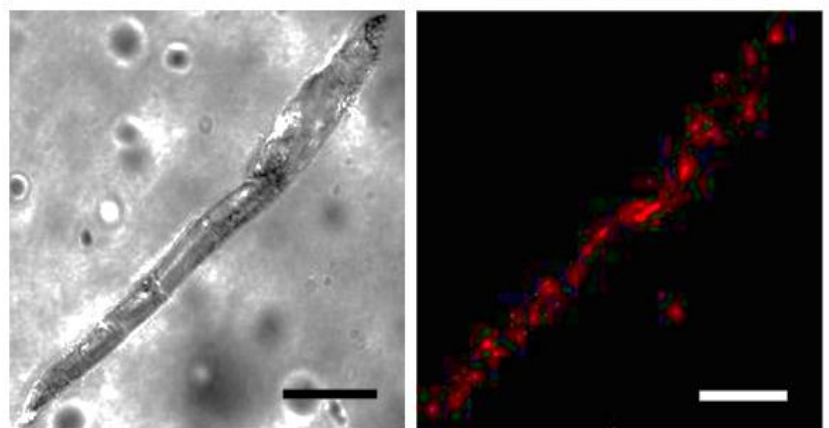


Рис. 5. Просторовий характер розповсюдження Ca^{2+} -сигналу в ГМК детрузора, що спостерігається до аплікації 10 мкМ КАПС (А) та після неї (Б), вказує на локалізацію TRPV1 у внутрішньоклітинних кальцієвих депо. В – додаткове 5-кратне збільшення одного з регіонів клітини, 1 – ядро, 2 – підмембранна область, 3 – периклеарна область. Масштабна планка 10 мкм.

Для того, аби додатково перевірити наявність досліджуваного іонного каналу в ГМК на білковому рівні, було застосовано метод мічення анти-TRPV1 антитілами з подальшою візуалізацією за допомогою флуоресцентної мікроскопії та вторинних антитіл, кон'югованих із флуорофором Alexa Fluor 647. Було виявлено, що гладенькі міоцити, які були піддані пермеабілізації для доступу антитіл до внутрішньоклітинних мембран, виявляли ознаки присутності TRPV1 (Рис. 6).

Прохідне світло анти-TRPV1
Alexa Fluor 647

Рис. 6. Імунохімічне мічення ГМК детрузора антитілами, специфічними до TRPV1, підтверджує його наявність у цих клітинах.



5. TRPV1 як ланка у холінорецепторному сигнальному каскаді ГМК детрузора. Функцією TRPV1, локалізованого у детрузорних ГМК, може бути опосередкування холінергічного сигналу, а саме підвищення $[Ca^{2+}]_i$ після активації холінорецепторів із подальшим скороченням міоцита. Для перевірки цієї гіпотези було використано підхід тензометрії на м'язових смужках СМ. Для ініціювання холінергічного скорочення використовувався холіноміметик карбахол (CCh) у концентрації 10 мкМ.

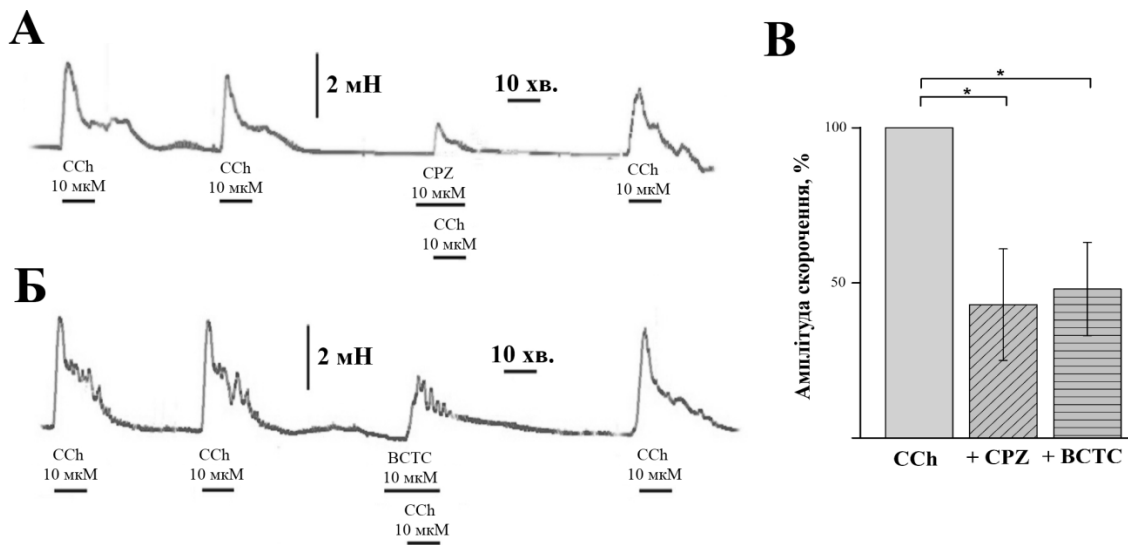


Рис. 7. Амплітуда холінергічного скорочення детрузора зменшується після блокування TRPV1. **А, Б** – репрезентативні записи скоротливої активності смужки СМ при прикладанні CCh *per se* та при інгібуванні TRPV1 двома його селективними антагоністами, **В** – кількісна оцінка зазначених ефектів.

Після кількаразової контрольної аплікації CCh здійснювалося прикладання блокаторів TRPV1 капсазепіну та BCTC у концентраціях 10 μМ, на фоні якого проводилася нова аплікація CCh. Ця передпромивка пригнічувала карбахол-викликане скорочення, у випадку CPZ, на 10% - 41% у різних препаратах (усереднене значення $21 \pm 6\%$, $n=5$, $p<0.05$, Рис. 7А, В), а у випадку BCTC – на 16% - 64% (усереднене значення $42 \pm 10\%$, $n=4$, $p<0.05$, Рис. 7Б, В). Відмивка CPZ впродовж ~1 год. повертала амплітуду CCh-викликаного скорочення близько до початкової (Рис. 7А, Б).

6. Активация макроскопического I_{TRPV1} донором оксиду азота в смеси с сульфгидрил-вмісним реагентом. Відомо, що TRPV1 є рецептором оксиду азоту (NO), хоча в попередніх дослідженнях активувати його макроскопичний струм донорами NO виявилось неможливим. У своїй роботі ми спробували вирішити цю задачу, посиливши вивільнення NO з донора реакцією з сульфгидрил-вмісним реагентом.

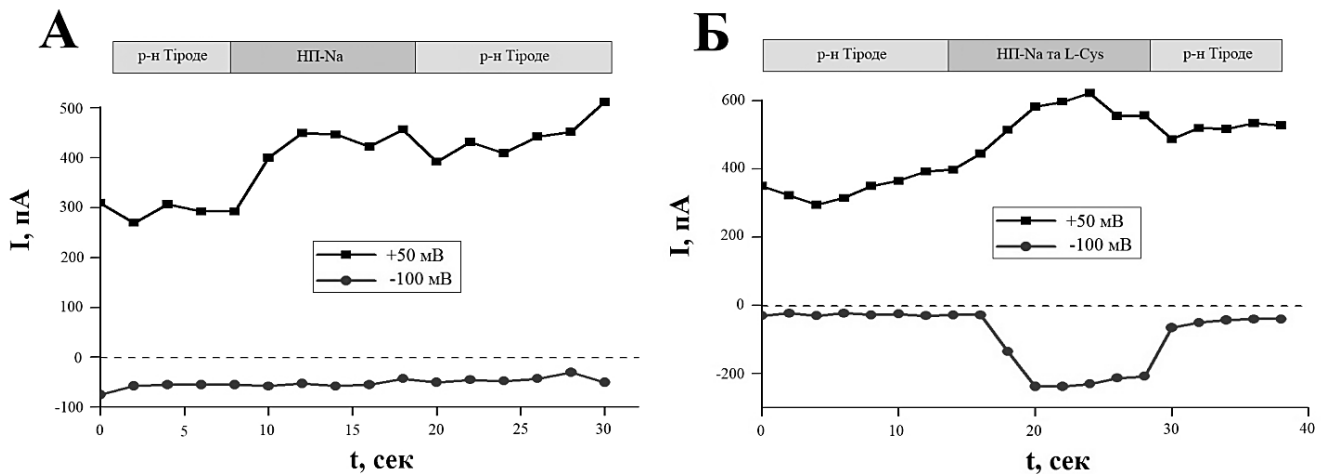


Рис. 8. Прикладання донора оксиду азоту НП-Na *per se* не викликає I_{TRPV1} (А) за V_{comm} +50 і -100 мВ, але індукує струм зі схожими характеристиками при одночасній аплікації сульфгидрил-вмісного реагенту L-цистеїну (Б).

Після прикладання донора NO нітропрусиду натрію (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 (Рис. 8.). Натомість після одночасної аплікації донора із сульфгидрил-вмісною амінокислотою L-цистеїном L-Cys ($n=6$) спостерігалися різнонапрямлена зміна струмів на обох реєстрованих V_{comm} (Рис. 8, Б). Ефект, що спостерігався, може бути пояснений відкриванням TRPV1, що було підтверджено із використанням його блокатора CPZ (Рис. 9).

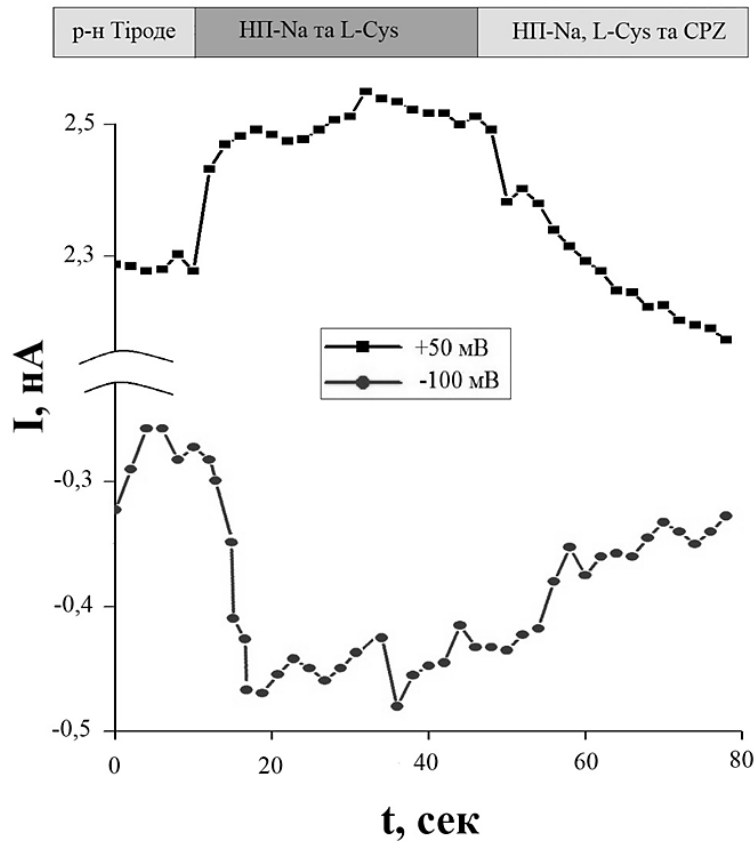


Рис. 9. Блокатор TRPV1 капсазепін (10 мкМ) пригнічує струм, індукований сумішшю НП-*Na* та *L-Cys* (100 мкМ для обох речовин).

7. Внесок іонного каналу TRPV1 у діабетичну дисфункцію сечового міхура. 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 ДКТ, що іннервують зазначений орган. Піддослідні щурі, 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. 10).

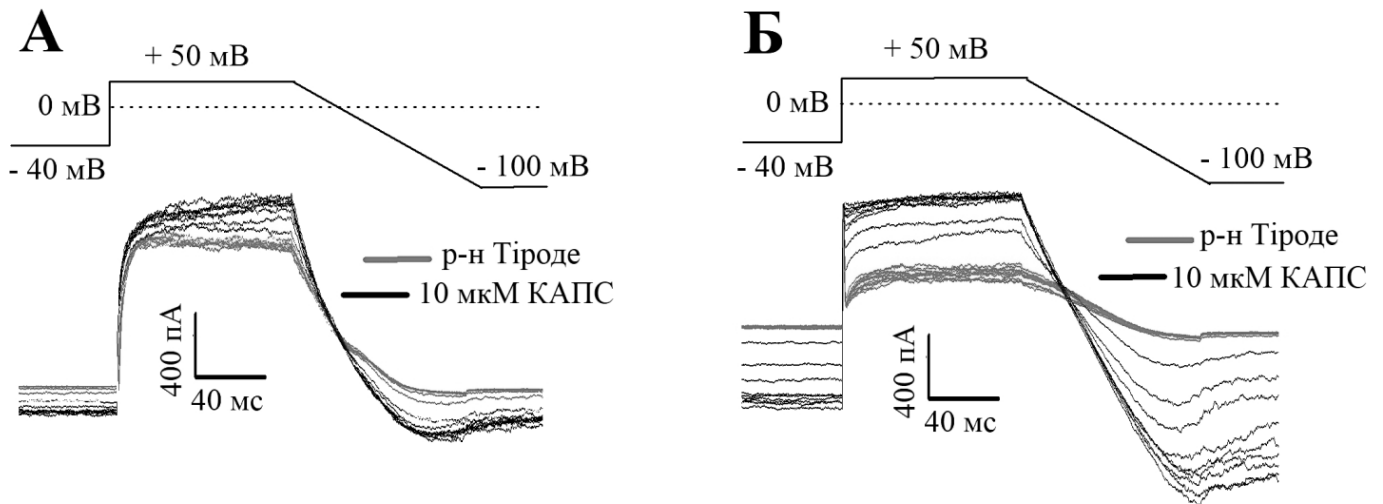
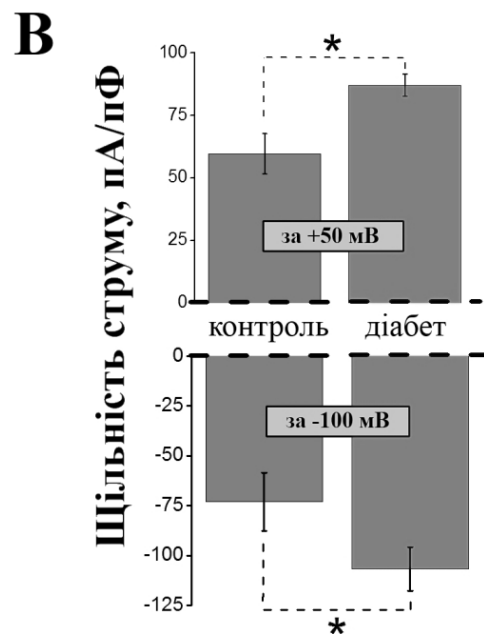


Рис. 10. При STZ-індукованому діабеті I_{TRPV1} у СМ-специфічних нейронах ДКТ збільшується. **А** – трансмембранні струми в зазначених клітинах контрольних тварин, **Б** – трансмембранні струми в зазначених клітинах діабетичних тварин, **В** – порівняння амплітуди I_{TRPV1} в двох групах за стаціонарних значень $V_m +50$ мВ і -100 мВ.



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.

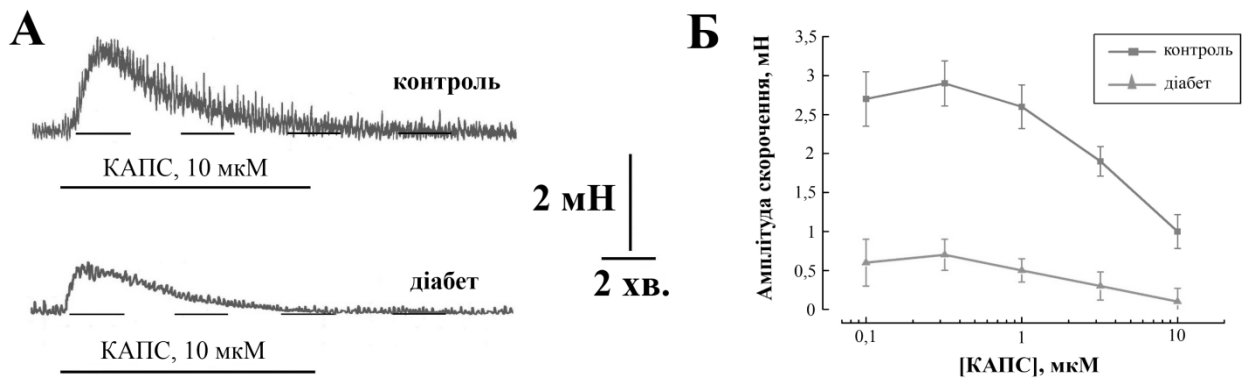


Рис. 11. При STZ-індукованому діабеті відбувається зменшення амплітуди скорочення детрузора, викликаного агоністом TRPV1, **A** – репрезентативні записи скоротливої активності м’язових смужок СМ у контрольних і STZ-проколотих щурів, **Б** – відповідні криві “доза-ефект”.

У той же час, амплітуда скорочення м’язових смужок виявилася суттєво слабшою у діабетичній групі аніж у контрольній, причому цей ефект спостерігався за всіх перевірених концентрацій КАПС (Рис. 11). Різниця між групами зростала майже монотонно від 77% до 90% за концентрацій, відповідно, від 100 нМ до 10 мкМ.

Отже, наші результати демонструють, що ЦД викликає різноспрямовані зміни в TRPV1-залежному сигналюванні. Вони 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. Ці протилежні ефекти можуть пояснити різноманіття симптомів при дисфункції сечовиділення у хворих на цукровий діабет, деякі з яких страждають від гіперзбудливості СМ, а інші – від його арефлексії та зменшення скоротливої активності. Треба думати, збільшення функціональної експресії TRPV1 робить внесок у гіперзбудливий фенотип СМ, що виявляється у посиленні відповідної рефлекторної дуги. У той же час, можливі збої у функціонуванні локальних пептидергічних сигнальних систем, які пов’язують збудження КАПС-чутливих нервових закінчень із власне скороченням детрузора, роблять внесок у декомпенсований фенотип діабетичної дисфункції цього органа.

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 пришвидшують 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.

ПЕРЕЛІК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті:

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. Ca^{2+} -мобілізація у гладеньких міоцитах сечового міхура щура у відповідь на прикладання капсаїцину // Вісник Львівського Університету (серія біологічна) – 2019 – Т. 80 – С. 177-182.

Тези доповідей:

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 Ca^{2+} -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.**, Болдирев 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.

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.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. – Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, 2019.

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.

АННОТАЦИЯ

Шаронов Б.Р. Экспрессия и функция капсаицинового рецептора TRPV1 в мочевом пузыре крысы в норме и при патологии. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.02 – биофизика. – Институт физиологии им. О.О. Богомольца НАН Украины, Киев, 2019.

В диссертационной работе представлены новые данные относительно функционирования ионного канала Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) в

тканях мочевого пузыря. Этот канально-рецепторный мембранный белок, классически известный как рецептор капсаицина (КАПС) и термосенсор в периферических ноцицепторах млекопитающих, в последнее десятилетие обращает на себя все большее внимание как физиологически значимый полимодальный сенсор множества физико-химических стимулов – обжигающих температур ($>42^{\circ}\text{C}$), кислого pH, механического напряжения и ряда эндогенных лигандов липидной природы, а также оксида азота (NO). В данной работе впервые продемонстрировано, что TRPV1 функционально присутствует в гладкомышечных клетках (ГМК) детрузора мочевого пузыря крысы. Обнаружено, что КАПС вызывает увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) в 42% изолированных ГМК, причем пространственный характер распространения кальциевого сигнала указывает на локализацию TRPV1 во внутриклеточных Ca^{2+} -депо (саркоплазматическом ретикулуме). Этот вывод подтверждается результатами электрофизиологических измерений, согласно которым КАПС неспособен вызвать канонический, TRPV1-опосредованный мембранный ток (I_{TRPV1}), а также данными флуоресцентной иммуноцитохимии с использованием анти-TRPV1 антител. Приложение селективных антагонистов TRPV1 – капсазепина или ВСТС – к полоскам гладких мышц детрузора (ГМД) блокировало 20-40% сокращения, вызванного холиномиметиком карбахолином, свидетельствуя об участии TRPV1 в сигнальном каскаде холинергического сокращения ГМД. Нами также впервые показано, что в сенсорных нейронах доноры оксида азота могут активировать макроскопический I_{TRPV1} только при наличии сульфгидрил-содержащих реагентов (напр. L-цистеина), которые ускоряют высвобождение NO из молекул-доноров. При моделировании диабета у крыс при помощи стрептозотоцина удалось установить увеличение функциональной экспрессии TRPV1 в афферентных нейронах с одновременным ослаблением локальных эффектов, связанных с его активацией, на сократимость ГМД. Это указывает, с одной стороны, на усиление TRPV1-зависимого афферентного участка рефлекторной дуги мочеиспускания при диабете, а с другой – на нарушение соответствующего пептидэргического сигналинга в стенке органа.

Ключевые слова: TRPV1, мочевого пузыря, детрузор, гладкомышечная клетка, оксид азота, диабетическая дисфункция мочевого пузыря.

ABSTRACT

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

PhD thesis, 03.00.02 “Biophysics”. – Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv, 2019.

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

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВАХ – вольт-амперна характеристика

ГМК – гладеньком'язова клітина

ДКТ – дорзальний корінцевий ганглії

КАПС – капсаїцин

НП-Na – нітропрусид натрію

СМ – сечовий міхур

СР – саркоплазматичний ретикулум

ЦД – цукровий діабет

СCh – карбахол

CPZ – капсазепін

L-Cys – L-цистеїн

NO – оксид азоту

TRPV1 – іонний канал Transient receptor potential vanilloid 1

ДЛЯ НОТАТОК