

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

*Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису*

УДК: 577.35:576.33

Єльяшов Семен Ігорович

**ХАРАКТЕРИСТИКА МЕХАНОЧУТЛИВИХ ІОННИХ КАНАЛІВ В
ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИНАХ ДЕТРУЗОРА СЕЧОВОГО МІХУРА
ЩУРА**

Спеціальність: 091 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії біологічних наук

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

Єльяшов С.І. _____

Науковий керівник:

д.б.н., проф., академ.

Я.М. Шуба

Київ - 2024

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 механоактивований струм із 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 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 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 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 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, Ca^{2+} , 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 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 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 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 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 (K_{ATP}). This indicates that Piezo1 may be involved in regulation of the open state of K_{ATP} , inhibiting its activity through 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, Ca^{2+} , 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.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	11
ВСТУП.....	13
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	19
1.1. Механочутливість як явище.....	19
1.1.1. Види механічних подразнень	19
1.1.2. Родини механочутливих каналів	20
1.2. Структурні особливості тканин сечового міхура	21
1.2.1. Будова та тканинні шари: уротелій, lamina propria, інтерстиціальні клітини Кахаля	21
1.2.2. Будова детрузора	25
1.2.3. Електрофізіологічні властивості гладеньком'язових клітин детрузора.....	28
1.3. Механочутливі рефлекси сечового міхура: нервова та автономна компоненти	29
1.4. Основні механочутливі канали детрузора.....	35
1.4.1. Калій провідні механочутливі канали родини TREK	35
1.4.2. TREK-1 у клітинах гладенького м'яза детрузора.....	37
1.4.3. Будова каналу TRPV4.....	38
1.4.4. TRPV4 у контексті функціонування сечового міхура.....	41
1.4.5. Механочутливий канал Piezo1	43
1.4.6. Piezo1 та його роль в механочутливості сечового міхура.....	46
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	48
2.1. Експериментальні тварини	48
2.2. Приготування гостроізольованих клітин	48
2.2.1. Ізолювання клітин гладенького м'язу детрузора та відбір подібних до інтерстиціальних клітин Кахаля	48
2.2.2. Ізолювання аферентних нейронів дорзальних корінцевих гангліїв.....	51

2.3.	Цистометрія.....	51
2.4.	Тензометрія смужки детрузора.....	52
2.5.	Patch clamp.....	53
2.6.	Реєстрація Ca ²⁺ -залежних флуоресцентних сигналів	56
2.7.	Активація та вплив на роботу каналів	58
2.7.1.	Метод гідродинамічної стимуляції	58
2.7.2.	Механічна активація скляним зондом	59
2.7.3.	Застосування фармакологічних агентів	59
2.8.	Екстракція мРНК, ПЛР зі зворотною транскрипцією та гелелектрофорез	61
2.9.	Імуноцитохімія.....	64
2.10.	Фізіологічні розчини	65
2.10.1.	Глутаматний безкальцієвий розчин	65
2.10.2.	Зовнішній розчин Тіроде	66
2.10.3.	Внутрішній розчин для patch clamp	66
2.10.4.	Розчин Кребса	67
2.11.	Статистичні методи.....	68
	РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	69
3.1.	Ізольований сечовий міхур проявляє дві механочутливі динаміки при наповненні	69
3.2.	Експресія механочутливих каналів TREK-1, TRPV4 та Piezo1 у тканинах сечового міхура	71
3.2.1.	Дослідження експресії механочутливих каналів методом ПЛР зі зворотною транскрипцією	71
3.2.2.	Імуноцитохімічні докази присутності механочутливих каналів у гладеньком'язових клітинах детрузора	74
3.3.	Механочутливість гладеньком'язових клітин детрузора	76
3.4.	Компонент каналу TREK-1 у механочутливості клітин гладенького м'яза детрузора	84

3.5. Механочутливі Ca²⁺-провідні канали в гладеньких міоцитах детрузора	92
3.5.1. Механоактивовані Ca²⁺ сигнали в гладеньких міоцитах	92
3.5.2. GSK-активація TRPV4 в гладенько-м'язових клітинах детрузора не викликає генерацію струмів.....	94
3.5.3. Ефект Yoda1-опосередкованої селективної активації Piezo1 в гладенько-м'язових клітинах детрузора.....	97
3.5.4. Yoda1 але не GSK викликає мобілізацію іонів Ca²⁺ в гладеньком'язових клітинах детрузора	102
3.6. Yoda1-залежне інгібування АТР-чутливих Калієвих каналів.....	110
ВИСНОВКИ	117
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	119

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- ГМК – гладенько-м'язові клітини
- СМ – сечовий міхур
- TRPV4 – 4-й канал з транзйентних катйонних рецепторйв пйдсймейства ванйлойдних (**T**ransient **r**eceptor **p**otential cation channel subfamily **V** member **4**)
- TREK – пйдсймейство механочутливих калйєвих двопородоменнних каналйв (**T**WIK-related endothelial **K**⁺ channel)
- ММ – мукозистй м'язовй клйтини (*muscus mucosae*)
- ICC – йнтерстицйальнй клйтини Кахаля (**i**nterstitial cells of **C**ajal)
- K2P – калйєвй двопородоменнй канал (**T**wo-pore-domain **K**⁺ channel)
- Piezo1 – першйй представник родини механочутливих каналйв Piezo
- Yoda1 – селективнйй агонйст йонного механочутливого каналу Piezo1
- GSK – GSK1016790A, селективнйй активатор TRPV4
- АК – арахйдонова кислота
- K_v – Калйєвйй потенцйалчутливйй канал (**V**oltage gated **K**⁺-channel)
- K_{АТР} – **К**алйєвйй **АТР**-чутливйй канал
- ВК – Кальцйй-залежнйй калйєвйй канал великої провйдностй (**Ca**²⁺-sensitive **B**ig conducting **K**⁺-channel)
- SK – Кальцйй-залежнйй калйєвйй канал малої провйдностй (**Ca**²⁺-sensitive **S**mall conducting **K**⁺-channel)
- Ca_v – Кальцйєвйй потенцйалчутливйй канал (**v**oltage gated **C**alcium channel)
- V_{com} – команднйй потенцйал (**c**ommand potential/ **v**oltage)

- V_{rev} – потенціал реверсії (**r**eversion potential/ **v**oltage)
- I_{trpv4} – очищений селективний струм іонного каналу
- ПЛР – полімеразна ланцюгова **р**еакція
- АТР – **A**denosine **t**ri**p**hosphate (аденозин трифосфат)
- РОРА – 1-**p**almitoyl-2-**o**leoyl **p**hosphatidic **a**cid (сайт зв'язування TREK-1 з мембраною)
- ВАХ – **в**ольт-**а**мперна характеристика
- ENaC – епітеліальний натрієвий механочутливий канал (**E**pithelial **N**a⁺ channel)

ВСТУП

Актуальність теми. Механочутливість є одним з основних способів взаємодії з фізичним світом, що забезпечує тактильне чуття, слух, відчуття тиску, потоку рідин або розтягнення. На сьогодні відомо про велику кількість іонних каналів з родин TRP, Piezo, ENaC та TREK, яким властива чутливість механічних подразнень різного типу. Канали з цих родин експресовані, наприклад, у механочутливих системах, що відповідають за тактильне чуття – аферентні закінчення нейронів, епітеліальні тільця Меркеля, що залучені у пропріорецепцію та відчуття внутрішніх процесів – в тканинах опорно-рухової системи, ендотелії та інших тканинах, що вистилають порожнисті органи. Саме ці іонні канали й відіграють домінуючу роль у забезпеченні механочутливості живих систем, тому встановлення їх участі у нормальному функціонуванні організму та можливості точкової регуляції дозволить винайти ефективні шляхи лікування розладів, що пов'язані з патологічними станами.

Більшість хребетних незважаючи на своє положення у еволюційній ніші, починаючи від риб і закінчуючи ссавцями з часом розвинули у сечовидільній системі орган, що накопичує вторинну сечу перед її вивільненням у навколишнє середовище. Еволюційно, необхідність в існуванні СМ змінювалась від осморегуляторної функції (у морських видів) до важливого складного поведінкового елемента, як от зменшення ймовірності бути впольованим завдяки контрольованому вивільненню сечі [1]. Для людини нормальне функціонування сечового міхура (СМ) є важливим елементом, що забезпечує комфортні умови життя. Нажаль, досить часто в роботі СМ відбуваються розлади внаслідок ряду хвороб (рак, діабет, простатит, нефрит, цистит) через які СМ може втрачати здатність виконувати свою головну функцію з розвитком таких розладів, як нетримання сечі, “гіперактивний міхур” та інші дисфункції [2,3].

Роботу сечового міхура регулюють механочутливі рефлексії з залученням ЦНС, яких ще у першій половині 20-го сторіччя було відкрито 7 типів фізіологом з Грехемської дослідницької лабораторії Ф.Дж. Барінгтоном [4]. Нові дослідження фокусуються на автономній механочутливості СМ. Орган має дві реакції на механічні подразнення, які були показані як нервово-незалежні: перша – розслаблення, що дає можливість розтягуватись та друга – напруження м'язу, що стримує розтягнення та збільшує внутрішній тиск [5]. Порушення нормальної механочутливості є головною причиною розвитку дисфункцій СМ, що є одним з важливих об'єктів для фундаментальних і практичних досліджень.

Механізми механочутливості безпосередньо в детрузорі до кінця не досліджені. Було показано [6–8], що трансмембранні струми TREK-1 каналу генеруються у відповідь на механічний стимул у ГМК детрузора та втрату механочутливості при блокуванні каналу. Більшість дослідників визначають TREK-1 як домінуючий механорецептор у гладенькому м'язі детрузора, гіперполяризація від активації якого пояснює першу автономну реакцію СМ на розтягнення [9]. Однак, присутність і інших механочутливих каналів було показано у м'язовому шарі СМ. Так, активація TRPV4 у СМ морської свинки викликала зменшення спонтанних скорочень на рівні ізольованої смужки детрузора [10], що знижувало “гіперактивність” через пряму активацію ВК-каналів (калієві канали великої провідності). Крім цього, ряд механочутливих каналів (Piezo1, Piezo2, TRPV2) були продемонстровані методами молекулярної біології [11,12], однак відповідні трансмембранні струми в ГМК детрузора наразі ще не досліджені. Загалом, природу каналу, що відповідає за розслаблення під час розтягнення остаточно приписують до TREK-1, однак досі залишається актуальним встановлення каналу, який відповідає за механостимульоване скорочення детрузора за відсутності нейронного або уротеліального сигналювання.

Розуміння механізму автономної механочутливості СМ в цілому, та участі каналів (головних фармакологічних цілей) у загальних процесах в

детрузорі дозволить ідентифікувати найкращу мішень для лікування розладів та зменшити побічні ефекти.

Мета та завдання роботи. Метою роботи було дослідити механочутливість детрузора сечового міхура на рівні ізольованих ГМК, визначити типи механоактивованих відповідей, встановити функціональну наявність іонних каналів TREK-1, Piezo1 та TRPV4 у ГМК та їхню залученість у автономні реакції на механічне подразнення.

Відповідно до мети були поставлені завдання:

1. Підтвердити методом цистометрії незалежну від нервової системи механочутливу відповідь СМ під час наповнення та встановити участь механочутливих каналів у міогенному компоненті відповіді під час розтягнення.
2. Дослідити наявність транскриптів генів *kcnk2*, *piezo1*, *piezo2* та *trpv4* у основних тканинах сечового міхура методом ПЛР зі зворотною транскрипцією.
3. Встановити локалізацію білкових продуктів генів механочутливих каналів.
4. Дослідити механостимульовані струми, що виникають в ізольованих ГМК детрузора у відповідь на активацію гідродинамічною стимуляцією.
5. Визначити об'єм внеску TREK-1 у загальноклітинні механостимульовані струми.
6. Ідентифікувати природу іонних каналів, що бере участь у механоактивованих трансмембранних струмах ГМК.
7. Дослідити механізм інгібування K^+ -провідних струмів під час активації каналу Piezo1 у ГМК детрузора.

Об'єкт дослідження: механочутливість гладенько-м'язових клітин детрузора СМ.

Предмет дослідження: функціональна механочутливість та експресія іонних каналів TREK-1, Piezo1, TRPV4 у тканинах сечового міхура, а конкретно у гладенько-м'язових клітинах детрузора.

Методи дослідження: ферментативне ізолювання ГМК детрузора та нейронів ДКГ, patch clamp в конфігурації “ціла клітина”, візуалізація Ca^{2+} -сигналів кальційчутливими флуоресцентними барвниками, цистометрія ізолюваного СМ, тензометричні дослідження скорочень ізолюваної м’язової смужки, ПЛР зі зворотною транскрипцією та візуалізацією в агарозному гелі за допомогою електрофорезу, імуноцитохімія з флуоресцентним міченням, статистичні обрахунки Т-тестом Вельша та парним Т-тестом Вілксона.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше автором було показано існування механостимульованих $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -струмів у гладенько-м’язових клітинах детрузора та існування 3-х окремих популяцій ГМК детрузора за типом механочутливості. Наведено раніше відсутні докази функціональної присутності каналу Piezo1 у ГМК детрузора, що проявлялись Yoda1-індукованими Ca^{2+} сигналами. Крім цього, відсутність Piezo1-подібних трансмембранних струмів від Yoda1 можуть бути доказом субклітинної локалізації каналу. Вперше було показано Piezo1-опосередковане інгібування K^{+} струмів в ГМК, що може бути пов’язане з непрямою дією мобілізованого Ca^{2+} на АТР-чутливий K^{+} -провідний канал.

Практичне значення отриманих результатів. Визначення природи деполяризуючого, Ca^{2+} -провідного механочутливого каналу в ГМК детрузора є потенційною мішенню для регуляції роботи СМ у механочутливих розладах. Отримані результати спростовують роль TRPV4 безпосередньо в роботі м’язової тканини, тоді як активація Piezo1 не викликає очікуваної деполяризації, а викликає інгібування глібенкламід-чутливих K^{+} провідностей. Подібної реакції на активацію Ca^{2+} -провідного каналу не демонстрували раніше ні на ГМК детрузора, ні на інших типах клітин, що свідчить про відкриття потенційно нового системного регулятора активності м’язових клітин через інгібування АТР-чутливих K^{+} каналів.

Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження механочутливості детрузора СМ виконувалось у рамках планових проектів відділу нервово-м’язової фізіології Інституту ім. О.О.

Богомольця НАН України, за наступними темами: “Іонні канали – рецептори фізико-хімічних впливів у регуляції збудження-скорочення вісцеральних м'язів у нормі та патології” (номер реєстрації: ДР № 0118U007351), “Іонні канали як мішені фармакологічного впливу” (номер реєстрації: ДР № 0124U001683), “Роль TRPM8- і TRPV1- каналів у функціонуванні гладких м'язів урогенітального тракту самців щурів” (номер реєстрації: ДР № 0116U004470). Крім цього, роботи виконувались у межах грантового проекту “Міогенні механізми механочутливості сечового міхура в нормі і при діабеті 2-го типу” (номер реєстрації: ДР № 0120U104960) 2020.02/0189 від Національного Фонду Досліджень України.

Особистий внесок здобувача. Усі результати, наведені у дисертаційній роботі (крім імуноцитохімії, тензометрії та цитометрії, що були отримані в сумісній діяльності з рівним внеском) зібрані безпосередньо автором. Автор здійснював усі налагодження протоколів та обладнання для запису струмів, конструювання установки для механічної стимуляції, усі підготовчі етапи до експериментів, роботи з тваринами, електрофізіологічні експерименти, візуалізацію Ca^{2+} -сигналів, виділення зразків, очистки мРНК та ПЛР ампліфікації. Обрахунок, оформлення та аналіз результатів, написання статей, висунання більшості гіпотез щодо загальних механізмів функціонування органу та аналіз специфічної літератури здійснював автор.

Апробація результатів дисертації. Отримані результати досліджень представлялись впродовж їхнього накопичення на ІХ з'їзді УБФТ (30.10-02.11 2023; Київ), Всеукраїнській конференції з нейронаук (25-27 липня 2022 р; Київ), Міжнародній конференції з нейронаук “FENS” (9-13 липня 2022; Париж, Франція), II науково-практичній конференції з міжнародною участю “Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології” (22 листопада 2022, Запоріжжя), та на VII і VIII з'їздах УБФТ (2018, 2019 роки; Київ). А також результати представлялись в доповідях на декількох семінарах Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

Публікації. Результати, представлені у дисертаційній роботі були представлені у 9 публікаціях в наукових виданнях, а саме у 4-х фахових журналах, індексованих у базі Scopus, один з яких закордонний, а також у 6-ти збірниках тез конференцій, з яких – один закордонний (Франція) та 5 українських.

Структура та обсяг праці. Дисертація складається з таких розділів: “Вступ”, “Огляд літератури”, “Матеріали та методи”, “Результати та їх обговорення”, “Висновки” та “Список використаних джерел”. Результати продемонстровані 39 ілюстраціями та схемами на 47 сторінках, з 140 загальних. Для написання було опрацьовано 199 джерел фахової літератури.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Механочутливість як явище

1.1.1. Види механічних подразнень. Механочутливість є одним з основних форм фізичної чутливості на рівні з термочутливістю, фото та хемочуттям. Механочутливість відповідає за ряд важливих фізіологічних механізмів в організмі: відчуття дотику, розтягнення, пропріорецепція, регуляція внутрішньоклітинного та внутрішньо-тканинного тиску, слух та усі процеси, що пов'язані з розтягненням або з іншими формами механічного подразнення. Наразі механочутливістю називають здатність тканини перетворювати механічне подразнення у електричний струм [13]. В живих системах електричний струм генерується відкриттям іонних каналів. Вперше теорію про існування іонних каналів, що відкриваються у відповідь на механічне подразнення з'явилося ще у роботах дослідників наприкінці 1970-х років [14]. А вже у 1983-му році були відкриті перші механочутливі канали у м'язовій тканині курячого ембріона [15], а пізніше і у ооцитах шпоркової жаби *Xenopus sp.* [16].

У випадку дослідницької роботи з механочутливими іонними каналами необхідно імітувати природній стимул або знайти найбільш ефективний спосіб впливу на клітинну мембрану для відкриття каналу (див рис. 1.1).

Механочутливість властива багатьом типам тканин, однак виділяють дві окремі групи – специфічні механорецептори (до прикладу волоскові клітини внутрішнього вуха, ноцицептори – больовою механочутливістю, тільця Меркеля в шкірі, тільця Мейснера або м'язове веретено) та неспецифічно чутливі тканини (такі як ендотелій або м'язові тканини) [17]. В багатьох випадках різниця полягає не лише в функціональній унікальності роботи перших, але і у типах іонних каналів що експресують ці тканини.

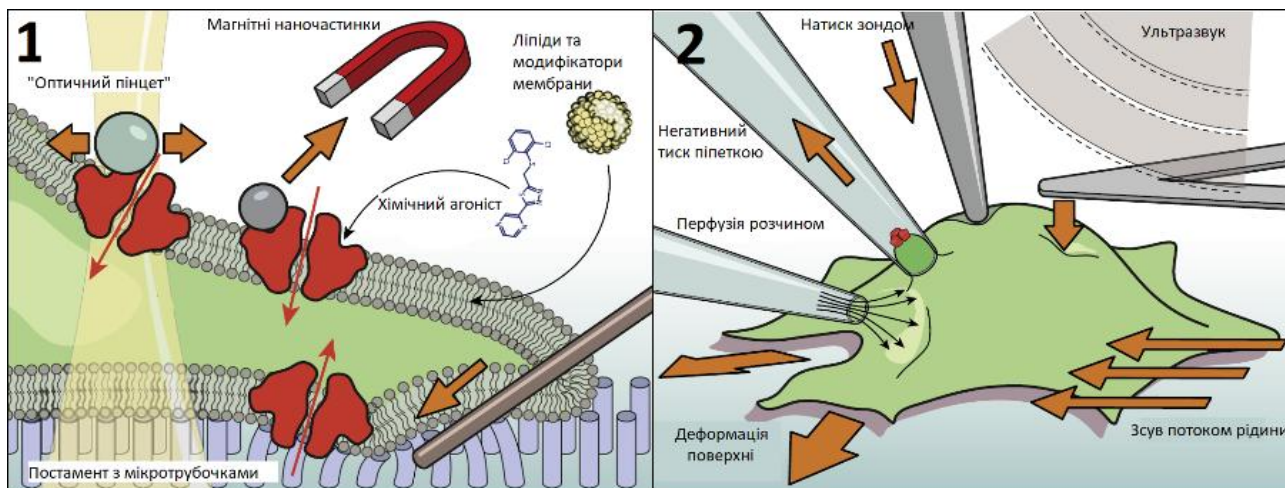


Рис. 1.1 Механічні методи стимуляції клітин для активації механочутливих іонних каналів. а – методи молекулярного впливу, б – макроскопічні фізичні методи. Модифіковано з [18].

1.1.2. Родини механочутливих каналів. На сьогоднішній день прийнято розділяти специфічні механочутливі іонні канали та канали, що мають механочутливі властивості. Перші виконують переважно функцію механорецептора, тоді як другі лише додатково можуть приймати участь у механочутливості при певних умовах, наприклад, стимулах близьких до больових викликаючи механічну аллоддинію [19,20]. Наразі говорять про представників 5-ти родин іонних каналів, що мають чутливість до механічних подразнень [17]. До них відносять: ENaC – епітеліальні натрієві канали (Epithelial sodium channel), деяких представників родини TRP (Transient Receptor Potential), компоненти механочутливого комплексу волоскових клітин – TMC/TMHS/TMIE (Transmembrane Channel Like proteins/ Tetraspan Membrane Protein of Hair Cell Stereocilia/ Transmembrane Inner Ear Expressed Gene), механочутливі двопородоменні калієві канали K2P (котрих відокремили в субродину TREK), представники родини потенціалчутливих калієвих каналів (K_v) та іонні канали родини Piezo [17,21]. Подразнення різного типу та інтенсивності, такі як легкий дотик, сильний натиск, розтягнення тканини, потік рідини різного напрямку можуть викликати активацію різних каналів з вищеназваних [22].

Наразі відомо, що рослини, одноклітинні найпростіші (*Protozoa*) та слизовики мають механочутливість, що може забезпечуватись ортологами типовими для хребетних рецепторами з родин Piezo, ENaC/DEG та TRP. Відомо що у рослин та протозоа є ортологи Piezo1 каналу, зокрема, у протозоа є не 2 (як у вищих хребетних), а 6 генів з родини *piezo* [23]. В той же час прокаріоти та гриби не мають ортологів найбільш виражених механорецепторів, однак мають унікальні механочутливі канали – MscL (mechanosensitive channel of large conductance) [18,24,25]. Загалом дослідники досі не мають узагальненої системи щодо чутливості до механічних подразнень у живих системах. В багатьох роботах представлені докази щодо головної ролі каналів родини TRP і ENaC в механічному чутті безхребетних (плоскі черви, членистоногі), або MscL у рослин та бактерій, тоді як для хребетних єдиного кандидату на основну роль в механорецепції встановити не вдається [17,18].

1.2. Структурні особливості тканин сечового міхура

1.2.1. Будова та тканинні шари: уротелій, *lamina propria*, інтерстиціальні клітини Кахаля. Сечовий міхур являє собою порожнистий резервуар трикутної форми, котрий накопичує вторинну сечу та виводить у навколишнє середовище. Сеча, котра виділяється нирками надходить в СМ з сечовидільної системи через сечівники. Коли орган наповнюється до критичного об'єму аферентні нейрони передають сигнал до центральної нервової системи, після чого СМ отримує ефекторний сигнал на виведення накопиченої рідини у навколишнє середовище завдяки скороченню детрузора (гладенького м'яза СМ) та розслабленню сфінктерів [26].

У людини орган розташований в абдомінальній зоні тіла. СМ має виражені структурні елементи: купол (верхівка резервуару), основне тіло, трикутник (місце розташування отворів з сечівників (2-х) та отвору ший, що веде до сечоводу, внутрішній сфінктер (кільцеві м'язи перед виходом до уретри), канал уретри та наступні елементи, котрі відносять до статевої системи

самців (простата, бульбовидне тіло, що виділяє середовище для сперматозоїдів та печеристі тіла статевого члена) [27] (рис. 1.2).

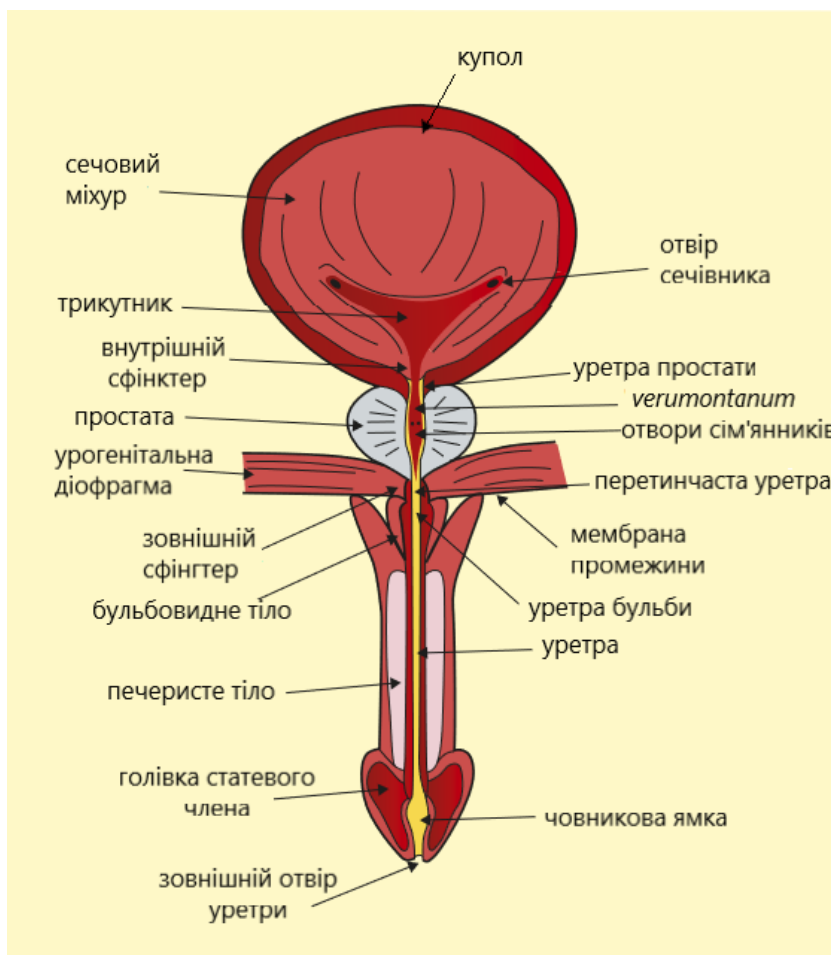


Рис. 1.2 Схематична будова сечового міхура та органів сечовиділення (у чоловіків). Адаптовано з [27].

Сечовий міхур як і більшість вісцеральних м'язистих порожнистих органів (такі як шлунок, кишківник) має багат шарову будову. Внутрішня порожнина органу покрита захисним шаром глікозаміногліканів (рис. 1.3) для захисту клітинної вистілки від доволі жорстких властивостей вторинної сечі, котрі проявляються не фізіологічними та токсичними для клітин сечовиною, аміаком та солями сечової кислоти, несталий рівень рН, від 5,5 до 9,5 та змінній концентрації NaCl та KCl [28].

Наступним шаром йде вистілка з ендотелійподібних клітин, які виділені у окремий тип – уротеліальні клітини. Клітини уротелію між собою доволі сильно відмінні морфологічно та за експресією функціональних білків.

Уротелій складається з 3-х шарів, де є базальний, проміжний (у великих ссавців цей шар може бути не з одного ряду клітин) та поверхневий шар з парасолькових уротеліоцитів [29]. Базальний та проміжний шари сформовані дрібними клітинами (5-15 мкм) що фіксують шар уротелію до базальної мембрани та слугують пулом для відновлення верхнього шару. Базальний шар єдиний має здатність до поділу, та у разі пошкодження верхніх шарів базальні уротеліоцити відновлюють захисну поверхню СМ. Поверхневий шар складається з зонтикоподібних клітин уротелію як формують між собою – водонепроникний бар'єр що не пропускає рідину крізь позаклітинне середовище, а між собою мають щільні контакти між собою білками ZO-1, оклудином, клаудином-4, -8 та -12 [30]. Парасолькові клітини можуть бути від 25 до 250 мкм розміром, що залежить від стану наповненості СМ. Розтягнення поверхневих клітин разом зі зморшкуватою поверхнею уротелію дають змогу органу розтягуватись та компактуватись під час ретракції [31].

Після базальної мембрани, між уротелієм та детрузором розташована *lamina propria* – ділянка стінки СМ з щільним позаклітинним матриксом, що має низьку концентрацію клітин (в основному це фібробласти та інтерстиціальні клітини). Вважається що цей шар слугує додатковим бар'єром, зв'язком між уротеліальним шаром та м'язом, а також крізь нього проходять основні судини [32].

Під *lamina propria* залягає окремий м'язовий шар, котрий називають *muscularis mucosae* (ММ). Шар формують гладенько-м'язові клітини, що в порівнянні з детрузорними морфологічно відрізняються меншими розмірами та пропорцією довжини до діаметру клітини [33]. ММ шар може відповідати за слабкі фазові спонтанні скорочення стінки органу, оскільки смужки ММ мали таку ж або навіть сильнішу амплітуду спонтанних скорочень в порівнянні з смужками детрузора, хоча КСІ стимульоване скорочення було ледь помітним в порівнянні з детрузорним. Окрім цього, в ММ міоцитах при блокуванні SK та BK блокатором іберіотоксином трансмембранні струми не змінювались, хоч для гладеньких міоцитів Ca^{2+} -чутливі K^{+} канали відіграють ключову роль у

розслабленні клітини [34]. Сукупного розуміння функції, яку цей шар виконує в СМ, досі немає, однак, базуючись на літературних даних, вважають, що ММ має бути відповідальним за процеси передачі сигналів від уротелію та інтерстиціальних клітин до детрузора [35]. Проте, у деяких роботах зазначають, що у людей загалом ММ може бути відсутнім [36]. Крім цього у багатьох дослідженнях показано, що шар першим зазнає морфологічних порушень під час розвитку раку сечового міхура [32].

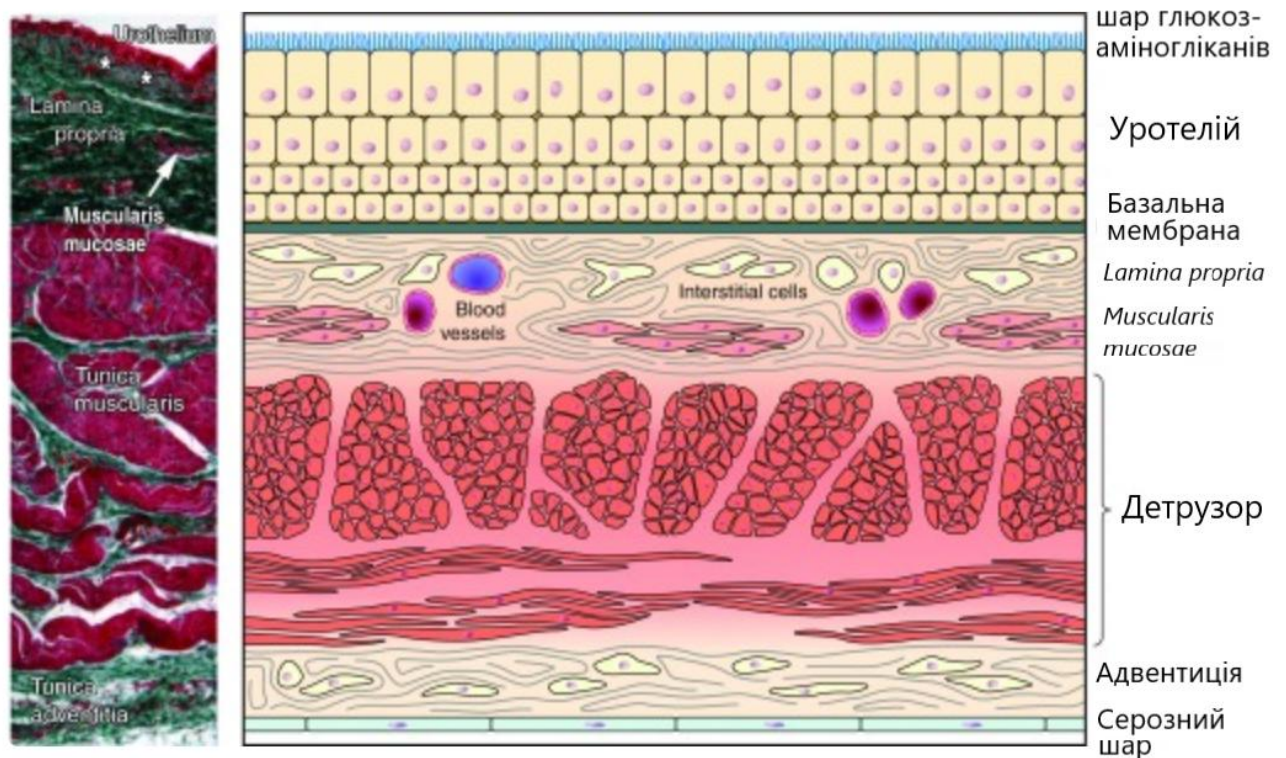


Рис. 1.3 Схематичний переріз стінки сечового міхура на основі гістологічного препарату: згори донизу – порядок розташування шарів від внутрішньої порожнини. Синім – покривний шар глікозаміногліканів, кубічні клітини – уротеліальні клітини, базальна мембрана, lamina propria, детрузор, адвентиція та серозний шар (зовнішня сторона органу). Адаптовано з [32].

Зовні орган має шар адвентиції та серозний шар, що складаються з фіброblastів котрі головним чином виконують типові функції сполучної тканини, а також ізолювання основного м'язового шару СМ – *muscularis propria*

[37], крізь який проходить велика кількість кровоносних судин та нервові волокна.

1.2.2. Будова детрузора. Головним м'язовим шаром СМ є – *muscularis propria* (який було названо детрузором). Він складається з 3-х субшарів, що орієнтовані у поздовжні (внутрішній та зовнішній шари) та кругову площинах (внутрішній шар), на відміну від кишківника, який має лише один поздовжній шар та один в круговій площині [38]. Незважаючи на відносну простоту питання, досі присутня плутанина стосовно кількості шарів та причини відмінності в їх кількості між різними видами, хоч деякі автори і говорять про більшу вираженість різниці як про параметр розміру, як от у людини та кроля [38,39]. В більшості орган має однорідну товщину м'яза, окрім ділянки, що називається трикутник. Тут більш тонкий шар м'язів щільніше прилягає до *lamina propria* та уротелію [40,41].

Основою детрузора є гладенько-м'язові клітини (ГМК). ГМК зустрічаються у різних ділянках мозку, в зіниці ока, в епітеліальному шарі, серцево-судинній системі, в органах шлунково-кишечного тракту (ШКТ), в залозах, лімфатичній системі та дихальних шляхах [42]. Такий широкий спектр тканин та органів викликав інтерес у дослідників стосовно походження та міграції цих клітин. Було встановлено, що ГМК під час ембріогенезу формуються з абсолютно різних попередників, на відміну від посмугованих м'язів та кардіоміоцитів. Так ГМК з дихальної системи походять з легневих мезенхімальних клітин, а гладеньком'язовий шар кишківника – з латеральної пластинки мезодерми [43]. ГМК детрузора походять разом з уротелієм від латеральної мезодерми, що є попередником спланхо-плевральної мезодерми (внутрішнього шару мезодерми, що після поділу зародкової клоаки формує суміжну мезодерму яка вкриває попередньо сформований шар клітин ендодермального походження, котрі вистилають порожнину майбутнього СМ) [44]. За проліферацію ГМК детрузора відповідає експресія *shh* (sonic hedgehog) та уротелій. В дослідженні з екстрагованими мезодермальними клітинами без

додавання Sonic hedgehog та відсутності інтактних клітин уротелію попередники ГМК не проліферували [45]. Навіть у одній серцево-судинній системі ГМК формуються з спланхнічної та соматичної мезодерм, з про-епікардіуму, склеротому та з нервового гребня [46,47]. Це свідчить про те, що під терміном “гладеньком'язові клітини” об'єднують велику кількість різних тканин, що між собою можуть кардинально відрізнитись як за експресією ГМК-специфічних білків, таких як α -гладенько-м'язового актину, віментину, h-кальдесмону, так і за чутливістю та функціональним проявом [40].

Останнє стосується не лише ГМК з різних органів. Гладенькі міоцити з детрузора, хоч і морфологічно є доволі однорідними, але гістологічно розділені на 3 окремих шара, та в різних частинах органу формують м'яз різної товщини [48]. Робіт, що дослідили б функціональні відмінності в будові та розбіжності в експресії рецепторів між різними шарами та зонами детрузора бракує через складність сепарування цих окремих груп. В найближчому майбутньому за допомогою одноклітинного РНК сиквенсу такі роботи повинні з'явитись.

Наразі є декілька досліджень на тему розбіжності експресії в детрузорі. Так, в роботі з кроликами показали існування 2-х окремих популяцій клітин ГМК[49]. Ізольовані неонатальні ГМК були висаджені на живильне середовище у культуру, після чого зазнали морфологічного та молекулярного вивчення. Було показано, що перша група ГМК мала пропорційно короткі, округлої форми клітини, тоді як друга – видовжені та плоскі (до 15 разів довші за першу групу), які крім цього мали відмінності в експресії α -актину та віментину. Такі ж результати були отримані з СМ 6-ти річних тварин.

Більш ретельно було досліджено топографічні особливості експресії пар генів мускаринових рецепторів M2 й M3, та іонних каналів P2X1 й ASIC1. Мускаринові холінорецептори передають сигнал до скорочення від ЦНС до детрузора. Тож, на людських СМ показали, що в куполі рівень мРНК вищеназваних рецепторів був вищий на 20% в порівнянні з трикутником, тоді як у останньому на вищому рівні експресувались білки щільних контактів та маркери клітинної адгезії [40].

Вже на іншому об'єкті дослідження, а саме на мишах було ідентифіковано як мінімум 4 групи ГМК за типом спонтанної активності. За допомогою позаклітинної мікроелектродної техніки в роботі [50] досліджували спонтанну електричну активність ГМК, в результаті чого розділили на 4 групи:

- пасивні клітини, що не проявляли спонтанної активності,
- що мали швидке відновлення після гіперполяризації,
- інвертовані струми в порівнянні з другою,
- деполяризувалась з високою частотою транзйентних струмів (які, на

думку авторів роботи, повинні мати близькі контакти з нервовими клітинами або з клітинами, подібними до інтерстиціальних клітин Кахаля (ІСС).

Окрім ГМК у детрузорі присутні ІСС ШКТ, що є похідними від гладеньких міоцитів клітини. Як і у кишківнику, в детрузорі вони виконують функцію генерації скоротливих імпульсів та поширення збудження з нервових закінчень. Для цього клітини мають великі видовжені розміри з розгалуженням, що дає змогу мати контакт з кількома міоцитами одночасно [51]. ІСС не мають скоротливого апарату, та не експресують міозин. Наразі виокремлюють не менше 4-х субтипів інтерстиціальних клітин у СМ. На відміну від вже названих ІСС з *lamina propria* які мають зірчасту форму та формують мережу (синцитій) між собою за допомогою щілинних контактів [52], видовженої форми детрузорні ІСС не мають об'єднаної мережі, а розміщені на краях пучків гладенького м'яза у різних векторних орієнтаціях [53]. Третій субтип ІСС також розташований у детрузорі між ГМК та мають зірчасту форму. Вони формують зв'язки з нервовими закінченнями та мають консервативне розташування та морфологію у більшості ссавців [54,55]. Четвертий субтип виділяють через розташування навколо мікросудин в ММ шарі та “ультраструктурним профілем” та близькими контактами з ГМК судин [56], що таким чином може синхронізувати тиск в судинах які живлять детрузор при різних фазах роботи органу. Було показано, що ІСС клітини, котрі мають контакт з нервовими закінченнями експресують холін-ацетилтрансферазу, що підсилює ацетил-холіновий нервовий сигнал на скорочення [57].

1.2.3. Електрофізіологічні властивості гладеньком'язових клітин детрузора. Гладенькі міоцити належать до електрично-збудливих клітин, та експресують значну кількість іонних каналів. Стандартний електрофізіологічний опис ГМК детрузора відрізняється в залежності від виду. До прикладу, потенціал спокою, що є базовою ознакою варіюється в межах між – 31 та – 60 мВ для ГМК детрузора морської свинки та людини відповідно [58,59]. У щурів цей показник у гостроізольованих клітин в нормі становить – 40...– 47 мВ [60].

Видові відмінності спостерігаються і з потенціалом дії: було показано, що ГМК детрузора людини, морської свинки, миші та кроля генерують потенціал дії, що пов'язаний з повільними хвилями спонтанної деполяризації [61,62], тоді як у щурів потенціал дії від спонтанної деполяризації показано лише мікроелектродним методом на смужках [60]. Вважається, що за потенціал дії в гладеньких міоцитах відповідають потенціалчутливі кальцієві канали (Ca_v) L-типу [63]. Можливість генерувати потенціал дії зникла від блокатору Ca_v L-типу та жодним чином не реагувала на тетродотоксин – блокатор потенціалчутливих натрієвих каналів [58,64]. Інгібування T-каналів не впливає на генерацію потенціалу дії [65,66]. Наявність Ca_v (L-типу, N-типу та T-типу) у щурах не викликає питань, що не узгоджується з відсутністю потенціалу дії в їх ГМК детрузора [67]. Саме Ca_v вважають основними каналами, що відповідають за вхід кальцію, оскільки щодо присутності інших, неселективних кальцій-провідних каналів (як про канали родини TRP) немає достовірних остаточних досліджень [68].

Скорочення ГМК детрузора відбувається внаслідок входу Ca^{2+} у цитоплазму та активацію скоротливого апарату. Походження Ca^{2+} може бути як позаклітинним (кальцієві L-, N- чи T-канали), так і з внутрішнього депо (через ріанодинові рецептори – RyR) [69,70].

Калієві канали в ГМК детрузора є найбільшою групою каналів та представлені 4-ма родинami: АТР-чутливими K^+ (K_{ATP}), Двопородоменними

калієвими (K_{2P}), потенціалчутливими K⁺ (K_v) та кальцій чутливими K⁺ (K_{Ca}) каналами. K_{ATP} створюють вихідне випрямлення та гіперполяризують клітину у разі нестачі ресурсів, що ускладнює генерацію сигналів до скорочення [71]. Двопородоменні канали, що виконують функцію підтримання постійного K⁺ струму для потенціалу спокою, представлені у ГМК детрузора каналами K_{2P}2.1 (TREK-1), K_{2P}3.1 (TASK-1) та K_{2P}5.1 (TASK-2) [68]. Стосовно ряду інших каналів родини робіт мало, але у скринінгових базах на людині показано кілька інших K_{2P} (TWIK, TRAAK). В ГМК детрузора з Калієвих потенціалчутливих каналів присутні K_v1, K_v2 та K_v7 [72], які у нормі забезпечують відновлення після потенціалу дії [68].

Однак найбільш значимим у роботі ГМК детрузора щурів вважають внесок потенціалчутливих кальційзалежних калієвих каналів (K_{Ca}), до яких відносять кальційзалежний калієвий канал великої провідності BK-канал (K_{Ca}1.1), середньої провідності IK-канал (K_{Ca}3.1) та малої провідності SK-канал (K_{Ca}2.1–K_{Ca}2.3), які мають провідності з одного каналу до 250 пСм, 20-80 пСм та 10 пСм відповідно [73]. Завдяки чутливості до Ca²⁺ та до деполяризації BK-канали беруть участь у регулюванні збудливих сигналів від кальційпровідних каналів гіперполяризуючи мембрану з потоком K⁺-провідності [74].

1.3. Механочутливі рефлексії сечового міхура: нервова та автономна компоненти

Механочутливість є критично важливою властивістю всіх вісцеральних органів. Чутливість до тиску та розтягнення забезпечує можливість СМ адекватно реагувати на зовнішні фактори та підлаштовуватись – розслабляти м'язи для розтягнення та збільшення об'єму, або навпаки – скорочувати м'яз для сечовиділення. Механочутливість СМ має свої особливості в порівнянні з іншими органами, аналогічно з відмінностями на клітинному рівні між різного походження ГМК.

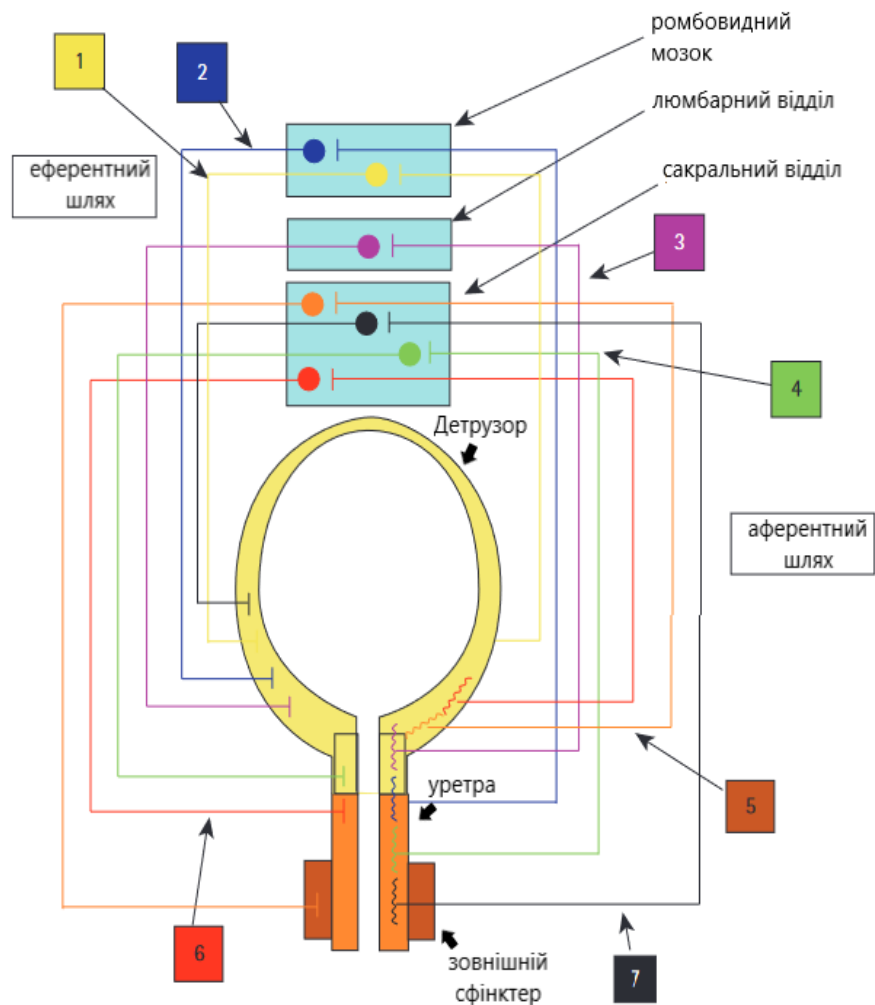


Рис.1.4 Механочутливі рефлекси СМ за Барінгтоном (подразнення та відповідь): 1 – розтягнення СМ та скорочення, 2 – потік сечі, що викликає скорочення СМ, 3 – розтягнення уретри з скороченням СМ, 4 – потік сечі з кальційзалежних розслабленням уретри, 5 – розтягнення міхура з розслабленням уретри, 6 – розтягнення міхура з розслабленням уретри, 7 – потік сечі з скороченням міхура. Адаптовано з [4].

В першій половині 20-го сторіччя піонер досліджень функціонування сечового міхура – фізіолог з Грехемської дослідницької лабораторії (Велика Британія) Ф.Дж. Барінгтон у експериментах на котах виділив 7 рефлексів СМ під час наповнення та сечовиділення на основі походження нейронів та їхніх зв'язків [4]. Перший полягав у скороченні СМ у відповідь на розтягнення стінок міхура та рефлексу через ромбоподібний мозок (ділянку головного

мозку, що об'єднує довгастий мозок, мозочок та вароліів міст), другий – скорочення у відповідь на потік сечі через уретру, що також регулюється ромбовидним мозком (рис. 1.5). Третій рефлекс полягав у скороченні детрузора у відповідь на розтягнення уретри, що регулюється в поперековому відділі спинного мозку. Сегменти крижової ділянки регулюють наступні рефлекси: четвертий – розслаблення сфінктера у відповідь на потік сечі в уретрі, п'ятий – розслаблення зовнішнього сфінктера у відповідь на розтягнення сечового міхура, шостий – розслаблення стінок уретри у відповідь на розтягнення сечового міхура та сьомий, що полягає у скороченні СМ у відповідь на потік сечі через уретру [75–77]. Однак, деякі з описаних ним рефлексів не функціонують або важко реєструються у людей на особах чоловічої статі, а саме 2-й та 7-й [4].

Загалом наразі виділяють три варіанти реакцій СМ на механічну стимуляцію: перша – це розслаблення детрузора, під час якої міхур наповнюється, друга – утримання об'єму з тонічним скороченням детрузора та третя, коли збільшення тиску викликає фазове скорочення та вивільнення сечі [78]. Основними механочутливими рецепторами, що беруть участь у цих рефлексах вважають аферентні терміналі нейронів ДКГ та уротеліальний шар [79,80].

Іннервація сечового міхура забезпечується активністю нейронів крижових (S2-S4) сегментів спинного мозку. Парасимпатичні нейрони спинного мозку стимулюють мотонейрони парасимпатичних гангліїв СМ. З цього ж сегменту сомато-мотонейрони через активацію рецепторів M2, M3 ацетилхоліном іннервують детрузор напряду. Симпатична нервова система іннервує СМ нейронами поперекової (T10-L2) ділянки спинного мозку через тазові ганглії та постгангліонарні симпатичні волокна, котрі стимулюють внутрішній уретральний сфінктер [81]. Крім цього, вони ж іннервують кровоносні судини СМ. Крім цього, нейрони з T10-L2 забезпечують можливість до наповнення міхура активацією рецепторів β_2 та β_3 (норадреналінові). Зворотній зв'язок забезпечують нейрони дорзальних корінцевих гангліїв, котрі виконують роль

основних механорецепторів в стінках органу. Чутливі нейрони формують розгалужену сітку аферентних волокон в СМ під уротеліальним шаром. Чутливі нейрони дають сигнал для активації парасимпатичної нервової системи що стимулює скорочення детрузора, паралельно з чим відбувається пригнічення активності симпатичної системи (розслаблення сфінктерів) [81,82].

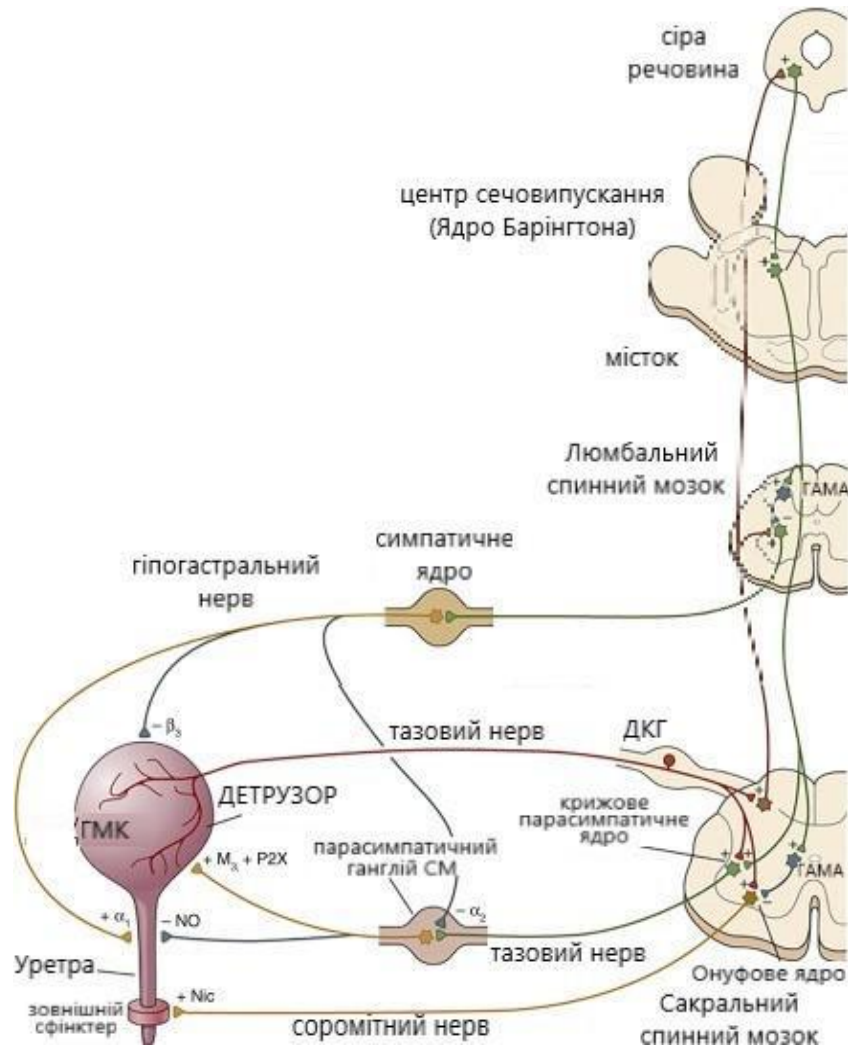


Рис. 1.5 Нервові ланцюги механочутливих рефлексів сечового міхура. Адаптовано з [83].

Вольовий контроль сечотримання, забезпечується іннервацією зовнішнього сфінктера α -мотонейронами вентральних рогів S2-S4 сегментів спинного мозку та відповідної ацетилхолінової стимуляції посмугованого кільцевого м'язу зовнішнього сфінктера [83]. Власне керування роботи СМ забезпечується невеликою ділянкою головного мозку у мості, яку назвали на

честь відкривача ядром Барінгтона. Вольовий контроль забезпечується корою головного мозку, що формує зв'язки з, власне, ядром Барінгтона, але цей процес вимагає навчання [81]. Нейрони Барінгтонового ядра в своїй більшості є глутаматергічним [84,85], які мають нетипово довгі дендрити. Стимулюючий сигнал з цих нейронів по аксонам прямує до поперекового відділу, де активуює ГАМК нейрони, які гальмують передвузлові симпатичні, а також до сакрального відділу, де активація ГАМК нейронів в онуфовому ядрі гальмує мотонейрони сороміцького нерву. Також, у крижовому відділі глутаматергічний нейрон ядра Барінгтона інервує парасимпатичне ядро, котре через парасимпатичний ганглії CM активує АТР-чутливий канал P2X у детрузорі (деполяризуючий сигнал до скорочення) [86].

У нервових сенсорних терміналях було показано експресію властивих для нервових тканин канали родини TRP – TRPA1, TRPC1/TRPC4, TRPV2 та переважно нейронального представника родини Piezo – Piezo2 [79].

Гіперполяризація детрузорного м'яза у відповідь на надходження сечі та поступове збільшення об'єму виникає також і без участі нервової тканини. Це часто пояснюють автономною саморегуляцією CM. Основним рецептором, що відповідає за відповідь, що не залежить від нейрональної системи вважають уротеліальний шар (рис. 1.6). Найбільші, найближчі до порожнини органу клітини уротелію – парасолькові клітини експресують велику кількість хемо- та терморекцепторів (ASIC, TRPV1, TRPA1, TRPM8), осмо- і механорецепторів (TRPV4 та TRPV2), субродини канонічних каналів TRP (TRPC1 та TRPC4), канали родини Piezo (Piezo1, Piezo2) та властивий лише епітеліальним тканинам – механочутливий натрієвий канал (ENaC) [87–91].

Крім уротелію, в стінках CM механочутливі канали експресуються у *lamina propria*, а саме у ICC клітинах [92]. Було показано електрофізіологічними методами, що ICC мають механочутливість [93]. Автори дослідження стверджують, що самостійна механочутливість ICC грає важливу роль за сечовиділенням у новонароджених, тоді як під час формування свідомого контролю з віком, їхня роль падає, що пояснюють зменшенням

кількості ІСС, збільшенням інтеграції у детрузор, втратою синцитію та збільшення ролі сенсорних та ефektorних нервових волокон.

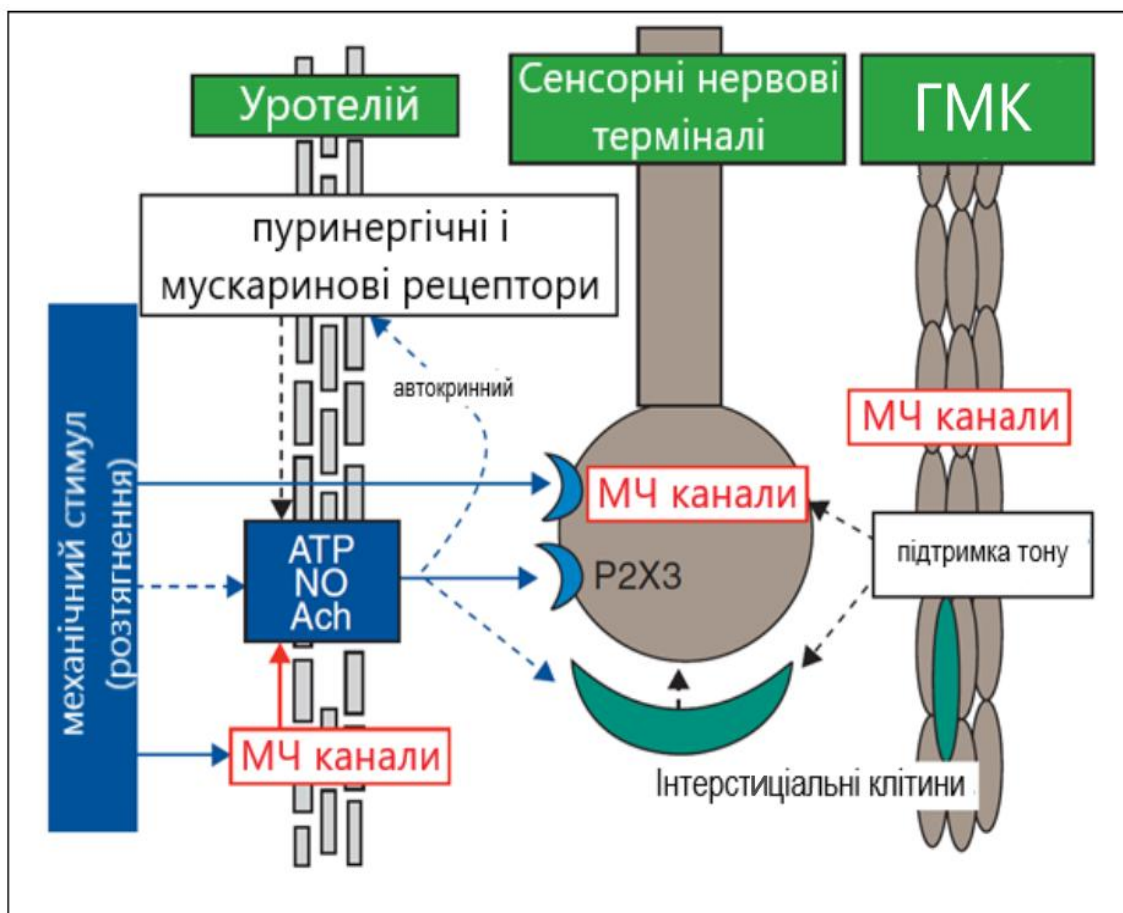
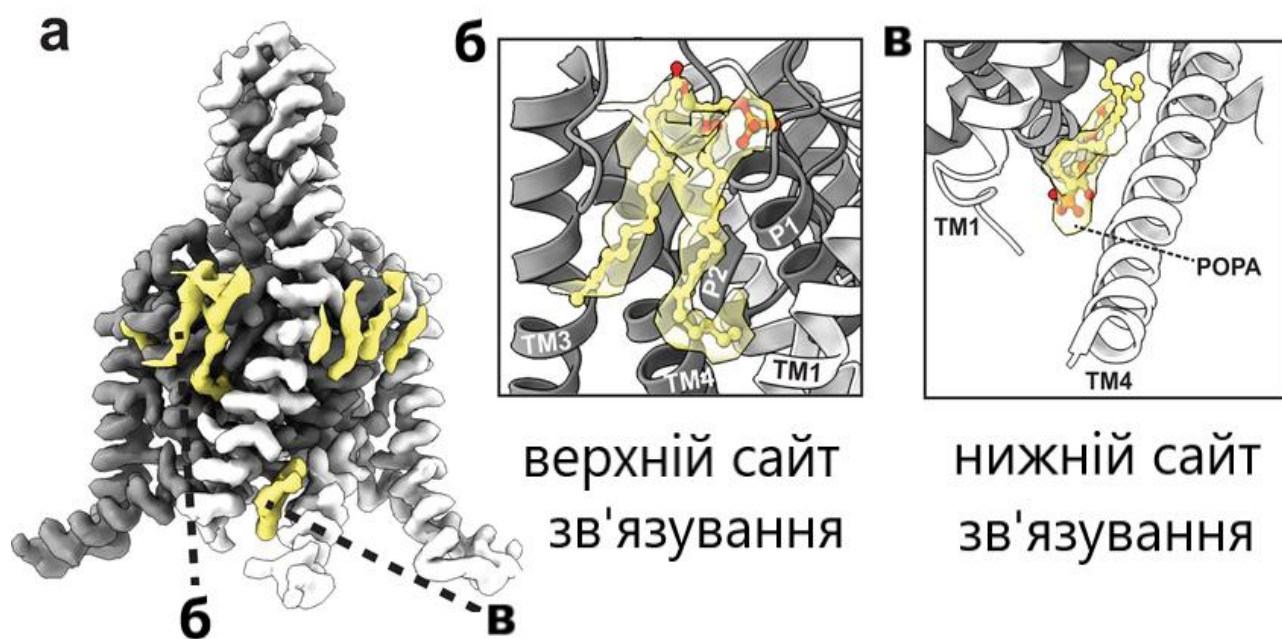


Рис. 1.6 Схема механочутливих процесів у стінці сечового міхура: 1 – активація струмів механочутливих каналів (МЧ) на стимул в уротелії, передача сигналу сигнальними молекулами (АТР, NO, Асн) до нейронів/або інтерстиціальних клітин; 2 – пряма активація МЧ в гладенько-м'язових клітинах шляхом розтягнення детрузора, самостійна реакція м'яза – розслаблення, або скорочення. Адаптовано з [5].

Власне сам детрузор, а саме його ГМК також мають самостійну механочутливість, хоча робіт щодо цього не багато. В деяких працях було показано, що ізольовані ГМК генерують механочутливу відповідь [7], а також можуть експресувати ряд механочутливих каналів, як TRPV4, TRPV2, Piezo1, Piezo2 та TREK-1 [7,79,88].

1.4. Основні механочутливі канали детрузора

1.4.1. Калій провідні механочутливі канали родини TREK. Існує дві родини K^+ -провідних каналів, що мають механочутливість – це потенціал чутливі K^+ канали – K_v (K^+ voltage-gated) та двопородоменні K^+ канали K2P (K^+ two-pore domain) [94,95]. Найбільшої уваги в контексті механочутливості отримали представники субродини TREK, що належать до великої групи K2P. Саме один з каналів TREK був вперше ідентифікований як перший механочутливий канал ще у 1984-му році в м'язовій тканині ембріона курчат [15].



*Рис. 1.7 Структура механочутливого K^+ -провідного каналу TREK-1 на основі криогенного електрон-мікроскопічного дослідження: **а** – загальна будова, проєкція збоку (сірим – перший мономер, білим – другий мономер, жовтим – сайти PORA) ; **б** – верхній сайт зв'язування каналу з біліпідною мембраною (TM- трансмембранні домени мономерів); **в** – нижній сайт PORA. Адаптовано з [96]*

Субродина була виокремлена через подібність будови, наявність механочутливості та поширеність у еукаріотичних багатоклітинних організмів. Структурно, TREK-канали складаються з 2 ТМ мотивів, одним з яких білок формує пору (P) у димерному стані (з двох мономерів) з дзеркальною

симетрією та високою селективністю до K^+ (рис. 1.7). Представники TREK субродини мають типово для $K2P$ три функціональних стани, а саме закритий, низько провідний та відкритий [97]. TREK канали практично не чутливі до змін потенціалу, мають високу селективність до іонів K^+ завдяки специфічному K^+ -зв'язуючому фільтру S4, що було показано блокуванням цього сайту іонами Ba^{2+} [98].

Самостійна здатність до механочутливості була показана для двох представників субродини – TREK-1 ($K_{2P}2.1$) та TRAAK ($K_{2P}4.1$). В роботах з протеоліпосомами було продемонстровано, що механічна активація каналів може відбуватись лише за наявності біліпідного шару без внутрішніх цитоскелетних елементів або допоміжних білків. Канали проявили чутливість до багатьох механічних типів подразнень: дії негативним та позитивним тиском, потоком рідини та розтягуванням [99]. Канали додатково приєднуються до біліпідної мембрани С-термінальним доменом, що виконує одну з основних ролей у механочутливості, оскільки його втрата призводить до втрати реагувати на механічні подразники [97,100]. Нещодавно були відкриті сайти зв'язування з біліпідною мембраною – POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidic acid). Було показано, що ці субодиниці можуть створювати систему, в якій біліпідна мембрана приймає участь у закриванні пори у С-подібному закритому стані [96].

Розміри каналів з родини $K2P$ в порівнянні з деякими іншими є відносно невеликими. Сформовані мономери представників субродини TREK мають наступні розміри: TRAAK – 393 амінокислот, TREK-1 – 426 а.к. та TREK-2 – 538 а.к. Експресія представників субродини має тенденцію до розділення по функціям тканин. Так TREK-1 є незамінним у функціонуванні м'язових тканин, тоді як TRAAK-канал частіше асоціюють з нервовою системою (сітківка, нюхові рецептори, неокортекс, гіпокамп, мозочок) та приймає участь у рості та розвитку нервової системи [101,102]. Крім механічних подразнень, представники субродини мають чутливість до природних лігандів: поліненасичені жирні кислоти (арахідонова кислота, яку використовують для

активації TREK-1 і TREK-2), до зміни концентрації протонів (чутливі до кислот), також до нещодавно відкритого селективного інгібітора ТКІМ та певних анестетиків, нейропротекторів та антидепресантів [100,103].

1.4.2. TREK-1 у клітинах гладенького м'яза детрузора. Експресія першого представника субродини TREK у сечовому міхурі була показана ще на початку 2000-х років за допомогою кількісної ПЛР зі зворотною транскрипцією та імуногістохімії. TREK-1 є майже у всіх типах тканин органу, таких як уротеліальний шар (у парасолькових клітинах уротелію), *lamina propria*, але найбільше у м'язовому шарі (*tunica muscularis*) та нервових аферентних волокнах [104,105].

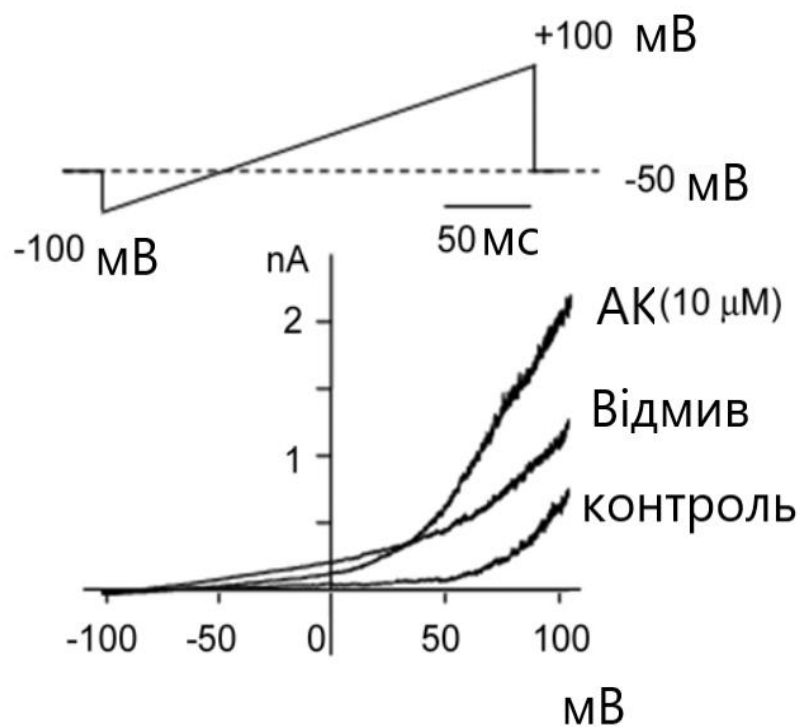


Рис. 1.8 Вольт-амперна характеристика струму TREK-1-каналу у гладеньком'язовій клітині детрузора у відповідь на прикладання арахідонової кислоти (АК). Адаптовано з [7].

Про функціональну роль TREK-1-каналу в уротелії досліджень доволі мало, хоч і відомо про нижчий рівень його експресії у цьому типі тканини в порівнянні з іншими. Однак є роботи, що стосуються залежності роботи TREK-

1-каналу в ендотелії, та можливості регуляції синтезу NO, що може впливати на додатковий NO-опосередкований шлях розслаблення [106]. Щодо його ролі у нервовій тканині СМ було показано, що переріз нервових закінчень не впливає на рівень генерації передчасних скорочень під час прикладання блокатора TREK-1 – L-метіоніну в порівнянні з контролем [105]. Однак, у деяких роботах навели докази щодо залучення каналу у механізм сечовиділення саме через нервові закінчення в ЦНС [6].

TREK-1 є одним з домінантних каналів K₂P у детрузорі, що було показано методами ПЛР та імуногістохімії [38,107]. Крім цього, в ГМК детрузора струм каналу у відповідь на механічну стимуляцію була зареєстрована методом patch clamp [7]. TREK-1 активували розтягненням мембрани та негативним тиском (в конфігурації "прикріплена клітина" або cell-attached) (рис. 1.8). Через це саме TREK-1 називають головним механорецептором гладеньком'язовому шарі СМ. Канал залучений у розвиток гіперактивного сечового міхура та кількох інших розладів роботи СМ, які мають зв'язок з поліморфізмом гену *kcnk2* [108]. У випадку TREK-1 нокауту в детрузорі СМ за допомогою тензометрії показали зростання спонтанних скорочень майже вдвічі порівняно з контролем.

До такого ж висновку прийшли і в іншій роботі з TREK-1, де за допомогою фармакологічного інгібування каналу за допомогою L-метіоніну унеможливили розслаблення та стимулювали спонтанні скорочення у відповідь на розтягнення смужок детрузора [7,105].

1.4.3. Будова каналу TRPV4. Першочергово відомий як осморорецептор, мономер TRPV4 більший за TREK-1 та має 871 амінокислоту з типовими для каналів TRP шістьма трансмембранними доменами (ТМ). Канал має подібність у будові до TRPV1, складається з 4-х мономерів і має багато спільних елементів будови, таких як центральна послідовність амінокислот, що формують пору (між 5-м та 6-м ТМ), наявність масивного (465 а.к.) N-хвоста з 6-ма

анкіриновими повторами. N-хвіст кріпиться з середини до мембрани через сайт зв'язування з фосфоінозитолом – PIBS сайт (рис. 1.9) [109,110].

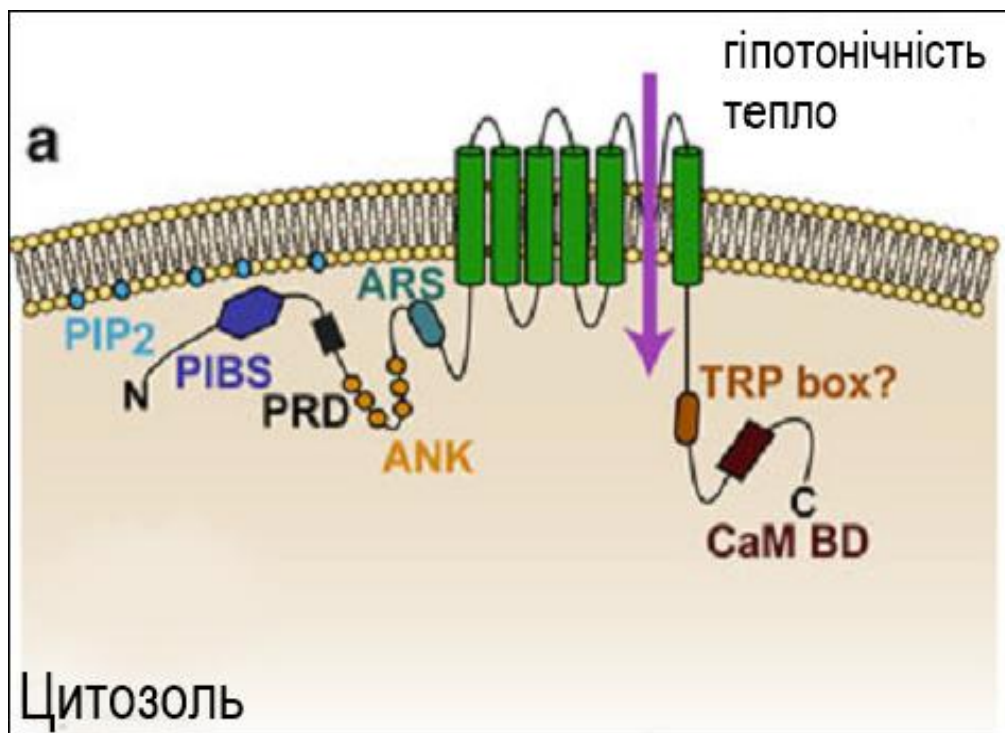


Рис. 1.9 Схематична структура TRPV4-каналу: N-хвіст має сайт зв'язування з фосфоінозитолом PIBS, PRD – домен насичений проліном, ANK – анкіриновий домен, ARS – арахідонат подібний сайт. На C-кінці TRP box – наявність якого під питанням, CaM BD – кальмодулін зв'язуючий домен. Адаптовано з [109].

TRPV4 як і усі представники родини є неселективним катіонним каналом з перевагою до двовалентних іонів Ca^{2+} та Mg^{2+} , хоч і пропускає іони Na^+ . Кальцієвий вхід у відкритій конфігурації створює провідність 80-100 пСм при позитивному потенціалі та нижчий – 30-50 пСм при негативному [111] (рис. 1.10). Спорідненість до двохвалентних іонів забезпечує Аспартат (Asp) в позиції 682 та Метіонін (Mth) в позиції 680 (що формують центр селективного фільтра). Перенасичення концентрації Ca^{2+} створює зворотну негативну регуляцію оскільки TRPV4 має сайт зв'язування (CaM BD) з Ca^{2+} -чутливим білком, природу якого поки не встановлено достеменно (кальмодулін, пасцин3 або F-актин) [109,112].

Як вже згадувалось вище, TRPV4 здатен до осмочутливості та активується під час осмотичного набрякання. Крім цього, канал має термочутливість до 24-38 °С завдяки чутливому до змін температури домену на N-кінці, що було показано в позаклітинних експериментах, що вимагали присутності PIP₂, а також механочутливість [113].

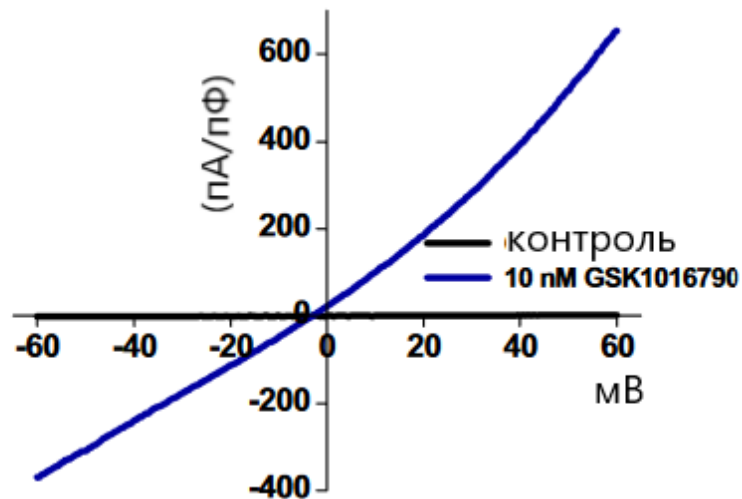


Рис. 1.10 Вольт-амперна характеристика TRPV4-каналу. Канал має характерне невелике зміщення перетину точки абсцис ліворуч від 0 з вихідним випрямленням. Адаптовано з [114].

Механочутливість TRPV4 досі є предметом досліджень, однак її показали в щурячому TRPV4 [115], та виведено кілька гіпотез, що пояснюють чутливість каналу через справжню самостійну механочутливість від викривлення біліпідної мембрани, хоча є можливість формування комплексу між каналом та цитоскелетом [116].

Канал може бути активованим і через внутрішньоклітинні сигнальні шляхи від інших стимулів. TRPV4 може бути активований 5-6-епоксиейкозатрієною кислотою (epoxyeicosatrienoic acid) – продуктом роботи фосфоліпази A₂. Водночас робота каналу може активувати фосфоліпазу A₂ та через сигнальний шлях далі – протеїнкіназу C та позаклітинну сигнал регулюючу кіназу 1/2 (PKC – protein kinase C, ERK1/2 – extracellular signal-regulated kinase 1/2) [113,117–119]. В лабораторних умовах з каналом

працюють відкритим у 2008-му році штучним селективним активатором GSK1016790A [114] та кількома нововідкритими блокаторами – HC-067047 та GSK2798745 (що є подібним до агоністу за будовою) [120].

TRPV4 широко поширений в організмі у різних типах тканин: в СМ, нирках, матці, серці, легенях, мозку, кишківнику. Окрім цього канал виявлений у нейронах ДКГ, епідермісі, вібрисових клітинах Меркеля та волоскових клітинах внутрішнього вуха [121]. Завдяки широкому спектру способів активації, в різних системах канал задіяний у ряді функцій. Так, наприклад, в серці виступає в якості основного термочутливого регулятора а також ноцицептора [122]. В кровоносній системі йому визначають роль головного механорецептора ендотелію та регулятора кров'яного тиску [119]. Крім рецепторної, було показано його роль у регуляції запалення, оскільки наявність запальних агентів – інтерлейкіну 1 β або інтерлейкіну 17 підвищує експресію каналу [109].

1.4.4. TRPV4 у контексті функціонування сечового міхура. В сечовому міхурі TRPV4 в останні роки вивчають досить активно. Відомо про його експресію у різних шарах органу: в уротеліальному, м'язовому та аферентних нервових волокнах [79,123]. За допомогою делеції гену, показано що TRPV4 приймає участь у формуванні спонтанних скорочень, а також в нормальних процесах сечовиділення [124]. З цього логічно випливає, що порушення роботи каналу, або генетичні відхилення можуть впливати на порушення функції СМ. Було показано зв'язок TRPV4 з розвитком синдрому “надзбудливого” сечового міхура [125]. При деяких системних хворобах рівень експресії TRPV4 в окремих органах підвищується. Так було показано, що в уротелії підвищення експресії каналу може бути причиною виникнення дисфункції сечового міхура та «неспроможності вивільнення сечі», що може бути викликане розвитком діабету 2-го типу [89,126,127].

Нервово-незалежна участь каналу в регуляції роботи СМ була показана на моделі з перетином спинного мозку. Дослідження продемонструвало, що

різниці від прикладання селективного активатора TRPV4 в порівнянні з контрольними тваринами немає, ба більше, це збільшило спонтанну активність тканини [78]. У іншому дослідженні з використанням селективного блокатора каналу – сполуки HC-067047 показали збільшення критичного об'єму органу, як і у випадку повного нокдауну *trpv4* [124].

Щодо клітинноспецифічної функціональної присутності каналу у тканинах СМ достовірних даних наразі немає. Багато робіт демонструють експресію каналу в ГМК детрузора методами ПЛР та імуногістохімії [114,126]. Дослідження з тензометричними вимірами очищених від уротелію м'язових смужок доводить функціонування каналу безпосередньо у детрузорі [128], хоч ефект активації є значно нижчим в порівнянні з експериментами з присутнім уротелієм. Тож головним чином про TRPV4 в СМ говорять саме в уротелії.

В дослідженнях з уротеліальним шаром було показано участь TRPV4 у регуляції скорочення під час наповнення та чутливості до потоку сечі [129]. На морських свинках продемонстрували спарену роботу TRPV4-каналу з ВК-каналом (big potassium – large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel) [10]. Активація TRPV4 на ізольованих смужках СМ за допомогою GSK1016790A викликала збільшення інтенсивності скорочення у відповідь на стимул, проте зменшувала довільні спонтанні скорочення котрі відновлювались при прикладанні паксиліну (інгібітора ВК-каналів). Очевидно, що TRPV4-опосередкований Ca^{2+} сигнал викликав активацію ВК та гіперполяризацію клітин, що блокувала спонтанні скорочення. Така спаренність є видоспецифічною, оскільки на мишах та щурах прикладання GSK1016790A не викликало зниження спонтанної активності, а навпаки різко – збільшувало спонтанну активність детрузора та підвищувало інтенсивність сечовиділення [78,130].

Передача сигналу від уротеліального шару до ефекторного м'язу відбувається в основному через вивільнення АТР. Було показано на гостроізольованих та культивованих уротеліоцитах миші, що TRPV4-залежний Ca^{2+} сигнал викликає вивільнення АТР з клітин [129,131]. Щодо механізму

котрий поєднує TRPV4 та вивільнення АТР вважають, що тут може бути залучений класичний екзоцитоз через активність АВС транспортерів (ATP-binding cassette transporters), конексиновими каналами або ж активністю білків паннексин-1 та CALHM1 (Calcium homeostasis modulator 1, субодиниці Ca_v-каналу). Функціональними методами присутність TRPV4 також була локалізована у кластері ICC клітин морських свинок та показана в залученні передачі Ca²⁺ сигналів у *lamina propria* [132,133]. Щодо присутності TRPV4 саме у гладеньких міоцитах, то принаймні на мишах було доведено їхню присутність саме у ICC але не у ГМК [134].

1.4.5. Механочутливий канал Piezo1. Piezo – одна з нещодавно відкритих родин механочутливих каналів. Piezo1 та Piezo2 саме як іонні канали, що мають механочутливість, були відкриті у 2010-му році, але власне ген, що кодує трансмембранний білок були відкриті за 5 років до того та описані як мембранні білки ендоплазматичного ретикулуму астроцитів, названі в оригінальній роботі як *Fam38A* (пізніше названий *piezo1* від грецького "πίεση" (пієзі), що означає "тиск") та *Fam38B* [18,135]. Piezo1 – є одним з найбільших іонних каналів. Канал складається з 3-х субодиниць що мають по 2521 амінокислоти в своєму складі (у людей) [136]. За допомогою нокауту генів *piezo1 piezo2* було доведено механочутливу природу каналів в культурі клітин нейробластоми. Обидва канали були виділені в окрему родину завдяки значній відмінності з іншими каналами за кодуючими послідовностями та гомологічності. В середині родини, порформуючі домени двох каналів Piezo1 та Piezo2 в амінокислотній послідовності співпадають на 54% [18]. Канал поширений в більшості багатоклітинних доменів: Protozoa мають 6 ортологів родини Piezo, риби – 3, рослини (*Arabidopsis thaliana*), слизовики (*Physarium polycephalum*) та членистоногі (*Drosophila melanogaster*) – по 1-му ортологу. Таксономічні групи, що еволюційно відділились у окрему еволюційну гілку значно раніше моменту зародження розділення ядерних та без'ядерних

організмів (такі як гриби) не мають ортологів цієї родини каналів, хоч і мають інші, притаманні лише без'ядерним організмам механорецептори [18].

Діаметр каналу Piezo1 є одним з найбільших і сягає біля 200 Å. За допомогою кріоелектромікроскопії було показано, що Piezo1 має 14 ТМ та довгий N-хвіст в міжклітинному просторі, що формує домен, що нависає над біліпідною мембраною (рис. 1.11). З іншого ж боку (С-кінець), в цитоплазмі сформований домен СТД (C-terminal domain), котрий закріплює білок у мембрані [137]. Ще один унікальний домен CED (C-terminal Extracellular domain) властивий обом представникам родини розташований між двома останніми ТМ доменами формує корок, що прикриває пору каналу в закритому конформаційному стані.

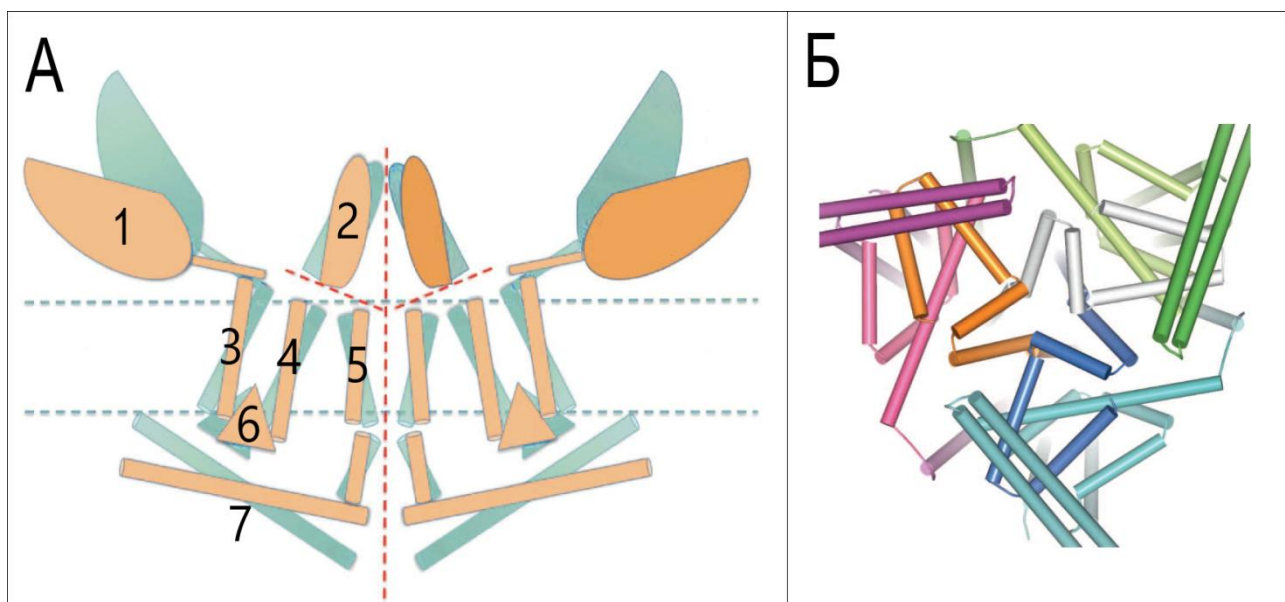


Рис. 1.11 Схематична будова каналу Piezo1 на основі кріо електронної мікроскопії та його іонна пора: 1 – N-кінець з "лопаттю"; 2 – CED-домен; 3 – зовнішній ТМ; 4 – внутрішні ТМ; 5 – поро-формувальний ТМ; 6 – СТД "якір"; 7 – "коромисло". А. Помаранчева модель – відкрита конформація Piezo1, синій – закрыта. Б – модель іонної пори каналу Piezo1, вид згори. Адаптовано з [137].

Piezo1-канал має неселективну пору, що може пропускати іони Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ та Cl^- але з значною перевагою на користь Ca^{2+} [138] та в конформації повного відкриття має провідність на рівні 29 pS (рис. 1.12). Канал чутливий до

іону Gd^{3+} , до червоного рутеніуму та до неселективного блокатора механочутливих каналів – GsMTx4, пептидного токсину павуків [139]. Крім цього наразі відкрито хімічний активатор Yoda1 [140], та Jedi1, дія яких може бути заблокована селективним блокатором Dooku1 через конкуренцію до сайту зв'язування [141].

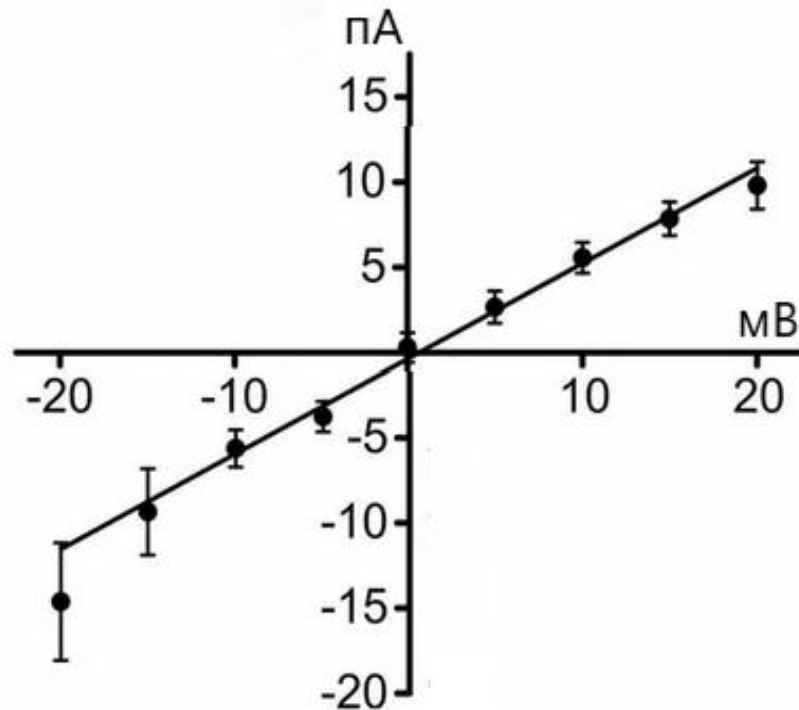


Рис. 1.12 Вольт-амперна характеристика механоактивованого струму Piezo1. Адаптовано з [139].

Всього лише через десять років було доведено фундаментальну важливість каналу Piezo1. В роботі [142] показали, що нокаут каналу спричиняє загибель ембріона миші на 16-му дні ембріогенезу (E16,5). Пізніше в іншій роботі було показано, що Piezo1 є незамінним під час розвитку судинної системи ембріона [143,144]. Тварини з нокаутом гену не мали розгалуженої системи судин в тілі, а органи, з яких починається розвиток судин (пуповина), мали лише не структурні утворення неорганізованих ендотеліоцитів. Крім відсутності судин, нокаут Piezo1 може порушувати розвиток нервової системи, оскільки бере участь у міграції нейронів [145].

Piezo1 в основному представлений у широкому спектрі тканин внутрішніх органів (шлунку, м'язах, еритроцитах, легенях), тоді як другий представник родини Piezo – Piezo2 зустрічається в тканинах, що спеціалізуються на чутливості до подразнень – в рецепторах дотику шкіри (тільця Меркеля), ендотелії та уротелії (вистилаючі тканини, що виконують чутливу роль для саморегуляції) [146,147]. Нокаут каналу також є летальним, а його мутації можуть бути причиною виникнення ряду патологій, що асоціюються з порушеннями розвитку опорно-рухового апарату [148].

1.4.6. Piezo1 та його роль в механочутливості сечового міхура.

Механочутливість в сечовому міхурі є доволі важливою темою для досліджень, адже впливає на його основну фізіологічну роль – утримання певного рівня рідини за певного тиску. Piezo1 майже з перших років відкриття привернув увагу і дослідників СМ. Наявність каналу показано методами ПЛР та імуногістохімії в уротелії, аферентних нейронах ДКГ, в *lamina propria* (та безпосередньо в ІСС клітинах), мезотелії та в мінорних м'язах міхура ММ (*muscularis mucosae*) та в детрузорі [149]. Функціонально канал був досліджений в уротеліальних клітинах та інтерстиціальних (ІСС). Активація Piezo1-каналу була прив'язана до вивільнення АТР з уротеліоцита в позаклітинний простір [88]. Однак, в іншій роботі показано, що вимкнення функції каналу нокаутом знижувало максимальний об'єм наповнення СМ, що вказує на можливість Piezo1 стримувати передчасне скорочення, а не стимулювати його через вивільнення Ca^{2+} та АТР сигнал [150].

В роботі [151] навели дані, що можуть говорити, що денервація (втрата нервових закінчень) може збільшувати експресію каналу в СМ, таким чином приймаючи участь у автономній саморегуляції органу (без участі ЦНС). У іншій роботі показали залежність експресії Piezo1 та генів циркадних ритмів *clock* та *bmal1* [152]. Зниження рівня експресії Piezo1 та TRPV4 в культурі уротеліоцитів було зафіксоване при збільшенні денної темної фази, і так само нокауд регулятора *clock* знизив експресію каналу та порушив ритмічність.

Функціональну присутність каналу в ІСС клітинах було показано у роботі [51], де дослідили роль Piezo1 у гіперактивності клітин під час запалення. Кальциметричними вимірюваннями та patch clamp автори роботи показали зростання Ca^{2+} сигналів від гіпотонічного стресу (активація негативним тиском), що зникали у клітинах з нокаутом Piezo1, або ж блокуванням неселективним блокатором механочутливих каналів – GsMTx4.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Експериментальні тварини

Для досліджень використовували щурів лінії Вістар (98 самців віком 3 місяці та вагою 200-250 г), що утримувались з *ad libitum* доступом до харчування та води при віварії інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Експериментальні процедури були затверджені комітетом з біоетики Інституту (протокол № 3/21, від 23.09.21) та відповідали вимогам Директиви ЄС 2010/63/EU «Стосовно захисту тварин, що використовуються у наукових цілях». Анестезію та присипання тварин проводили за допомогою інгаляції CO₂ газом відповідно до затверджених процедур після чого для гострих експериментів анестезованих тварин декапітували.

2.2. Приготування гостроізолюваних клітин

2.2.1. Ізолювання клітин гладенького м'язу детрузора та відбір подібних до інтерстиціальних клітин Кахаля. Після анестезування інгаляцією CO₂ та декапітації з черева піддослідних знекровлених тварин видаляли хірургічними ножицями та пінцетом шкіру з хутром та розтинали черевну порожнину таким чином, щоб не зачепити внутрішні органи. Відтягуючи нижню частину черевного м'язу (область над статевими органами) з-під жирової тканини та сім'яників підтягується СМ, що прикріплений до поздовжньої фасції (сполучної тканини). СМ вирізували на рівні початку уретри та сечовивідних каналців (які у щурів розташовані в одній зоні, що називається “трикутник”). Ізолювані СМ поміщали у охолоджений до 4°C безкальцієвий Глутаматний розчин. Необхідність безкальцієвого розчину спричинена стресовою процедурою для тканин, що при наявності нормальної концентрації іонів Ca²⁺ можуть стимулювати клітини посилювати процеси

стресу та автофагії. Глутамат натрію додавався виходячи з його цитопротекторних властивостей для м'язової тканини.

Для підготовки до ферментативного виділення клітин охолоджений розчин разом з СМ поміщали під бінакуляр МБС-9 ЛОМО (8X) та за допомогою мікрохірургічних ножиць очищали залишки сполучної та жирової тканин. Очищений зовні, СМ розрізався поздовжньо (від дна до отвору) та фіксувався ентомологічними голками на підложці з розчином внутрішньою стороною догори. Уротелій та судини видалялись за допомогою мікрохірургічних ножиць для забезпечення доступу ферментів до м'язового шару оскільки уротелій має формує щільні контакти та міжклітинну матрицю, що не пропускає рідини. Очищений м'язовий шар різався на квадратні шматочки шириною 1-2 мм.

Подальше виділення проводили за адаптованим протоколом з 2-ма ферментними коктейлями. На першому етапі обробки шматки тканини переносили у пробірку з 1 мл безкальцієвого глутаматного розчину з додаванням 1 мг/мл папаїну, 1 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну (Bovine serum albumin, BSA) та 1 мг/мл дитіотреїтолу (ДТТ) та впродовж 25 хв інкубували за температури 37 °C з перемішуванням на магнітному шейкері. В результаті такої обробки міжклітинний матрикс втрачає зв'язки -S-S- (завдяки роботі слабкої протеази – папаїну та відновника – ДТТ) і тканина стає більш пористою, що покращує подальшу ферментативну обробку. Тканина обережно піпетувалась Пастерівською піпеткою з великим отвором, після чого пробірку з нею центрифугували при 200 g впродовж 4 хв та відбирали розчин. 1мл другого ферментативного розчину заливали в заміну. Він готувався на основі глутаматного розчину до якого додавали CaCl₂ до концентрації в 100 мкмоль/л (оскільки колагеназа II типу потребує для активації 4 іона Ca²⁺ на одну молекулу), 0,5 мг/мл колагенази з *Clostridium histoliticum* II типу, 0,5 мг/мл інгібітору трипсина та 1 мг/мл BSA. Колагеназа II типу є значно активнішим протеолітичним ферментом в порівнянні з папаїном, що розпізнає та розрізає послідовність -R-Pro-8-X-Gly-Pro-R- безпосередньо в колагені [153]. Інгібітор

трипсину додається як і BSA – з цитопротекторною метою. В цій суміші тканина інкубувалась впродовж 20 хв за 37 °С. Далі шматки тканини піпетували з меншим отвором, після чого отриману суспензію центрифугували (200g 4 хв), а осад з клітинами ресуспендували у свіжому глутаматному розчині зі 100 мкмоль/л CaCl_2 та перед тим як брати у експеримент залишали в холодильнику за 4 °С на годину для “відпочинку”. Типова ГМК детрузора в прохідному світлі після обережного виділення зберігає характерну морфологію, а саме видовжена клітина з пропорціями 1:5 – 1:7. Жива клітина має прозору чисту цитоплазму та чітко окреслені краї мембрани (рис. 2.1, б).

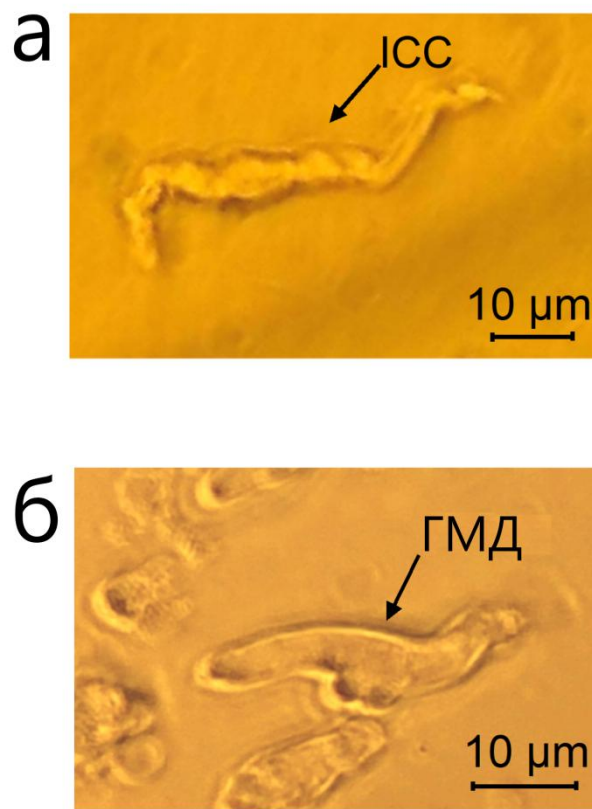


Рис. 2.1 Морфологія ізолюваних міоцитів та ICC-подібних клітин з детрузора щура. **а** – морфологія ICC-подібної клітини в прохідному світлі; **б** – ГМК детрузора. Масштабна шкала дорівнює 10 мкм.

В якості позитивного контролю в деяких експериментах використовували ICC-подібні клітини з *lamina propria* або з детрузора з клітинної суспензії. Клітини визначались за допомогою морфологічних ознак, описаних в літературі

[154]: видовжені тонкі клітини з відгалуженнями або зірчасті клітини (рис. 2.1, а).

2.2.2. Ізолювання аферентних нейронів дорзальних корінцевих гангліїв. Для отримання додаткового контрольного об'єкту застосовували гостроізолювані нейрони з дорзальних корінцевих гангліїв (ДКГ). Нейрони виділяли зазвичай з тих же тварин, з яких отримували ізолювані ГМК детрузора. Присиплену та декапітовану тварину клали черевом донизу. З центральної зони видаляли шкіру з шерстяним покривом та розрізали хребет разом зі спинним мозком на рівні одного – двох хребців від останніх ребер (для отримання тотального препарату з нейронами). Для збереження цілісності розташування нервових волокон та відростків під час розсічення внутрішнього каналу спинного мозку попередньо робили поздовжні розрізи в спинних м'язах. ДКГ видаляли з своїх лож за допомогою мікрохірургічних інструментів та переносили в охолоджений до 4 °С безкальцієвий розчин Тіроде. Під бінокелем корінцеві ганглії очищали від відростків та сполучної тканини, після чого розрізали на 4 частини для ферментативної обробки.

Для ізолювання нейронів ДКГ використовували однокроковий протокол з використанням 2-х протеаз: колагенази Іа типу (1мг/мл) та трипсину (2мг/мл), що розчиняли у стандартному розчині Тіроде (зі вмістом іонів Ca^{2+} в концентрації 2 ммоль/л). Препарат інкубували впродовж 28 хв за 37 °С постійно перемішуючи в магнітному шейкері. Після тканину піпетували Пастерівською піпеткою, а отриману суспензію центрифугували (200g 4 хв), а осад з клітинами ресуспендували у свіжому охолодженому до 4 °С розчині Тіроде та залишали до використання в експеримент.

2.3. Цистометрія

Цистометричні виміри зміни внутрішнього тиску в органі під час наповнення проводились на ізолюваних СМ за загально визнаною методикою

[155]. Після декапітації тварини орган переносили у охолоджений розчин Кребса та під бінокуляром очищали від зовнішніх сполучних тканин. Ізольований СМ переносили у свіжий підігрітий розчин Кребса у 50 мл стакані та приєднували до системи вимірювання та подачі тиску через канюлю. В системі до трійника з перемикачем був приєднаний манометр та мікрометр зі шприцом наповненим розчином Кребса (для фіксованого та повторюваного збільшення тиску). Для виміру тиску в залежності від наповнення використовували протокол з кроковою подачею об'єму розчину Кребса та фіксацією стабілізованої величини тиску. Отримані результати обробляли для отримання залежності стресу (реакції) і наповнення за допомогою формули:

$$S = [P(V^{1/3} + (V + V_{cm})^{1/3})] / [4((V + V_{cm})^{1/3} - V^{1/3})],$$

де S – стрес, P – тиск, V – об'єм рідини якою заповнювали СМ, V_{cm} – об'єм сечового міхура, що обраховувався через вагу СМ та характерну щільність вісцеральних гладеньком'язових тканин (1.05 мг/мм^3).

2.4. Тензометрія смужки детрузора

Визначення впливу фармакологічних агентів на скоротливість детрузора проводили методом тензометрії. Для цього з розрізаного СМ виготовляли гладеньком'язові смужки шириною близько 2 мм та 8-10 мм довжиною, очищали від уротелію та поміщали у підігрітий до 37° C розчин Кребса. Без уротелію в подальших дослідженнях отримані результати можна трактувати як такий, що пов'язаний виключно з детрузором. Далі смужку поміщали у проточну камеру наповнену нагрітим оксигенованим Кребсом та приєднували до тензометричного ємнісного сенсору одним кінцем (з початковим навантаженням 3 мН). Після встановлення смужки та налаштування обладнання крізь камеру проганяли чистий розчин Кребса впродовж 30 хв для нормалізації тканини, після чого починали експеримент з фармакологічними агентами. Міогенне скорочення стимулювали відтягуванням сенсора (що був приєднаний до мікроманіпулятора) кроком в 0,1 мм через 3,5 хв, чого вистачало

для розслаблення смужки на 90%. Під час експерименту тензометричний сенсор постійно передавав результати до перетворювача DigiData 1200 (Axon inst., США), з якого за допомогою програмного забезпечення pCLAMP 8.2 (Axon inst., США) дані реєструвались в реальному часі.

Стрес м'язової смужки визначали як залежність згенерованої сили (мН) на одиницю площі (мм²). Графіки будували на основі оригінальних записів від розтягнення смужки, що рахували як % подовження від початкового розслабленого стану (Δ подовження/початкову довжину).

2.5. Patch clamp

Для того, аби зафіксувати трансмембранні струми механочутливих іонних каналів було використано метод patch clamp в конфігурації “ціла клітина”. Для експерименту на пластикову кришку від 35 мм чашки Петрі наносили 100-200 мкл суспензії ізольованих клітин та витримували їх при 37 °С упродовж 5 хв після чого до них додавали 1мл зовнішнього розчину Тірде та дозволяли осісти наступні 30 хв за кімнатної температури. Осадження є критичною процедурою для успішного експерименту, оскільки клітини піддаються фізичному впливу (як власне сам patch clamp так і дія активаторів, зокрема механічною стимуляцією) та повинні бути зафіксовані до підложки. В разі вдалого ізолювання клітин та проведення “осадження” до підложки прикріплювалось від 20 до 40% клітин з суспензії.

Patch clamp проводився на електрофізіологічній установці, що складалась з електропідсилювача PC-ONE з аналогово-цифровим перетворювачем DigiData 1200 (Dagan instrument, США), камери фарадея з протівібраційним столом, на якому встановлений інвертований мікроскоп IX71 (Olympus, США), моторизованого мікроманіпулятора MP-225 (Sutter Instrument, США) та обладнання для активації – автоматична проточна аплікаційна система або установка для гідродинамічної стимуляції. Керування заданими протоколами,

збір та первинна обробка результатів проводилась на програмному забезпеченні Clampex 8.0 (Axon instruments, США).

Мікропіпетки для вимірювань виготовлялись зі скляних боросилікатних капілярів з отвором діаметром 0,86мм та стінками в 1,5 мм з вставленим внутрішнім філаментом (для зменшення поверхневого натягу) (WPI, США). Виготовлення піпеток відбувалось на пулері P-97, (Sutter Instrument, США). Мікропіпетки після виготовлення оброблялись на мікрокузні з розжареним платиновим дротом для згладження кінцівки та покращення фіксації клітин під час експерименту. Заповнені внутрішнім К-глюканантним розчином мікропіпетки мали опір 3-5 МΩ.

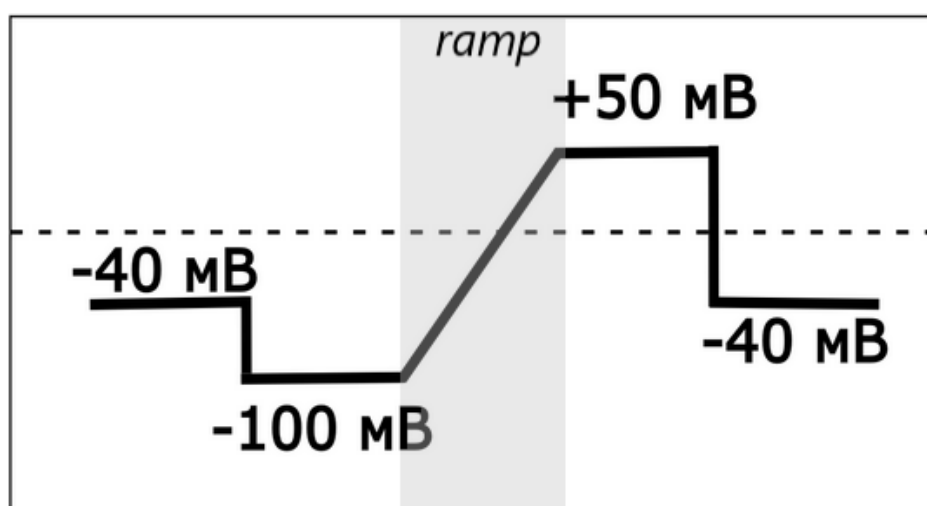


Рис. 2.2 Електрофізіологічний протокол стимуляції. “Рампа” дозволяє згенерувати вольт-амперну характеристику струмів під час пост-обробки.

Мембранні струми реєстрували у відповідь на електричну стимуляцію клітин (V_{com}) відповідним електрофізіологічним протоколом (рис. 2.2): підтримуючий потенціал -40 мВ фазовим переходом змінювався на імпульс з постійною гіперполяризацією -100 мВ впродовж 100 мс, після чого замінювався на лінійно наростаючу ділянку (ramp-ділянка) від -100 мВ до +50 мВ або +100 мВ впродовж 100 мс та кроком з постійною деполаризацією, рівною кінцевому значенню ramp-ділянки, що тривала 100 мс, після чого потенціал фазово повертався до підтримуючих значень. Загальна тривалість протоколу одного запису становила 400 мс з повтором кожні 3 с.

Перед початком експерименту під мікроскопом обирали придатну для роботи клітину. Головними чинниками відбору були: чиста, прозора цитоплазма, гострі краї мембрани, характерна морфологія клітини до експерименту (ГМК детрузора – видовжена, велика клітина, нейрон ДКГ – максимально округла клітина з відсутністю відростків) та гарна фіксація до підложки, що перевіряли легеньким постукуванням по предметному столу. Живі здорові клітини в мікроскопії з фазовим контрастом формують оптичне розсіяння світла навколо об’ємної клітини, тоді як пошкоджені або мертві мають тьмяну цитоплазму та відсутність “ареолу” (рис. 2.3).

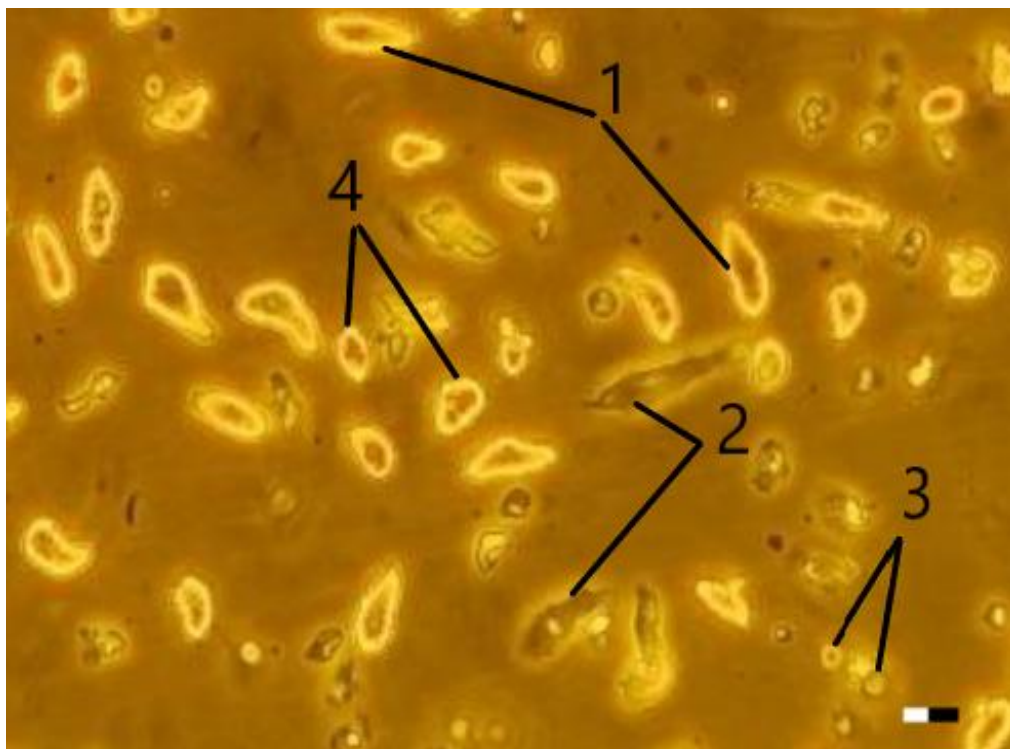


Рис. 2.3 Візуальна селекція клітин з суспензії для проведення електрофізіологічного експерименту. 1 – нормальна ГМК детрузора, що підходить для досліджень, 2 – мертві клітини, 3 – уротеліальна клітина, 4 – фрагменти ГМК детрузора, що втратили зовнішній матрикс під час виділення через ензиматичний та фізичний впливи. Мірна позначка = 10 мкм.

Процедура “фіксації” струму відбувалась наступним чином: заповнена внутрішнім фізіологічним розчином мікропіпетка одягалась на AgCl_2 вимірювальний мікроелектрод та занурювалась у зовнішній розчин Тіроде,

після чого проводили компенсацію дифузійного потенціалу на підсилювачі. Після підведення мікропіпетки до клітини та створення гігаомного контакту ($G\Omega$) проводилась ємнісна компенсація, а згодом після прориву клітинної мембрани, компенсація послідовного опору (R_s). Після цього проводили перевірку на нормальний фізіологічний стан клітини вимірюючи її струми спокою, та упевнившись у нормальності струмів та відсутності спонтанних флуктуацій переходили до проведення експериментів.

2.6. Реєстрація Ca^{2+} -залежних флуоресцентних сигналів

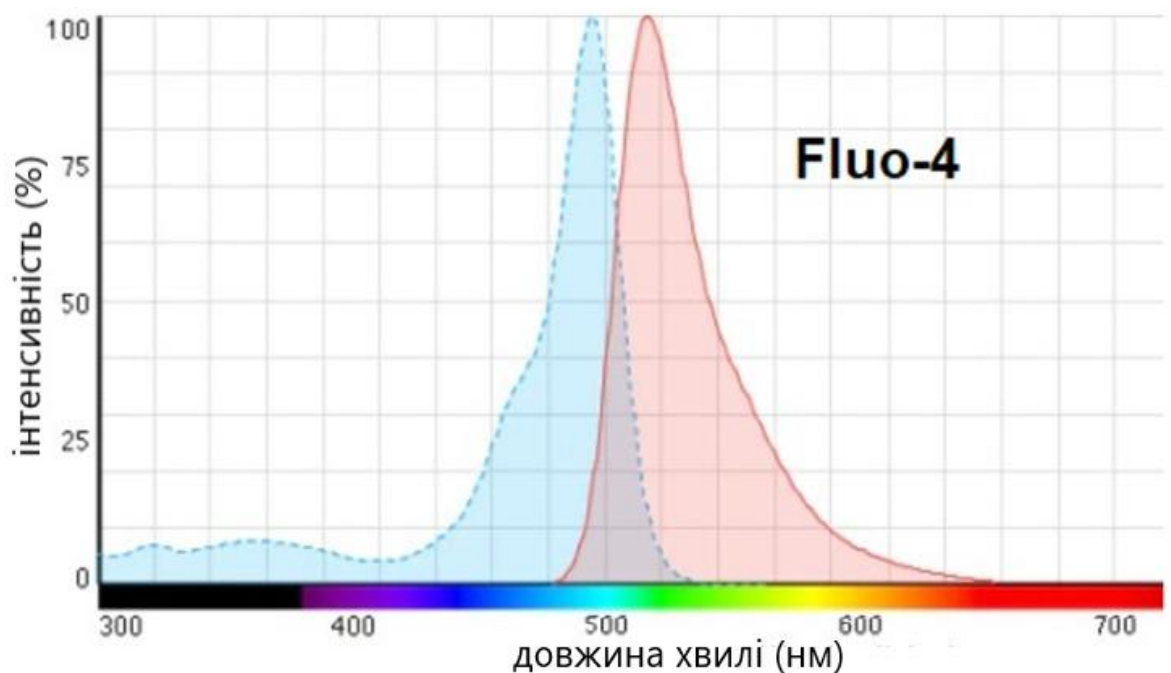


Рис. 2.4 Спектр поглинання та емісії кальційчутливого барвника Fluo-4 AM, адаптовано з [156].

Для реєстрації кальцієвого сигналу від активності Ca^{2+} -провідних каналів Piezo1 чи TRPV4 у відповідь на механічну стимуляцію та фармакологічні агоністи нами було використано метод кальцієвої візуалізації.

Для початку піддослідні клітини осаджували на покривні скельця, а не на пластикові чашки Петрі, оскільки даний метод фіксації активності клітин заснований на оптичному методі з залученням лазерного променя для активації

барвника, що вимагає використання матеріалу при проходженні крізь який промені світла в найменшій мірі будуть змінювати свій кут нахилу або затримуватись. Клітини осаджували за аналогічним протоколом, що описаний вище. Осадження перед фарбуванням клітин необхідне як через процеси зміни розчину під час фарбування, так і безпосередньо для експерименту.

Аби навантажити клітини Ca^{2+} -чутливим флуоресцентним барвником до осаджених клітин додавали 1 мкл стокового розчину кальцій-чутливого барвника Fluo-4AM (Thermo inc., США) до 1 мл зовнішнього розчину Тіроде (кінцева концентрація для фарбування становила 5 мкмоль/л), наносили на скельця з попередньо осадженими клітинами по 200 мкл та витримували 30 хв за кімнатної температури в повній темряві, аби запобігти передчасній стимуляції барвника та його вигоранню. Маркування “-AM” в назві барвника говорить про естерифікацію барвника, що надає йому можливість розчинятись в органічних розчинниках, тобто проникнення крізь ліпідну мембрану клітин. В цитоплазмі з “-AM” формою барвника взаємодіє з внутрішньоклітинна естераза, що унеможлиблює його вихід крізь ліпідну мембрану. Після цього барвник, що не завантажився в клітину відмивали свіжим розчином Тіроде 10 хв. Барвник має збудливість на 488 нм та пік свічення (емісії) на 505 нм (рис. 2.4). Процес фарбування барвником Fluo 3-AM (збудливість на 488 нм та пік емісії – 516 нм), який використовувався для експериментів з механічною стимуляцією, практично не відрізнявся від попереднього. Клітини витримували в розчині 5 мкмоль/л барвника впродовж 50 хв після чого відмивали так само – 10 хв.

Фарбований препарат з клітинами переносили до кальциметричної установки, що складається з конфокального комплексу LSM 5 PASCAL (Zeiss, Німеччина), інвертованого мікроскопа Axiovert 200M (Zeiss, Німеччина), імерсійного об'єктиву фірми Zeiss 40x (1,4 Ч.А.), лазерного сканеру LSM 510 (Zeiss, Oberkochen, Німеччина) та аргонного лазера (200 мВт) (Laser-Fertigung, Німеччина), з котрим працювали в умовах від 20 до 27 °С. Для реєстрації флуоресценції у відповідь на прикладання фармакологічних агентів

застосовували протокол зі зніманням кадру в межах 80-150 пікселів з часом експозиції 80-150 нс та оптичним розрізом в 5 мкм для отримання більш інтенсивного сигналу. Керування установкою та запис результатів проводили за допомогою програмного забезпечення для мікроскопа LSM 5 PASCAL.

2.7. Активація та вплив на роботу каналів

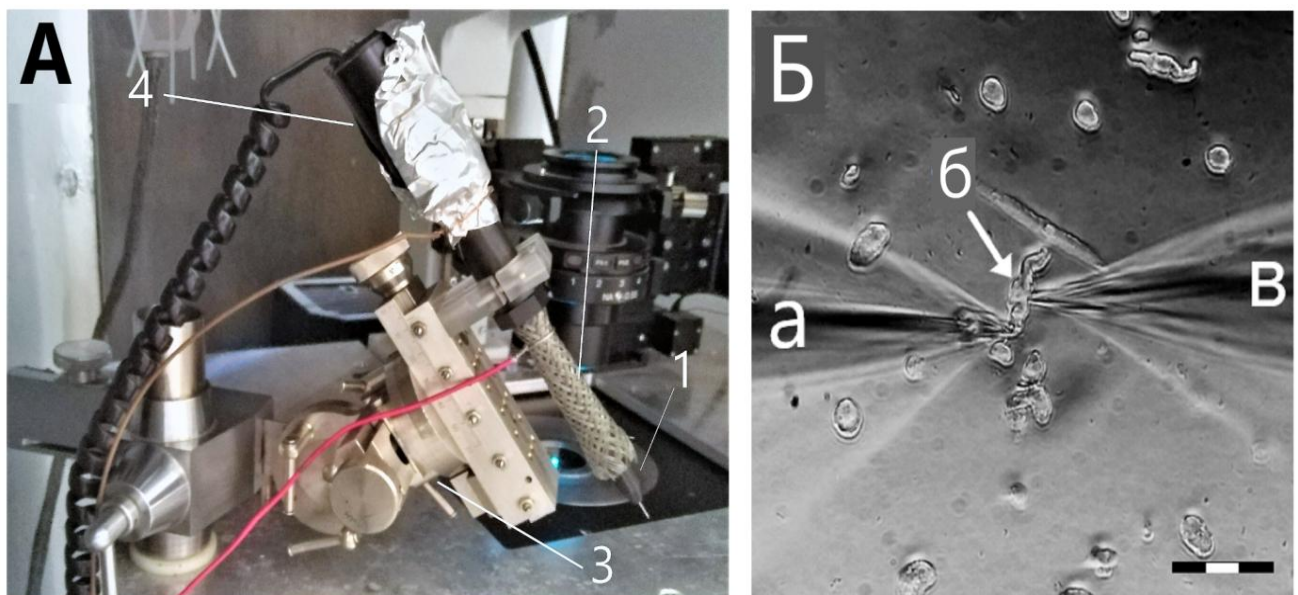


Рис. 2.5 Механічна активація каналів в ізольованих ГМК детрузора методом гідродинамічної стимуляції: *А* – нанолітровий мікроінжектор модифікований для механічної стимуляції (1 – поршень, 2 – заземлення, 3 – механічний мікроманіпулятор, 4 – інжектор); *Б* – процес механічної стимуляції під мікроскопом (збільшення 300X) (*а* – мікропіпетка з мікроінжектора, *б* – гладенький міоцит, *в* – мікропіпетка для фіксації струму). Розмірна позначка = 15 мкм.

2.7.1. Метод гідродинамічної стимуляції. Робота з механочутливими каналами вимагає підбору зручного та ефективного методу для стимуляції відкриття каналів. Спершу для цих цілей була випробувана аплікаційна система, котру використовували для внесення фармацевтичних засобів в роботах з іншими каналами. Система мала значний об'єм розчину та отвір 1 мм.

Цей спосіб був відкинутий через занадто великий об'єм потоку та відсутність достатнього струменя розчину, що був би направлений на клітину і міг зробити локальне викривлення мембрани для активації механочутливих каналів. Тож, для цих дослідів була сконструйована установка для генерації вузьких потужних струменів зовнішнього розчину, що створюватиме так звану гідродинамічну стимуляцію, яку в літературі називають "shear stress" (рис. 2.5).

За основу було взято адаптований мікроінжектор Drummond Nanoject I (LASER, США), котрий використовують для ін'єкції нанолітрових порцій розчинів з мРНК іонних каналів в ооцити жаби *Xenopus* та подальшої їх експресії та дослідження. На його поршневу систему, яка має діаметр 1 мм, вставлялась скляна мікропіпетка з модифікованим кінцем з діаметром в межах 10 мкм. Для експерименту піпетка наповнювалась зовнішнім розчином Тіроде з латексними кульками (5 мкм діаметром). Мікроманіпулятором піпетка підводилась до клітини на відстань 50-100 мкм та під час запису струмів подавалось 5-6 мікропорцій (25 мкл) розчину впродовж 5 секунд.

2.7.2. Механічна активація скляним зондом. Ще один використаний нами ефективний спосіб механічної стимуляції на ГМК детрузора був полягав у фізичному натиску скляним щупом. Ми проводили механічне подразнення клітини натисканням на мембрану скляною мікропіпеткою з запаяним ("тупим", англійською – blunt probe) кінчиком. Скляний зонд фіксували у просторі та рухали за допомогою автоматичного мікроманіпулятора, та кроком в 1 мкм просували мікропіпетку нижче, створюючи позитивний тиск на мембрану.

2.7.3. Застосування фармакологічних агентів. Застосування фармакологічних агентів відбулося через автоматизовану аплікаційну систему з магнітними електричними клапанами або безпосередньо лабораторною піпеткою з визначеним об'ємом у камеру з клітинами.

В 2008-му році був відкритий хімічний агоніст до каналу TRPV4 – бензотіофен-2-карбоксамін (GSK1016790A) з оптимальною концентрацією

активації 10^{-6} М [157]. GSK слабозчинний у воді, тож стоковий розчин доводили до 10^{-2} моль/л в диметилсульфоксиді (ДМСО) (Sigma inc., США) та зберігали за температури -20 °С. У експериментах з TRPV4 стоковий розчин розморожували та доводили до робочої концентрації у 10 мкмоль/л у зовнішньому розчині Тіроде.

Селективну активацію каналу Piezo1 стимулювали застосуванням молекули $2-(5-[(2,6\text{-Dichlorophenyl)methyl]sulfanyl})-1,3,4\text{-thiadiazol-2-yl} \text{ pyrazine}$, яку назвали «Yoda1» (Sigma inc., США). Стоковий розчин розводили в ДМСО (10^{-2} моль/л) та доводили в робочу концентрацію Yoda1 20 мкмоль/л безпосередньо перед експериментом. Концентрація ДМСО не перевищувала $0,02\%$.

Для роботи з каналом TREK-1 застосовували неселективний активатор K^+ -механочутливих каналів – 50 мкмоль/л арахідонової кислоти (АК) (стоковий розчин 10^{-1} моль/л в ДМСО, Merck inc., США) а також селективний інгібітор каналу TREK-1 – 10 мкмоль/л L-метіонін (стоковий розчин 10^{-2} моль/л в розчині Тіроде).

Для блокування каналів K_{ATP} до ГМК детрузора подавали розчин глібенкламід (Sigma inc., США). Робочий розчин (10 мкмоль/л) готували безпосередньо перед експериментом зі стокового розчину (10^{-2} моль/л).

В кальциметричних експериментах в якості позитивного контролю (аби фіксувати нормальний фізіологічний стан клітин, що не відповідали на інші селективні активатори) використовували розчин Карбахоліну (10 мкмоль/л) – синтетичного аналогу нейромедіатора Ацетилхоліну, що готували зі стокового розчину (10^{-2} моль/л у воді). Для позитивної активації нейронів, аби не спричиняти ексайтотоксичність використовували розчин кофеїну (50 мкмоль/л), що готували перед експериментом з сухої речовини розводячи у розчині Тіроде.

2.8. Екстракція мРНК, ПЛР зі зворотною транскрипцією та гель-електрофорез

Для визначення експресії мРНК у тканинах сечового міхура видалення органу та очистка відбувалась у максимально стерильних умовах в профільтрованому через 0,22 мкм фільтр розчині Тіроде та прожареними хірургічними інструментами.

Після очищення та розділення тканини одразу заморожували у рідкому азоті, а подальше виділення нуклеїнової кислоти проводилося за допомогою комерційного набору «Для виділення нуклеїнової кислоти з колонками», (ТОВ Біокорп, Україна). Тканину поміщали до «лізисного розчину» на основі гуанідин гідрохлориду в пропорції 100 мг тканини до 400 мкл буферу. Тканину вортексували та інкубували впродовж 15 хв за 72 °С. Після цього пробірку осаджували та доливали охолоджений (до -20 °С) «розчин для преципітації нуклеїнових кислот». Перемішану суміш наносили на колонку витримуючи 2 хв за кімнатної температури та центрифугували 1хв 10.000 грм. Для промивання в колонку заливали 600 мкл “буферу для промивання”, центрифугували 1хв 10.000 грм зливали рідину та висушували за допомогою центрифугування 3 хв за 14.500 грм. За допомогою 100 мкл «елюційного буферу» вимивали нуклеїнову кислоту з колонки заливши її на 3 хв при 72 °С. Концентрацію та чистоту отриманої нуклеїнової кислоти перевіряли за співвідношенням поглинання 260/280 та 260/230 нм спектрофотометром DS-11 (DeNovix, США).

Відповідність комплементарності до генів-ортологів саме *Rattus norvegicus* перевіряли за допомогою програмного забезпечення бази даних NCBI Gene – BLAST та NCBI – Primers. Для контролю експресії було використано ген гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (англійською – Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH), що використовується для перевірки якості проходження реакції та виділеної нуклеїнової кислоти [158]. Підібрані праймери визначали експресію механорецепторів KCNK2 (TREK-1),

TRPV4, Piezo1 та Piezo2 (Таблиця 1) були синтезовані під замовлення фірмою Metabion (Німеччина). Послідовності праймерів були отримані з фахової наукової літератури [159].

Таблиця 2.1

Послідовності праймерів для генів *Rattus norvegicus*

Ген	Праймер	Послідовність	Розмір продукту, нукл.
GAPDH	For	F – 5'-CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'	118
	Rev	R – 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'	
Piezo1	For	F – 5'-CGCAACCTCACGGGCTTC-3'	235
	Rev	R – 5'-GGGCCTCGCTCACTGTATCC-3'	
Piezo2	For	F – 5'-ACCGACCCCAATAGTTGCTT-3'	116
	Rev	R – 5'-GCATCCGTGAGAGGAAAAGA-3'	
TRPV4	For	F – 5'-TTTGCTCTTATTTCTACTCC-3'	84
	Rev	R – 5'-GCTGGCTTAGGTGACTCC-3'	
KCNK2 (TREK-1)	For	F – 5'-GTGGAGGAGACATTTATTAAGT-3'	93
	Rev	R – 5'-GAAGAGGAGACAGCCAAACA-3'	

Для проведення зворотної транскрипції та подальшої ампліфікації використовувався набір «Для однокрокової ПЛР» (ТОВ Біокорп, Україна) з Taq полімеразою та РНК-залежною ДНК-полімеразою. В ампліфікаційну пробірку додавали 5 мкл ТЕ буфера (Tris та Етилендіамінтетраоцтова кислота - EDTA), 5 мкл 4X ампліфікаційної суміші з ферментами та нуклеотидами, 5 мкл суміші праймерів (які розводили у деіонізованій воді до концентрації 10 пкмоль/л) та 5 мкл мРНК зразку. Ампліфікацію проводили за допомогою термоциклера CFX 96 (Bio-Rad, США) з протоколом, наведеним в Таблиці 2.

Зворотня транскрипція – синтез кДНК з матричної РНК згідно з інструкції виробника проводили за температури в 50 °С. Шляхом підбору

визначили, що 10 хв для синтезу кДНК з отриманих зразків було достатнім. Оскільки набір містив в собі Taq полімерази з гарячим стартом, суміш потрібно було прогрівати за 95 °С впродовж 10 хв інакше фермент залишиться в інактивованому стані, що унеможливило проведення ПЛР. Далі стадія циклічної полімеризації зі звичайними умовами, кроком в 95 °С для розгортання ниток ДНК, 62 °С для анелінгу праймерів (середня оптимальна температура для всіх праймерів, що підбиралась за ГЦ складом та мінімальною можливістю до формування димерів) та стадія 72 °С впродовж 30 сек для нарощення ланцюгу ДНК.

Таблиця 2.2

Протокол однокрокової ампліфікації зі зворотною транскрипцією

Стадія 1 – зворотна транскрипція	50 °С	10 хв
Стадія 2 – гарячий старт полімерази	95 °С	10 хв
Стадія 3 – ампліфікація цільової послідовності; 40 циклів	95 °С	10 сек
	62 °С	20 сек
	72 °С	30 сек

Результат ампліфікації перевіряли за допомогою агарозного гел-електрофорезу. Для цього готували 1,5% агарозний гель – розведенням 1.5 г агарози (Sigma, США) у 100 мл 1x TBE буферу (Tris/Borate/EDTA) (Sigma, США), розігрівали до 80 °С та після охолодження до 60 °С додавали розчин етидій броміду (Sigma, США) та заливали у форму для гелю зі вставленою гребінкою для формування лунок. Через 20 хв застиглий розчин поміщали у електрофорезну ванну заповнену 1x TBE буфером та вносили в лунки 9 мкл зразків з ПЛР з додаванням 1 мкл 10X буферу нанесення (10 % гліцерин, 50 mM EDTA, 20 mM Tris, 0,05 % бромфенол синій). Зразки піддавали дії постійного струму з фіксованою напругою в 220 В протягом 20 хв. Результат

електрофорезу визначали за допомогою ультрафіолетового транслюмінатора оскільки етидій бромід (що зв'язується з 2-х нитковою ДНК та може бути канцерогеном, що вимагає особливої уваги під час роботи) флуоресцює у разі наявності ДНК в гелі. Для визначення розмірів ампліконів в окрему лунку додавали маркер для ДНК з розмірами від 100 до 1000 пар нуклеотидів (10 маркерів з кроком в 100 пар) (Thermo, США).

2.9. Імуноцитохімія

Окрім визначення експресії мРНК генів інтересу для збільшення доказової бази ідентифікували наявність відповідних білків у ГМК детрузора та контрольних за допомогою специфічної реакції антиген-антитіло. Процедура проходила наступним чином: Ізольовані ГМК осаджували на предметні скельця протягом години за кімнатної температури, після чого скельця промивали розчином фосфатного буфера (PBS) з концентрацією 0,1 моль/л 10 хв. Далі клітини інкубували в PBS з 1% альбуміну (BSA) задля того, аби заблокувати неспецифічні сайти зв'язування.

Наступним кроком було фарбування клітинної мембрани за допомогою маркера Cholera toxin subunit B FITC 488 conjugate (Molecular Probes, в концентрації 1:2000). Для цього змінювали розчин PBS та заливали клітини розчиненим в буфері маркером і інкубували протягом 30 хв в темряві. Перед прикладанням наступного антитіла препарати тричі промивали по 10 хв розчином PBS та пермібіалізували мембрану (оскільки холерний токсин наносили без пермібіалізації, оскільки він зв'язується з усіма біліпідними мембранами). Клітини витримували 4 години в розчині PBS з 0.3% Triton X-100 та 5% козячої сироватки. Первинні антитіла (Invitrogen, США) до механочутливих каналів розводили у цьому ж розчині та прикладали до препаратів з концентрацією 1:100 протягом 24-х годин за +4°C в темряві. Після інкубування з первинним антитілом препарати тричі промивали по 10 хв розчином PBS. Перед фарбуванням вторинними антитілами препарат знову

інкубували за кімнатної температури з 5% козячої сироватки PBS. Вторинне антитіло, що було використане для препаратів Alexa Fluor® 647 (Invitrogen, США; goat anti-rabbit, 1:1000) прикладали протягом двох годин, після чого відмивали аналогічно з попереднім разом – тричі по 10 хв розчином PBS.

Таблиця 2.3

Білок-специфічні антитіла до *Rattus norvegicus*

об'єкт	походження	барвник	таргетний об'єкт
Біліпідна мембрана	Холерний токсин, субодиниця Б	FITC 488	гангліозид G _{M1}
первинне до Piezo1	Кролик, поліклональне IgG	–	PIEZO1, між 2230-2420 а.к. (людина, миша, щур)
первинне до Piezo2	Кролик, поліклональне IgG	–	PIEZO2 білок, між 1600-1650 а.к. (людина, миша, щур)
первинне до TRPV4	Кролик, поліклональне IgG	–	Середина TRPV4 (людина, щур)
вторинне антитіло	Коза	Alexa Fluor® 647	анти-кролик

Для покривання препаратів та можливості проведення конфокальної мікроскопії на готові предметні скельця з клітинами висушували та додавали розплавлений покривний розчин на основі полівінілу (Sigma, США). Завдяки цьому розчину препарат може зберігатись протягом великого проміжку часу та без вигорання фарби під час мікроскопії.

2.10. Фізіологічні розчини

2.10.1. Глутаматний безкальцієвий розчин. Для зберігання живих клітин після виділення, необхідні сольові розчини, що мають склад, подібний до складу тканинної рідини, осмолярність на рівні ~300 мОсм та рН 7.4. Однак,

високий вміст Ca^{2+} (на фізіологічному рівні близько 2 ммоль/л) може запустити активацію прокаспази 12 [160] й призвести до апоптичної загибелі клітин в процесі ізолювання. Таким чином розчин без іонів Ca^{2+} з додаванням глутамату натрію, що також має цитопротекторні властивості для м'язових клітин є найбільш оптимальним для роботи з гостроізолюваним СМ. Усі реагенти були від Sigma (США). В усіх експериментах для приготування буферів та розчинів використовували деіонізовану воду з опором понад 16 МΩ/см. Для без кальцієвого глутаматного розчину у відповідний об'єм деіонізованої води додавали наступний склад солей (в ммоль/л): 80 NaCl, 40 Na-глутамату, 5 KCl, 10 HEPES, 10 D-глюкози. Доводили необхідне значення рН до 7.35 за допомогою NaOH (контролювали рН-метром WTW, Німеччина). Кінчна осмотичність за розрахунками становила ~ 290 мОсм. Для виділення нейронів використовували безкальцієвий розчин без додавання Na-глутамату з заміщенням його на NaCl, оскільки він викликає ексайтотоксичність у нервовій тканині.

2.10.2. Зовнішній розчин Тіроде. Зовнішній розчин Тіроде є типовим аналогом розчину Рінгера, котрий має покращений рН буфер. Розчин мав наступний склад (в ммоль/л): 135 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 HEPES, 5 D-глюкози. рН доводили за допомогою NaOH до 7.35, а осмолярність розчину становила ~ 304 мОсм. Для успішності patch clamp експериментів в конфігурації “ціла клітина” осмотичність зовнішнього розчину повинна бути більше за внутрішній приблизно на 20 мОсм.

В експериментах з блокуванням K^+ -провідних струмів в звичайному Тіроде заміщували 5 ммоль/л KCl на 5 ммоль/л CsCl через його здатність зв'язуватись з активними центрами більшості K^+ каналів.

Для експериментів з підвищеними струмами кальцієвих каналів в зовнішній розчин замість 2 ммоль/л CaCl_2 додавали 10 ммоль/л BaCl_2 , оскільки він має вищу провідність через потенціалкеровані Кальцієві канали та не має властивості вторинного месенджера до апоптозу [161].

2.10.3. Внутрішній розчин для patch clamp. Для patch clamp в конфігурації "ціла клітина" використовують розчин за складом та фізико-хімічними властивостями подібний до рідкої фази цитоплазми клітини. Наважки відповідних реактивів повинні бути максимально точно відмірені, оскільки найменші похибки впливають на осмолярність розчину, що призводить до виникнення артефактів та осмотичного шоку під час електрофізіологічних досліджень. Розчин мав наступний склад (в ммоль/л): 8 EGTA, 20 KCl, 108 K-глюканат, 10 HEPES, 5 CaCl₂, 1 MgCl₂ та 1 Mg-АТР. Після приготування доводили рН до 7.35 за допомогою КОН, а кінцева розрахована осмотичність становила ~ 294 мОсм. Розчин аліквотували по 1,5 мл в пластикові мікропробірки та заморожували за -20 °С. Розчин вимагає зберігання на льоду під час роботи оскільки Mg-АТР є чутливим до плюсових температур.

Для блокування K⁺-провідних струмів K-глюканатний внутрішній розчин замінювали на CsCl розчин з наступним складом (в ммоль/л): 8 EGTA, 115 CsCl, 10 HEPES, 5 CaCl₂, 1 MgCl₂ та 1 Mg-АТР. рН доводили за допомогою CsOH до 7.35.

В експериментах з активацією АТР-чутливих K⁺-провідних каналів застосовували внутрішньопіпетковий розчин з Відсутністю солей АТР з наступним складом (в ммоль/л): 5 EGTA, 140 KCl, 10 HEPES, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂. рН доводили за допомогою КОН до 7.35. Кінцева розрахована осмотичність розчину становила ~ 307 мОсм.

2.10.4. Розчин Кребса. В експериментах з цистометрією цілих СМ для роботи застосовували фізіологічний розчин Кребса. Розчин мав наступний склад (в ммоль/л): 120.4 NaCl, 5.9 KCl, 1.8 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 15.5 NaHCO₃, 11.5 D-глюкози. рН доводили за допомогою NaOH до 7.4. Перед експериментом розчин підігрівався та насичувався киснем (за допомогою карбогену – 95% O₂, 5% CO₂).

2.11. Статистичні методи

Аналіз та графічне представлення результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Clampex 9.0, Origin 8.5. Електрофізіологічні графіки наводили як середнє значення за 5 секунд. Величини зазначали як середнє \pm стандартна похибка середнього (SEM). Для експериментів з визначенням кальцієвих сигналів F/F_0 рахували як середнє пікове значення під час прикладання агенту порівнювали з передуючим «нульовим» значенням для кожної аплікації окремо. Діаграми “бокси”, що відображали усереднення значень, розкид та кілька додаткових параметрів (медіану, віддалені дані – «аутлаери») виводили за допомогою усереднення необроблених оригінальних даних за певного відрізка часу (25 мс) після чого виводили середнє арифметичне по групі та рахували стандартну похибку середнього. Порівняння груп проводили за допомогою Т-тесту Вельша у випадку неоднакової кількості даних у вибірці. Нормальність в цьому випадку розподілу не визначали, оскільки було показано, що цей тест може використовуватись без втрати ефективності для ненормальних вибірок, так само, як і для нормальних за кількістю значень [162]. Для вибірок, в яких Т-тест Вельша не давав очікуваних результатів застосовували парний Т-тест Вілксона, що підходить для роботи з вибірками, що мають аутлаери. Для обрахунків використовували мову програмування R (версії 2023.03).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Ізольований сечовий міхур проявляє дві механочутливі динаміки при наповненні

Сечовий міхур являється м'язистим мішком з еластичними стінками. Для дослідження не пов'язаних з ЦНС процесів саморегуляції СМ орган ізолюють від модельного організму, перерізаючи усі висхідні та низхідні нервові зв'язки або виділяють загалом. Аби підтвердити тезу щодо існування самостійних механочутливих рефлексів у СМ та зв'язок з механочутливими іонними каналами ми провели цистометричні вимірювання зміни тиску в СМ під час наповнення. Отримані нами результати співпадають з описаними в літературі [10,155] та вказують на існування 2-х відмінних типів не пов'язаної з нейрональною активністю механочутливих реакцій на механічне подразнення (тиск). Під час першого типу реакції стінки СМ розтягуються без збільшення тиску, після якого починається другий тип – подальше збільшення об'єму пов'язане зі збільшенням тиску (рис. 3.1). Аби візуалізувати наявність піддатливості СМ під час наповнення ми взяли першу похідну з оригінальних записів, де наявність “полочки” – уповільнення росту тиску при збільшенні об'єму стає більш очевидною (рис. 3.1, В). Тут ми спостерігаємо не просто за опором стінки СМ (пружністю), а за роботою м'язової тканини, яка розслабляється за низького механічного впливу, а у разі збільшення сили – чинить більший опір. Подібна реакція може бути пов'язана з активністю механочутливих іонних каналів безпосередньо в тканинах СМ (оскільки ми працювали з ізольованим органом).

Тензометрія зі смужкою детрузора, механічно очищеного від уротеліального шару, дає змогу встановити принципи саморегулювання гладеньком'язового шару без участі уротеліального сигналювання. За допомогою тензометрії та інгібування механочутливих іонних каналів

прикладанням іону Gd^{3+} (який використовують в якості інгібітора механочутливих іонних каналів, що в більшості чутливі до нього через вплив на біліпідну мембрану поблизу каналу [163–165]) ми побачили практично повну втрату відповіді у вигляді скорочення у відповідь на розтягнення (рис. 3.1, Г). Отже, з цього можна зробити висновок, що здатність м'яза чинити опір у відповідь на розтягнення залежить в більшій мірі від механочутливих іонних каналів ніж від фізичних властивостей тканини (тобто від пасивних властивостей матеріалу).

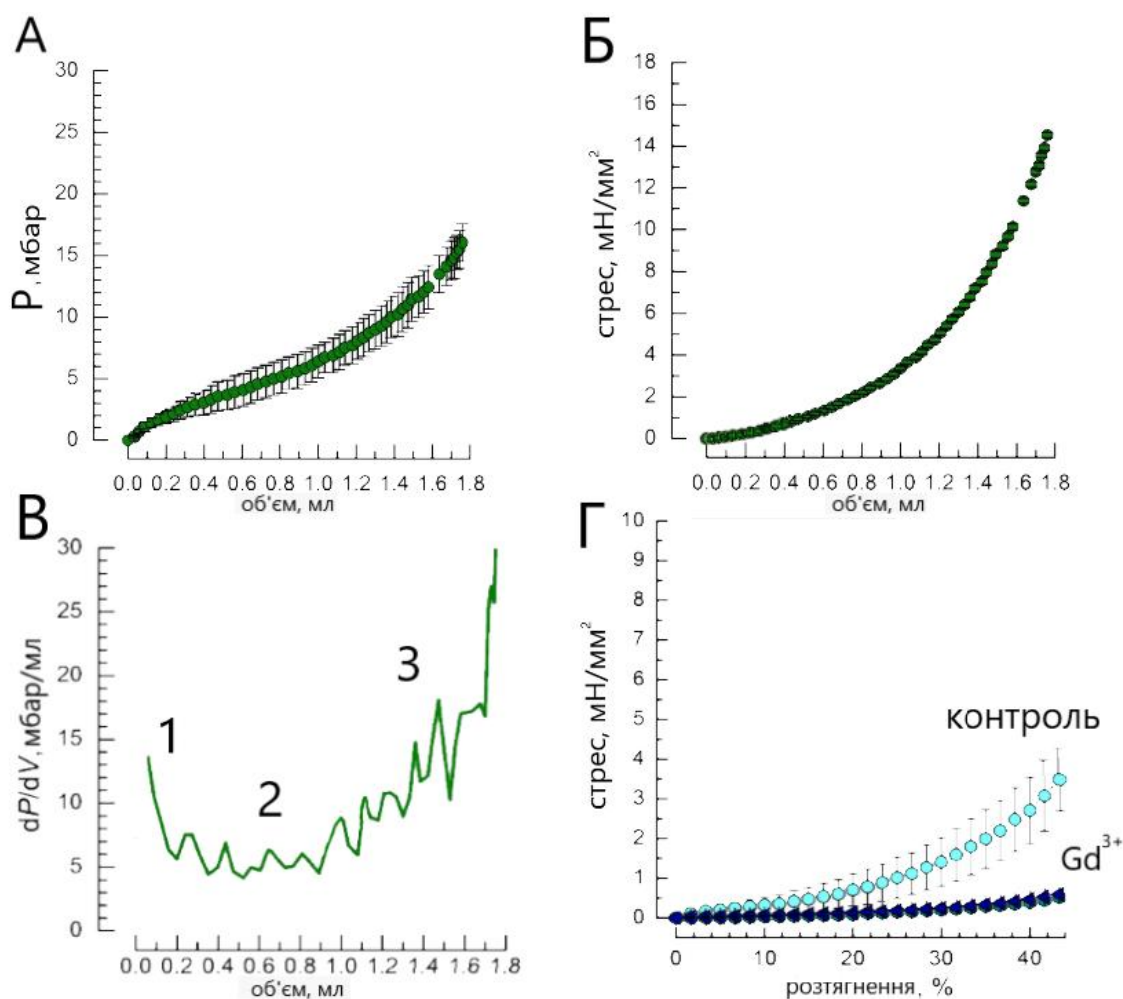


Рис. 3.1 Піддатливість стінки ізолюваного СМ під час заповнення пов'язане з механочутливими каналами: **А.** Оригінальні цистометричні вимірювання на наповнення; **Б.** Зміна напруженості стінки СМ; **В.** перша похідна оригінальних результатів цистометрії СМ, де 1 – початок наповнення, 2 – плато (розслаблення стінок без зміни тиску), 3 – зростання тиску через механічний опір стінок СМ; **Г.** зміна напруження очищеної від уротелію

смужки детрузора при розтягненні за контрольного експерименту та під час блокування механочутливих іонних каналів іонами гадолінію ($3 \times 10^{-5} \text{ M Gd}^{3+}$).

Вищезгадані результати були опубліковані в праці за номером 1.

3.2. Експресія механочутливих каналів TREK-1, TRPV4 та Piezo1 у тканинах сечового міхура

Встановлення типів каналів, що є механорецепторами в СМ, дозволить краще розуміти принципи регуляції роботи органу та встановити потенційний об'єкт для лікування розладів. Для початку варто ідентифікувати які саме механочутливі канали є у СМ, та в яких тканинах вони експресуються. Для цього ми визначали експресію мРНК найбільш поширених у СМ механочутливих каналів методом ПЛР зі зворотною транскрипцією та поширення специфічної імунної реакції поліклональних антитіл до білків іонних каналів.

3.2.1. Дослідження експресії механочутливих каналів методом ПЛР зі зворотною транскрипцією. Анатомія СМ включає в себе три основні структурні одиниці, аналогічні до будови судин, що можуть бути легко ідентифіковані гістологічно, та нервову тканину. Першим є уротеліальний шар, котрий вистилає внутрішню порожнину органа і виконує як бар'єрну, так і чутливу функції [79]. Другим, найтовщим шаром стінки СМ є м'язовий шар (детрузор), що виконує роль основного ефектора, третій шар – адвентицій. Нервова тканина, представлена аферентними або еферентними волокнами від різних центрів спинного мозку [5].

Ми досліджували експресію механочутливих каналів на 2-х головних тканинах: уротелії та детрузорі.

Напівкількісний аналіз (за допомогою програмного забезпечення ImageJ) отриманих результатів ПЛР зі зворотною транскрипцією показав, що TREK-1

експресується в детрузорі в 2,5 рази менше, у порівнянні з контрольним геном домашнього господарства *gapdh* [7]. Крім нього, в детрузорі експресуються кілька Ca^{2+} -провідних механочутливих іонних каналів, Piezo1, Piezo2 та TRPV4 (рис. 3.2), про які згадують в літературі, однак вони не показані функціонально на клітинному рівні [11,125].

Уротеліальний шар, в свою чергу має у 2.4 рази вищу експресію Ca^{2+} -провідних каналів в порівнянні з детрузором (для амплікону Piezo1), якщо використовувати напівкількісну методику порівняння інтенсивності ампліконів. Присутність амплікону TREK-1 в уротеліальному зразку на незначному рівні (оцінюючи інтенсивність яскравості ампліконів – у 2.1 рази менше в порівнянні з детрузором) може бути пояснена гладеньком'язовими клітинами з *muscularis mucosae*, які анатомічно розташовані під уротелієм [166].

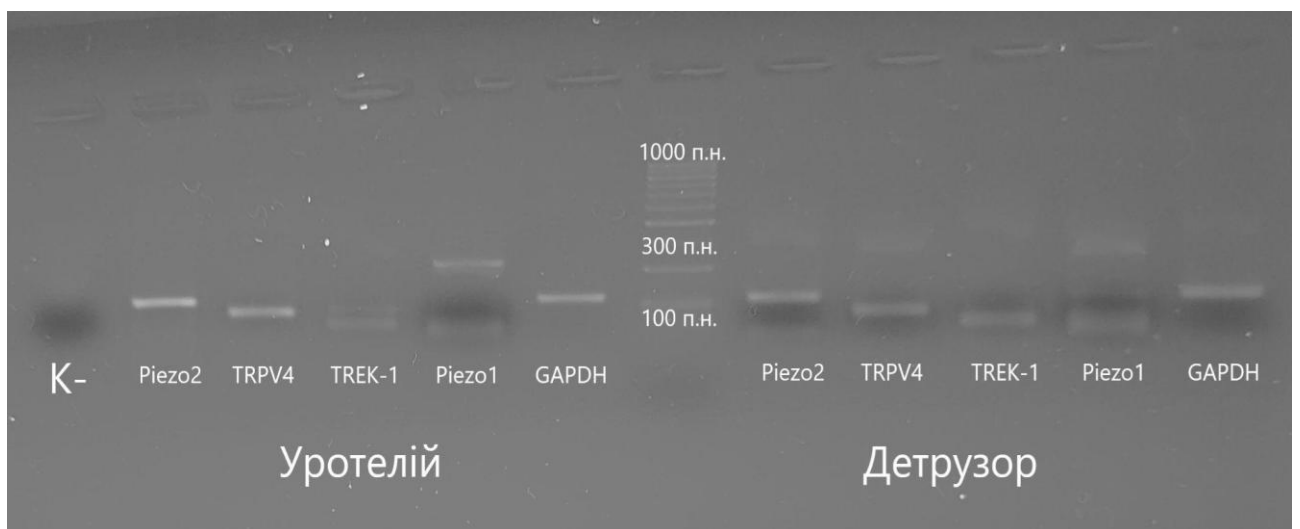


Рис. 3.2 Гель-електрофорез продуктів ПЛР експресії мРНК механочутливих каналів *piezo1 trpv4*, *piezo2*, *trek-1* та гену домашнього господарства – *gapdh* (в якості референсу) у зразках уротелію та детрузора. Шкала вказує на розмір ДНК зразку, крок = 100 пар нуклеотидів. Очікувані розміри ПЛР-продуктів зазначені в табл. 2.1.

Низький рівень експресії Piezo1, Piezo2 та TRPV4 в детрузорі загалом узгоджується з загальноприйнятою тезою, що м'язові тканини є ефекторами в

першу чергу, та не мають рецепторів, крім тих, що залучені до саморегуляції [68]. Кореляція між експресією мРНК та присутністю конформаційно правильного і функціонального білку не завжди існує, що вимагає вивчення наявності білкового продукту [167].

Експресію каналу Piezo2 більшість досліджень схильні пов'язувати з нервовою тканиною, як в сомах у мозку так і в периферичних аферентних волокнах (нервові закінчення у шкірі, тільця Меркеля, ендотелій) [146], тож не дивно, що в СМ саме в уротеліальних клітинах його рівень вищий в порівнянні з детрузором. Проте, у різних роботах висновки про функціональну роль Piezo2 у СМ можуть бути діаметрально протилежними. В одних роботах зазначають про провідну роль у сигналюванні між уротелієм та детрузором, тоді як в інших – навпаки [129]. Останні скринінгові дослідження вказують на те, що Piezo2 може експресуватись і у детрузорі сечового міхура на середньому рівні [168], що зрештою узгоджується з нашими результатами.

Оскільки канал TRPV4 було відкрито значно раніше за канали Piezo, його експресію досліджено ретельніше. У СМ найчастіше TRPV4 асоціюють з уротеліальним шаром, де було показано на клітинному рівні як TRPV4-специфічні струми так і виділення в позаклітинний простір молекул АТР у відповідь на активацію каналу [133]. Нервові аферентні волокна СМ також мають TRPV4, однак кілька робіт продемонстрували нейрон-незалежну роботу TRPV4 у СМ [10]. Окрім уротелію, експресія TRPV4 поширена і в нижчих шарах, наприклад в *lamina propria*, де аналогічно з уротелієм спостерігається вивільнення АТР внаслідок активації каналу [133]. Але також канал було показано і у м'язовому шарі за допомогою селективних антитіл та флуоресцентної мікроскопії [124]. Проте, принаймні на мишах, дослідили, що TRPV4 функціонує у ICC-клітинах але не у ГМК детрузора [169]. Наші результати з ПЛР свідчать, що TRPV4 в уротелії експресується на дуже високому рівні в порівнянні з контролем, тоді як в детрузорі його рівень є нижчим.

У роботі [88] на клітинній культурі первинних уротеліоцитів продемонстрували Piezo1-залежне вивільнення АТР у позаклітинний простір при механічній стимуляції. Крім уротелію, рівень експресії в якому є вищим в порівнянні з ГМК [11], Piezo1 показано в ІСС (методом ПЛР, та зареєстровано трансмембранні струми I_{piezo1} [51]). В детрузорі канал показано лише молекулярно-біологічними методами (ПЛР та імуногістохімією), тоді як остаточного підтвердження з функціональними відповідями у клітинах ГМК досі немає [11]. Це власне і було причиною подальших канал специфічних досліджень саме Piezo1, адже у ГМК судин, до прикладу, функціональну активність Piezo1 було показано [170]. Наші результати демонструють, що Piezo1 в уротелії значною мірою більше експресується в порівнянні з детрузором, що, втім не заперечує його потенційну роль у автономній механочутливості детрузора та наявності функціонуючого каналу.

Для додаткового підтвердження експресії механочутливих каналів було проведено імуно-специфічну реакцію з антитілами на ізольованих ГМК.

3.2.2. Імуноцитохімічні докази присутності механочутливих каналів в гладеньком'язових клітинах детрузора. Імуноцитохімія на відміну від гістохімії дає змогу з високою впевненістю спостерігати високо специфічну реакцію антиген-антитіло для конкретних білків в конкретному типі клітин. Оскільки щодо наявності функціонуючого TREK-1 в ГМК сумнівів у дослідників наразі немає, ми сконцентрувались на дослідженні експресії інших механочутливих каналів. В наших зразках спостерігати присутність TRPV4 та Piezo1 як в ГМК, так і в уротеліоцитах (рис. 3.3.).

Оцінюючи отримані конфокальні флуоресцентні зображення можемо помітити, що вторинне антитіло (червоний флюорофор – Alexa Fluor 647), яке зв'язується з первинним антитілом до Piezo1, концентрується поруч з холерним токсином, що зв'язався з мембраною (зелений флюорофор – FITC 488). Це може вказувати на розташування білку безпосередньо у плазмалемі. У випадку ж з

Piezo2 антитіла зв'язались з уротеліоцитами, тоді як в ГМК детрузора повністю відсутня реакція.

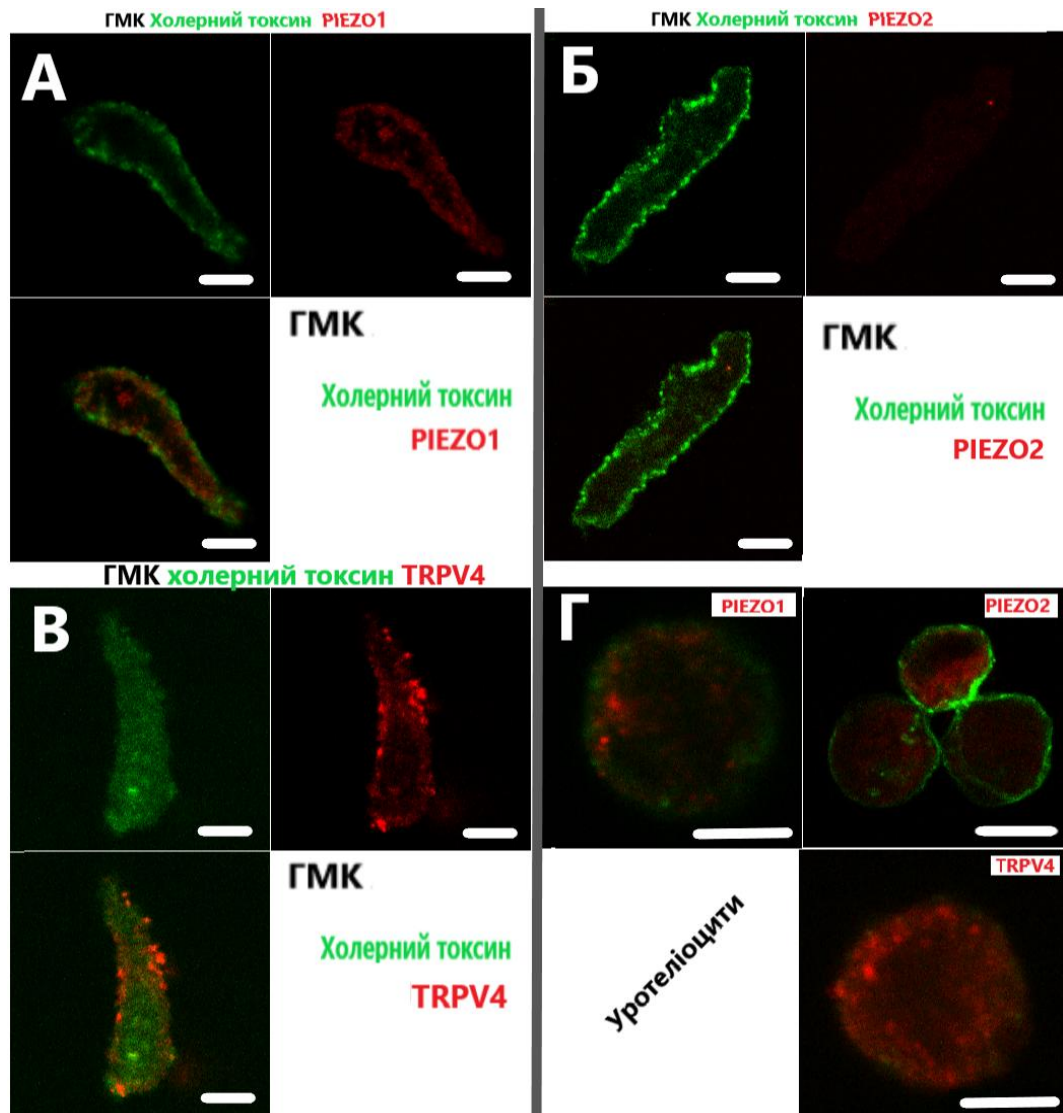


Рис. 3.3 Імуногістохімія ГМК детрузора та уротеліоцитів з антитілами до механочутливих каналів: А – ГМК з Piezo1, зеленим – мембрана, червоним – антитіло до Piezo1, накладене зображення; Б – ГМК з Piezo2; В – ГМК з TRPV4; Г – уротеліоцити з відповідними антитілами. Розмірна позначка – 5 мкм.

Однак метод імуноцитохімії не завжди є надійним доказом щодо наявності функціонального білку та може давати хибнопозитивні результати через поліклональність антитіл [171], що застосовувались та високу подібність між білками родини TRP. Тож, для збільшення доказової бази та визначення

ролі конкретного каналу у регуляції роботи клітини необхідно фіксувати функціональні зміни стану в клітинах, як то рівень сигнальних молекул (наприклад іонів Ca) або ж трансмембранні струми.

Вищезгадані результати були опубліковані в праці за номером 4.

3.3. Механочутливість гладеньком'язових клітин детрузора

Автономна механочутливість м'язів є важливим механізмом, що має на меті забезпечення безпечної роботи органу та адекватного реагування на фізичні впливи. Для запобігання незворотного виснаження або фізичного пошкодження м'язи мають запобіжні механізми, що реагують на надмірність скорочення (що забезпечується механізмами пропріорецепції) або ж зупинку скорочення задля функціональної дії органу. Аби пояснити останнє, можна навести приклад серцевого м'язу: закон Франка-Старлінга, який полягає в тому, що під час збільшення об'єму крові волокна розтягуються, а м'язи збільшують силу скорочення, що дозволяє органу перекачувати більший об'єм крові з однаковим тиском [172].

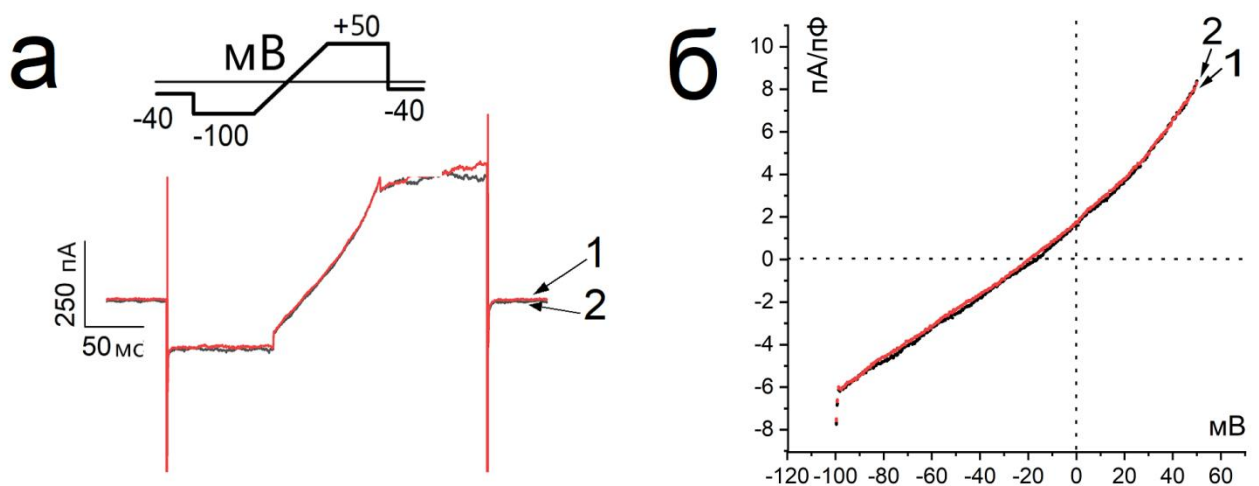


Рис. 3.4. Мембранні струми в ГМК детрузора першої групи під час гідродинамічної стимуляції. а – репрезентативні струми 1-ї групи за механочутливістю ГМК детрузора, котра була нечутлива до гідродинамічної стимуляції (1 – без стимуляції, 2 – струм під час стимуляції), протокол

командного потенціалу з рампою під час гідродинамічної активації зазначений згори, б – ВАХ групи нечутливих ГМК детрузора під час гідродинамічної стимуляції.

Цей механізм дозволяє серцю заповнюватись більшим об'ємом крові та, завдяки атріовентрикулярним клапанам (тристулковому та двостулковому), проштовхувати кров далі по серцево-судинній системі. Щось подібне відбувається і у СМ, хоч і в значно повільніших часових рамках: під час наповнення і незначного збільшення тиску детрузор розслабляється та дає змогу СМ наповнитись, але досягнувши певним значенням тиску – механічна стимуляція змушує м'яз скорочуватись, таким чином стримуючи подальше розтягнення. Як вже згадувалось раніше, в СМ механочутливі канали експресуються у всіх тканинах органу, однак, механізми функціонування механочутливості та канали, що беруть участь в цьому процесі не були до кінця вивченими.

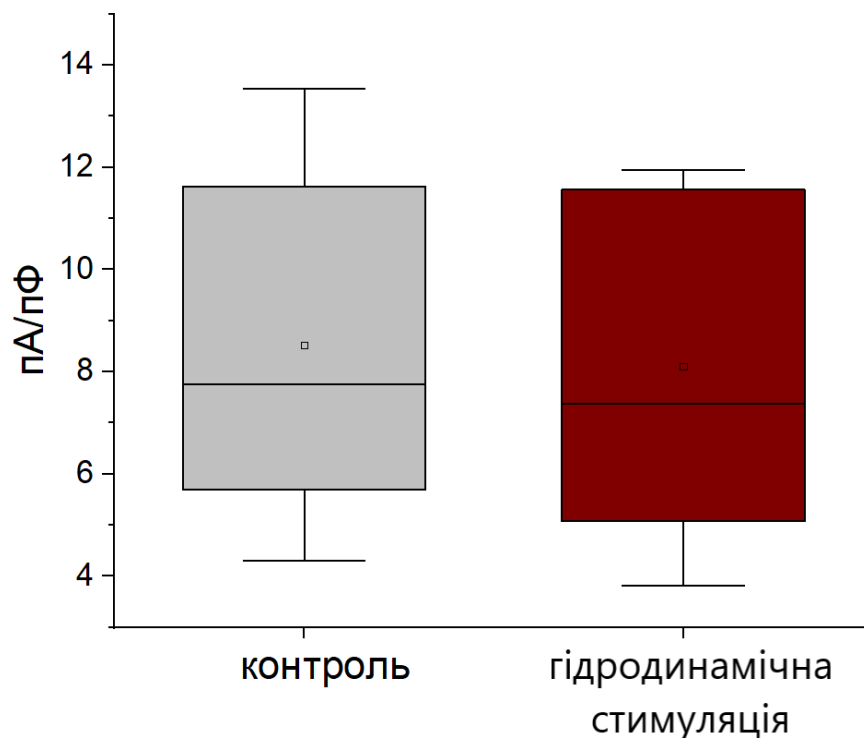


Рис. 3.5 Порівняння щільності контрольного струму та струму під час гідродинамічної стимуляції за позитивного командного потенціалу (V_{com}) (1 група), $p = 0,82$ за допомогою T -тесту Вельша ($n=27$).

Аби дослідити механочутливі струми в детрузорі ми провели ряд експериментів на ізольованих ГМК детрузора з гідродинамічною стимуляцією. В результаті дослідження нами було виявлено, що ГМК не мають уніфікованої механостимульованої провідності. Ми отримали різні варіанти струмів на механічну активацію, які виокремили в 3 окремі групи.

Так, з 49 досліджених клітин 27 виявились нечутливими до гідродинамічної стимуляції, та не проявляли жодних змін провідності мембрани (рис. 3.4). Порівняння контрольного струму та струму під час гідродинамічної стимуляції провідностей за позитивного потенціалу показало відсутність статистичної відмінності за Т-тестом Вельша (рис. 3.5). При цьому усі досліджені клітини демонстрували нормальні струми спокою з щільністю в межах 8 – 19 пА/пФ, та потенціалом спокою біля -50 мВ. Також, характерною ознакою “здорової” клітини були швидкі флуктуації амплітуди вихідного струму за позитивного потенціалу в межах 50-200 пА, що виникають за рахунок одноканальної активації кальційчутливих калієвих каналів (K_{Ca}) великої провідності, котрі генерують надзвичайно великий струм з одного каналу (BK-канал) [173–175] та відіграють важливу роль у Ca^{2+} -залежній регуляції потенціалу в ГМК детрузора [74].

Але в записах з другої групи (n=13) ГМК проявляли відтворювану чутливість до гідродинамічної стимуляції, що виражалась активацією струмів, які характеризувались вихідним напрямком при командному потенціалі (V_{com}) +50 мВ та вхідним напрямком за V_{com} -100 мВ з максимальною амплітудою в 150-200 пА та усередненою щільністю в $3,19 \pm 1,10$ пА/пФ при V_{com} +50 мВ (рис. 3.6). Подібні струми характерні для неселективних каналів, як наприклад у каналів родини TRP або ж Piezo, про струми яких в ГМК детрузора наразі нічого не відомо, хоч і багато досліджень демонструють суперечливі дані щодо експресії каналів цих родин в детрузорі.

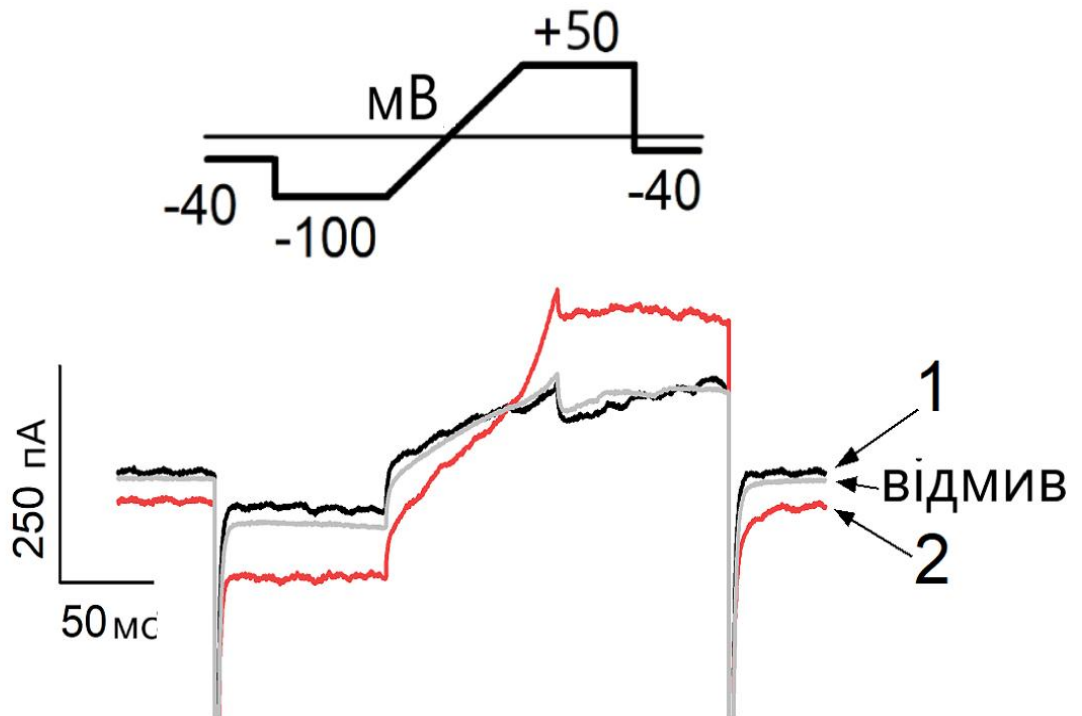


Рис. 3.6 Репрезентативні струми 2-ї групи ГМК детрузора під час механічної стимуляції з активацією струмів за негативного і позитивного V_{com} (1 – струм до активації, 2 – відповідь на гідродинамічну стимуляцію, відмив – відновлений струм після активації).

На основі рампового протоколу з деполяризацією клітини з -100мВ до $+50\text{мВ}$ отримали графік зміни струмів в залежності від напруги (рис. 3.7). Проаналізувавши його, можна побачити, що струми, активовані гідродинамічною стимуляцією 2-ї групи записів, мають потенціал реверсії (V_{rev}) близько 0 мВ (рис. 3.7 “різниця”) та вихідним напрямком при позитивних V_{com} . Такі характеристики струму характерні для неселективних каналів з провідністю до Ca^{2+} та Na^{+} , що ще раз наводить докази про ймовірну активність неселективних TRPV4 або Piezo1 [114].

Аби порівнювати струми в окремих клітинах, враховуючи різницю в їхніх розмірах та формі, ми проводили поправку до ємності клітин (C , пФ) – параметру, що включає в собі розмір та форму клітини як конденсатора (ізолятор – плазмолема оточена провідними електролітами, що створює різницю електричного заряду на поверхні та всередині клітини) [176].

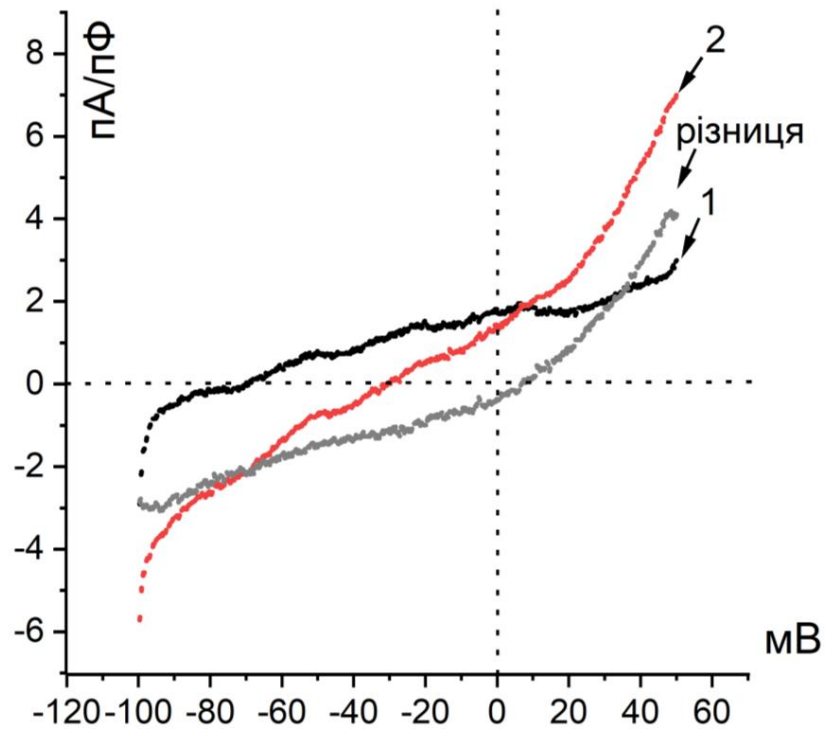


Рис. 3.7 *Репрезентативна вольт-амперна характеристика струмів клітин 2-ї групи, що були чутливі до механічної стимуляції (1 – контроль, 2 – струм під час гідродинамічної стимуляції, різниця – ізольований струм). Перетин вісі абсцис через 0 точку та вихідне випрямлення типові для неселективних Na^+/Ca^{2+} провідних каналів.*

Для цього силу струму ділили на ємність клітини та отримували загальну щільність струмів. Проте, на клітинах 2-ї групи поправка не суттєво вплинула на розкид, що можна побачити на щільності контрольних струмів спокою вибірки ($10,75 \text{ пА/пФ} \pm 1,22$) (рис. 3.8). Проаналізувавши дані з щільності трансмембранних струмів з 2-ї групи до та під час гідродинамічної активації за позитивного V_{com} ми отримали статистичну різницю за парним Т-тестом Вілсона ($p = 0,004$). Необхідно зазначити, що подібні механоактивовані Ca^{2+}/Na^+ -струми в ГМК детрузора не були показані раніше, оскільки раніше було показано лише K^+ провідний струм в ГМК детрузора у відповідь на стимуляцію негативним тиском [7].

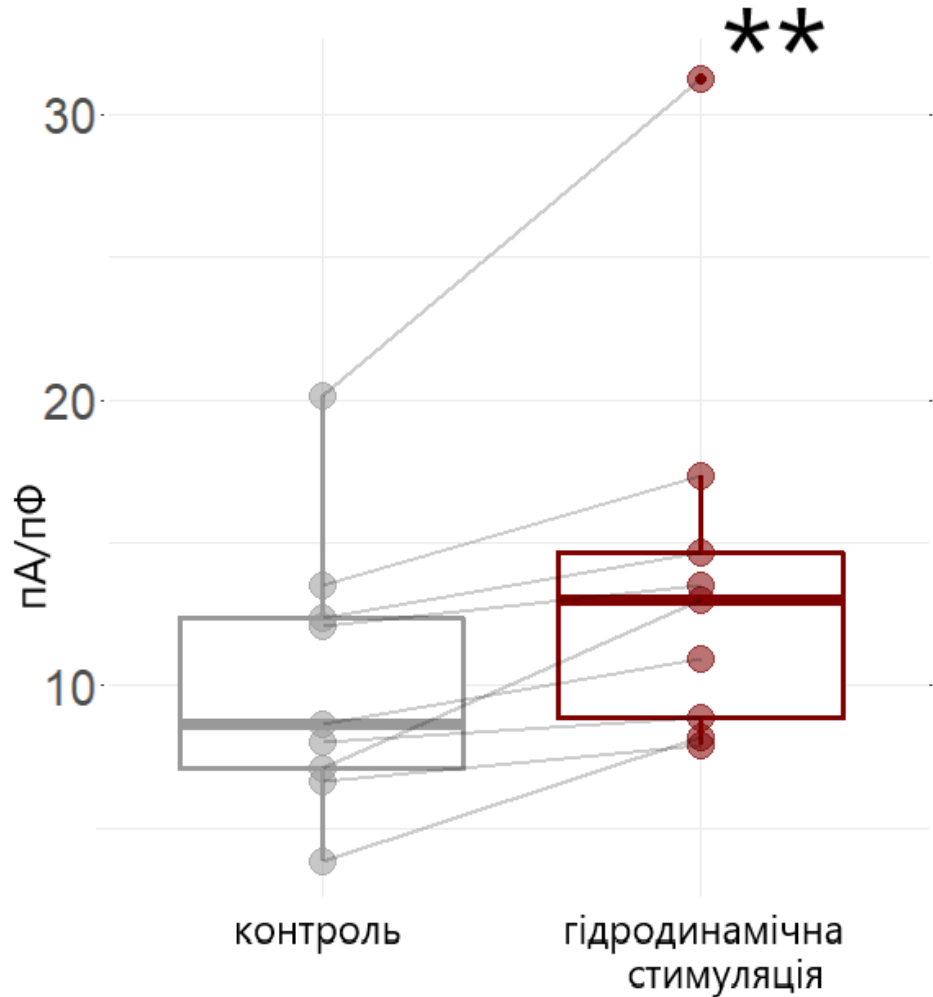


Рис. 3.8 Порівняння щільності контрольного струму та струму, викликаного гідродинамічною стимуляцією за позитивного потенціалу V_{com} (2 група ГМК) ** статистично значуща різниця ($p = 0,004$) за допомогою тесту Вілсона ($n=9$).

Третя група записів механоактивованих струмів в ГМК детрузора демонструвала вихідні струми при $V_{com} + 50$ мВ під час гідродинамічної стимуляції з щільністю в середньому $12,8$ пА/пФ $\pm 2,6$ ($n=8$) та практично не помітним збільшенням вхідного компонента при негативному V_{com} (рис. 3.9). З вольт-амперної характеристики загальноклітинних струмів можна побачити потенціал реверсії на рівні -10 мВ. Це говорить про те, що через клітинну мембрану тече струм різних іонів (K^+ , Cl^- , Na^+ , Ca^{2+}), але з сильним зміщенням у бік потенціалу реверсії для Ca^{2+} та Na^+ (рис. 3.10). Різниця між контрольним

струмом та струмом під час стимуляції, що, власне, є чистим струмом саме активованого каналу, то він не перетинав вісь абсцис та мав ознаки сильного вихідного випрямлення. Така поведінка струму на вольт-амперній характеристиці є характерною для K^+ -провідних двопородоменних калієвих каналів (K2P), серед яких є субродина механочутливих каналів TREK [97].

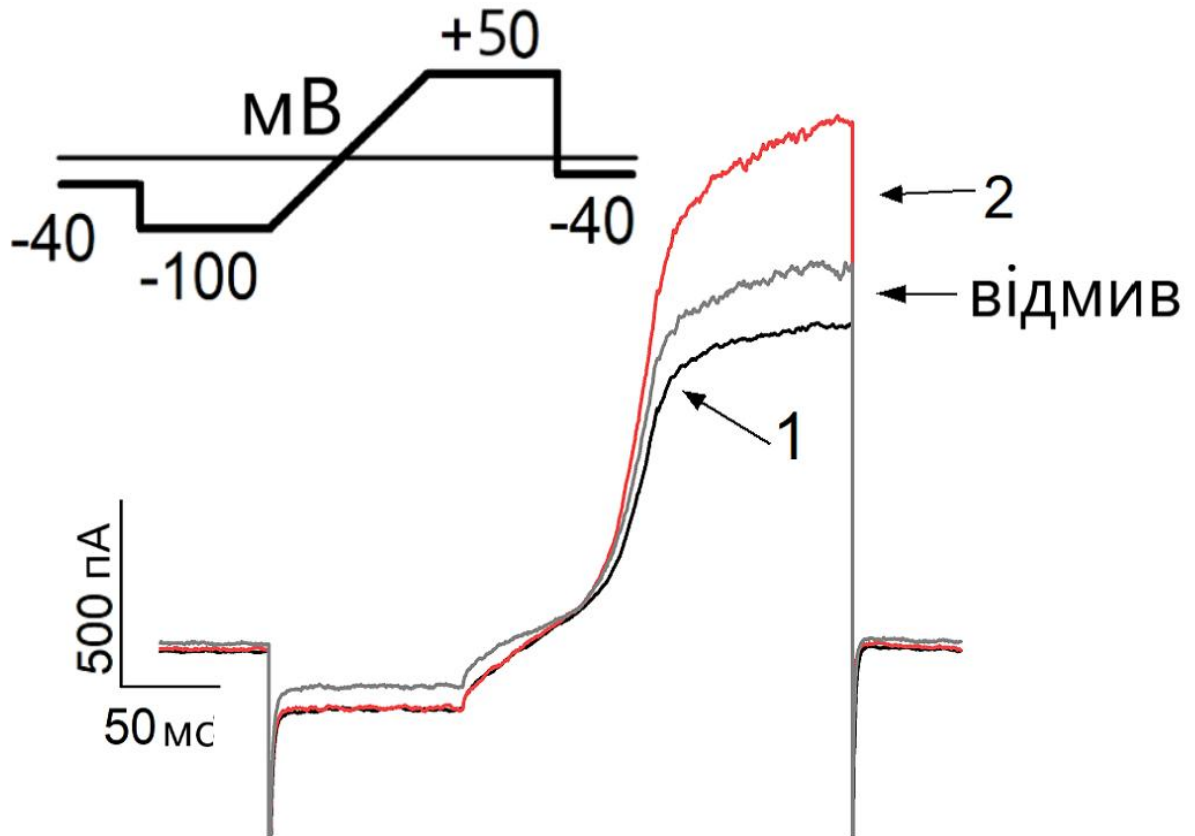


Рис. 3.9 Репрезентативні мембранні струми 3-ї групи ГМК детрузора за механочутливістю з активацією вихідних струмів лише за позитивного V_{com} (1 – без стимуляції, 2 – струм під час стимуляції, відмив – відновлений струм після активації).

Порівняння щільності струмів контрольних та під час гідродинамічної стимуляції за потенціалу $V_{com} +50$ мВ Т-тестом Вельша показало статистично значиму різницю ($p=0,035$) (рис. 3.11). Ще однією цікавою особливістю, що розділила 3 групи ГМК є (окрім, власне, різного типу механостимульованого

струму) різниця базової контрольної щільності струмів у всіх 3-х груп. Для 2-ї та 3-ї груп середнє значення було 11 пА/пФ та 29 пА/пФ відповідно, та для нечутливих – дещо менша від 2-ї групи (9 пА/пФ). Однак, ми не перші, хто розділив ГМК детрузора на окремі типи за особливостями їхньої провідності. Наприклад, в СМ миші на основі спонтанної активності були [61] виокремлені чотири типи ГМК за спонтанною активністю.

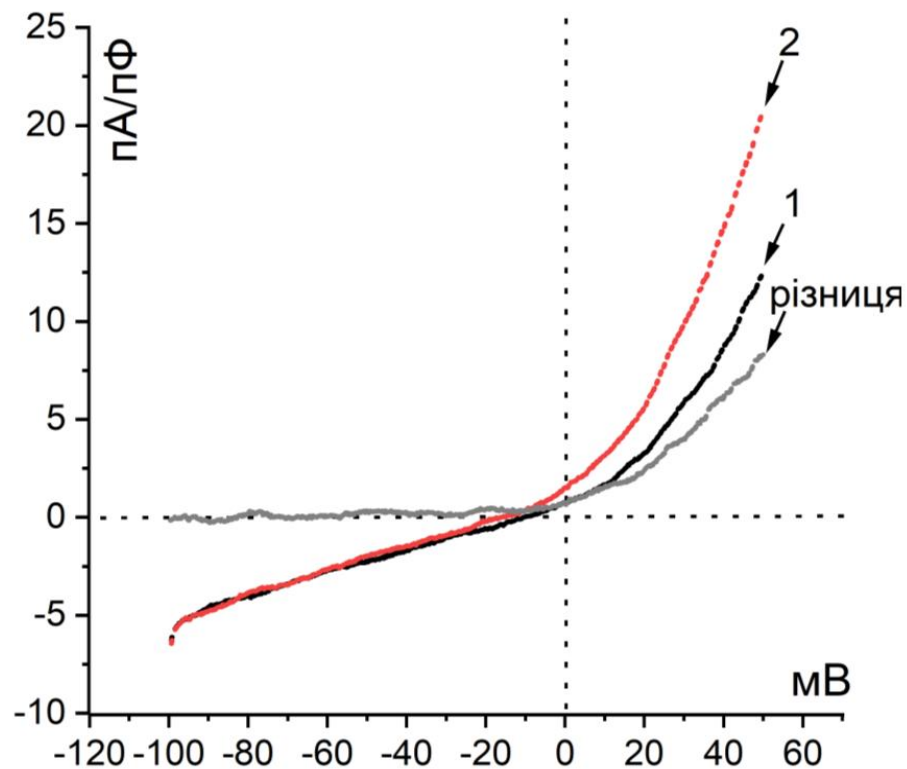
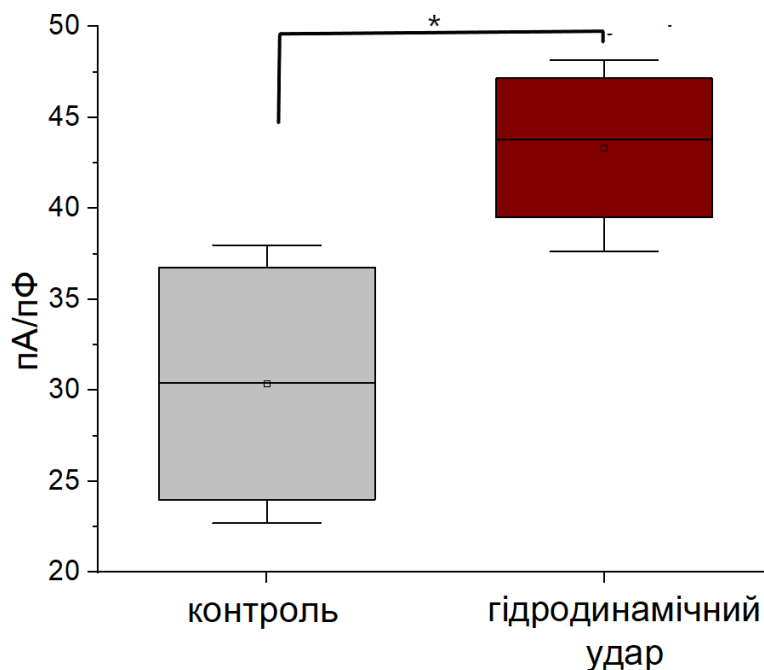


Рис. 3.10 Репрезентативна вольт-амперна характеристика струмів клітин 3-ї групи (1 – без стимуляції, 2 – струм під час стимуляції, різниця – ізольований струм). Відсутність струму за негативної V_{com} та неперетинання 0 значення пА/пФ типове для вихідних K^+ -струмів.

Подібні результати підтверджують присутність K^+ -провідного механочутливого каналу в ГМК детрузора, яким, власне, може бути TREK-1, який, як згадували раніше, експресується в ГМК на високому рівні, а також вважається основним механочутливим іонним каналом ГМК детрузора [177].

Однак, для остаточної впевненості необхідно отримати записи з застосуванням канал-специфічних блокаторів або активаторів.



*Рис. 3.11. Порівняння щільності контрольного струму та струму, викликаного гідродинамічною стимуляцією за позитивного потенціалу V_{com} (3 група); * $p = 0,035$ за допомогою T -тесту Вельша ($n=7$).*

Вищезгадані результати були опубліковані в працях за номером 5,6,8.

3.4. Компонент каналу TREK-1 у механочутливості клітин гладенького м'яза детрузора

Для отримання доказів, що K^+ -провідні струми, що були виявлені під час механічної стимуляції, обумовлені функціонуванням саме каналу TREK-1, ми провели низку додаткових експериментів. В роботах з механоактивованим TREK-1 застосовують блокатор L-метіонін для пригнічення струмів цього каналу [178], хоча й селективність цього підходу доволі низька. Усі сульфур-вмісні амінокислоти за високих концентрацій блокують механочутливі K^+ -провідні канали. Окрім L-метіоніна цю здатність було показано й для L-цистеїну [179]. Застосування амінокислот як блокаторів або активаторів має

значні недоліки, оскільки вони можуть мати неспецифічні ефекти. Про L-метіонін маємо зазначити особливо, оскільки сульфур-вмісні амінокислоти залучені у транссульфурному шляху та у синтезі H_2S [180,181].

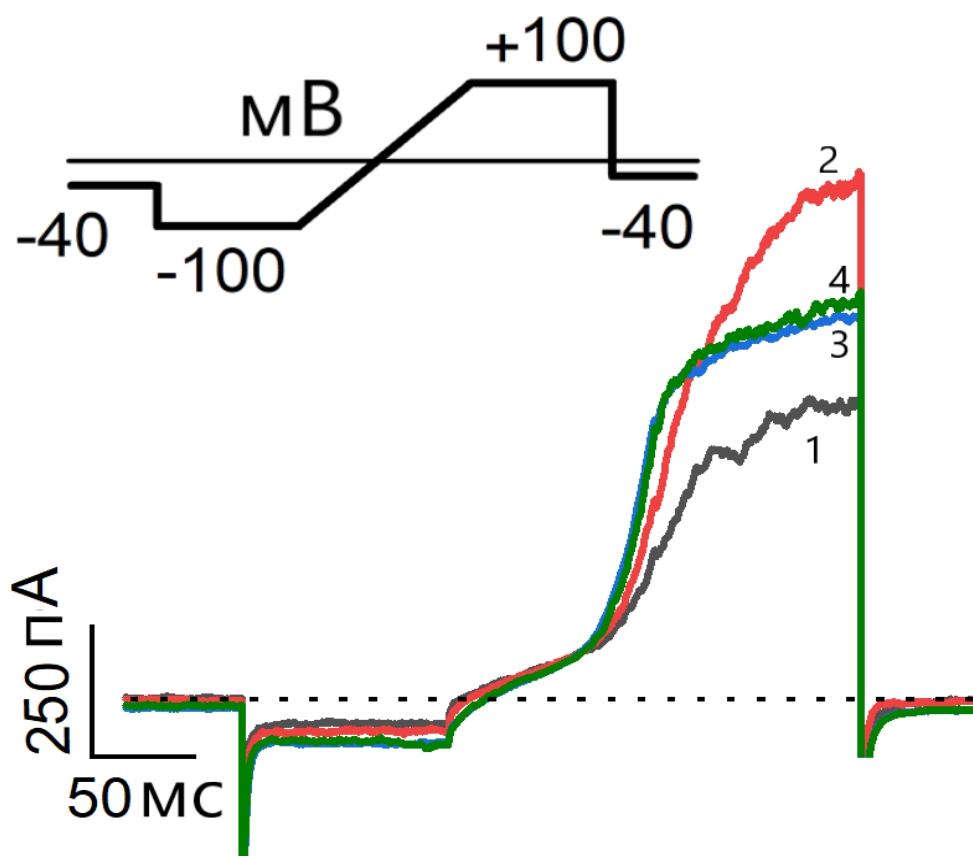


Рис. 3.12 Репрезентативні струми під час гідродинамічної стимуляції ГМК детрузора до та під час використання блокатора TREK-1 L-метіоніну: 1 – контрольний без блокатора, 2 – активація гідродинамічною стимуляцією, 3 – контрольний з L-метіоніном (1 ммоль/л), 4 – активація гідродинамічною стимуляцією під час прикладання L-метіоніну.

Скориставшись L-метіоніном (1 ммоль/л) під час експерименту з механічною активацією, ми показали, що в досліджуваних ГМК практично повністю пригнічувалась можливість активації струму гідродинамічною стимуляцією (n=3) (рис. 3.12).

Перед експериментом з інгібуванням клітини перевіряли на наявність механочутливих K^+ -провідностей, далі протягом 10 хв чекали на відновлення

нормального струму, після чого камеру з клітинами додавали L-метіонін. Контрольний струм не відновлювався повністю після гіперполяризації: потенціал реверсії ВАХ загальних струмів зміщувався з -50 мВ до -40 мВ, що вказує на часткове зменшення K^+ -провідності [182]. Витримавши клітини в L-метіоніні 3 хв ми повторили механічну стимуляцію. Блокатор спрацював, проте, ми все одно реєстрували ледь помітний механоактивований струм (рис. 3.13).

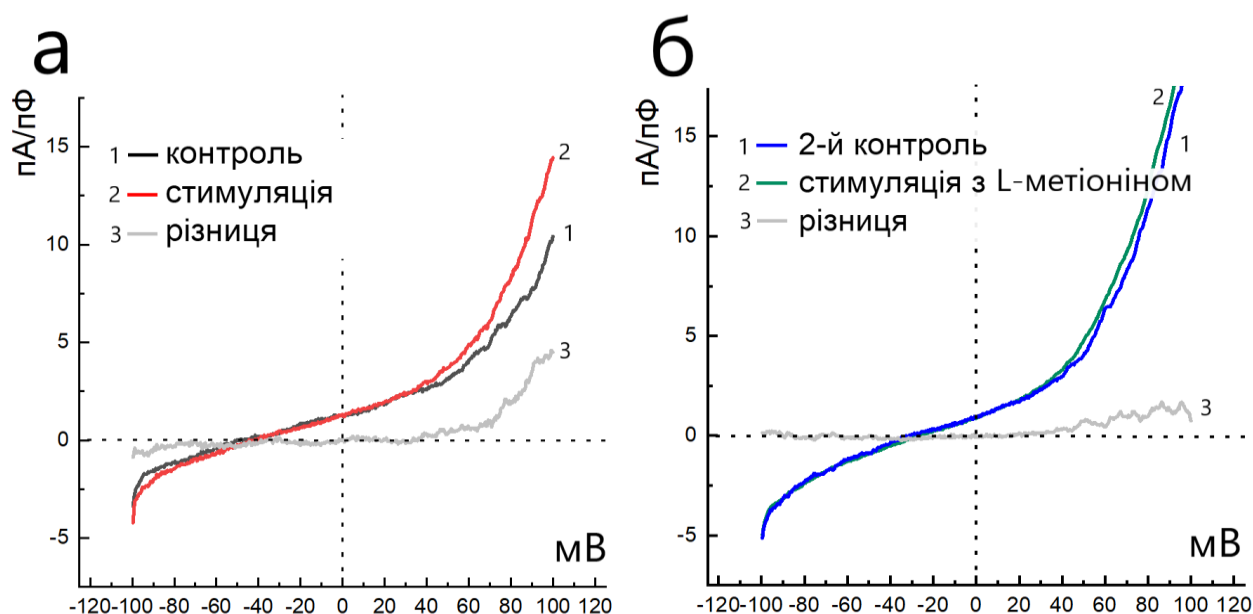


Рис. 3.13 Порівняння вольт-амперних характеристик струмів від гідродинамічної стимуляції та за наявності блокатора TREK-1 – L-метіоніну. **а** – за відсутності блокатора; **б** – за присутності L-метіоніну (1 ммоль/л).

Окрім інгібування, аби підтвердити активацію саме TREK-1, можна селективно активувати канал. Дослідники цього каналу користуються арахідоною кислотою (АК), котра перетворює струми TREK-1 з типовим вихідним випрямленням у класичні K^+ струми втрат через переведення каналів у стан конститутивно відкритих [107,183]. Селективність АК саме до TREK-1 низька, однак АК має спорідненість до каналів суб-родина TREK (до якої належать TRAAK, TREK-1, TREK-2) [184]. Оскільки саме TREK-1 був показаний як головний механорецептор в ГМК детрузора, та лише він з субродина експресується в м'язі, для підтвердження його присутності у наших

експериментах ми застосовували розчин з високою концентрацією АК (50 мкмоль/л), що викликало в ізольованих ГМК генерацію трансмембранного струму на позитивних V_{com} щільністю $14,6 \pm 5,4$ пА/пФ ($n=7$ позитивних з 10 досліджених клітин з 4-х тварин) (рис. 3.13).

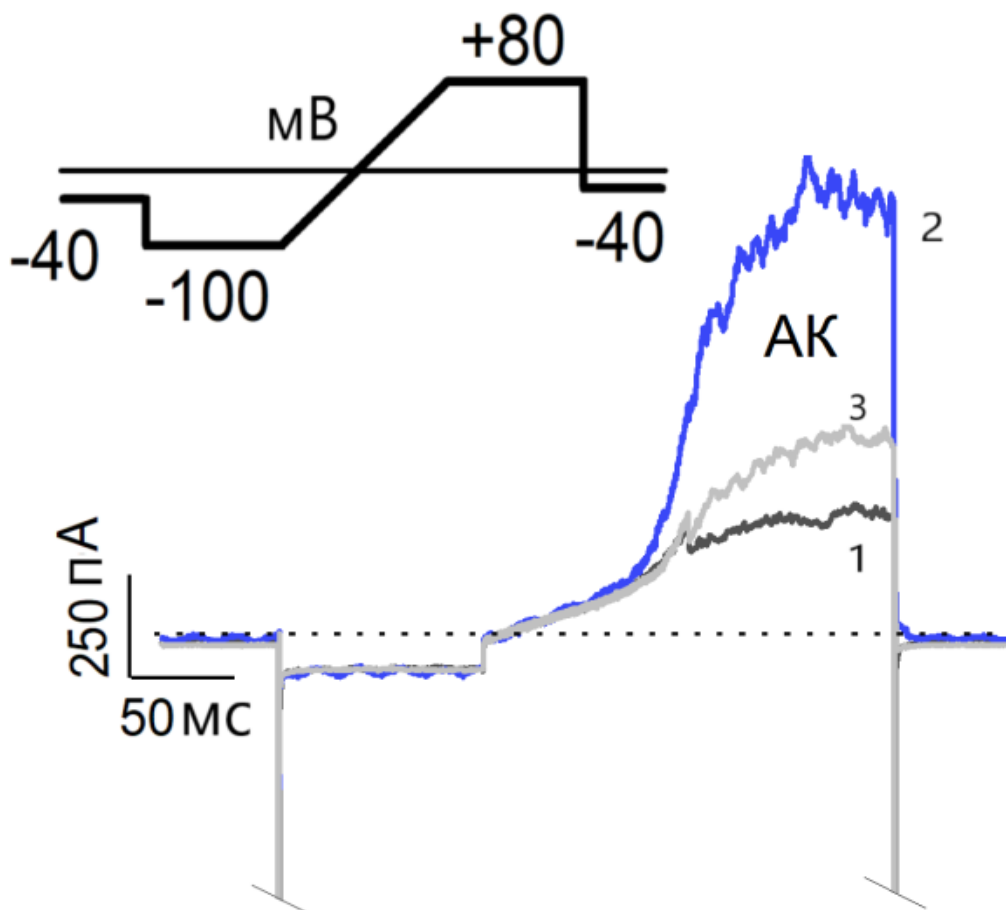


Рис. 3.13 *Репрезентативні струми фармакологічної активації TREK-1 прикладанням арахідонової кислоти: 1 – контрольний струм, 2 – усереднена пікова амплітуда під час прикладання АК, 3 – відмив.*

ВАХ АК-активованих струмів (рис.3.14) мають характерне для TREK-1 вихідне випрямлення, хоч і з більшим кутом ніж механоактивовані. Потенціал реверсії під час спокою та при активації в репрезентативному записі був більш характерний саме для K^+ -провідних струмів і становив -80 мВ, адже розрахунковий рівноважний калієвий (V_K) потенціал для наших експериментальних умов складав $V_K = -81.7$ мВ.

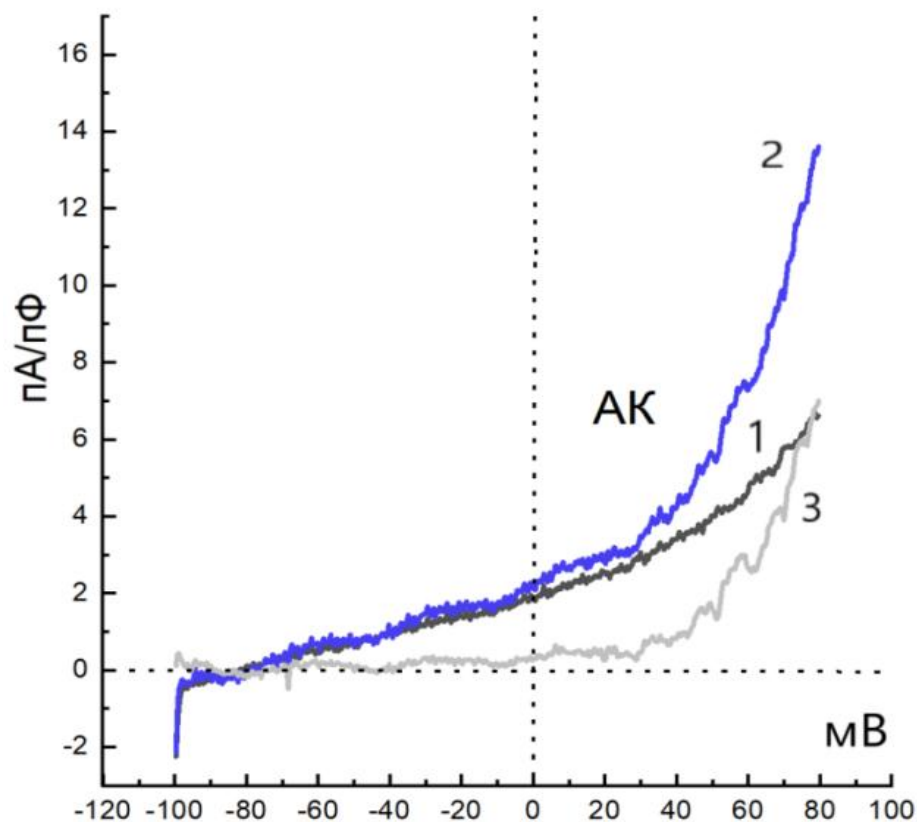


Рис. 3.14 Репрезентативна вольт-амперна характеристика струму під час прикладання неселективного активатора TREK-1 – АК (1 – контроль, 2 – струм під час прикладання АК, 3 – різниця).

Різниця щільності струмів активованих гідродинамічною стимуляцією та прикладанням АК за позитивного потенціалу V_{com} становила 1,8 пА/пФ. Хоч для малоактивних клітин, таких як ГМК, це і доволі значна різниця, однак вона становить менше 10% від загального струму (рис. 3.15). Статистичний аналіз вибірки записів щільності струмів Т-тестом Вельша показав відсутність статистичної різниці ($p=0,78$), що підтверджує нашу гіпотезу про активацію однакового каналу в обох випадках. АК-активовані струми мають більшу амплітуду оскільки можуть активувати TREK-1 до стадії каналу втрат (постійно відкритих) [107]. Порівняння ВАХ ж усіх струмів (рис. 3.16), пов'язаних з TREK-1 активацією підтверджує наше припущення, що механоактивовані K^+ -провідні струми, які ми спостерігали у 3-й групі записів напряму пов'язані з роботою каналу TREK-1.

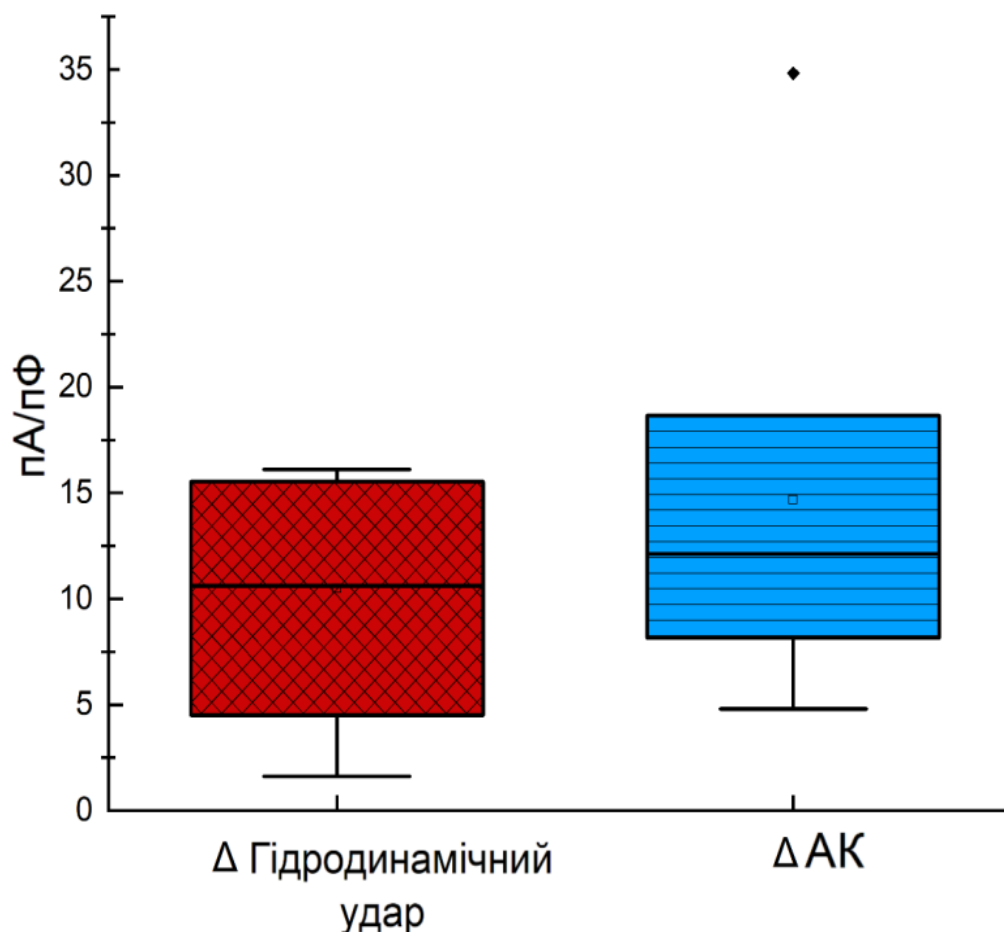


Рис. 3.15 Порівняння щільності очищених струмів за позитивного V_{com} в експериментах з клітинами 3-ї групи стимульованих шляхом гідродинамічної стимуляції та за допомогою прикладання АК ($n=7$). $p = 0,78$ за допомогою T -тесту Вельша.

Необхідно зазначити, що отримані нами результати підтверджують загальноприйнятту тезу щодо того, що TREK-1 є головним механорецептором в ГМК детрузора [177]. Натомість, механоактивовані струми, що залишились після блокування TREK-1, та також показана раніше 2-га група механоактивованих струмів ГМК, наскільки нам відомо, не були раніше описані. Тому надалі ми сконцентрували свою увагу на дослідженні не K^+ -провідних механостимульованих трансмембранних струмів ГМК.

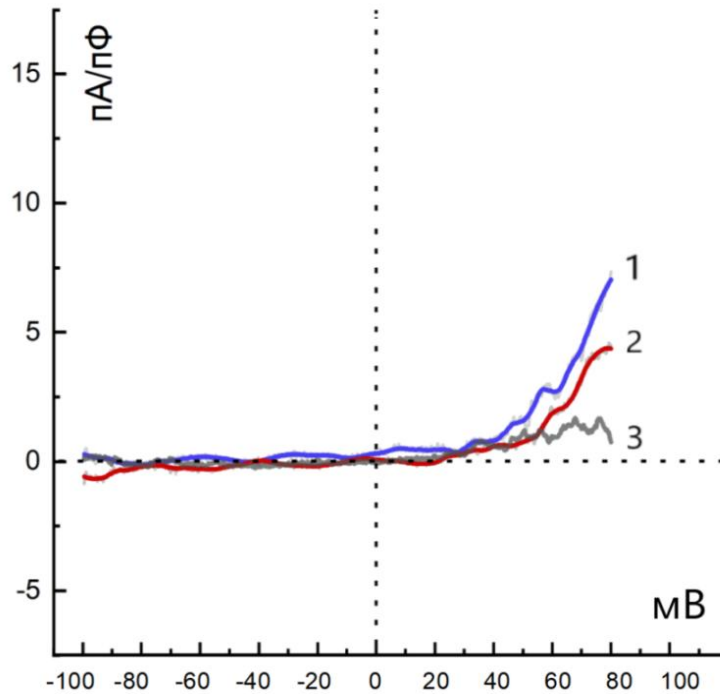


Рис. 3.16 Порівняння вольт-амперних характеристик очищених струмів: 1 – струм, активований прикладанням АК, 2 – струм, активований гідродинамічною стимуляцією, 3 – механоактивованій струм під час блокування TREK-1 L-метіоніном.

Для початку ми провели експерименти з реєстрацією струмів за відсутності іонів K^+ . Для цього в усіх робочих розчинах замінили солі K^+ на солі Cs^+ . Хоч гідратований іон Cs^+ має практично однаковий діаметр із K^+ (близько 1,6 та 1,3 Å відповідно), він блокує калієві провідності завдяки зв'язуванню з селективним фільтром більшості K^+ -провідних каналів [185]. В такий спосіб ми отримували систему з Na^+/Ca^{2+} -струмами та значним зниженням контрольного базового струму у вихідному напрямку. Гідродинамічна стимуляція викликала збільшення струму як за позитивного так і за негативного V_{com} ($n=3$) (рис. 3.17).

Побудована ВАХ базового струму та струму під час максимальної механостимульованої відповіді, а також очищений активований струм не показали типового для TREK-1 вихідного випрямлення, хоч потенціал реверсії зберігався у значеннях в області -40 мВ, що за відсутності K^+ є свідченням про проникність крім Na^+ та Ca^{2+} (які зсовують потенціал реверсії праворуч) також і

іонів Cs^+ та Cl^- (рис. 3.18). Такий результат доводить, що зареєстрований струм не пов'язаний з роботою TREK-1, а в ГМК присутній інший, неселективний катіонний механочутливий канал.

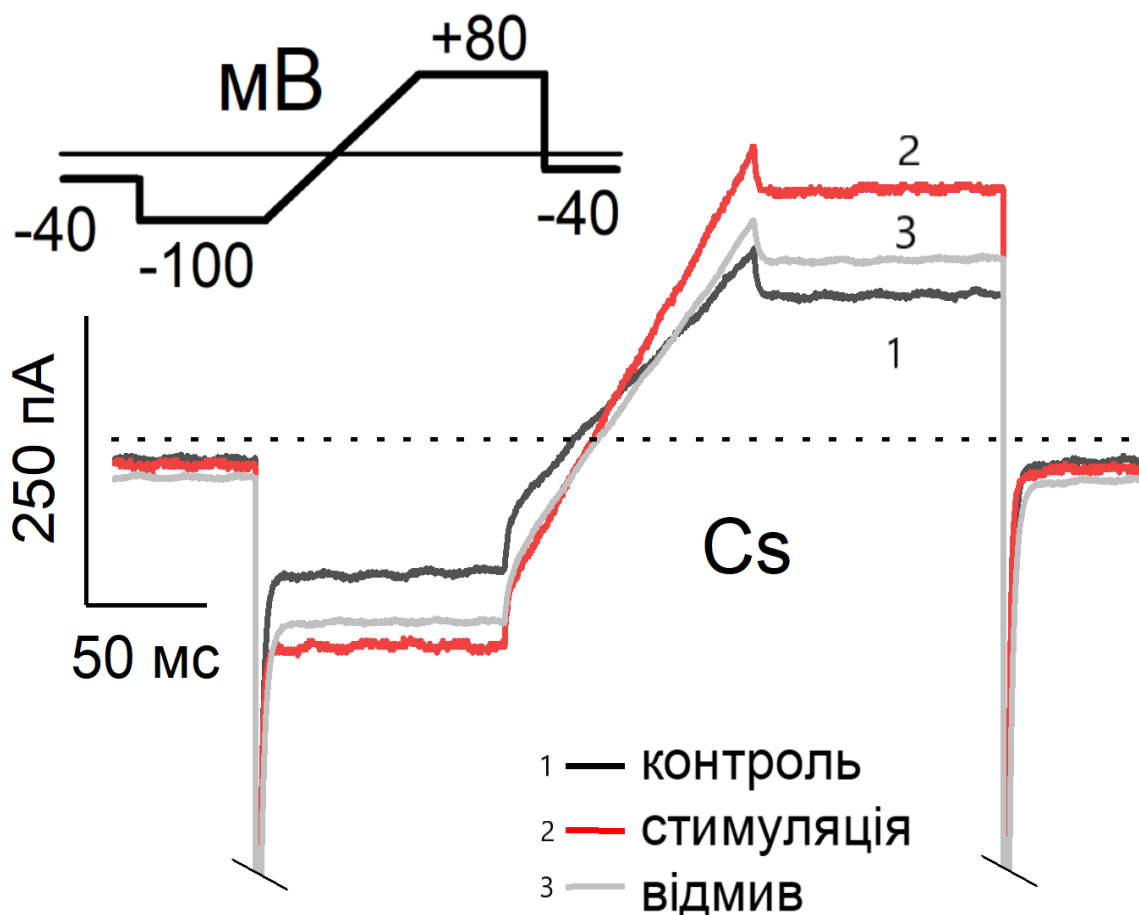


Рис. 3.17 Репрезентативні струми з гідродинамічною стимуляцією ГМК детрузора під час інгібування K^+ -провідних каналів за допомогою заміщення іонів K^+ на Cs^+ .

Збереження механоактивності ГМК при блокуванні TREK-1 та K^+ струмів частково спростовує сформовану 10 років тому [177] тезу щодо домінуючої ексклюзивності каналу TREK-1 в якості основного механочутливого рецептора ГМК та регулюванні розтягнення детрузора при наповненні СМ. Отримані дані вказують на те, що в ГМК експресується та функціонує неселективний механочутливий катіонний канал з провідністю до іонів Ca^{2+} , Na^+ та, ймовірно Cs^+ Cl^- і K^+ .

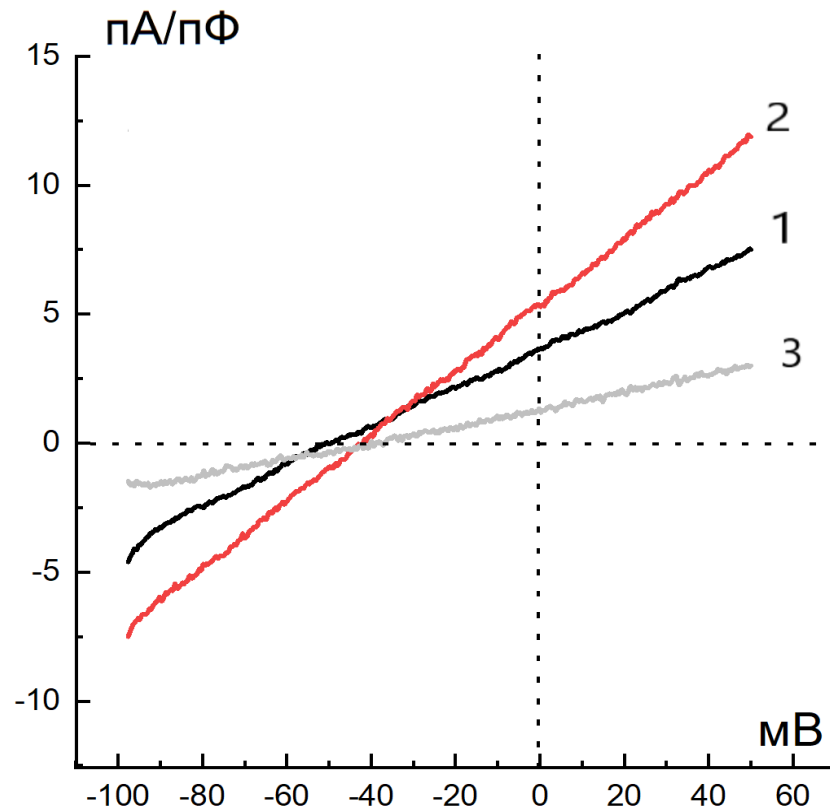


Рис. 3.18 *Репрезентативні вольт-амперні характеристики механоактивованих струмів під час блокування K^+ -провідних каналів іонами Cs^+ : 1 – контрольний струм, 2 – під час гідродинамічної стимуляції, 3 – очищений струм. Очищений струм при блокуванні K^+ -провідного механочутливого каналу TREK-1 має потенціал реверсії в області -40 мВ.*

Вищезгадані результати були опубліковані в працях за номером 2 та 8.

3.5. Механочутливі Ca^{2+} -провідні канали в гладеньких міоцитах детрузора

3.5.1. Механоактивовані Ca^{2+} сигнали в гладеньких міоцитах.

Подальше дослідження механочутливих реакцій ГМК клітин привело нас до необхідності встановлення природи неселективного каналу, що має Ca^{2+} -провідність. Для отримання доказу, що механічна стимуляція активуючи невстановлений канал може викликати вивільнення Ca^{2+} у цитоплазму ми

скористались скляним зондом аби натиснути на ізольований ГМК, що був пофарбований флюоресцентним Ca^{2+} -чутливим барвником Fluo 3-AM.

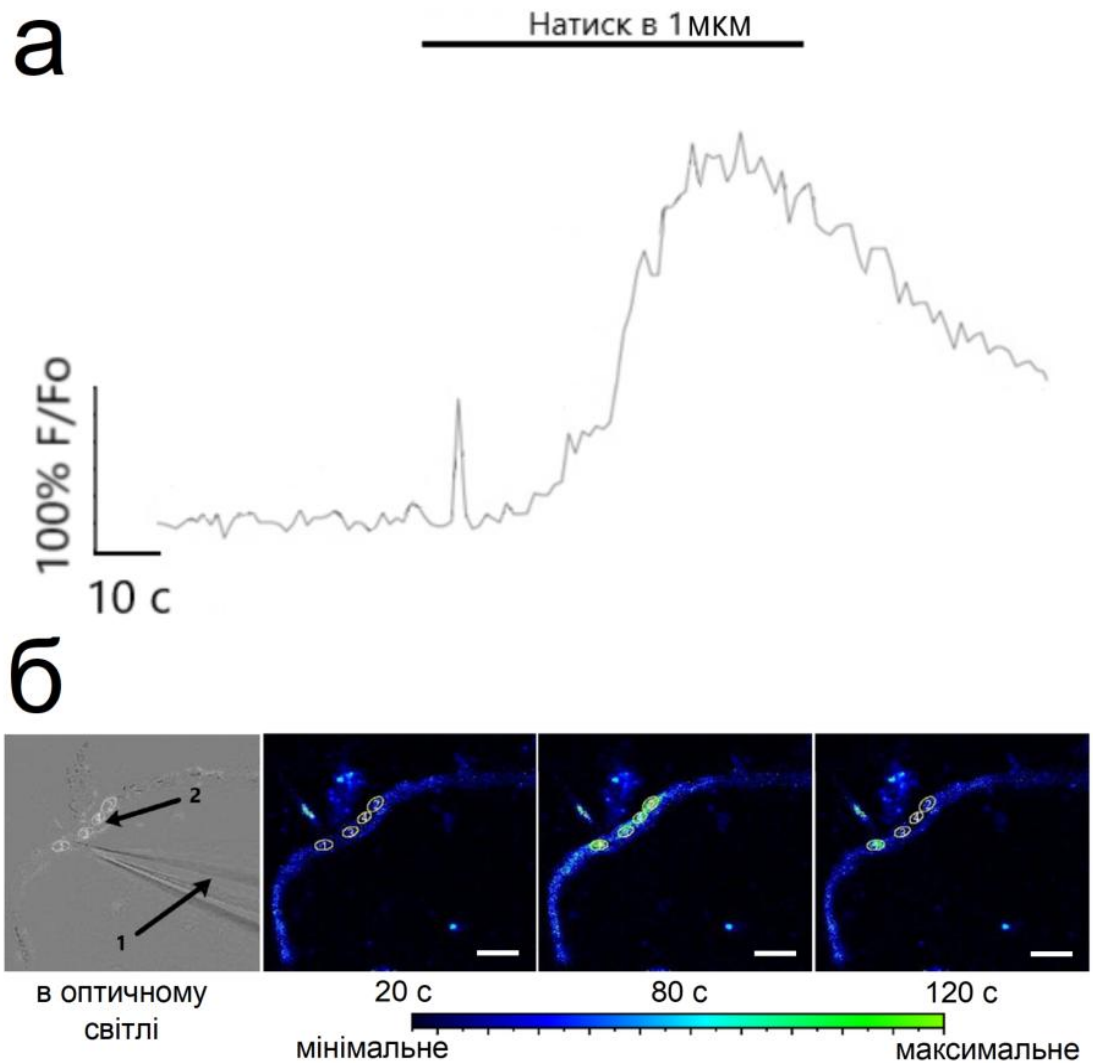


Рис. 3.19 Розповсюдження кальцієвого сигналу в ГМК детрузора у відповідь на активацію натиском. **а** – репрезентативний згладжений графік змін F/F_o у ГМК детрузора, які стимулювали натиском скляним зондом. **б** – розгортка запису з Fluo 3-AM флюоресцентними ефектами від стимуляції. Величина змін представлена на кольоровій шкалі змін інтенсивності флюоресценції (ΔF), масштабна шкала дорівнює 15 мкм.

Натиск на мембрану скляним зондом з кроком в 1 мкм викликав у ГМК детрузора інтенсивний кальцієвий сигнал ($F/F_o=3,83$), що розходився від ділянки клітини, де відбувалось механічне подразнення. Підвищення рівня

$[Ca^{2+}]_i$ мало повільну динаміку (впродовж 1 хв після натиску, клітина почала відновлювати звичайну $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 3.19). Можливість ГМК детрузора генерувати Ca^{2+} відповідь на механічну стимуляцію узгоджується з нашими попередніми результатами. До цього, в літературі Ca^{2+} механочутливі сигнали реєстрували лише в ICC подібних клітинах [186].

3.5.2. GSK-активація TRPV4 в гладенько-м'язових клітинах детрузора не викликає генерацію струмів. Оскільки ВАХ механоактивованих струмів ГМК детрузора, які ми отримали раніше, мали характерні для неселективного катіонного каналу властивості, одним з перших кандидатів на селективне дослідження був ванілоїдний механочутливий канал родини TRP – TRPV4, який вже був показаний одним з важливих механорецепторів в різних тканинах СМ [157], однак не у саме ГМК детрузора.

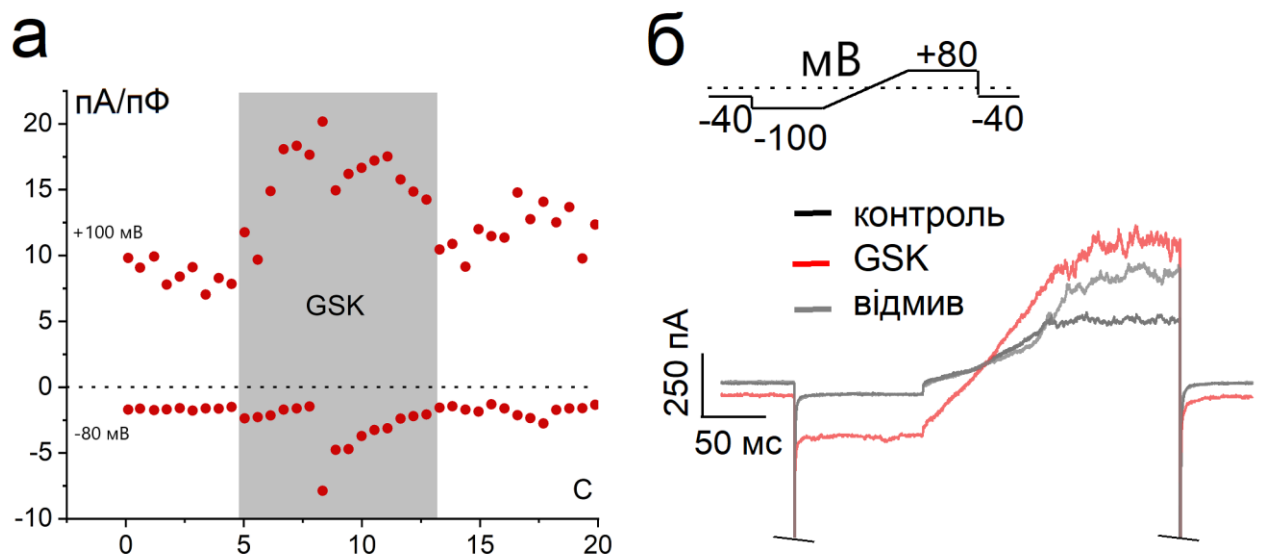


Рис. 3.20 Репрезентативні струми активовані в ICC-подібних клітинах детрузора у відповідь на прикладання активатора TRPV4 – GSK: **а** – часова розгортка зміни щільності струму за -100 та $+80 V_{com}$ під час прикладання 10 мкмоль/л GSK (сіра зона); **б** – репрезентативний запис активованих TRPV4-залежних струмів в ICC-подібних клітинах.

Ми використовували селективний активатор – GSK1016790A, що має досить високу спорідненість до TRPV4 та не взаємодіє з іншими каналами родини TRP. Для валідації робочого протоколу дослідження TRPV4 ми провели ряд експериментів з ICC-подібними клітинами, котрі часто згадуються в літературі в контексті TRPV4-опосередкованих селективних струмів [186].

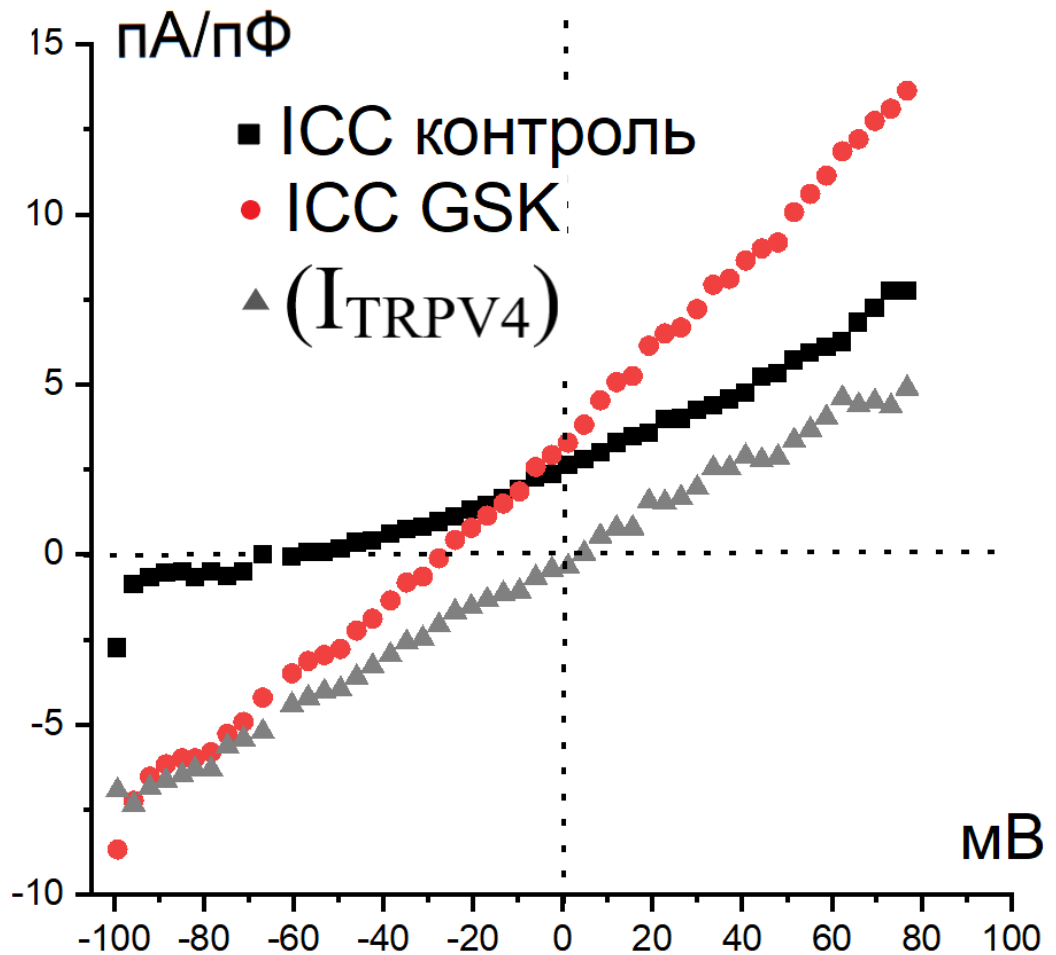


Рис. 3.21 Репрезентативні вольт-амперні характеристики струмів під час активації TRPV4-залежних трансмембранних струмів в ICC-подібних клітинах СМ..

Досліджували відібрані за морфологічними ознаками (як описано в розділі 2) клітини. В результаті прикладання досить високої концентрації (10 мкмоль/л) GSK до ICC-подібних клітин ми реєстрували характерний симетричний високо-провідний струм з вихідною компонентою за потенціалу

+80 мВ, вхідною компонентою при потенціалі -100 мВ з щільністю I_{TRPV4} при максимальному відкритті каналу $20 \pm 2,0$ пА/пФ і $-8,7 \pm 1,5$ пА/пФ при $V_{com} +80$ мВ і -100 мВ відповідно (рис. 3.20). На побудованій ВАХ можна спостерігати (рис. 3.21), що після прикладання GSK точка реверсії загальних струмів зсунулась з -50 мВ до -25 мВ, що вказує на збільшення Na^+ / Ca^{2+} -провідності, а власне ВАХ очищеного струму з характерним потенціалом реверсії біля 0 мВ співпадає з класичним для каналу TRPV4 описом струму.

Аналогічний протокол експерименту, який проводили з активацією I_{TRPV4} в ІСС-подібних клітинах, застосували для вивчення ГМК детрузора. Використання 10 мкмоль/л GSK жодним чином не впливало на мембранні провідності досліджуваних клітин ($n=8$). Це стало аргументом на користь того, що механостимульовані струми в записах 2-ї групи ГМК навряд чи пов'язані з активністю каналу TRPV4 через його відсутність у плазмолемі (рис. 3.22).

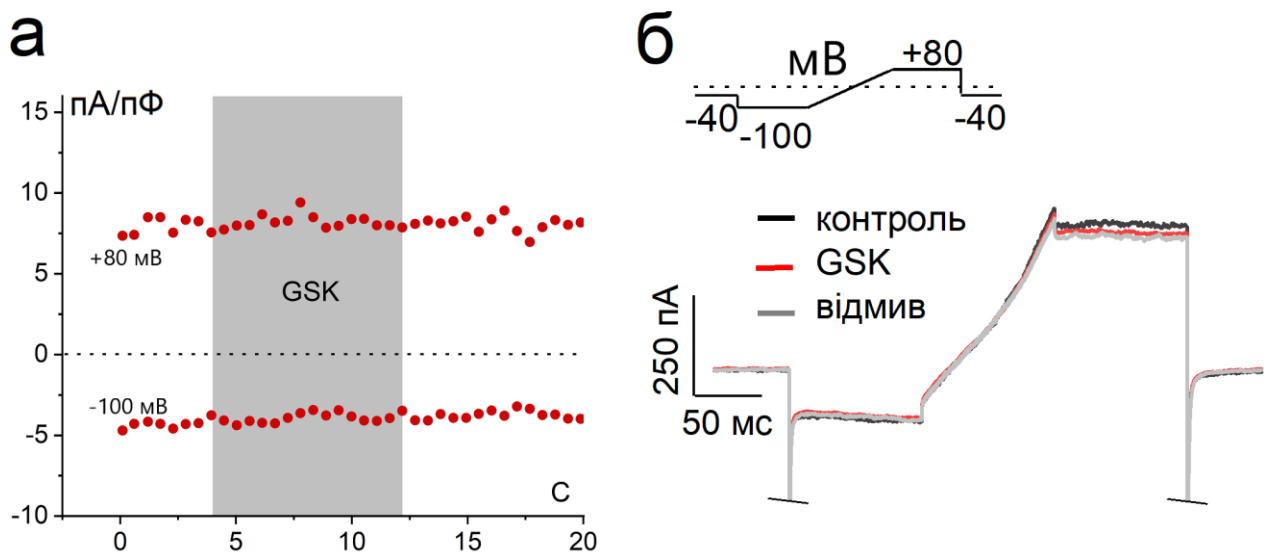


Рис. 3.22 Репрезентативні записи активації TRPV4-залежних струмів в ГМК детрузора: **а** – часова розгортка зміни щільності струму за -100 та $+80$ V_{com} під час прикладання 10 мкмоль/л GSK1016790A (сіра зона); **б** – репрезентативний запис трансмембранних струмів в ГМК детрузора.

Порівняння ВАХ струмів під час прикладання GSK спростовує ідею про роль TRPV4 у механочутливості ГМК. Таким чином, отримані результати щодо

I_{TRPV4} та експресії TRPV4 в детрузорі суперечать одне одному. Втім, ми не перші, хто зустрівся з подібним. В багатьох статтях TRPV4 розглядають як канал ГМК детрузора, проте жодної роботи, що б демонструвала його електрофізіологічну активність тут наразі немає, а більшість досліджень проводились на рівні цілого органу методом цистометрії або смужки детрузора методом тензометрії [186]. Ймовірно, методом ПЛР ми фіксували мРНК каналу не з м'язових, а з ICC-подібних клітин, оскільки даних з одноклітинного секвенування або одноклітинного ПЛР наразі немає.

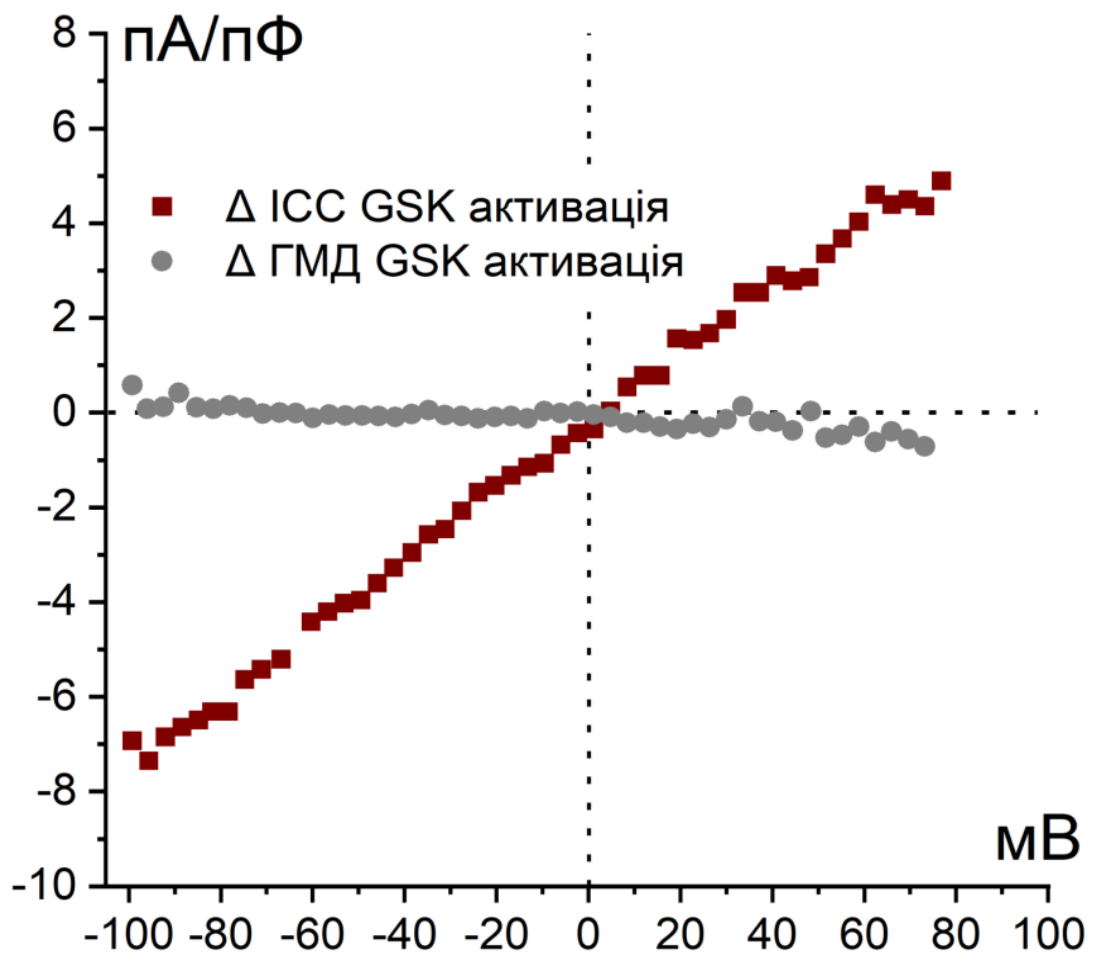


Рис. 3.23. Порівняння вольт-амперних характеристик очищених струмів під час прикладання GSK в ГМК детрузора та ICC. а – вольт-амперна характеристика очищених струмів.

3.5.3. Ефект Yoda1-опосередкованої селективної активації Piezo1 в гладенько-м'язових клітинах детрузора. Наступним потенційним кандидатом

на роль неселективного механочутливого катіонного каналу в ГМК детрузора був канал Piezo1. Аналогічно до експерименту з GSK, ми валідували метод активації каналу на наперед відомо позитивному зразку, яким були ICC-подібні клітини, на яких також було показано й I_{Piezo1} [51]. Застосування 20 мкмоль/л селективного активатора Yoda1 до ICC-подібних клітин активувало симетричний високо-амплітудний струм з вихідною компонентою за потенціалу +80 мВ, вхідною компонентою при потенціалі -100 мВ з щільністю I_{Piezo1} при максимальному відкритті каналу 37 ± 4 пА/пФ та -14 ± 2 пА/пФ при, відповідно, $V_{com} +80$ мВ і -100 мВ (рис. 3.24).

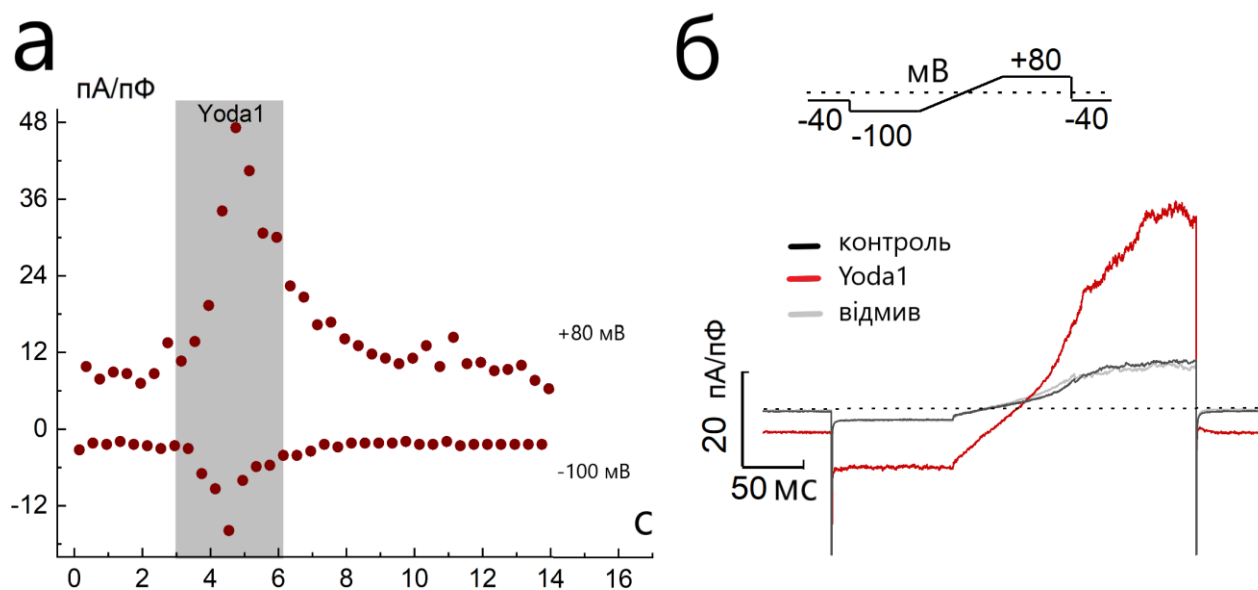


Рис. 3.24 Репрезентативні записи активації Piezo1-залежних струмів в ICC-подібних клітинах детрузора у відповідь на прикладання активатора Yoda1: **а** – часова розгортка зміни щільності струму за -100 та +80 V_{com} під час прикладання 20 мкмоль/л Yoda1 (сіра зона); **б** – репрезентативний запис трансмембранних струмів в ICC-подібній клітині.

Побудована ВАХ активованого струму (рис. 3.25) аналогічно з активацією TRPV4 в ICC демонструє Na^+ - Ca^{2+} -провідності з характерним потенціалом реверсії біля 0 мВ, що співпадає з класичним для типовою для каналу Piezo1 характеристикою струму, описаних в літературі.

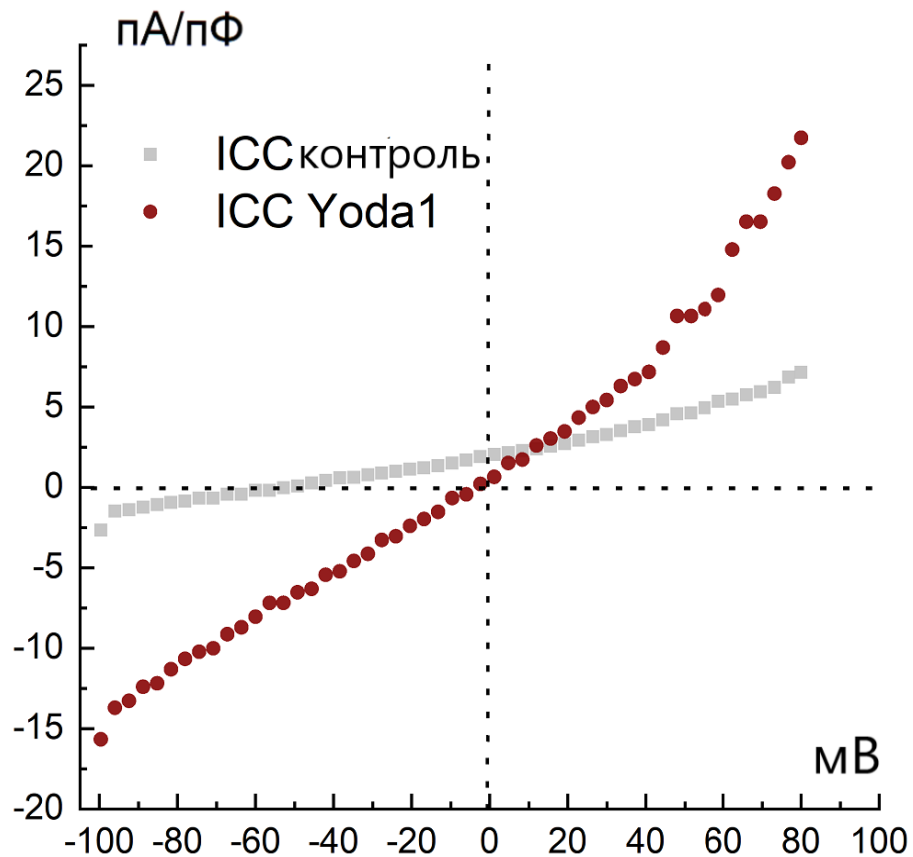


Рис. 3.25 *Репрезентативні вольт-амперні характеристики струмів під час активації Piezo1-залежних трансмембранних струмів в ICC-подібних клітинах СМ.*

Відтворивши типовий I_{Piezo1} , ми провели експеримент з ГМК детрузора. В результаті від прикладання 20 мкмоль/л Yoda1 ми отримали нетипову для Piezo1 зміну трансмембранних провідностей. Ми спостерігали повторюване ($n=14$ позитивних, з 19 досліджених) інгібування струмів спокою з пригніченням вихідних струмів за позитивного V_{com} (рис. 3.26). В середньому зниження становило $2,0 \pm 0,9$ пА/пФ при загальній щільності струму в середньому $9,5 \pm 3,0$ пА/пФ, тобто біля 20%).

Однак порівнюючи ВАХ, важко визначити ефект від прикладання Yoda1, оскільки в ГМК детрузора він виражений в основному лише за позитивного V_{com} без зміщення потенціалу реверсії, та лиш з незначним зменшенням вихідного випрямлення. Yoda1 не викликала активацію трансмембранного

струму, а навпаки – відбулось зменшення щільності струмів на позитивних потенціалах. На ВАХ можна помітити слабо виражене інгібування струмів, що за контролю активуються після +50 мВ (рис. 3.28).

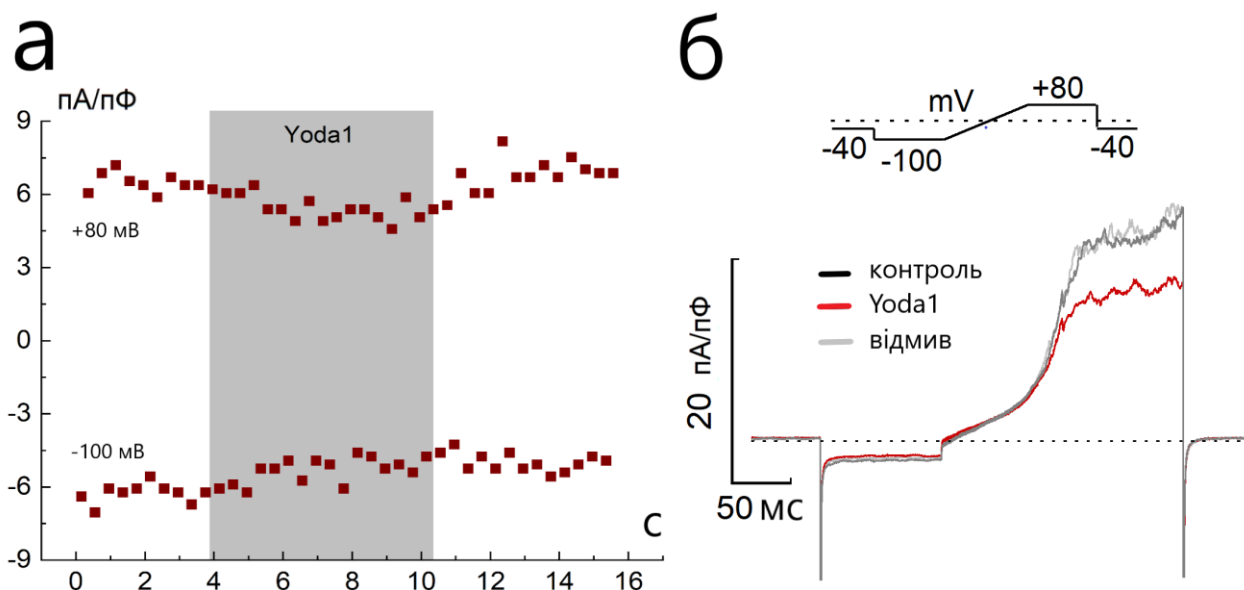


Рис. 3.26 Репрезентативні записи активації *Piezo1*-залежних струмів в ГМК детрузора: **а** – часова розгортка зміни щільності струму за -100 та +80 V_{com} під час прикладання 20 мкмоль/л *Yoda1* (сіра зона); **б** – репрезентативний запис трансмембранних струмів в ГМК детрузора.

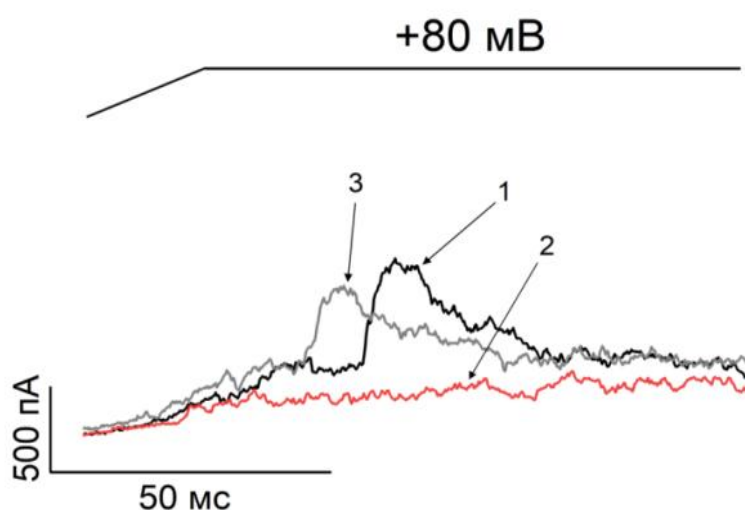


Рис. 3.27 Пригнічення флуктуацій K^+ -струму під час прикладання *Yoda1* до ГМК детрузора: 1 – контрольний запис перед прикладанням активатора, 2 – запис з пригніченням шуму під час прикладання *Yoda1*, 3 – відмивка *Yoda1* відновила початкову інтенсивність K^+ -провідності.

Для класичного доказу присутності каналу в клітині його заблокувати селективним агоністом, та прикласти механічний стимул на тлі. Отриманий негативний результат беззаперечно вказуватиме на роль каналу в механочутливості. Однак, у випадку з Piezo1 інгібування механочутливості можливе лише генетичною модифікацією (до прикладу нокаутом гену), оскільки відкритий в 2018-му році блокатор каналу Piezo1 – Dooku1 [141] інгібує Yoda1-опосередковану активацію у конкурентний спосіб та не впливає на механічну чутливість каналу.

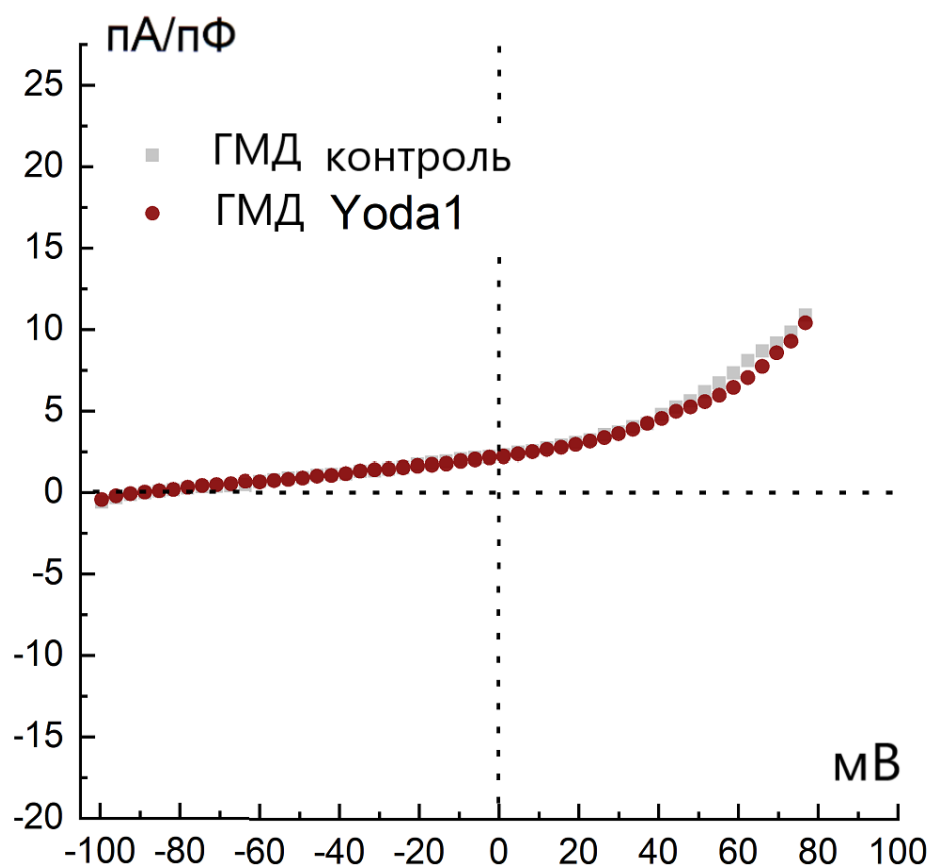


Рис. 3.28. Репрезентативні вольт-амперні характеристики струмів під час активації Piezo1-залежних трансмембранних струмів в ГМК детрузора.

Якщо подивитись на оригінальний запис експерименту (рис. 3.27) за позитивного V_{com} то можна спостерігати чітко виражену реакцію від прикладання Yoda1. Крива струму згладжується, знижуючи виникнення

“шумів”, що зумовлені відкриттям поодиноких K^+ -провідних каналів, активованих тривалою деполяризацією [187]. Схожі механізми були показані в ГМК взаємодії між кальцій-чутливими K^+ -провідними каналами як з TRPV4, так і з каналами Ca_v [10,188].

Але у випадку показаної взаємодії TRPV4 з ВК-каналом у детрузорі морської свинки активація Ca^{2+} -провідного каналу стимулювала до гіперполяризації м’яза через збільшення активності ВК, а не через пригнічення K^+ -провідностей. У випадку взаємодії з Ca_v^{2+} активація потенціал чутливих K^+ -провідних каналів та класичних $K_{ir2.X}$ інгібує їхню активність шляхом гіперполяризації.

Вищезгадані результати були опубліковані в працях за номером 3, 7 та 8.

3.5.4. Yoda1 але не GSK викликає мобілізацію іонів Ca^{2+} в гладеньком’язових клітинах детрузора. Як зазначось вище, механічна стимуляція викликала кальцієвий сигнал в ГМК детрузора, тому ми провели селективну активацію неселективних механочутливих каналів під час фіксації зміни $[Ca^{2+}]_i$. Активація кальцієвих сигналів за відсутності трансмембранних струмів в експериментах з patch clamp в конфігурації “ціла клітина” може вказувати на те, що функціонуючий рецептор розташований не у клітинній мембрані, а в мембрані саркоплазматичної мембрани або ж іншої внутрішньої мембранної органели [189]. Тож ми провели експерименти з завантаженням цитоплазми ГМК Ca^{2+} -чутливим барвником Fluo-4 та аплікували на клітини GSK для дослідження ймовірності наявності TRPV4 у внутрішніх мембранах. Після аплікації активатора усі досліджені клітини (n=9) не проявили жодної зміни $[Ca^{2+}]_i$, тоді як позитивний контроль з прикладанням CCh (10 μ M), працював в нормі з типовим яскраво вираженим піком кальцієвого сигналу (рис. 3.29). Таким чином гіпотеза участі TRPV4 у механочутливості ГМК детрузора повністю спростована.

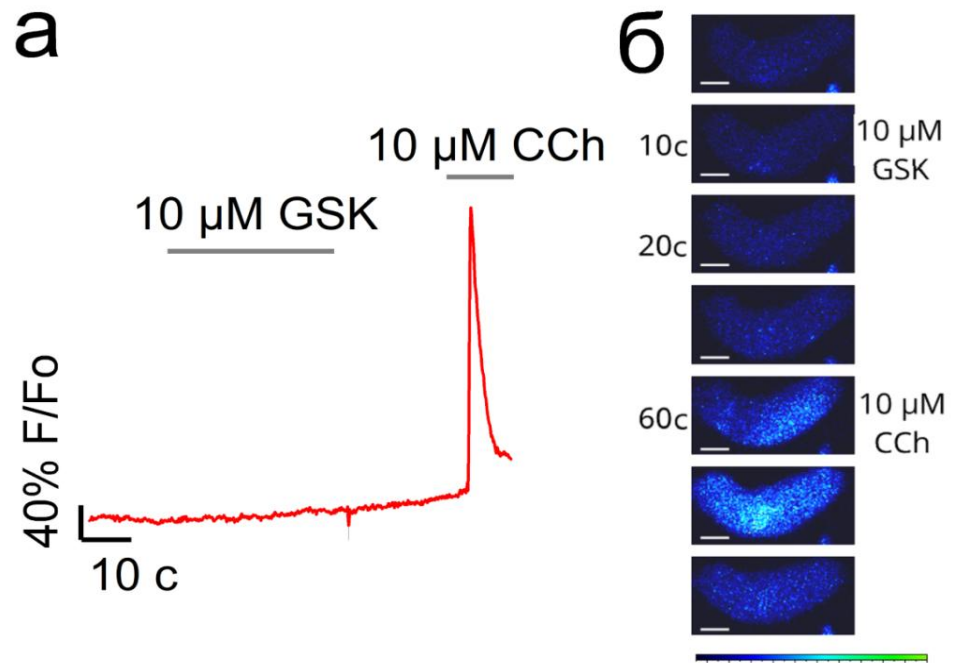


Рис. 3.29 Кальцієві сигнали в ГМК детрузора у відповідь на прикладання активатора TRPV4 – GSK: **а** – репрезентативний графік кальцієвого сигналу з ГМК детрузора з послідовним прикладанням активаторів: Тіроде – негативний контроль зовнішнім розчином, 10 мкМоль/л GSK та позитивний контроль – 10 мкМоль/л CCh; **б** – розгортка запису з флуоресцентними ефектами від стимуляції. Величина змін представлена на кольоровій шкалі змін інтенсивності флуоресценції (ΔF), масштабна шкала дорівнює 10 мкм.

У випадку з Yoda1, аби валідувати протокол дослідження, ми провели експеримент з нейронами ДКГ. Нещодавні дослідження показали, що Piezo1 зустрічається в основному в нейронах малого діаметру ($<30 \mu\text{m}$) [138], тож ми відбирали соми відповідного розміру. Прикладання 20 мкмоль/л Yoda1 до механочутливого нейрона ДКГ викликало контрастний кальцієвий сигнал в половину інтенсивності ($F/F_0 = 21\%$) контрольної аплікації 50 мкмоль/л розчину кофеїну в якості позитивного контролю (рис. 3.30), що доводить ефективність застосованого протоколу дослідження.

Тож наступним кроком було проведення експерименту з гостро ізольованими ГМК детрузора. ГМК у відповідь на Yoda1 мобілізували кальцій з цитоплазму з середнім $F/F_0 = 29 \pm 4\%$ ($n=12$), що було в середньому в 4 рази

меншим за позитивний контроль (рис. 3.31). Варто зазначити, що не всі клітини, які пройшли позитивний тест на нормальну чутливість (тобто відреагували на CCh) проявили чутливість до Yoda1. З 19-ти досліджених клітин 5 були повністю не чутливі до Yoda1.

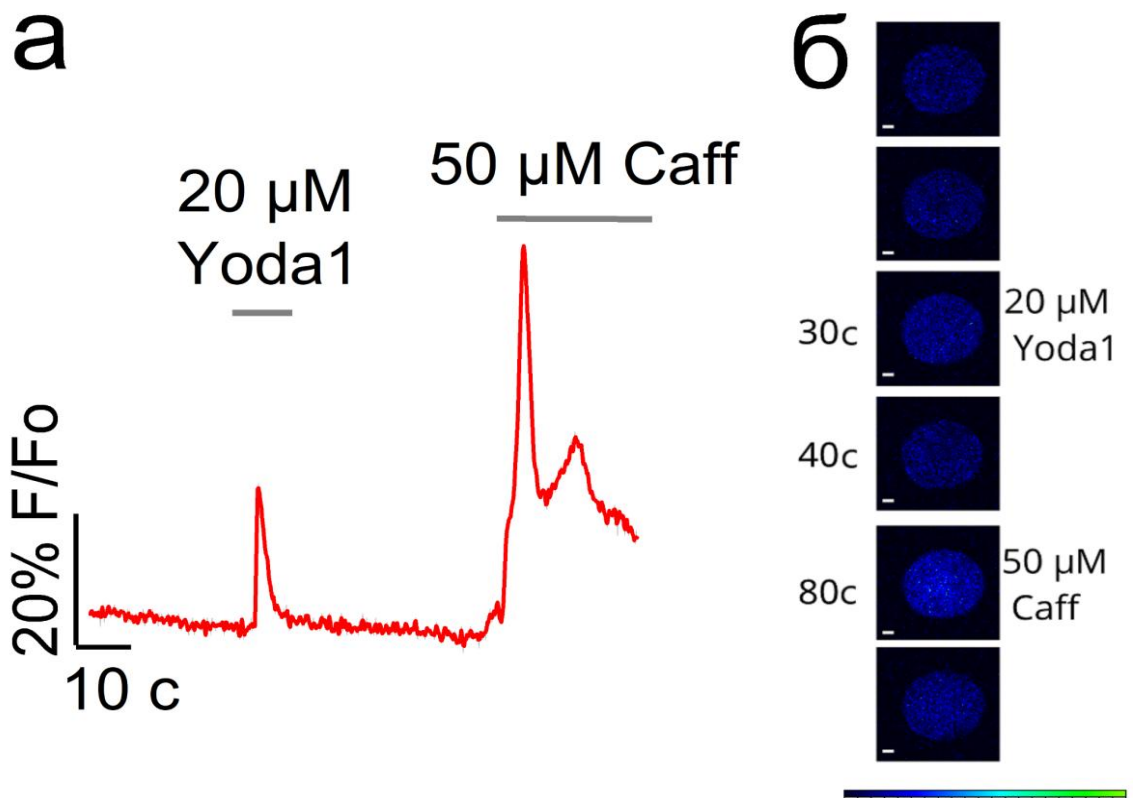


Рис. 3.30 Кальцієві сигнали в нейроні ДКГ у відповідь на прикладання активатора *Piezo1* – *Yoda1*: **а** – репрезентативний графік кальцієвого сигналу з нейрону ДКГ з послідовним прикладанням активаторів: Тіроде – негативний контроль зовнішнім розчином, 20 мкмоль/л *Yoda1* та позитивний контроль – 50 мкмоль/л Кофеїн; **б** – розгортка запису з флуоресцентними ефектами від стимуляції. Величина змін представлена на кольоровій шкалі змін інтенсивності флуоресценції (ΔF), масштабна шкала дорівнює 5 мкм.

Така слабка відповідь на *Yoda1* в порівнянні з контрольним прикладанням CCh вимагає ретельного аналізу результатів. Обробку проводили з записів з максимально чітко визначеними ROI (region of interest – ділянка кадру, з якої детектували середнє значення інтенсивності свічення в порівнянні до фону). В результаті аналізу записів отримали чітке розділення контрольної

групи (де порівнювали аплікацію зовнішнього розчину в якості негативного контролю) з аплікацією Yoda1. Статистичний аналіз за допомогою Т-теста Вельша довів значущість різниці між цими двома групами (рис.3.32).

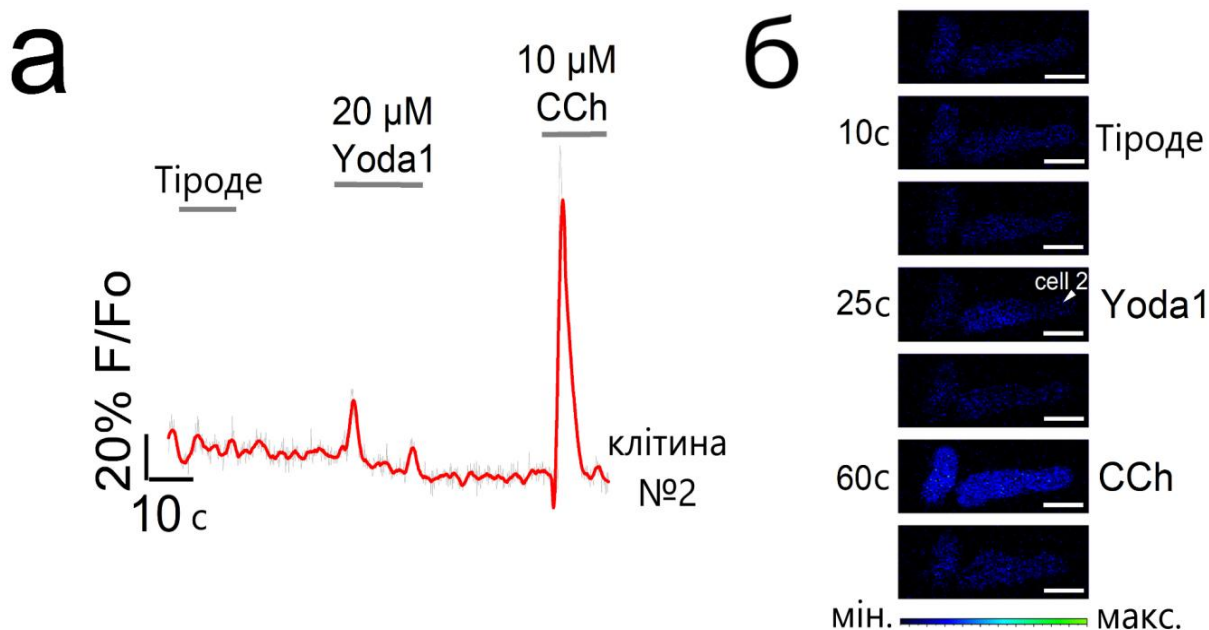


Рис. 3.31 Yoda1-активованій Piezo1-залежний кальцієвий сигнал в ГМК детрузора. **а** – репрезентативний графік кальцієвого сигналу з ГМК детрузора з послідовним прикладанням активаторів: Tirode – негативний контроль зовнішнім розчином, 20 мкмоль/л Yoda1 та позитивний контроль – 10 мкмоль/л CCh; **б** – розгортка запису з флуоресцентними ефектами від стимуляції. Величина змін представлена на кольоровій шкалі змін інтенсивності флуоресценції (ΔF), масштабна шкала дорівнює 10 мкм.

Таким чином, можемо стверджувати що в обох випадках ми спостерігали саме специфічну дію Yoda1 на Piezo1 в ГМК детрузора, з подальшим вивільненням Ca^{2+} у внутрішньоклітинний простір клітини. Неспецифічна дія Yoda1 відома [190], що, втім, наразі не змінило загальне ставлення до використання цього активатора Piezo1. Все ж таке підтвердження присутності Piezo1 у ГМК детрузора не дозволяє вважати Piezo1 можливим каналом, активацію якого ми мали в записах механоактивованими неселективними струмами другої групи, отриманими раніше.

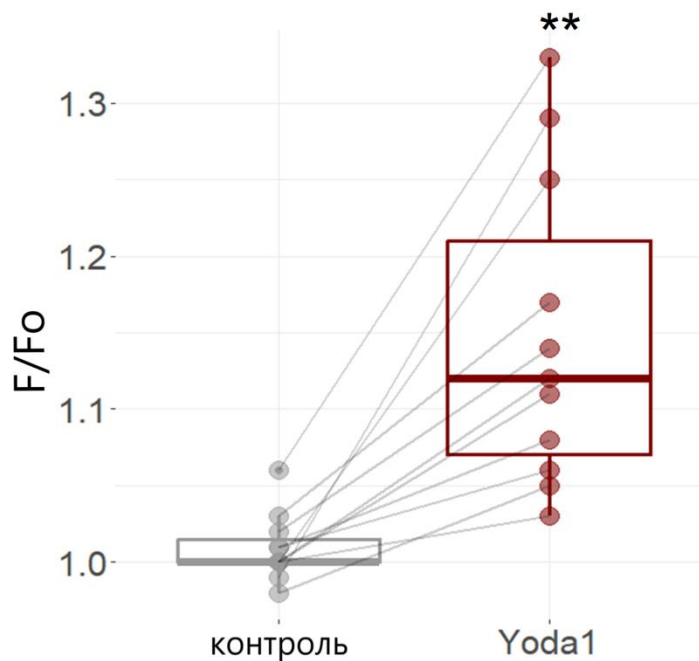


Рис. 3.32 Порівняння F/F_0 низькоамплітудної *Yoda1*-залежної активації *Piezo1* та контролю в ГМК детрузора: середнє значення флуоресценції під час експерименту на піку сигналу негативного контролю та під час прикладання *Yoda1*, окремі точки – значення окремих клітин (рискою поєднані пари даних з одної клітини), $**p < 0,001$ за допомогою *T*-тесту Вельша ($n=12$).

Аби об'єднати отримані результати в загальну систему нами було сформовано кілька гіпотез. Функціональна присутність TREK-1 у групі ГМК, які були дослідженні, повністю співпадають з отриманими результатами записів 3-ї групи клітин за механочутливістю. Це узгоджується з загальноприйнятою наразі тезою щодо ролі TREK-1 як головного механорецептора в детрузорі. Існування двох інших груп ГМК детрузора за механочутливістю досі не були описані у літературі.

Найбільш ймовірною з нашої точки зору є гіпотеза щодо неоднорідної мозаїчності експресії, або більш організованого – міжшарового розділення клітин (ГМК з різних шарів детрузора) (рис. 3.34). На користь цієї гіпотези свідчить показана в літературі неоднорідність експресії деяких генів та розділення ГМК за генерацією спонтанних скорочень [49].

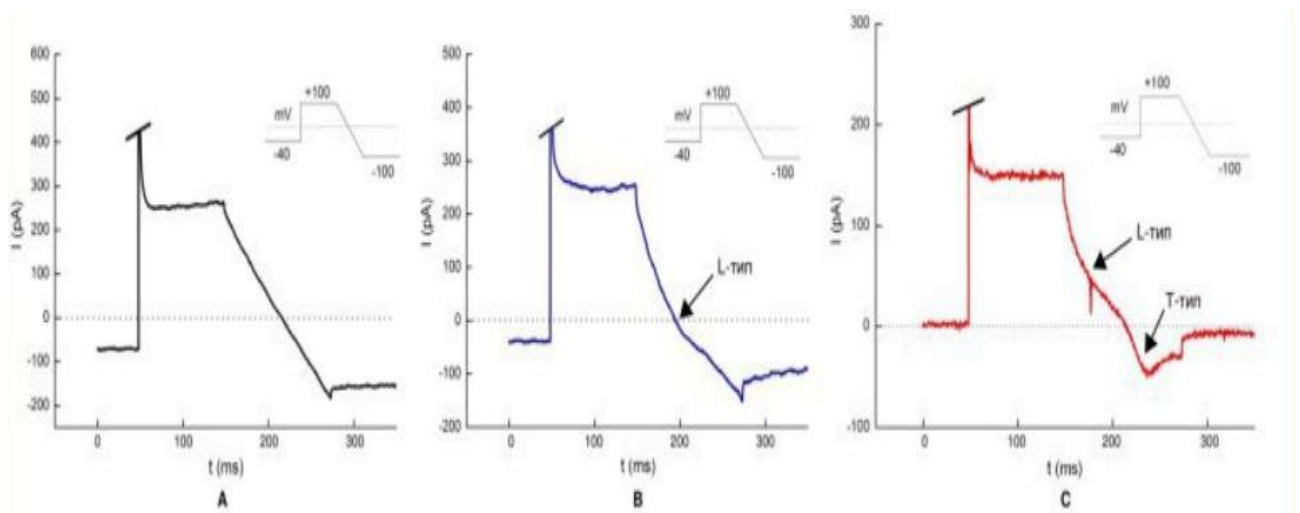


Рис. 3.33 *Різновиди ГМК детрузора за наявності потенціалчутливих струмів Ca_v . А – без генерації потенціалчутливих Ca^{2+} каналів, Б – клітини зі струмами Ca_v L-типу (відкриття за -60 мВ), В – клітини з струмами Ca_v L-типу (що вимагають значної деполяризації та активуються за -30 мВ) та T-типу.*

В наших додаткових дослідках ми реєстрували різницю між ГМК у Ca_v струмах, силу яких підвищували заміщенням солей у розчинах з іонами Ca^{2+} на Ba^{2+} , до яких канали Ca_v мають більшу афінність. В результаті ми з'ясували, що у частині клітин були потенціал чутливі струми, характерні для Ca_v L-типу (з потенціалом активації -60 мВ), частина – кальцієві струми з Ca_v T-типу (які активуються за максимальної деполяризації, що починається з -30 мВ), також були клітини, що мали одночасно струми двох типів, та клітини, що не мали Ca_v струмів взагалі (рис. 3.33), що дозволяє зрозуміти, наскільки провідні властивості ГМК детрузора можуть бути неоднорідними.

Крім цього, аргументом на користь різниці в експресії може бути наявність різниці в щільності струмів в стані спокою в вибірках ГМК, що були розділені за показником механочутливості (рис. 3.5, 3.8, 3.11). Клітини з вихідним K^+ -провідним механостимульованим струмом мали струми спокою зі щільністю в середньому 32 пА/пФ проти 11 пА/пФ у клітин, з неселективним вхідним механостимульованим струмом. Одночасне співпадіння декількох

параметрів говорить на користь гіпотези щодо просторової експресії механочутливих каналів.

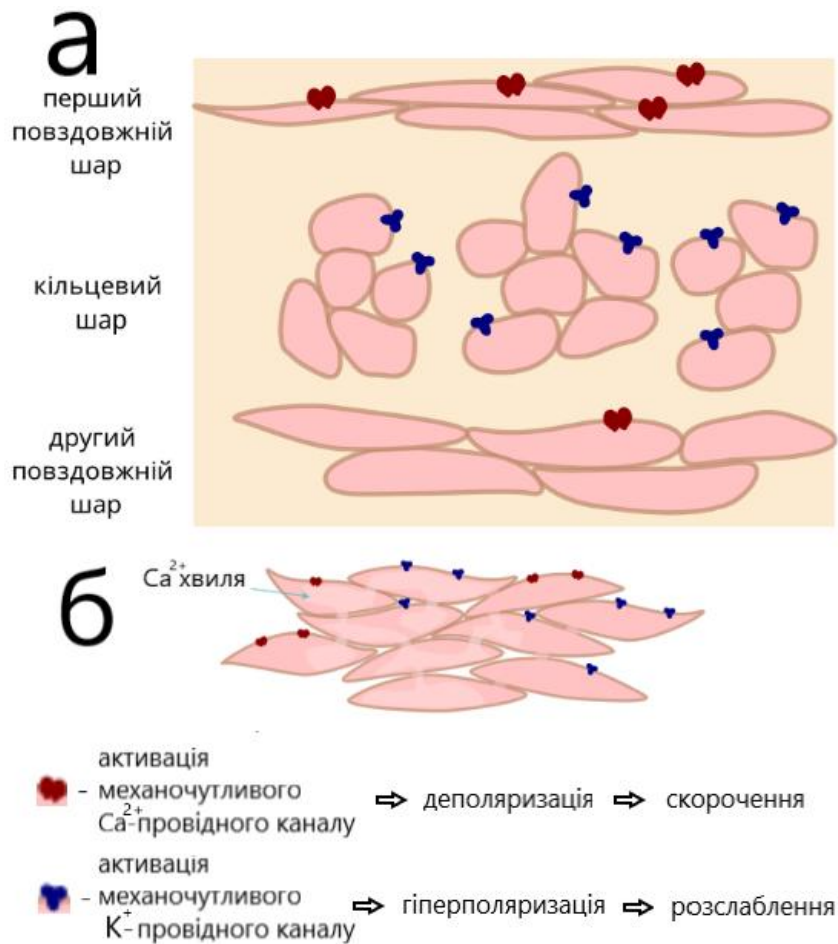


Рис. 3.34 Схема ілюструє різні гіпотези, що можуть пояснити існування 3-х груп ГМК детрузора за механочутливістю. **а** – експресія різних типів механочутливих каналів в залежності від належності до одного, з 3-х шарів. **б** – гіпотеза мозаїчної експресії механочутливих каналів Ca^{2+} -провідного каналу (яким може бути *Piezo1*) та *TREK-1*, активація яких в окремих клітинах поширюється до всього м'яза через нексуси та стимулює м'яз до скорочення або розслаблення.

Менш ймовірною є гіпотеза, що тип реакції (гіперполяризація або деполяризація) на механічний стимул залежить від стану, в якому ГМК знаходяться. Тобто, в такому варіанті клітини у скороченому стані на розтягнення можуть реагувати генеруванням гіперполяризуючого вихідного струму клітину та блокує скоротливий апарат. І навпаки – розслаблена клітина

під час розтягнення має генерувати Ca^{2+} -провідний струм, що активує скорочення. Однак, доказів на користь цієї гіпотези ми не отримали. Загальновідомим є факт, що детрузор формує між окремими гладеньком'язовими клітинами та ІСС так звану мережу (функціональний синцитій) з поєднанням цитоплазми через специфічні трансмембранні білки, що формують “щілинні контакти” – нексуси, які можуть передавати Ca^{2+} -сигнали або електричні потенціали [50]. Завдяки цьому, згенеровані в окремих клітинах з різними механочутливими каналами сигнали можуть поширюватись на весь м'яз та забезпечувати загально-тканинну адекватну відповідь на механічне подразнення.

Деякі дослідники вважають, що окремі шари детрузора можуть значно відрізнятись за своїми властивостями. До прикладу було показано, що внутрішній шар сечового міхура свині відповідає на скорочення повільніше за зовнішній, та має меншу фазову силу скорочення [191].

Крім цього, у роботі [39] показали різницю між поздовжнім та циклічним шарами. В результаті дослідження активного/пасивного скорочення виявили, що поздовжній шар детрузора за пасивного скорочення створює сильніший тиск за циклічний. Крім цього, в іншій праці на кроликах було продемонстровано можливість функціонального розділення поздовжнього і циклічного шарів у формуванні тонічного та фазного скорочень СМ [192]. Тож загалом гіпотеза про міжшаровий розподіл експресії механочутливих K^+ -провідного гіперполяризуючого та неселективного Ca^{2+} -провідного деполаризуючого каналів.

Втім, отримані нами результати щодо функціонування Piezo1 в ГМК детрузора та відсутність TRPV4-специфічних струмів не дають змоги пояснити механоактивовані струми неселективного катіонного каналу, що ми реєстрували в записах 2-ї групи, і це потребує в майбутньому додаткового вивчення.

Вищезгадані результати були опубліковані в працях за номером 3, 8 та 10.

3.6. Yoda1-залежне інгібування АТР-чутливих Калієвих каналів

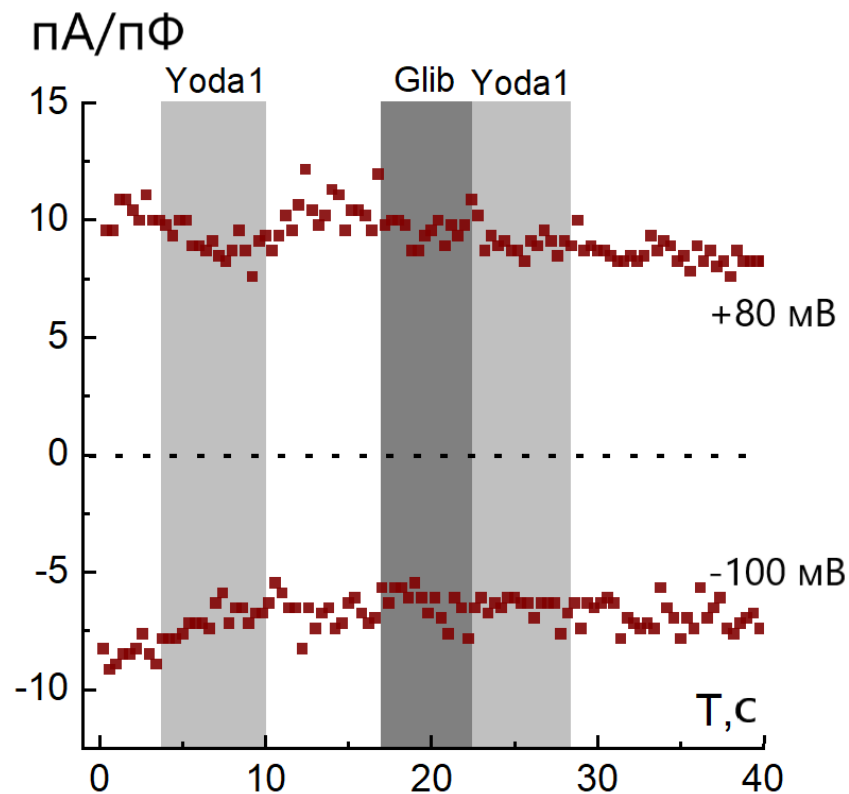


Рис. 3.35 Блокування АТР-чутливих K^+ -провідних каналів глібенкламідом перед прикладанням Yoda1 майже повністю нівелює інгібуючий ефект від прикладання Yoda1: часова розгортка щільності струмів під час аплікації Yoda1, відмикки ефекту, аплікації глібенкламїду (Glib) та повторної аплікації Yoda1.

Отримавши нетиповий ефект від прикладання Yoda1 до ізольованих ГМК детрузора під час експериментів з patch clamp в конфігурації “ціла клітина”, де ми фіксуємо не характерні активацію струмів та деполяризацію клітин через відкриття каналу Piezo1, а інгібування K^+ -провідних струмів з одночасним типовим для Piezo1 кальцієвим входом, ми вирішили ретельніше дослідити цей феномен.

Вважається, що у ГМК детрузора одним з головних K^+ -провідних каналів є механочутливий TREK-1, однак гіперполяризація у ГМК забезпечується й іншими калієвими каналами, серед яких широко представлені в цьому типі тканини BK-канали [68]. BK-канали активуються за присутності вільного Ca^{2+} ,

тоді як, у нашому випадку Ca^{2+} сигнал викликає зниження вихідного струму та пригнічення високоамплітудних флуктуацій, характерних для ВК-каналів (рис.3.27).

Літературних даних, в яких б описувався схожий феномен, досить мало. Відомо, що гладеньком'язові клітини, крім чутливих до кальцію калієвих каналів експресують значну кількість інших K^+ -провідних каналів (K_v , K_{ir}), що виконують критично важливу функцію підтримання нормального потенціалу спокою або гіперполяризацію клітини у випадку нестачі ресурсів для скорочення. Одним з K^+ -провідних каналів ГМК, який опосередковано регулюється іонами Ca^{2+} , є АТР-чутливий Калієвий канал ($\text{K}_{\text{АТР}}$) вихідного випрямлення (Kir1.6/SUR2B) [71].

Аби перевірити можливий зв'язок між Piezo1 та $\text{K}_{\text{АТР}}$, ми провели низку експериментів. На одній дослідній клітині ($n=4$) аплікували Yoda1 для встановлення інтенсивності інгібування, після чого відмивали ефект до повернення нормальної щільності струмів. Далі до клітини прикладали блокатор $\text{K}_{\text{АТР}}$ – розчин 10 мкмоль/л глібенкламід, та на його тлі – 20 мкмоль/л Yoda1 (рис. 3.35).

В результаті, у досліджених клітин спостерігали інгібування фонових провідностей від прикладання Yoda1 на $1,6 \pm 0,8$ пА/пФ (на рівні 20% від контрольної щільності струмів), подібно до описаного в попередніх експериментах. Після пригнічення $\text{K}_{\text{АТР}}$ каналів блокатором – глібенкламідом, різниці між глібенкламід-інгібованими струмами та струмами під час прикладання Yoda1 не спостерігали (рис. 3.36).

Таким чином, з наших результатів випливає, що інгібування $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналів глібенкламідом та Yoda1 -опосередковане інгібування K -струмів пов'язані між собою. На ВАХ цих струмів за наявності 2 мкмоль/л АТР в внутрішньому розчині доволі складно побачити інгібування K^+ -струму, оскільки без стимуляції потенціал реверсії знаходиться біля -40 мВ, що означає, що струм має змішану провідність (K^+ , Ca^{2+} , Na^+) з не значною перевагою K^+ струмів (V_r за рівнянням Нернста для іонів K^+ становить -81 мВ, а для Na^+ за цих же умов

+120 мВ) (рис. 3.37). Практичне накладання кривих свідчить про те, що ефект від прикладання Yoda1 та глібенкламідую діють на один і той самий кінцевий об'єкт.

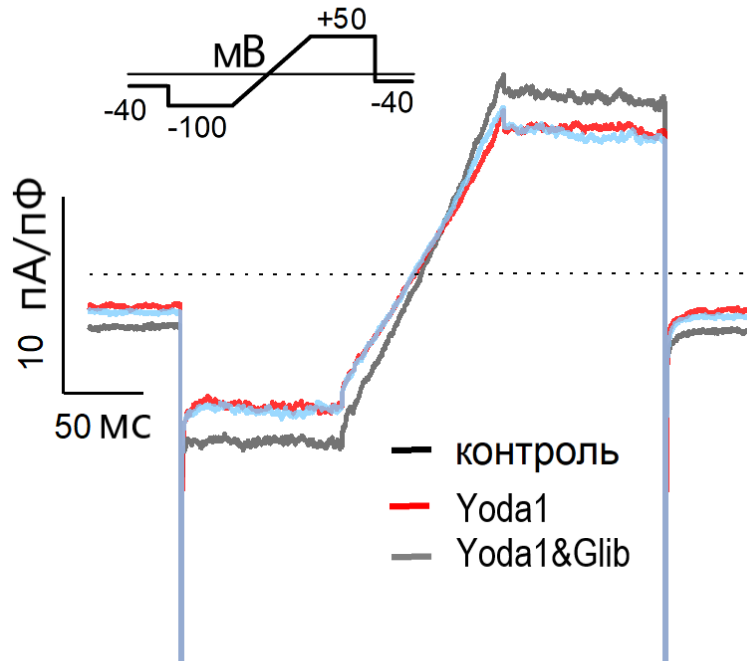


Рис. 3.36 *Репрезентативні струми з Yoda1-залежним інгібуванням K^+ -струмів в ГМК детрузора з одночасним інгібуванням K_{ATP} каналів прикладанням глібенкламідую.*

Тож, аби посилити ефект інгібування K^+ -струмів, ми посилили активність K_{ATP} каналів, шляхом виключення солей Na-ATP з внутрішньоклітинного розчину. В результаті ми отримали значне збільшення K^+ -провідностей зі зміщенням потенціалу реверсії струмів без прикладання інгібіторів до - 80 мВ (тобто в цих умовах K^+ -провідність була домінуючою) (рис. 3.38). На ВАХ можна помітити збільшення вхідного випрямлення, що починається з 0 мВ до + 65 мВ, характерне для K_{ATP} (рис. 3.28), після чого домінуючими стають струми, характерні для $KCa1.1$ (BK-канал) [187,193]. Глібенкламід-опосередковане інгібування в умовах відсутності АТР на загальній ВАХ проявлялось інтенсивніше ($n=5$) і становило в середньому $3,0 \pm 1,4$ пА/пФ, як і інгібування

через Yoda1. Зміщення потенціалу реверсії для K^+ тут відбувається до -84 мВ (загальноклітинний струм). Під час інгібування K_{ATP} спостерігали за позитивного потенціалу зростання щільності струму, та збільшення вихідного випрямлення.

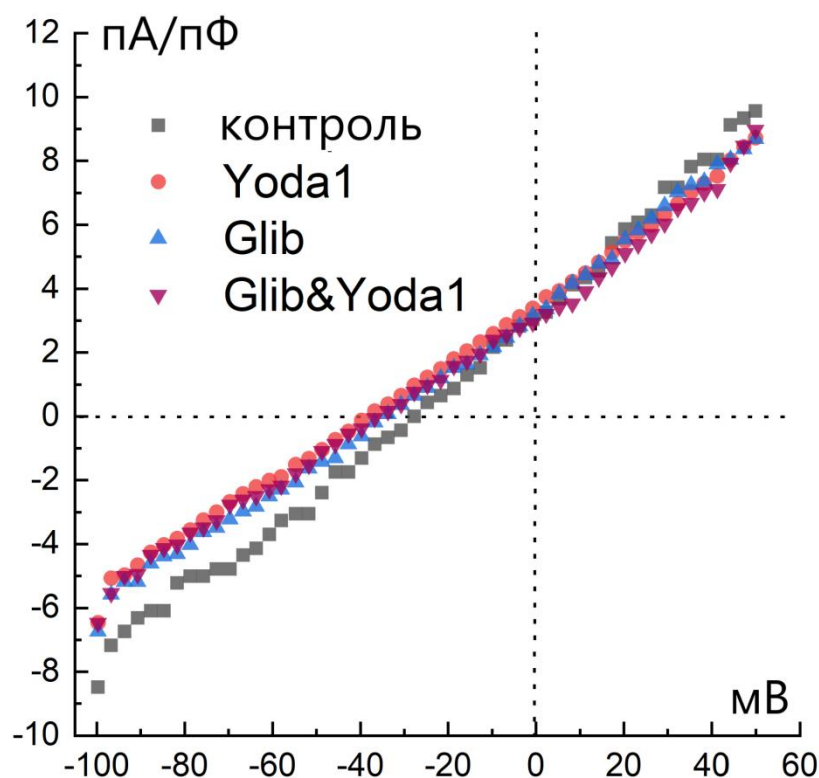


Рис. 3.37 Репрезентативна вольт-амперна характеристика Yoda1-активованих струмів в ГМК детрузора: Glib – прикладання глібенкламіду, Glib&Yoda1 – прикладання Yoda1 на тлі глібенкламіду.

Схожим чином проявляється інгібування K_{ATP} в умовах заміщення АТР у роботах з K_{atp} каналами на ГМК судин, де за нормальної концентрації АТР прикладання глібенкламіду зменшила інтенсивність струмів, проте лише за відсутності АТР інгібування глібенкламідом створило вихідне випрямлення загальних струмів в клітині [194]. Вихідного випрямлення у записах з нормальним фізіологічним рівнем АТР немає через скорочений протокол стимуляції з піковим V_{com} на рівні $+0$ мВ, тоді як випрямлення в експериментах без АТР яскраво виражене вихідне випрямлення починалось після $V_{com} + 60$ мВ.

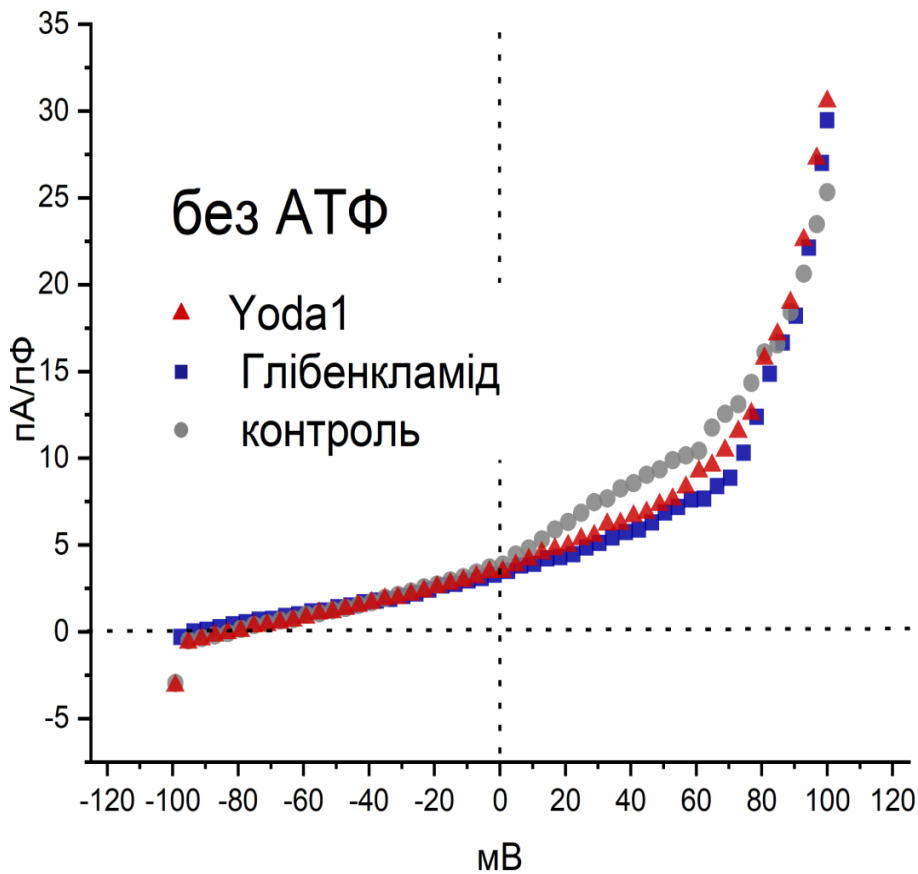


Рис. 3.38 *Репрезентативна вольт-амперна характеристика Yoda1-активованих струмів в ГМК детрузора за посилення K_{ATP} струмів через видалення АТФ з внутрішньо піпеткового розчину. сірим – контрольний струм, синім – струм під час прикладання глібенкламід, червоним – струм під прикладання Yoda1 разом з глібенкламідом.*

Тож інгібування K^+ -провідних глібенкламід-чутливих струмів в наших результатах говорить про можливість взаємозв'язку між активністю Piezo1 та K_{ATP} . Зустрічаються роботи, що демонструють інгібування канонічно відкритих АТР-чутливих K^+ каналів спричинене збільшенням концентрації Ca^{2+} в клітині [194–196]. Хоча й напряду чутливості до іонів Ca^{2+} в K_{ATP} не було показано, в судинних ГМК він може впливати на роботу каналу через фосфорилування/дефосфорилування, активуючи кальцій-чутливу фосфатазу – кальциневрин (CaN) або через Ca^{2+} /Кальмодулін-взаємодію та наступне утворення комплексу з протеїнкіназою II (РК II) [195,196]. Ca^{2+} /Кальмодулін/РКII комплекс може впливати на роботу K_{ATP} через

інгібування протеїнкінази G (PKG), яка за нормальних умов стабілізує відкриту конфігурацію K_{ATP} [197]. Кальцинеуринове дефосфорилування K_{ATP} пов'язане з попереднім цАМФ сигналюванням, яке через активацію каталізуючої субодиниці протеїнкінази А гідролізує АТР, відщеплюючи $-PO_4^{3-}$ та переносить його на серин/треоніновий сайт K_{ATP} [194] (рис. 3.39).

Відсутність ж Piezo1-подібних струмів під час селективної активації з Yoda1 при наявності описаних вище процесів може свідчити на користь гіпотези, що канал Piezo1 розташований не у цитоплазматичній мембрані, струми через яку ми реєструємо під час patch clamp в конфігурації “ціла клітина”, а бути у внутрішніх мембранах, до прикладу у саркоплазматичній мембрані.

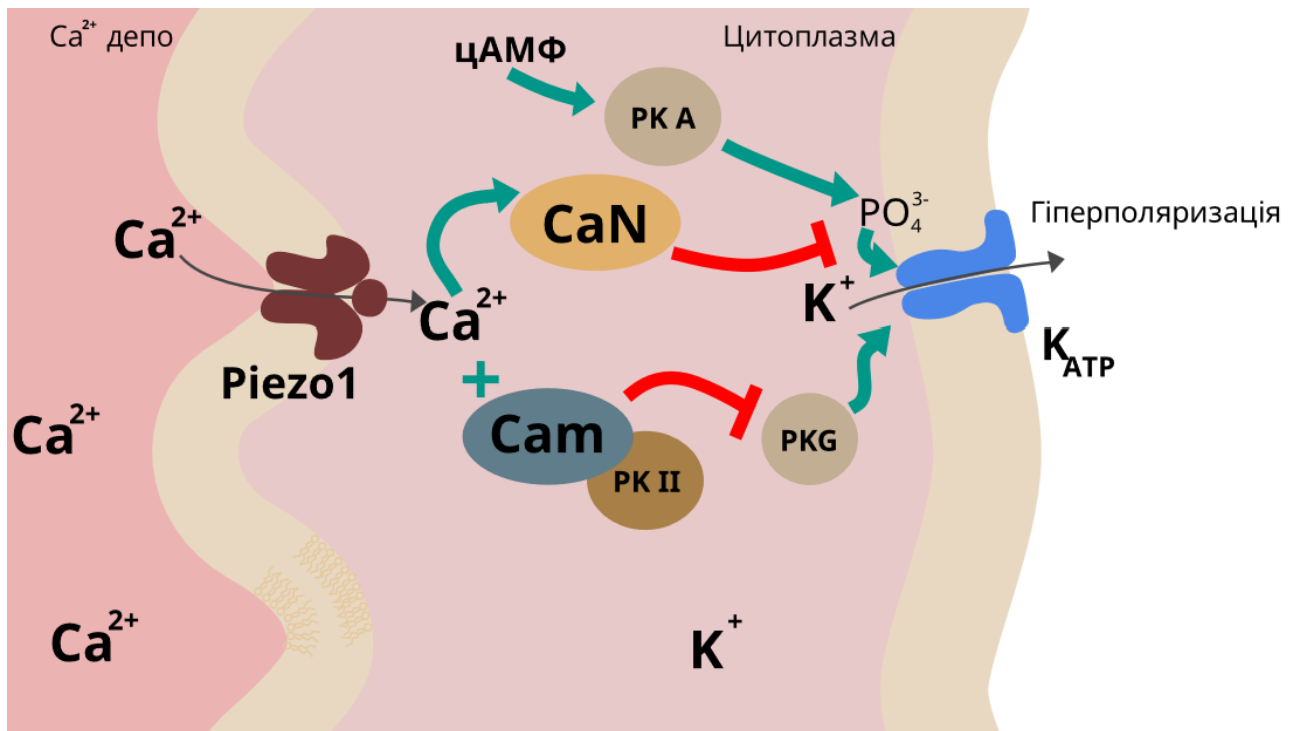


Рис. 3.39 Схема з ілюстрацією гіпотетичної моделі сигнального шляху з двома можливими сигнальними шляхами на основі існуючих механізмів інгібування K_{ATP} , в яких мобілізація іонів Ca^{2+} з Piezo1 можуть інгібувати глібенклamid-чутливі K^+ -провідні струми у ГМК детрузора СМ: з залученням CaN та Ca^{2+} /Cam/PKII.

Це може бути досить тривіальним припущенням, адже вперше білок Piezo1 знайшли саме як трансмембранний білок клітинної лінії з епітеліальних клітин легень (під першою назвою Fam38A) у саркоплазматичному ретикулюмі [198]. Також у недавній роботі [199] показали на легневих ГМК людини Yoda1-залежне вивільнення Ca^{2+} з внутрішніх депо. Для цього вони застосовували до клітин безкальцієвий розчин з активатором каналу Piezo1 та спостерігали активацію кальційчутливого барвника Fura-2. В їхніх висновках канал Piezo1 розташований у внутрішніх депо на рівні з плазматичною мембраною.

Тож підсумовуючи, нами було вперше показано неоднорідність механочутливих властивостей ГМК детрузора, продемонстрований механоактивованій Ca^{2+}/Na^{+} -струм та функціональна присутність Piezo1. Проте, природа механочутливого Ca^{2+}/Na^{+} -провідного каналу та відкриття причини існування трьох груп ГМК за типом механочутливості та функціональна роль Piezo1 в ГМК потребує майбутніх досліджень.

Вищезгадані результати були опубліковані в працях за номером 9 та 10.

ВИСНОВКИ

У роботі досліджено експресію механочутливих іонних каналів TREK-1, TRPV4 та Piezo1 та їхню участь у механочутливості ГМК детрузора. Було досліджено електрофізіологічний внесок K^+ -провідних та Ca^{2+}/Na^+ -провідних каналів у механочутливість гладеньком'язових клітин детрузора, їх здатність до генерування Ca^{2+} сигналів та участі у молекулярних сигнальних шляхах та взаємозв'язок активності Piezo1 з АТР-чутливими K^+ каналами. Із проведеної роботи відповідно до поставлених завдань можна зробити наступні висновки:

1. Сечовий міхур має незалежну від нервової системи механочутливість. Механізм механочутливості може регулюватись на рівні гладеньких м'язів детрузора та забезпечується механочутливими іонними каналами, оскільки практично повністю втрачається внаслідок впливу неселективного блокатора механочутливих каналів - іонів Gd^{3+} .

2. Детрузор щура експресує усі чотири досліджувані канали із значною перевагою *kcnk2* (гену, що кодує канал TREK-1), тоді як уротелій має перевагу у рівні експресії *piezo2*, *piezo1* та *trpv4* генів.

3. Імуноцитохімічні дослідження показали, що канали Piezo1 та TRPV4 локалізуються здебільшого на периферії клітини. Антитіла до Piezo2 не зв'язались з ізольованими гладеньком'язовими клітинами детрузора.

4. За реакцією на гідродинамічну стимуляцію гладеньком'язові клітини детрузора щура можна розділити на три популяції: перша (55%) електрофізіологічно нечутлива до механічного стимулу, друга (26%) генерує вхідний струм з Ca^{2+}/Na^+ -провідностями, третя (19%) має лише вихідний механоактивованій струм з K^+ -провідністю.

5. TREK-1 виконує провідну роль у механочутливості гладеньком'язових клітин детрузора, однак не у всіх досліджених популяціях клітин. Інгібування TREK-1 блокує механочутливість з K^+ -провідністю, але зберігаються TREK-1 незалежні механоактивовані Ca^{2+}/Na^+ -провідні струми.

6. TRPV4 не функціонує у ізольованих ГМК детрузора СМ щура, що підтверджується відсутністю як трансмембранних струмів, так і Ca^{2+} -сигналів.

7. Селективна активація Piezo1 викликає підвищення цитоплазматичної концентрації Ca^{2+} , що доводить функціональну присутність каналу в гладеньком'язових клітинах детрузора.

8. Показане нами Yoda1-залежне інгібування вихідних K^{+} -струмів може бути пов'язане з інгібуванням K_{ATP} -каналу через Piezo1-опосередкований Ca^{2+} .

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. McCarthy M, McCarthy L. The evolution of the urinary bladder as a storage organ: scent trails and selective pressure of the first land animals in a computational simulation. *SN Appl Sci.* 2019 Dec 29;1(12):1727.
2. Fotter R, Riccabona M. Funktionelle störungen des unteren harntrakts im kindesalter. *Radiologe.* 2005;
3. Jung J, Kim A, Yang SH. The Innovative Approach in Functional Bladder Disorders: The Communication between Bladder and Brain-Gut Axis. *International Neurourology Journal.* 2023.
4. Gillespie JI, Van Koevinge GA, De Wachter SG, De Vente J. On the origins of the sensory output from the bladder: the concept of afferent noise. *BJU Int.* 2009 May 1 ;103(10):1324–33. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1464-410X.2009.08377.x>
5. 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(12):681–7.
6. Pineda RH, Hypolite J, Lee S, Jr AC, Iguchi N, Meacham RB, et al. Altered detrusor contractility and voiding patterns in mice lacking the mechanosensitive TREK-1 channel. *BMC Urol.* 2019;19(40):1–15.
7. Lei Q, Pan X qing, Chang S, Malkowicz SB, Guzzo TJ, Malykhina AP. Response of the human detrusor to stretch is regulated by potassium channel. *J Physiol.* 2014;592(14):3013–30.
8. Pineda RH, Nedumaran B, Hypolite J, Pan XQ, Wilson S, Meacham RB, et al. Altered expression and modulation of the two-pore-domain (K_{2P}) mechanogated potassium channel TREK-1 in overactive human detrusor. *Am J Physiol Physiol.* 2017 Aug 1;313(2):F535–46.
9. Xie AX, Iguchi N, Malykhina A. The lack of mechanosensitive trek-1 channel mimics the development of aging-related bladder phenotypes in mice. *J Urol.* 2023 Apr;209(Supplement 4).

10. Isogai A, Lee K, Mitsui R, Hashitani H. Functional coupling of TRPV4 channels and BK channels in regulating spontaneous contractions of the guinea pig urinary bladder. *Pflügers Arch - Eur J Physiol*. 2016;468(9):1573–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-016-1863-0>
11. Li Z, Lin D, Luo C, Wei P, Deng B, Li K, et al. The Expression and Function of Piezo Channels in Bladder. *Bladder*. 2023 Oct 30;10:e21200008.
12. Avelino A, Charrua A, Frias B, Cruz C, Boudes M, de Ridder D, et al. Transient receptor potential channels in bladder function. *Acta Physiol*. 2013 Jan;207(1):110–22.
13. Petrov AG, Usherwood PNR. Mechanosensitivity of cell membranes - Ion channels, lipid matrix and cytoskeleton. *European Biophysics Journal*. 1994.
14. Hudspeth AJ. Mechanoelectrical Transduction by Hair Cells in the Acousticolateralis Sensory System. *Annu Rev Neurosci*. 1983 Mar;6(1):187–215.
15. Guharay F, Sachs F. Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J Physiol*. 1984 Jul 1 ;352(1):685. Available from: </pmc/articles/PMC1193237/?report=abstract>
16. Methfessel C, Witzemann V, Takahashi T, Mishina M, Numa S, Sakmann B. Patch clamp measurements on *Xenopus laevis* oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels. *Pflugers Arch*. 1986 Dec;407(6):577–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2432468/>
17. Ranade SS, Syeda R, Patapoutian A. Mechanically Activated Ion Channels. *Neuron*. 2015 Sep 9;87(6):1162. Available from: </pmc/articles/PMC4582600/>
18. Wu J, Lewis AH, Grandl J. Touch, Tension, and Transduction - The Function and Regulation of Piezo Ion Channels. *Trends Biochem Sci*. 2017 Jan;42(1):57–71.

19. Lennertz RC, Kossyreva EA, Smith AK, Stucky CL. TRPA1 Mediates Mechanical Sensitization in Nociceptors during Inflammation. Bacceti ML, editor. PLoS One. 2012 Aug 23 ;7(8):e43597. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0043597>
20. He BH, Christin M, Mouchbahani-Constance S, Davidova A, Sharif-Naeini R. Mechanosensitive ion channels in articular nociceptors drive mechanical allodynia in osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2017 Dec ;25(12):2091–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28882752>
21. Gu Y, Gu C. Physiological and Pathological Functions of Mechanosensitive Ion Channels. *Mol Neurobiol*. 2014 Oct 15;50(2):339–47.
22. Bazopoulou D, Tavernarakis N. Mechanosensitive Ion Channels in *Caenorhabditis elegans*. In: Hamill OP, editor. *Current Topics in Membranes*. Elsevier Masson SAS; 2007. p. 49–79.
23. Prole DL, Taylor CW. Identification and analysis of putative homologues of mechanosensitive channels in pathogenic protozoa. PLoS One. 2013 Jun 13;8(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23785469/>
24. Coste B, Xiao B, Santos JS, Syeda R, Grandl J, Spencer KS, et al. Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature*. 2012 Mar 8;483(7388):176–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22343900/>
25. Dionysopoulou M, Yan N, Wang B, Pliotas C, Diallinas G. Genetic and cellular characterization of MscS-like putative channels in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Channels*. 2022 Dec 31;16(1):148–58.
26. Panicker JN. Overview of the Neural Control of the Lower Urinary Tract. In: *Handbook of Neurourology*. Singapore: Springer Nature Singapore; 2023. p. 75–9.
27. Patel AK, Chapple CR. Anatomy of the lower urinary tract. *Surg*. 2008 Apr;26(4):127–32.
28. Santoro C, Garcia MJS, Walter XA, You J, Theodosiou P, Gajda

I, et al. Urine in Bioelectrochemical Systems: An Overall Review. *Chemelectrochem.* 2020 Mar 3;7(6):1312. Available from: [/pmc/articles/PMC7161917/](#)

29. Pradidarcheep W, Wallner C, Dabhoiwala NF, Lamers WH. Anatomy and Histology of the Lower Urinary Tract. In 2011. p. 117–48.

30. Smith NJ, Hinley JS, Varley CL, Eardley I, Trejdosiewicz LK, Southgate J. The human urothelial tight junction: claudin 3 and the ZO-1 α + switch. *Bladder.* 2015 Jan 19;2(1):e9. Available from: [/pmc/articles/PMC4530542/](#)

31. Khandelwal P, Abraham SN, Apodaca G. Cell biology and physiology of the uroepithelium. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2009 ;297(6):F1477. Available from: [/pmc/articles/PMC2801337/](#)

32. Birder L, Andersson K erik. Urothelial Signaling. *Physiol Rev.* 2013;93:653–80.

33. Paner GP, Shen SS, Lapetino S, Venkataraman G, Barkan GA, Quek ML, et al. Diagnostic Utility of Antibody to Smoothelin in the Distinction of Muscularis Propria From Muscularis Mucosae of the Urinary Bladder. *Am J Surg Pathol.* 2009 Jan;33(1):91–8.

34. Heppner TJ, Layne JJ, Pearson JM, Sarkissian H, Nelson MT. Unique properties of muscularis mucosae smooth muscle in guinea pig urinary bladder. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;301(6):351–62.

35. Fry CH, Vahabi B. The Role of the Mucosa in Normal and Abnormal Bladder Function. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2016 Oct 1 ;119:57–62. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bcpt.12626>

36. Dixon JS, Gosling JA. Histology and fine structure of the muscularis mucosae of the human urinary bladder. *J Anat.* 1983 Mar;136(Pt 2):265–71.

37. Bolla SR, Odeluga N, Amraei R, Jetti R. Histology, Bladder. *StatPearls.* 2023 Feb 25 ; Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540963/>

38. Andersson KE, Arner A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2004 Jul ;84(3):935–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15269341/>

39. Borsdorf M, Tomalka A, Stutzig N, Morales-Orcajo E, Böl M, Siebert T. Locational and Directional Dependencies of Smooth Muscle Properties in Pig Urinary Bladder. *Front Physiol.* 2019;10:63.

40. Freire VS, Burkhard FC, Schmitz A, Kessler TM, Monastyrskaya K. Structural differences between the bladder dome and trigone revealed by mRNA expression analysis of cold-cut biopsies. *BJU Int.* 2010;108:126–35.

41. Dixon JS, Gosling JA. Ultrastructure of smooth muscle cells in the urinary system. In: *Ultrastructure of Smooth Muscle*. Boston, MA: Springer US; 1990. p. 153–69.

42. Ross M, Pawlina W. *Histology Atlas*. 7th ed. Taylor C, editor. Philadelphia, USA: Wolters Kluwer Health; 2011. 984 p.

43. Donadon M, Santoro MM. The origin and mechanisms of smooth muscle cell development in vertebrates. *Dev.* 2021 Apr 1 ;148(7). Available from: <https://dx.doi.org/10.1242/dev.197384>

44. Tasian G, Cunha G, Baskin L. Smooth Muscle Differentiation and Patterning in the Urinary Bladder. *Differentiation.* 2010 Sep;80(0):106. Available from: </pmc/articles/PMC3712869/>

45. Cao M, Tasian G, Wang MH, Liu B, Cunha G, Baskin L. Urothelium-derived Sonic hedgehog promotes mesenchymal proliferation and induces bladder smooth muscle differentiation. *Differentiation.* 2010 Apr;79(4–5):244–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20227816/>

46. Majesky MW. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Jun ;27(6):1248–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17379839/>

47. Sinha S, Iyer D, Granata A. Embryonic origins of human vascular smooth muscle cells: implications for in vitro modeling and clinical application.

Cell Mol Life Sci. 2014 ;71(12):2271. Available from: /pmc/articles/PMC4031394/

48. MUELLNER SR. The physiology of micturition. *J Urol.* 1951;
49. Lau CL, Chacko S. Identification of two types of smooth muscle cells from rabbit urinary bladder. *Tissue Cell.* 1996;28(3):339–55.
50. Padmakumar M, Brain KL. Classification of Cells in Detrusor Smooth Muscle Syncytium Based on Analysis of Spontaneous Electrical Activities. *IEEE Recent Adv Intel Comput Syst.* 2015;(12):212–7.
51. Liu Q, Sun B, Zhao J, Wang Q, An F, Hu X, et al. Increased Piezo1 channel activity in interstitial Cajal-like cells induces bladder hyperactivity by functionally interacting with NCX1 in rats with cyclophosphamide- induced cystitis. *Exp Mol Med.* 2018; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-018-0088-z>
52. Wiseman OJ, Fowler CJ, Landon DN. The role of the human bladder lamina propria myofibroblast. *BJU Int.* 2003 Jan 1 ;91(1):89–93. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1464-410X.2003.03802.x>
53. McCloskey KD. Bladder interstitial cells: an updated review of current knowledge. *Acta Physiol.* 2013 Jan 1 ;207(1):7–15. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/apha.12009>
54. Johnston L, Woolsey S, Cunningham RMJ, O’Kane H, Duggan B, Keane P, et al. Morphological expression of KIT positive interstitial cells of Cajal in human bladder. *J Urol.* 2010 Jul ;184(1):370–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20488490/>
55. Johnston L, Cunningham RMJ, Young JS, Fry CH, McMurray G, Eccles R, et al. Altered distribution of interstitial cells and innervation in the rat urinary bladder following spinal cord injury. *J Cell Mol Med.* 2012 Jul ;16(7):1533. Available from: /pmc/articles/PMC3823221/
56. Cunningham RMJ, Larkin P, McCloskey KD. Ultrastructural properties of interstitial cells of Cajal in the Guinea pig bladder. *J Urol.* 2011

- Mar ;185(3):1123–31. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21255801/>
57. Gillespie JI, Markerink-Van Ittersum M, De Vente J. Interstitial cells and cholinergic signalling in the outer muscle layers of the guinea-pig bladder. *BJU Int.* 2006 Feb ;97(2):379–85. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16430651/>
58. Creed KE. Membrane properties of the smooth muscle membrane of the guinea-pig urinary bladder. *Pflugers Arch.* 1971 ;326(2):115–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5105450>
59. Sui GP, Wu C, Fry CH. The electrophysiological properties of cultured and freshly isolated detrusor smooth muscle cells. *J Urol.* 2001 Feb ;165(2):627–32. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11176449>
60. Creed KE, Malmgren A. The effect of cromakalim on the electrical properties of and [86Rb+] efflux from normal and hypertrophied rat bladder. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1993 Apr ;20(4):215–21. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8485922>
61. 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 Jan 19;13(1):e0190016.
62. Montgomery BS, Fry CH. The action potential and net membrane currents in isolated human detrusor smooth muscle cells. *J Urol.* 1992 Jan ;147(1):176–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1729528>
63. Brading AF. Spontaneous activity of lower urinary tract smooth muscles: Correlation between ion channels and tissue function. *Journal of Physiology.* 2006.
64. Andersson K erik, Arner A. Urinary Bladder Contraction and Relaxation : Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev.* 2003;84(467):935–86.
65. Forman A, Andersson K -E, Maigaard S. Effects of Calcium

Channel Blockers on the Female Genital Tract. *Acta Pharmacol Toxicol* (Copenh). 1986;

66. 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;

67. Igawa Y, Kumano S, Aizawa N, Saito Y, Ito H, Watanabe S, et al. Changes in the function and expression of T-type and N-type calcium channels in the rat bladder after bladder outlet obstruction. *J Urol*. 2014;

68. Malysz J, Petkov G V. Urinary bladder smooth muscle ion channels: expression, function, and regulation in health and disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2020 Aug 1;319(2):F257–83.

69. Wuest M, Hiller N, Braeter M, Hakenberg OW, Wirth MP, Ravens U. Contribution of Ca^{2+} influx to carbachol-induced detrusor contraction is different in human urinary bladder compared to pig and mouse. *Eur J Pharmacol*. 2007 Jun 22 ;565(1–3):180–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17395173>

70. 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 Feb ;147 Suppl 2(Suppl 2):S41-55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16465183>

71. Quayle JM, Nelson MT, Standen NB. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev*. 1997 Oct ;77(4):1165–232. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9354814>

72. Afeli SAY, Malysz J, Petkov G V. Molecular Expression and Pharmacological Evidence for a Functional Role of Kv7 Channel Subtypes in Guinea Pig Urinary Bladder Smooth Muscle. *PLoS One*. 2013 Sep 20;8(9):e75875.

73. Petkov G V. Chapter 16 - Ion Channels. In: Miles Hacker, William Messer KB, editor. *Pharmacology*. Elsevier; 2009. p. 387–427.

74. Petkov G V. Role of potassium ion channels in detrusor smooth muscle function and dysfunction. *Nat Rev Urol.* 2012 Jan 13;9(1):30–40.
75. Yoo PB, Woock JP, Grill WM. Somatic Innervation of the Feline Lower Urinary Tract. *Brain Res.* 2008 Dec 12 ;1246:80. Available from: [/pmc/articles/PMC2704737/](#)
76. Mahony DT, Laferte RO, Blais DJ. Integral storage and voiding reflexes: Neurophysiologic concept of continence and micturition. *Urology.* 1977 Jan 1;9(1):95–106.
77. Blanco L, Ros CM, Tarragón E, Fernández-Villalba E, Herrero MT. Functional role of Barrington’s nucleus in the micturition reflex: Relevance in the surgical treatment of Parkinson’s disease. *Neuroscience.* 2014 Apr 25;266:150–61.
78. Young JS, Johnston L, Soubrane C, Mccloskey KD, McMurray G, Eccles R, et al. The passive and active contractile properties of the neurogenic , underactive bladder. *BJU Int.* 2012;111:355–61.
79. Merrill L, Gonzalez EJ, Girard BM, Vizzard MA. Receptors, channels, and signalling in the urothelial sensory system in the bladder. *Nat Rev Urol.* 2016;13(4):193–204.
80. Birder LA. Urinary bladder urothelium: Molecular sensors of chemical/thermal/mechanical stimuli. *Vascul Pharmacol.* 2006;
81. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara JO, et al. Autonomic Regulation of the Bladder. 2001 ; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10886/>
82. Yoshimura N, Chancellor MB. Neurophysiology of Lower Urinary Tract Function and Dysfunction. *Rev Urol.* 2003 ;5(Suppl 8):S3. Available from: [/pmc/articles/PMC1502389/](#)
83. Zderic SA. Neuroscience: A New Golden Age for Neurourology. *Curr Biol.* 2019 Sep 23;29(18):R880–3.
84. Verstegen AMJ, Vanderhorst V, Gray PA, Zeidel ML, Geerling JC. Barrington’s nucleus: Neuroanatomic landscape of the mouse “pontine

micturition center.” *J Comp Neurol.* 2017 Jul 18;525(10):2287–309.

85. Keller JA, Chen J, Simpson S, Wang EHJ, Lilascharoen V, George O, et al. Voluntary urination control by brainstem neurons that relax the urethral sphincter. *Nat Neurosci.* 2018 Sep 13;21(9):1229–38.

86. Andersson KE. Bladder activation: afferent mechanisms. *Urology.* 2002 May;59(5):43–50.

87. Smith PR, Mackler SA, Weiser PC, Brooker DR, Ahn YJ, Harte BJ, et al. Expression and localization of epithelial sodium channel in mammalian urinary bladder. *Am J Physiol.* 1998 Jan ;274(1):F91-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9458827>

88. Miyamoto T, Mochizuki T, Nakagomi H, Kira S, Watanabe M, Takayama Y, et al. Functional Role for Piezo1 in Stretch-evoked Ca²⁺ Influx and ATP Release in Urothelial Cell Cultures. *J Biol Chem.* 2014 Jun;289(23):16565–75.

89. Girard BM, Merrill L, Malley S, Vizzard MA. Increased TRPV4 Expression in Urinary Bladder and Lumbosacral Dorsal Root Ganglia in Mice with Chronic Overexpression of NGF in Urothelium. *J Mol Neurosci.* 2013;51(2):602–14.

90. Boudes M, Uvin P, Pinto S, Freichel M, Birnbaumer L, Voets T, et al. Crucial Role of TRPC1 and TRPC4 in Cystitis-Induced Neuronal Sprouting and Bladder Overactivity. *PLoS One.* 2013;8(7):1–12.

91. Caprodossi S, Lucciarini R, Amantini C, Nabissi M, Canesin G, Ballarini P, et al. Transient Receptor Potential Vanilloid Type 2 (TRPV2) Expression in Normal Urothelium and in Urothelial Carcinoma of Human Bladder : Correlation with the Pathologic Stage. *Eur Urol.* 2008;54:612–20.

92. Kanai A, Fry C, Hanna-mitchell A, Birder L, Zabbarova I, Bijos D, et al. Do We Understand Any More About Bladder Interstitial Cells? *Neurourol Urodyn.* 2014;33(5):573–6.

93. Kim SO, Jeong HS, Jang S, Wu MJ, Park JK, Jiao HY, et al. Spontaneous Electrical Activity of Cultured Interstitial Cells of Cajal from

Mouse Urinary Bladder. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2013;17(6):531.

94. Schmidt D, Mármol J, Mackinnon R. Mechanistic basis for low threshold mechanosensitivity in voltage-dependent K⁺ channels. *PNAS*. 2012;109(26):10352–7.

95. Marmol J del, Rietmeijer RA, Brohawn SG. Studying Mechanosensitivity of Two-Pore Domain K⁺ Channels in Cellular and Reconstituted Proteoliposome Membranes. In: Shyng SL, editor. *Potassium Channels: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer Science+Business Media LLC; 2018. p. 129–50.

96. Schmidpeter PAM, Petroff JT, Khajouejad L, Wague A, Frankfater C, Cheng WWL, et al. Membrane phospholipids control gating of the mechanosensitive potassium leak channel TREK1. *Nat Commun*. 2023 Dec 1;14(1).

97. Milac A, Anishkin A, Fatakia SN, Chow CC, Guy HR, Milac A, et al. Structural models of TREK channels and their gating mechanism. *Channels*. 2011;5(1):23–33.

98. Ma X yun, Yu J mei, Zhang S zhuo, Liu X yan, Wu B hong, Wei X li, et al. External Ba²⁺ Block of the Two-pore Domain Potassium Channel TREK-1 Defines Conformational Transition in Its Selectivity Filter *. *J Biol Chem*. 2011;286(46):39813–22.

99. Brohawn SG. How ion channels sense mechanical force : insights from mechanosensitive K²P channels TRAAK , TREK1 , and TREK2. *Ann N Y Acad Sci Jour*. 2015;1352:20–32.

100. Dong YY, Pike ACW, Mackenzie A, McClenaghan C, Aryal P, Dong L, et al. K²P channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac. *Science*. 2015 Mar 13 ;347(6227):1256–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25766236/>

101. Feng Yue1,*, Yong Cheng2,*, Alessandra Breschi3,*, Jeff Vierstra4,* W, Wu5,*, Tyrone Ryba6,*, Richard Sandstrom4,*, Zhihai Ma2,* CD, Benjamin D. Pope6,*, Yin Shen1,*, Dmitri D. Pervouchine3, Sarah

Djebali³ B, Thurman⁴, Rajinder Kaul⁴, Eric Rynes⁴, Anthony Kirilusha⁸ GKM, Brian A. Williams⁸, Diane Trout⁸, Henry Amrhein⁸, Katherine Fisher-Aylor⁸ I, Antoshechkin⁸, Gilberto DeSalvo⁸, Lei-Hoon See⁷, Meagan Fastuca⁷ J, et al. A Comparative Encyclopedia of DNA Elements in the Mouse Genome. *Nature*. 2015;515(7527):355–64.

102. Fink M, Lesage F, Duprat F, Heurteaux C, Reyes R, Fosset M, et al. A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO Jour*. 1998;17(12):3297–308.

103. Ma Y, Luo Q, Fu J, Che Y, Guo F, Mei L, et al. Discovery of an Inhibitor for the TREK-1 Channel Targeting an Intermediate Transition State of Channel Gating. *J Med Chem*. 2020 Oct 8 ;63(19):10972–83. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jmedchem.0c00842>

104. Baker SA, Hatton WJ, Han J, Hennig GW, Britton FC, Koh SD. Role of TREK-1 Potassium Channel in Bladder Overactivity After Partial Bladder Outlet Obstruction in Mouse. *J Urol*. 2010;183(2):793–800. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2009.09.079>

105. Baker SA, Hennig GW, Han J, Britton FC, Smith TK, Koh SD. Methionine and its derivatives increase bladder excitability by inhibiting stretch-dependent K(+) channels. *Br J Pharmacol*. 2008 Mar;153(6):1259–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18204472/>

106. Goonetilleke L, Quayle J. TREK-1 K(+) channels in the cardiovascular system: their significance and potential as a therapeutic target. *Cardiovasc Ther*. 2012 Feb ;30(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20946320/>

107. Djillani A, Mazella J, Heurteaux C, Borsotto M. Role of TREK-1 in health and disease, focus on the central nervous system. *Front Pharmacol*. 2019 Apr 11;10(APR):448323. Available from: www.frontiersin.org

108. Lee LM, Müntefering T, Budde T, Meuth SG, Ruck T. Pathophysiological Role of K₂P Channels in Human Diseases. *Cell Physiol Biochem*. 2021 Mar 6;55(S3):65–86. Available from:

<https://www.proteinatlas.org/>

109. Garcia-elias A, Mrkonjic S, Jung C, Pardo- C, Mrkonjic S, Valverde MA. The TRPV4 Channel. In: Nilius B, Flockerzi V, editors. Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin, Heidelberg: Springer Science+Business Media LLC; 2014. p. 293–319.

110. Deng Z, Paknejad N, Maksaev G, Sala-rabanal M, Nichols CG, Hite RK, et al. Cryo-EM and X-ray structures of TRPV4 reveal insight into ion permeation and gating mechanisms. *Nat Struct Mol Biol.* 2018;25:252–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41594-018-0037-5>

111. Nilius B, Watanabe H, Vriens J. The TRPV4 channel : structure-function relationship and promiscuous gating behaviour. *Eur J Physiol.* 2003;(446):298–303.

112. Chun J, Hwa S, Sun S. The negative feedback regulation of TRPV4 Ca²⁺ ion channel function by its C-terminal cytoplasmic domain. *Cell Signal.* 2012;24(10):1918–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.06.008>

113. Garcia-Elias A, Mrkonjic S, Pardo-Pastor C, Inada H, Hellmich UA, Rubio-Moscardó F, et al. Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate-dependent rearrangement of TRPV4 cytosolic tails enables channel activation by physiological stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jun 4 ;110(23):9553–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23690576>

114. Thorneloe KS, Sulpizio AC, Lin Z, Figueroa DJ, Clouse AK, Mccafferty GP, et al. benzothiophene-2-carboxamide (GSK1016790A), a Novel and Potent Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Channel Agonist Induces Urinary Bladder Contraction and Hyperactivity : Part I □. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;326(2):432–42.

115. Loukin S, Zhou X, Su Z, Saimi Y, Kung C. Wild-type and Brachyolmia-causing Mutant TRPV4 Channels Respond Directly to Stretch Force * □. *J Biol Chem.* 2010;285(35):27176–81.

116. Goswami C, Kuhn J, Heppenstall PA, Hucho T. Importance of Non-Selective Cation Channel TRPV4 Interaction with Cytoskeleton and Their Reciprocal Regulations in Cultured Cells. *PLoS One*. 2010;5(7):19–21.
117. J J, Fernandes J, Lorenzo IM, Andrade YN, Garcia-elias A, Serra SA, et al. IP 3 sensitizes TRPV4 channel to the mechano- and osmotransducing messenger 5 J -6 J -epoxyeicosatrienoic acid. *J Cell Biol*. 2008;181(1):143–55.
118. Pochynyuk O, Zaika O, Neil RGO. Novel insights into TRPV4 function in the kidney. *Eur J Physiol*. 2012;(465):177–86.
119. Li H, Kan H, Zhang X, Yang Z, Jin J, Zhang P, et al. TRPV4 activates cytosolic phospholipase A2 via Ca²⁺-dependent PKC/ERK1/2 signaling in controlling hypertensive contraction. *Clin Exp Pharmac Physiol*. 2018;
120. Brooks CA, Barton LS, Behm DJ, Eidam HS, Fox RM, Hammond M, et al. Discovery of GSK2798745: A clinical candidate for inhibition of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4). *ACS Med Chem Lett*. 2019 Aug 8 ;10(8):1228–33. Available from: [/pmc/articles/PMC6691566/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/)
121. Alessandri-haber N, Yeh JJ, Boyd AE, Parada CA, Chen X, Reichling DB, et al. Hypotonicity Induces TRPV4-Mediated Nociception in Rat. *Neuron*. 2003;39(7):497–511.
122. Ho TC, Horn NA, Huynh T, Kelava L, Lansman JB. Evidence TRPV4 contributes to mechanosensitive ion channels in mouse skeletal muscle fibers. *Channels*. 2012;6(4):246–54.
123. Yamada T, Ugawa S, Ueda T, Ishida Y, Kajita K. Differential Localizations of the Transient Receptor Potential Channels TRPV4 and TRPV1 in the Mouse Urinary Bladder. *J Histochem Cytochem*. 2009;57(3):277–87.
124. Gevaert T, Vriens J, Segal A, Everaerts W, Roskams T, Talavera K, et al. Deletion of the transient receptor potential cation channel TRPV4 impairs murine bladder voiding. *J Clin Invest*. 2007;117(11):3453–62.
125. Angelico P, Testa R. TRPV4 as a target for bladder overactivity. 2010;6(2):1–6.

126. Merrill L, Vizzard MA. Intravesical TRPV4 blockade reduces repeated variate stress-induced bladder dysfunction by increasing bladder capacity and decreasing voiding frequency in male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014;307:471–80.

127. Philyppov IB, Sotkis G V., Danshyna AO, Yelyashov SI, Sharopov BR, Shuba YM. Impairment of urinary bladder mechanical properties in rat model of type 2 diabetes. *Neurourol Urodyn*. 2022 Nov 1 ;41(8):1670–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/nau.25024>

128. Skryma R, Prevarskaya N, Gkika D, Shuba Y. From urgency to frequency : facts and controversies of TRPs in the lower urinary tract. *Nat Rev Urol*. 2011;8(11):617–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2011.142>

129. Li X, Hu J, Yin P, Liu L, Chen Y. Mechanotransduction in the urothelium: ATP signalling and mechanoreceptors. *Heliyon*. 2023 Sep 1;9(9):e19427.

130. Deruyver Y, Weyne E, Dewulf K, Rietjens R, Pinto S, Ranst N Van, et al. Intravesical Activation of the Cation Channel TRPV4 Improves Bladder Function in a Rat Model for Detrusor Underactivity. *Eur Urol*. 2018;74(3):336–45. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.05.020>

131. Mochizuki T, Sokabe T, Araki I, Fujishita K, Shibasaki K, Uchida K, et al. The TRPV4 Cation Channel Mediates Stretch-evoked Ca^{2+} Influx and ATP Release in Primary Urothelial Cell Cultures □. *J Biol Chem*. 2009;284(32):21257–64.

132. Nakayama S, Kajioka S, Goto K, Takaki M, Liu HN. Calcium-associated mechanisms in gut pacemaker activity. *J Cell Mol Med*. 2007 Sep ;11(5):958. Available from: </pmc/articles/PMC4401267/>

133. Perkins ME, Vizzard MA. Transient receptor potential vanilloid type 4 (TRPV4) in urinary bladder structure and function. *Curr Top Membr*. 2022 Jan 1 ;89:95–138. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36210154/>

134. Lee H, Koh B, Corrigan R, Peri L, Perrino B, Chai T, et al. LB-S&T-37 INTERACTION OF TRPV4 AND SK3 CHANNELS IN DETRUSOR PDGFR+ CELLS CONTROLS BLADDER FILLING. *J Urol.* 2016 Apr;195(4S).

135. Satoh K, Hata M, Takahara S, Tsuzaki H. A novel membrane protein, encoded by the gene covering KIAA0233, is transcriptionally induced in senile plaque-associated astrocytes. *Brain Res.* 2006;1108:19–27.

136. Saotome K, Murthy SE, Kefauver JM, Whitwam T, Patapoutian A, Ward AB. Structure of the mechanically activated ion channel Piezo1. *Nature.* 2018;554((7693)):481–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature25453>

137. Ge J, Li W, Zhao Q, Li N, Chen M, Zhi P, et al. Architecture of the mammalian mechanosensitive Piezo1 channel. *Nature.* 2015;527:64–9.

138. Zheng W, Gracheva EO, Bagriantsev SN, Ma D. A hydrophobic gate in the inner pore helix is the major determinant of inactivation in mechanosensitive Piezo channels. *Elife.* 2019;8:1–18.

139. Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, et al. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically-activated cation channels. *Jor Sci.* 2010;330(6000):55–60.

140. Syeda R, Xu J, Dubin AE, Coste B, Mathur J, Huynh T, et al. Chemical activation of the mechanotransduction channel Piezo1. *Elife.* 2015 May 22;4.

141. Evans EL, Cuthbertson K, Endesh N, Rode B, Blythe NM, Hyman AJ, et al. Yoda1 analogue (Dooku1) which antagonizes Yoda1-evoked activation of Piezo1 and aortic relaxation. *Br J Pharmacol.* 2018 May;175(10):1744–59.

142. Ranade SS, Qiu Z, Woo SH, Hur SS, Murthy SE, Cahalan SM, et al. Piezo1, a mechanically activated ion channel, is required for vascular development in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Jul 15 ;111(28):10347–

52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24958852>

143. Li J, Hou B, Tumova S, Muraki K, Bruns A, Ludlow MJ, et al. Piezo1 integration of vascular architecture with physiological force. *Nature*. 2014; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13701>

144. Hyman AJ, Tumova S, Beech DJ. Piezo1 Channels in Vascular Development and the Sensing of Shear Stress. In: Gottlieb PA, editor. *Piezo Channels*. Cambridge, USA: Elsevier Inc. Academic Press; 2017. p. 37–57.

145. Koser DE, Thompson AJ, Foster SK, Dwivedy A, Eva K, Sheridan GK, et al. Mechanosensing is critical for axon growth in the developing brain. *Nat Neurosci*. 2017;19(12):1592–8.

146. Woo SH, Ranade S, Weyer AD, Dubin AE, Baba Y, Qiu Z, et al. Piezo2 is required for Merkel cell mechanotransduction. *Nature*. 2014;509(7502):622–6.

147. Ferrari LF, Bogen O, Green P, Levine JD. Contribution of Piezo2 to endothelium - dependent pain. *Mol Pain*. 2015;11(65):1–8.

148. Mcmillin MJ, Beck AE, Chong JX, Shively KM, Buckingham KJ, Gildersleeve HIS, et al. Mutations in PIEZO2 Cause Gordon Syndrome , Marden-Walker Syndrome , and Distal Arthrogyrosis Type 5. *Am J Hum Genet*. 2014;94(5):734–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.03.015>

149. Dalghi MG, Clayton DR, Ruiz WG, Al-bataineh MM, Satlin LM, Kleyman TR, et al. Expression and Distribution of PIEZO1 in the Mouse Urinary Tract. *Jor Physiol*. 2019;317(2):303–21.

150. Dalghi MG. Role of Piezo Channels in Urothelial Cell Mechanotransduction Marianela. Vol. 114, *Biophys Jour*. Elsevier Ltd; 2018. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.11.639>

151. Michishita M, Yano K, Tomita K ichi, Matsuzaki O, Kasahara K ichi. Piezo1 expression increases in rat bladder after partial bladder outlet obstruction. *Life Sci*. 2016;166:1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.10.017>

152. Ihara T, Mitsui T. The Circadian expression of Piezo1 , TRPV4 , Connexin26 , and VNUT , associated with the expression levels of the clock genes in mouse primary cultured urothelial cells. *Neurourol Urodyn*. 2017;(08):1–10.
153. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*. 1976;13:29–83.
154. McCloskey KD. Interstitial cells in the urinary bladder--localization and function. *Neurourol Urodyn*. 2010;29(1):82–7.
155. Chun AL, Wallace LJ, Gerald MC, Wein AJ, Levin RM. Functional whole rat bladder model. *Neurourol Urodyn*. 1989;
156. Lock JT, Parker I, Smith IF. A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicators for imaging local Ca²⁺ signals in cultured cells. *Cell Calcium*. 2015 Dec;58(6):638–48.
157. Andersson KE. TRP Channels as Lower Urinary Tract Sensory Targets. *Med Sci (Basel, Switzerland)*. 2019 May 22;7(5).
158. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 2005 May 11;21(3):389–95.
159. Song JS, Kang CM, Park CK, Yoon HK, Lee SY, Ahn JH, et al. Inhibitory effect of receptor for advanced glycation end products (RAGE) on the TGF- β -induced alveolar epithelial to mesenchymal transition. *Exp Mol Med*. 2011;43(9):517.
160. Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 ;1010:186–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15033718/>
161. Carbone E, Lux HD. Kinetics and selectivity of a low-voltage-activated calcium current in chick and rat sensory neurones. *J Physiol*. 1987 May;386(1):547–70.
162. Fagerland MW. t-tests, non-parametric tests, and large studies—a paradox of statistical practice? *BMC Med Res Methodol*. 2012 Dec 14;12(1):78.

163. Ermakov YA, Kamaraju K, Sengupta K, Sukharev S. Gadolinium Ions Block Mechanosensitive Channels by Altering the Packing and Lateral Pressure of Anionic Lipids. *Biophys J*. 2010 Mar;98(6):1018–27.
164. Caldwell RA, Clemo HF, Baumgarten CM. Using gadolinium to identify stretch-activated channels: technical considerations. *Am J Physiol Physiol*. 1998 Aug 1;275(2):C619–21.
165. Zong B, Yu F, Zhang X, Pang Y, Zhao W, Sun P, et al. Mechanosensitive Piezo1 channel in physiology and pathophysiology of the central nervous system. *Ageing Res Rev*. 2023 Sep;90:102026.
166. Ma R, Seifi M, Papanikolaou M, Brown JF, Swinny JD, Lewis A. TREK-1 Channel Expression in Smooth Muscle as a Target for Regulating Murine Intestinal Contractility: Therapeutic Implications for Motility Disorders. *Front Physiol*. 2018 Mar 6;9.
167. 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 Jun 8;5:10775.
168. Dalghi MG, Ruiz WG, Clayton DR, Montalbetti N, Daugherty SL, Beckel JM, et al. Functional roles for PIEZO1 and PIEZO2 in urothelial mechanotransduction and lower urinary tract interoception. *JCI Insight*. 2021 Oct 8;6(19).
169. Lee H, Koh BH, Peri LE, Corrigan RD, Lee HT, George NE, et al. Premature contractions of the bladder are suppressed by interactions between TRPV4 and SK3 channels in murine detrusor PDGFR α ⁺ cells. *Sci Rep*. 2017 Sep 25;7(1):12245.
170. Retailleau K, Duprat F, Arhatte M, Ranade SS, Peyronnet R, Martins JR, et al. Piezo1 in Smooth Muscle Cells Is Involved in Hypertension-Dependent Arterial Remodeling. *Cell Rep*. 2015 Nov;13(6):1161–71.
171. Rogers AB, Cormier KS, Fox JG. Thiol-reactive compounds prevent nonspecific antibody binding in immunohistochemistry. *Lab Investig*. 2006 May;86(5):526–33.

172. Sequeira V, van der Velden J. Historical perspective on heart function: the Frank-Starling Law. *Biophys Rev.* 2015 Dec;7(4):421–47.
173. Wang B, Chen QH, Brenner R. ION CHANNELS | Proepileptic Effects of BK Channel Gene Mutations. In: *Encyclopedia of Basic Epilepsy Research.* Elsevier; 2009. p. 662–9.
174. Simmons MA. Charybdotoxin. In: *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference.* Elsevier; 2009. p. 1–3.
175. Strong PN, Brewster BS. Apamin: A Probe for Small-Conductance, Calcium-Activated Potassium Channels. In 1992. p. 15–24.
176. Niebur E. Electrical properties of cell membranes. *Scholarpedia.* 2008;3(6):7166.
177. 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 Jul 15 ;592(14):3013–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24801307/>
178. Park KJ, Baker SA, Cho SY, Sanders KM, Koh SD. Sulfur-containing amino acids block stretch-dependent K⁺ channels and nitrenergic responses in the murine colon. *Br J Pharmacol.* 2005 Apr;144(8):1126–37.
179. Gil V, Gallego D, Moha Ou Maati H, Peyronnet R, Martínez-Cutillas M, Heurteaux C, et al. Relative contribution of SK Ca and TREK1 channels in purinergic and nitrenergic neuromuscular transmission in the rat colon. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2012;
180. Gil V, Gallego D, Jiménez M. Effects of inhibitors of hydrogen sulphide synthesis on rat colonic motility. *Br J Pharmacol.* 2011 Sep 2;164(2b):485–98.
181. Jimenez M. Hydrogen sulfide as a signaling molecule in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil.* 2010 Nov;22(11):1149–53.
182. Dubois JM. Simultaneous changes in the equilibrium potential and potassium conductance in voltage clamped Ranvier node in the frog. *J Physiol.* 1981 Sep;318:279–95.

183. Patel AJ, Honoré E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, et al. A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *EMBO J*. 1998 Aug 3;17(15):4283–90.
184. Schewe M, Nematian-Ardestani E, Sun H, Musinszki M, Cordeiro S, Bucci G, et al. A Non-canonical Voltage-Sensing Mechanism Controls Gating in K2P K(+) Channels. *Cell*. 2016 Feb 25;164(5):937–49.
185. Ouanounou G. K⁺-independent Kir blockade by external Cs⁺ and Ba²⁺. *Physiol Rep*. 2022 Mar 11;10(5).
186. Lee H, Koh BH, Peri LE, Corrigan RD, Lee HT, George NE, et al. Premature contractions of the bladder are suppressed by interactions between TRPV4 and SK3 channels in murine detrusor PDGFR α + cells. *Sci Rep*. 2017 Sep 25;7(1):12245.
187. Chen Q, Tao J, Hei H, Li F, Wang Y, Peng W, et al. Up-Regulatory Effects of Curcumin on Large Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channels. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144800.
188. U. Syed A, Le T, F. Navedo M, Nieves-Cintrón M. Ion Channels and Their Regulation in Vascular Smooth Muscle. In: *Basic and Clinical Understanding of Microcirculation*. IntechOpen; 2020.
189. Sakmann B, Neher E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol*. 1984;46:455–72.
190. Paz NG, Frangos JA. Yoda1-induced phosphorylation of Akt and ERK1/2 does not require Piezo1 activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;497(1):220–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.058>
191. Pel JJM, van Asselt E, van Mastrigt R. Contractile properties of inner and outer smooth muscle bundles from pig urinary detrusor. *Urol Res*. 2005 Feb 22;33(1):23–30.
192. Arner A, Mattiasson A, Radzizewski P, Uvelius B. Shortening velocity is different in longitudinal and circular muscle layers of the rabbit urethra. *Urol Res*. 1998 Dec 4;26(6):423–6.
193. Lu T, Hoshi T, Weintraub NL, Spector AA, Lee HC. Activation of

ATP-sensitive K(+) channels by epoxyeicosatrienoic acids in rat cardiac ventricular myocytes. *J Physiol*. 2001 Dec 15;537(Pt 3):811–27.

194. Wilson AJ, Jabr RI, Clapp LH. Calcium Modulation of Vascular Smooth Muscle ATP-Sensitive K⁺ Channels. *Circ Res*. 2000 Nov 24;87(11):1019–25.

195. Amberg GC, Koh SD, Perrino BA, Hatton WJ, Sanders KM. Regulation of A-type potassium channels in murine colonic myocytes by phosphatase activity. *Am J Physiol Physiol*. 2001 Dec 1;281(6):C2020–8.

196. Orié N, Thomas A, Perrino B, Tinker A, Clapp L. Ca²⁺/calcineurin regulation of cloned vascular K_{ATP} channels: crosstalk with the protein kinase A pathway. *Br J Pharmacol*. 2009 Jun 3;157(4):554–64.

197. Chai Y, Zhang DM, Lin YF. Activation of cGMP-Dependent Protein Kinase Stimulates Cardiac ATP-Sensitive Potassium Channels via a ROS/Calmodulin/CaMKII Signaling Cascade. *PLoS One*. 2011 Mar 29;6(3):e18191.

198. McHugh BJ, Buttery R, Lad Y, Banks S, Haslett C, Sethi T. Integrin activation by Fam38A uses a novel mechanism of R-Ras targeting to the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*. 2010 Jan 1;123(Pt 1):51–61.

199. Liao J, Lu W, Chen Y, Duan X, Zhang C, Luo X, et al. Upregulation of Piezo1 (Piezo Type Mechanosensitive Ion Channel Component 1) Enhances the Intracellular Free Calcium in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells From Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension Patients. *Hypertension*. 2021 Jun;77(6):1974–89.