

A kolinerg és purinerg jelátvitel szerepe a húgyhólyagműködés szabályozásában

1. Bevezetés és célkitűzések

1.1. Általános megfontolások

A húgyhólyagműködés zavarainak vizsgálata nem tartozik az intenzíven tanulmányozott szakterületek közé a magyar orvostudományban, pedig a különböző életkorokban előbb-utóbb nagyon sokan szembesülnek azzal, hogy a húgyhólyagműködésben bekövetkező zavarok mennyire befolyásolják és megnehezítik az életvitelt. Elég csak a gyermekkorban jelentkező éjszakai ágybavizelésre, a terhesség kapcsán jelentkező vizelettartási problémákra, a férfiakban prosztatata hyperplasia melléktüneteként jelentkező sürgető vizeletürítésre, vagy az alsó húgyutak gyulladásakor megjelenő panaszokra gondolnunk. Mindezek miatt még inkább érthetetlennek tűnik a terület elhanyagolt volta. Napjainkban azonban -leginkább az amerikai és a nyugat-európai területeken- kezd megváltozni a helyzet. A fellendülő experimentális innováció maga után vont a húgyhólyaggal kapcsolatos élettani és farmakológiai ismeretanyag robbanásszerű növekedését, és többek között olyan érdekes dolgokra világított rá az utóbbi néhány évben, mint a húgyhólyag simaizomzatának régió-függő módosulása, illetve az uroepithelium és a simaizomzat közötti információcsere (Christ és Liebert, 2005, Szigeti és mtsai, 2005).

Munkám során a patkányhúgyhólyagot, mint állatkísérletes modellt használtam a kolinerg és a purinerg jelátvitel szerepének életkor szerinti és húgyhólyagterület-függő módosulásainak vizsgálatához. Ezt követően az állatkísérletes eredményekre alapozva megvizsgáltuk, hogy a humán húgyhólyagban is kimutathatók-e ugyanezek a mechanizmusok.

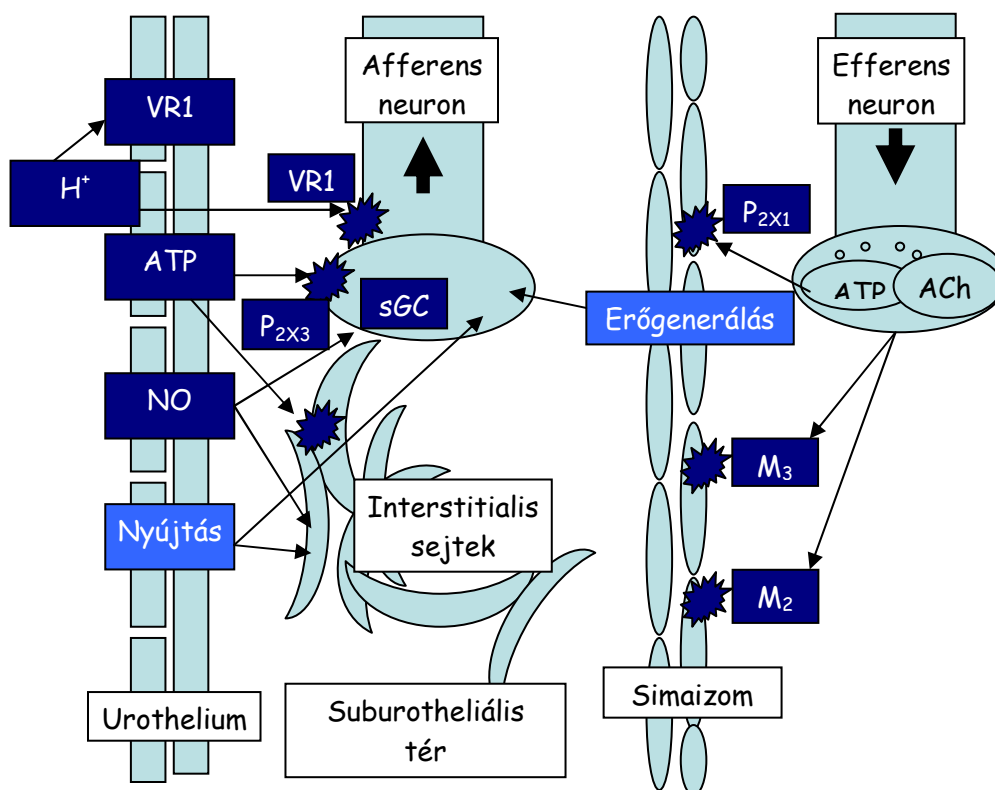
1.2. Kapcsolat a humán húgyhólyag és a patkány húgyhólyag működése között

Az általam vizsgálni kívánt húgyhólyagfunkciók és életkorfüggő változások humán húgyhólyagon történő kivitelezésének nehézségei indokolták, hogy ezeket a folyamatokat állatmodellen vizsgáljam meg. Napjainkban a két leginkább elfogadott állatmodell a húgyhólyagbetegségek tanulmányozására a patkány (Rosenblatt és Lehrman, 1963, Maggi és mtsai, 1984) és a macska (de Groat és mtsai, 1975) húgyhólyagja. Mivel az életkorfüggő változások sokkal egyszerűbben és olcsóbban tanulmányozhatók patkányokban, ezért ezt a rágcsálót választottam kísérleteim alanyául. Patkány esetén az újszülött állatokban, a postnatalis élet korai szakaszában, a vizeletürítést egy somato-visceralis reflex szabályozza. Ez akkor aktiválódik, amikor az anya megnyalja az újszülött perinealis testtájékát (Rosenblatt és Lehrman, 1963, Maggi és mtsai, 1984 és 1986). A postnatalis fejlődés során ez a primitív reflex kicserélődik egy akaratlagosan szabályozott vizeletürítést biztosító supraspinalis mechanizmusra, amelynek az alapját egy húgyhólyag eredetű viscerovisceralis reflex jelenti (de Groat és mtsai, 1975 és 1998, Maggi és mtsai, 1986). Patkányokban ez a vizeletürítési reflexben bekövetkező módosulás időben ugyanakkor következik be, amikor a neurotranszmisszióban, valamint a húgyhólyag simaizomsejtjeiben is jelentős változások zajlanak (de Groat és mtsai, 1998, Szigeti és mtsai, 2005). Tudjuk, hogy az egyedfejlődés során mind a serkentő, mind a gátló idegrendszeri mechanizmusok megváltoznak (Oh és mtsai, 2000, Longhurst, 2004, Szigeti és mtsai, 2005). Míg az egy-kéthetes patkányok húgyhólyagműködését a kolinerg mechanizmusok, addig az idősebb állatok húgyhólyagkontrakcióit leginkább a purinerg folyamatok szabályozzák (Hourani, 1999, Kageyama és mtsai, 2000, Yoshida és mtsai, 2001), amelyeket ráadásul az adrenerg (Mattiasson és mtsai, 1987, de Groat és mtsai, 1999) és egyéb hatások (pl. szerotoninerg, Testa és mtsai, 2001) is befolyásolhatnak, módosíthatnak.

Fontos kiemelni, hogy a patkány húgyhólyag a korai postnatalis élet során az ún. „túlstimulált, overaktív” vagy „fokozott aktivitással bíró, instabil” húgyhólyag (overactive bladder, OAB) képét mutatja (Mills és mtsai, 2000, Fry és mtsai, 2004). Ez az elváltozás emberben igen gyakran megfigyelhető, fiziológiásan gyermekkorban a húgyhólyag fokozott érzékenysége miatt, esetleg húgyuti-infekció következtében, édesanyákban szülés után, férfiakban prosztatabetegségek kapcsán és harántlézió szövődményeként. Mindezek következtében a patkány húgyhólyag szabályozási folyamatainak feltérképezése, mint állatmodell, alapvető jelentőségű lehet az emberekben kialakuló „túlstimulált” húgyhólyag mechanizmusának megismerésében, és terápiájának továbbfejlesztésében.

1.3. Az alsó vizeletelvezető traktus idegi kapcsolatai

A vizelet tárolása és periódikus eltávolítása alapvetően két funkcionális egység, a húgyhólyag és a kivezető csőrendszer működésétől függ (Chancellor és Yoshimura, 2002, Fry és mtsai, 2004). A sacralis paraszimpatikus mechanizmus a legjelentősebb vizeletürítést serkentő mechanizmus (Chancellor és Yoshimura, 2002). A kolinerg preganglionális neuronok sejttestje a gerincvelő sacralis részének intermediolaterális részén található, míg az axonok a nervus pelvicus-on át jutnak el a vegetatív ganglionsejtekhez, majd a húgyhólyag falához. A ganglionokban a neurotranszmisszió nikotin típusú kolinerg receptorokon keresztül valósul meg, amelyet különböző mechanizmusok, többek között a muscarinos kolinerg, az adrenerg, a purinerg és a peptiderg receptorok aktiválódása módosíthat. A postganglionális neurotranszmisszió a korábban említett preszinaptikus acetilkolin-felszabadulást moduláló folyamatok által, főleg M_1 muscarinos acetilkolin receptorokon keresztül szabályozott, amelyek nagy frekvenciájú, elnyújtott idegstimuláció hatására aktiválódnak (Maggi és mtsai, 1985, Somogyi és mtsai, 1994 és 1998). Ezeknek a receptoroknak az aktivációja nagymértékben fokozza a felszabaduló acetilkolin mennyiségét.



1. ábra A hólyag simaijomában található receptorok. A hólyagkontrakció kialakításában mind kolinerg, mind NANC (nem adrenerg, nem kolinerg, pl. ATP mediálta, purinerg) mechanizmusok szerepet játszanak. A simaijomsejtekben található M_2 és M_3 muscarinos, valamint a P_{2X1} purinoreceptorok együttesen határozzák meg a kialakuló kontrakciót. A hólyagösszehúzóds létrehozásában további fontos szerepe van a szenzoros információtovábbításnak is.

A patkány húgyhólyag kolinerg rostjain az α -adrenerg serkentő, az M_4 muscarinos és a neuropeptid Y gátló receptorok egyaránt kimutathatóak. Ezáltal a perifériás kolinerg szinapszisok több olyan mechanizmussal rendelkeznek, amelyek az idegi aktivitás intenzitásának és mintázatának létrejöttében és plaszticitásában igen fontos szerepet játszanak. Ez az alkalmazkodóképesség központi szerepet játszik a húgyhólyag vizeletet tároló, illetve kiürítő mechanizmusaiban (Zoubek és *mtsai*, 1993, de Groat, 2002).

A külső urethra szfinkterhez menő somaticus efferens rostok szintén nikotinos kolinerg transzmisszióval rendelkeznek. A sejttestek a gerincvelő sacralis 3-4. szegmentumának elülső szarvában találhatóak, és a kilépő rostok a pudendalis ideget hozzák létre. A n. pudendus egyéb rostjai és más sacralis somaticus idegrostok a kismedence egyéb izmait is innerválják (1.ábra) (Chancellor és Yoshimura, 2002).

1.4. A húgyhólyag simaizomzat élettani sajátosságai

Az emlősökben a simaizomsejtek kontrakcióit elsődlegesen a receptor-mediált folyamatok, valamint a kontraktilis fehérjék megnyújtása hozza létre. Az ily módon aktivált folyamatok által előidézett membránpotenciál változás maga után vonhatja az akciós potenciálok tüzelési frekvenciájának módosulását, ami a sejtkontrakcióban változásokat idéz elő (Webb, 2003).

Különböző agonisták (neurotranszmitterek, hormonok) specifikus receptoraikhoz kötődve létrehozzák a kontrakciót. Ezeket a hatásokat leginkább a foszfolipázC G-fehérjéken keresztül kialakuló serkentése hozza létre. Az aktivált enzim a sejtmembránban található foszfatidylinositol 4,5-biszfoszfátból (PIP_2) diacylglycerolt (DG) és inositol 1,4,5-triszfoszfátot (IP_3) alakít ki. Az IP_3 képes hozzákötödni az izomsejtek belső kalciumraktárának (endoplasmaticus reticulum, ER) membránjában található IP_3 receptorhoz, és ezáltal fokozza az ER-ből történő kalcium kiáramlást. A DG a protein kináz C (PKC) enzim specifikus aktivátora, ezáltal képes a sejten belüli foszforilációs folyamatok serkentésére. A PKC egyrészt fokozza a Ca^{2+} csatornák foszforiláltságát, aktiválja azokat, ezáltal a Ca^{2+} ionok fokozottabb mennyiségben képesek a csatornákon keresztül belépni a citoplazmába. Másrészt a PKC foszforilálja a keresztkötések kialakításában szerepet játszó fehérjéket is, ezáltal fokozva a Ca^{2+} iránti érzékenységüket. A sejten belüli térben megemelkedett Ca^{2+} mennyiség kalmodulinhoz kötődik, így emelve a miozin könnyű lánc kináz aktivitását. A kináz foszforilálja a miozin könnyű láncot, ezáltal biztosítva az aktin és miozin közötti keresztkötések kialakulásának lehetőségét, és a következményes sejtrövidülést. Bár a sejten belüli kalciumkoncentráció emelkedése átmeneti állapot, a kontraktilis fehérjék kalcium iránti érzékenyítése egy időben elnyújtottabb folyamatot jelent, ami a miozin foszfatáz aktivitásának Rho kinázok által létrehozott gátlásában nyilvánul meg. Ez a folyamat a foszfolipázC aktiválásával egyszerre indul el, és egy kis GTP-kötő fehérje, a RhoA serkentését jelenti. A folyamat precíz leírása még nem ismert. A membránban lévő, aktivált RhoA fokozza a Rho kinázok működését, ami a miozin foszfatázok gátlását idézi elő. Ez a folyamat ezáltal védeni fogja a kontraktilis fehérjék keresztkötési helyeit, így a miozin könnyű lánc kevésbé tud defoszforilálódni, ezáltal elősegítve a kontrakció fenntartását (Fukata és *mtsai*, 2001).

2. Célkitűzések

1. Az életkor előrehaladtával a húgyhólyag morfológiája, neurogén innervációja, ezáltal a szabályozása jelentős változáson halad keresztül, miközben a szerv alapvető funkciója, a vizelet tárolása és ürítése, nem változik meg. Jól ismert az a tény, hogy a vizelet húgyhólyagban történő tárolás-ürítés ciklusának zavara az életminőség jelentős romlását jelenti a betegekben. A detrusor izomzat aktivitásának fokozódása gyakori vizeletürítési ingert, valamint következményesen inkontinenciát eredményezhet, aminek hátterében a

hólyag telődési fázisában bekövetkező akaratlan, fokozott izomkontrakciók állnak. Ezek az elváltozások az idősebb emberekben igen gyakori problémát jelentenek és megakadályozhatják őket a megfelelő életvitel folytatásában. Jelen ismereteink szerint a hólyagműködés, szabályozás, valamint fejlődés szempontjából a patkány és a macska húgyhólyag tekinthető a human húgyhólyag legjobb állapotmodelljének. Mivel korábban a patkány húgyhólyagkontrakciók életkorfüggő változásait vizsgáltuk, ezért ezt az állatot választottuk vizsgálatunk alanyául. *Céлом az volt, hogy megvizsgáljam az elektromos téringerléssel kiváltott húgyhólyagkontrakciók paramétereinek, kolinerg és purinerg komponensének az életkor- és a húgyhólyagterület függő módosulásait a korai posztnatális hetekben.*

2. Egy szövet működését különböző sejttípusok befolyásolják. A detrusor izomzat kontrakcióinak alapjául a simaizomsejtek szolgálnak, de azok működését egyéb sejttípusok, például uroepitheliális sejtek, kötőszöveti sejtek, speciális intersticiális sejtek, idegsejtek módosíthatják. A szövetet alkotó sejtek szerepe, a különböző sejtek önálló működése többek között sejttenyészetben vizsgálható. *Célul tűztem ki patkány húgyhólyagból tenyésztett simaizomsejtek ATP-vel, valamint karbakollal kiváltott kalciumtranzienseinek mérését. Az életkor- és hólyagterületfüggés kérdését itt is figyelembe vettem.*

3. Az ATP purinoreceptorokon keresztül fejti ki hatását, melyeket P2X ionotróp, és P2Y metabotróp csoportba sorolunk. A húgyhólyag simaizomsejteken P2X₂ és P2X₃ típusú purinerg receptorok jelenlétét feltételezzük. A karbakol receptora az acetilkolin receptor, mely szintén lehet ionotróp (nikotin típusú receptorok), vagy metabotróp (muszkarin típusú receptorok). Muszkarinos receptorok jelenléte a húgyhólyagban már bizonyított (M₂, M₃), ezért a *céлом az volt, hogy nikotinos acetilkolin receptorok jelenlétét is kimutassam, egyrészt a simaizomtenyészeteken, másrészt detrusor izomdarabokon. Végül a P2X purinerg receptorok feltérképezése volt a cél, immuncitokémiai és immunhisztokémiai módszerek alkalmazásával.*

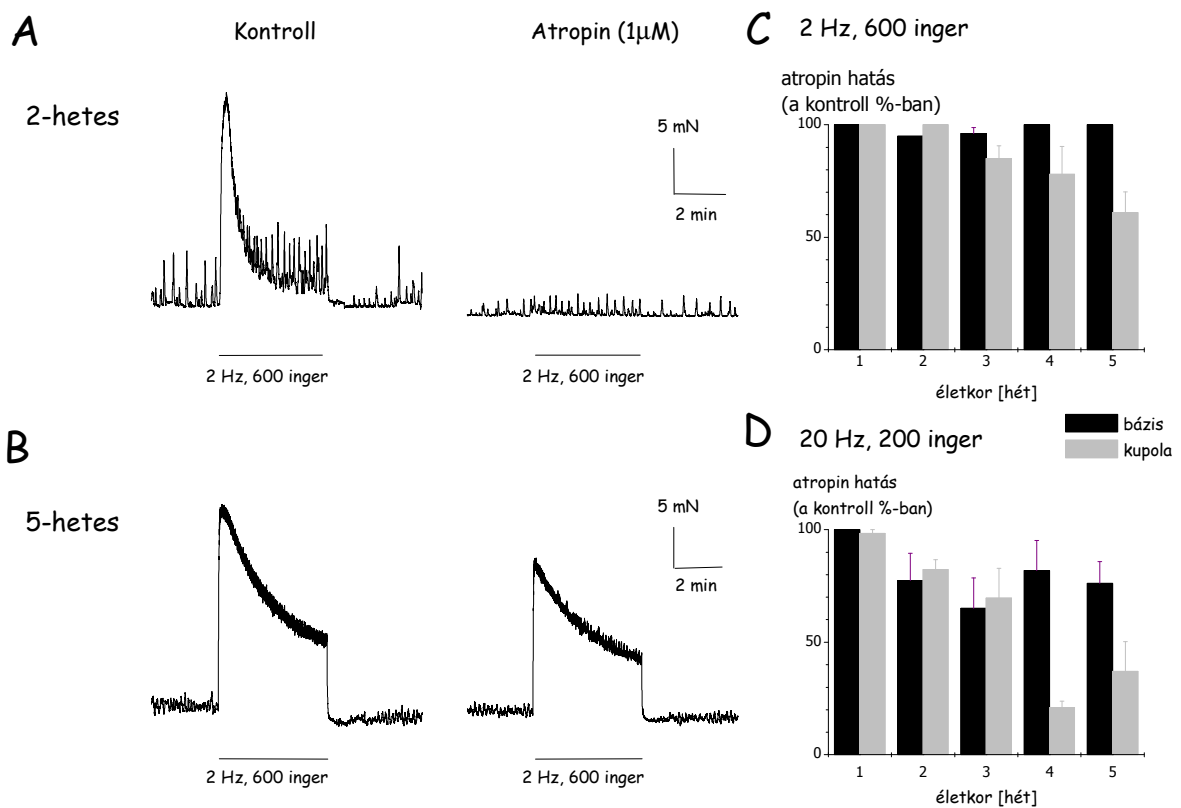
3. Eredmények

3.1. A kiváltott válaszok vizsgálata

3.1.1. Atropin hatása a téringerléssel kiváltott húgyhólyag kontrakciókra

A 2. ábrán az atropin elektromos téringerléssel kiváltott húgyhólyag kontrakciókra kifejtett hatását mutatjuk be. A bemutatott kísérletekben kétféle ingerlést alkalmaztunk. Egyrészt 600 stimulust 2 Hz-es frekvenciával, ami az irodalmi adatok alapján (Somogyi és mtsai, 1994, Somogyi és de Groat, 1999) mind acetilkolin, mind ATP felszabadulást képes előidézni, ezáltal egyaránt aktiválja a kolinerg és a purinerg folyamatokat. Másrészt 200 stimulust 20 Hz-es frekvenciával használtunk, ami a korábbi adatok alapján kizárólag acetilkolint szabadít fel az idegvégződésekből (Somogyi és mtsai, 1994, Somogyi és de Groat, 1999). A bemutatásra került kontrakciós görbék (2A és B ábra), két- és négyhetes állatok hólyagjának kupola területéből izolált izomdarabok válaszreakcióit mutatják. Ebben az esetben a 600 stimulust 2 Hz-es frekvenciával alkalmaztuk, kontroll körülmények között, valamint 1 μM atropin jelenlétében. Jól látható az, hogy az atropin hatékonysága az életkor előrehaladtával csökken. Az első oszlopdigramon (2C ábra) az atropinhatás életkor függését mutatjuk be a 2 Hz, 600 ingerléssel kiváltott kontrakciókra. Az adatok kiértékelésénél a stimulus által létrehozott kontrakciós görbék görbe alatti területeit vettük figyelembe. Megfigyelhető, hogy a 4-5 hetes állatokban a húgyhólyag kupolából származó izomdarabokon csökken az atropinérzékenység, ami arra utal, hogy csökken az acetilkolin-függő kontrakciók jelentősége

az izomösszehúzódnak kialakításában. Nagyon érdekes az atropin 20 Hz, 200 ingerlésre kifejtett hatása. Az atropinérzékenység megváltozásának tendenciája nagyon hasonló az előzőekben bemutatotthoz, viszont az idősebb állatokban sokkal kifejezettebb a húgyhólyag kupola és a bázis területek közötti különbség. Tovább árnyalja a képet, hogy ebben az esetben csak acetilkolin szabadul fel elektromos ingerlés hatására. Ha példaként összehasonlítjuk az 5-hetes húgyhólyag kupolából származó izomdarabok atropintól nem függő kontrakcióit, akkor az $39\pm 9\%$ 2 Hz, 600 inger esetén, míg $63\pm 13\%$ 20 Hz, 200 ingernél. Mindez arra is utalhat, hogy a nagyfrekvenciájú relative rövidebb ideig tartó ingerlés ATP-t is felszabadít, vagy pedig a felszabadított acetilkolin hatására ATP felszabadulás is létrejön. Ez utóbbi vagy az idegcsontból, vagy az uroepitheliumból, vagy magából a simaizomból jöhet létre. A két típusú inger által létrehozott atropinérzékenységbeli különbség azt a lehetőséget is felveti, hogy a kolinerg és a purinerg jelátvitel között interakció is kialakulhatott, ami nagymértékben függ a két neurotranszmitter felszabadulásának arányától.



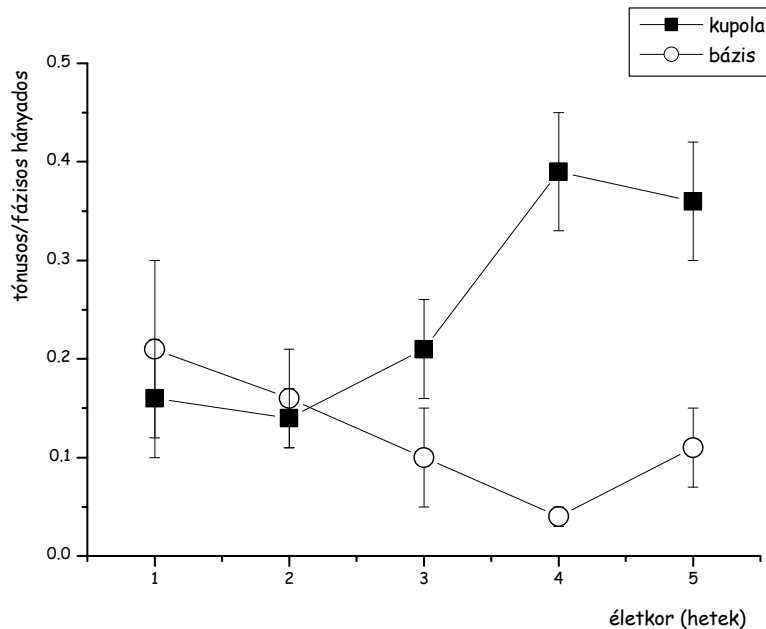
2. ábra

1 mM atropin hatása az elektromos téringerléssel kiváltott kontrakciókra 2 (A) és 5 hetes(B) patkány húgyhólyag kupola izomzaton, valamint az atropinhatás életkor és húgyhólyagterület függése 2 Hz, 600 inger (C) és 20 Hz, 200 inger (D) esetén. C-D: A fekete oszlopok a húgyhólyag bázison, míg a szürke oszlopok a kupolán mért eredményeket mutatják. Minden csoportban az esetszám minimum 4 volt.

3.1.2. A téringerléssel kiváltott húgyhólyagkontrakciók csúcs- és steady-state értékeinek életkor- és húgyhólyagterület függése

A továbbiakban azt vizsgáltuk meg, hogy a 2 Hz, 600 inger esetén kialakuló fázisos-tónusos összehúzódnak esetén hogyan változik a tónusos kontrakció aránya a fázisoshoz viszonyítva (3. ábra). Ezt úgy határoztuk meg, hogy az ingerlés végén meglévő steady-state kontrakció amplitúdóját (tónusos válasz) viszonyítottuk az ingerlés kezdetén kialakult csúcserőértékhez

(fázisos kontrakció). Megállapítható, hogy míg az 1-2 hetes állatok esetében nem volt különbség a hányados tekintetében a két húgyhólyag terület között (2 hetes patkány húgyhólyag kupola $0,14 \pm 0,03$, bázis $0,16 \pm 0,05$), addig a 4-5 hetes patkányok esetében a húgyhólyag kupolából származó izomdarabok esetén nagymértékben megnőtt a tónusos válasz részaránya a fázisos válaszhoz viszonyítva (5 hetes patkány húgyhólyag kupola $0,36 \pm 0,05$, bázis $0,11 \pm 0,04$).



3. ábra

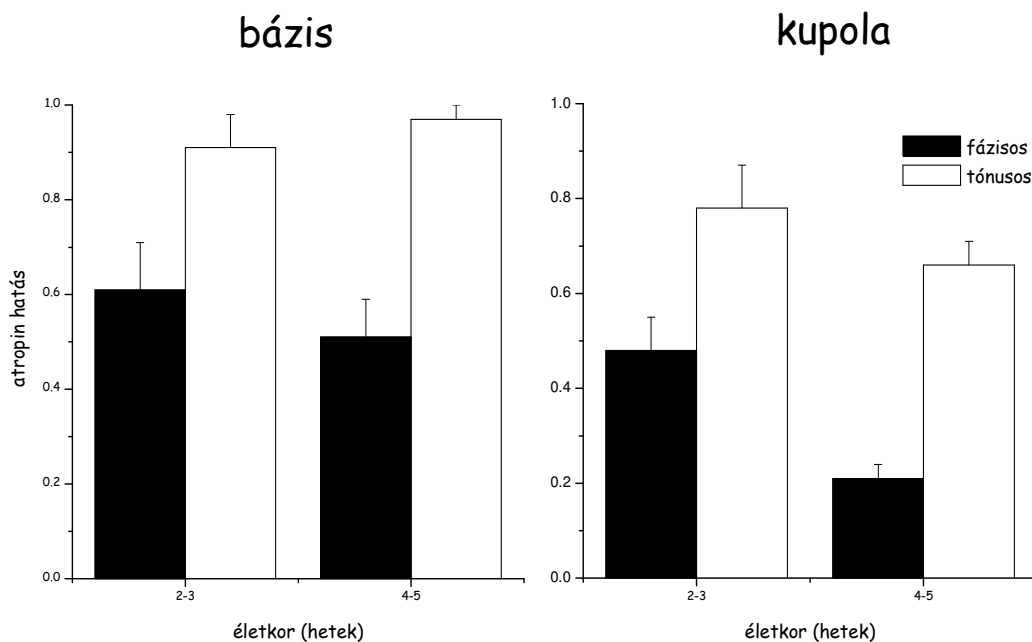
A 2 Hz, 600 inger hatására kialakult kevert fázisos-tónusos kontrakciókból meghatározott arányszám (tónusos/fázisos kontrakció) életkorfüggése kupola (-■-) és bázis (-○-) izomdarabok esetében. A fázisos kontrakciót az ingerlés hatására kialakuló kontrakció csúcserértékéből, míg a tónusos kontrakció nagyságát az ingerlés végén meglévő steady-state értékéből határoztuk meg.

3.1.3. Atropin hatása a kiváltott válasz csúcsának és steady-state értékeinek életkor- és húgyhólyagterület függésére

A következő lépésben megvizsgáltuk a 2 Hz, 600 inger hatására kialakult izomkontrakciók csúcsi (fázisos) és steady-state (tónusos) komponensek atropinérzékenységét és meghatároztuk ennek a paraméternek az életkor- és húgyhólyagterület függését (4. ábra). Ezt úgy határoztuk meg, hogy a 2 Hz, 600 inger hatására kialakuló kontrakciót megmértük atropin mentes, valamint $1 \mu\text{M}$ atropint tartalmazó mérőoldat esetén. Ezután az atropin jelenlétében mért kontrakció csúcserérték csökkenését viszonyítottuk a kontroll esetben mért csúcserértékhez, ami a fázisos válasz atropinszenzitivitására utalt. A következő lépésben hasonló módon meghatároztuk a steady-state értékeknél a tónusos válasz atropinfüggését. Megállapítható, hogy a fázisos válasz a tónusos válaszhoz viszonyítva minden esetben kevésbé érzékeny atropinra.

Korábban hasonló ingerlő protokollt alkalmazva megmérték a transzmitterek felszabadulását patkány húgyhólyagban (Somogyi és mtsai, 1994, Somogyi és de Groat, 1999). A transzmitterfelszabadulás mérési eredményei alapján azt állapították meg, hogy az acetilkolin inkább a fázisos, az ATP pedig inkább a tónusos válasz kialakításáért lehet felelős. A funkcionális méréseinkben meghatározott atropinérzékenység azonban inkább arra utal, hogy a kolinerg transzmisszióknak bár jelentősége van a fázisos válasz kialakításában, de sokkal inkább a tónusos válasz létrehozásában bír nagyobb jelentőséggel.

A 2C ábrán bemutatott eredményekhez hasonlóan az 2-3 hetes patkányok esetében nem volt eltérés a húgyhólyag kupola és bázis tekintetében a meghatározott paraméterek között. Ezzel szemben a 4-5 hetes állatokból származó húgyhólyag daraboknál a kupola esetén jelentősen csökkent az atropinérzékenység mind a fázisos, mind a tónusos válaszok tekintetében.



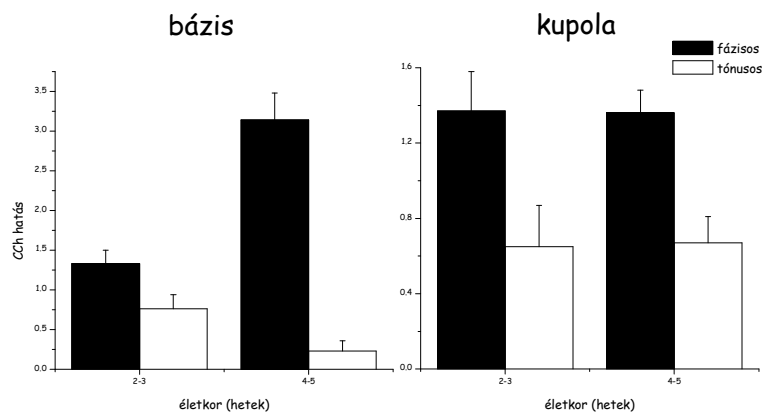
4. ábra

1 μM atropin hatása a 2 Hz, 600 ingerrel kiváltott izomkontrakciók fázisos (fekete oszlopok), illetve a tónusos (fehér szlopok) válaszára különböző életkorú patkányok húgyhólyag bázisának és kupolájának esetében. A szerhatás meghatározásához a 2 Hz, 600 inger hatására kialakuló kontrakciót megmértük atropin mentes, valamint 1 μM atropint tartalmazó mérőoldat esetén. Ezután az atropin jelenlétében mért kontrakció csúcsérték csökkenését viszonyítottuk a kontroll esetben mért csúcsértékhez, ami a fázisos válasz atropinszenzitivitására utalt. A következő lépésben hasonló módon meghatároztuk a steady-state értékeknél a tónusos válasz atropinfüggését. Minden feltüntetett állatcsoport esetében az esetszám minimum 8 volt.

3.1.4. Karbakol hatása az elektromos ingerléssel kiváltott húgyhólyagkontrakciók csúcsának és steady-state értékeinek életkor- és húgyhólyagterület függésére

Az atropin gátló hatásának ismeretében megvizsgáltuk, hogy a karbakol (egy kevert muszkarinos-nicotinos kolinerg receptor agonista) hogyan befolyásolja az elektromos ingerléssel kiváltott húgyhólyagkontrakciókat (5. ábra). Ebben az esetben a karbakol hatását az atropinnál is ismertetett módon határoztuk meg. Általánosságban megállapítható, hogy 1 μM karbakol minden esetben növelte a fázisos kontrakciókat. Ezzel ellentétesen a szer a tónusos válasz amplitúdóját minden általunk vizsgált húgyhólyagdarabon csökkentette. Jelentős különbségek adódtak azonban a serkentés, illetve a gátlás nagyságában. A kupolából származó izomdaraboknál a fázisos kontrakciók átlagosan 37 %-kal növekedtek a 2-3 hetes húgyhólyagnál és 36 %-kal a 4-5 hetes állatok esetében. Hasonló mértékű növekedést találtunk a 2-3 hetes húgyhólyag bázisából izolált húgyhólyag esetében is (33 %). Ezzel szemben, ha 4-5 hetes patkányok húgyhólyag bázisából származó mintán vizsgáltuk meg az 1 μM karbakol hatását, akkor azt tapasztaltuk, hogy a növekedés mértéke átlagosan 214 %-os. A tónusos kontrakciónál is hasonló eredményeket kaptunk a 2-3 és 4-5 hetes patkányok húgyhólyag kupola (átlagosan 35 és 33 % csökkenés a karbakolmentes kontrakciókhoz viszonyítva), valamint a 2-3 hetes húgyhólyag bázis esetén (24 %-os csökkenés). Ezzel

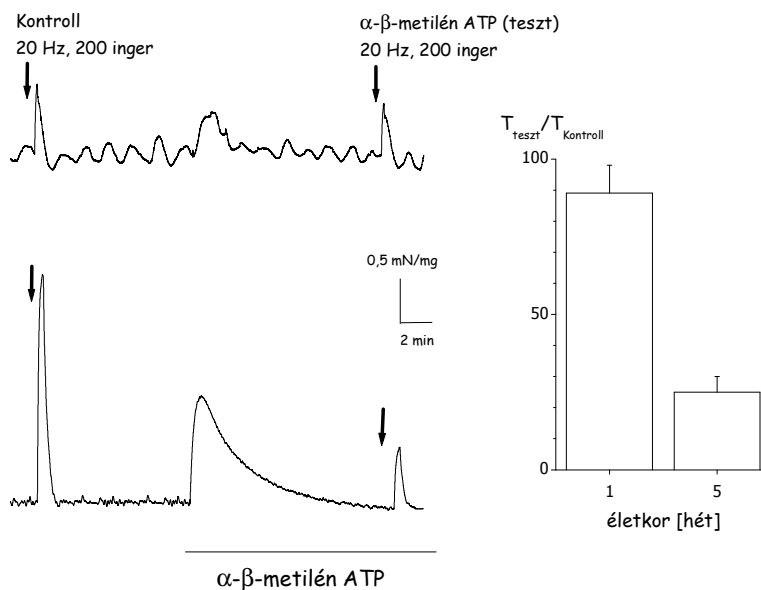
szemben az idősebb (4-5 hetes) patkányok húgyhólyag bázisából származó izomdarabokban a 2 Hz és 600 inger hatására kialakuló tónusos válaszcsökkenés átlagosan 77 %-os volt.



5. ábra

1 μM karbakol hatása a 2 Hz, 600 ingerrel kiváltott izomkontrakciók fázisos (fekete oszlopok), illetve a tónusos (fehér szlopok) válaszára különböző életkorú patkányok húgyhólyag bázisának és kupolájának esetében. A szerhatás meghatározásához a 2 Hz, 600 inger hatására kialakuló kontrakciót megmértük karbakolmentes, valamint 1 μM karbakolt tartalmazó mérőoldat esetén. Ezután a karbakol jelenlétében mért kontrakció csúcscérték változását viszonyítottuk a kontroll esetben mért csúcscértékhez, ami a fázisos válasz karbakolszenzitivitására utalt. A következő lépésben hasonló módon meghatároztuk a steady-state értékeknél a tónusos válasz karbakolfüggését. Minden feltüntetett állatcsoport esetében az esetszám minimum 8 volt.

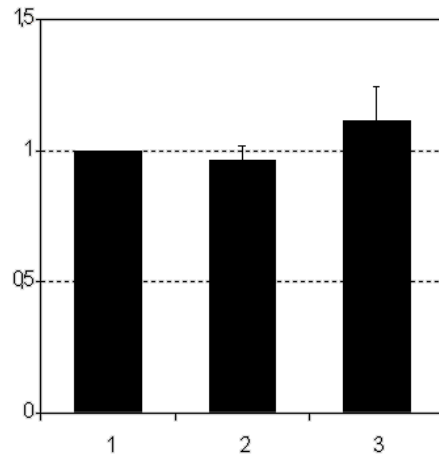
3.1.5. Az α - β -metilén ATP hatása a 20 Hz és 200 inger hatására kialakuló húgyhólyag kontrakciók tónusos komponensére



6. ábra

α - β -metilén ATP hatása a 20 Hz, 200 ingerrel kiváltott izomkontrakciókra 1 és 5-hetes patkány kupola izomdarabokon, valamint az α - β -metilén ATP érzékenység változása 1 és 5 hetes patkány húgyhólyagdarabok esetében. A szerhatás meghatározásához két 20 Hz, 200 ingert alkalmaztunk. Az elsőt (kontroll) a szer adagolása előtt, míg a másodikat (teszt) a szer által létrehozott deszenzitizációt követően alkalmaztuk. Az α - β -metilén ATP hatását a teszt impulzus által kialakított válasz kontroll ingerléssel létrehozott kontrakcióhoz viszonyított csökkenése alapján határoztuk meg.

Jelen ismereteink szerint a húgyhólyag tartalmaz $P2X_1$ purinoreceptorokat. Erről az altípusról azt kell tudni, hogy egyrészt mivel kalciumpermeábilis, ezért részt vehet az izomkontrakcióban, másrészt deszenzitizálódik, ezért a hatása valószínűleg rövid ideig tart. Ez a purinoreceptortípus érzékeny az α - β -metilén ATP-re, ezért kísérleteinkben ezt az agonistát alkalmaztuk. Az 1- és az 5-hetes állatból származó hólyagdarabok kontrakciós görbéjén látható, hogy a szer hatására egy rövid ideig tartó tónusos kontrakció alakul ki, ami az idősebb állatokban és azon belül is a hólyag kupola izomdarabokon kifejezett. Mivel a második elektromos téringerlés akkor történt, amikor a purinoreceptorok már deszenzitizálódtak, ezért az elektromos ingerlés hatására kialakuló válaszcsökkenés korrelál a legátolt purinerg válasz nagyságával. Megfigyelhető, hogy míg az 1 hetes állatoknál nincs jelentős változás a kiváltott válaszban α - β -metilén ATP adagolás után, 5 hetes állatok esetén csökken a kiváltott válasz, főként a hólyag kupola területén. (6. ábra)



7. ábra

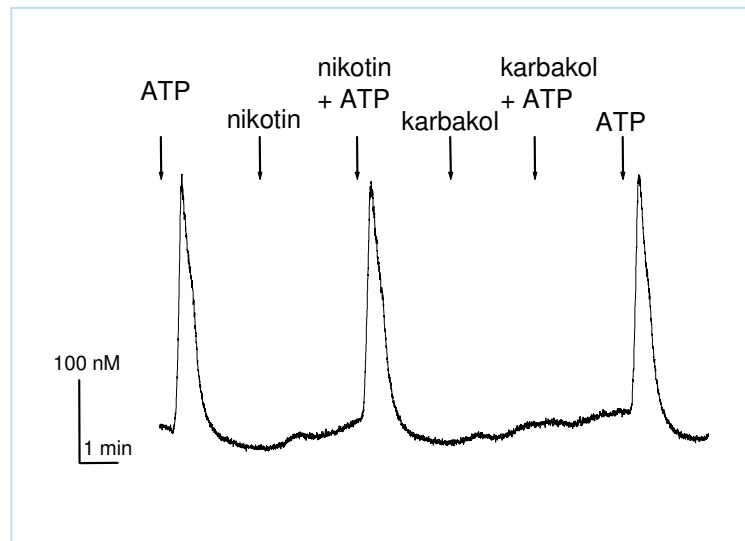
Háromszor ismételt ATP adagolás hatására kiváltott Ca^{2+} -tranziensek nagysága. Az első ATP-adagolás által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek nagyságára normalizáltuk 2. és a 3. ATP-válaszokat sejtenként. A hisztogram 5 sejt ATP-re adott válaszainak átlagát mutatja.

3.2. Purinerg és kolinerg agonistákkal kiváltott intracelluláris kalciumkoncentráció-változások mérése

3.2.1. Ismételt ATP adagolásának hatása a patkány húgyhólyag simaizomsejtjeinek Ca^{2+} -koncentrációjára

A kolinerg és purinerg jelátvitelt patkány húgyhólyag simaizomzatából nyert primer sejttenyészetben vizsgáltuk. Első lépésként megvizsgáltuk az ATP által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációváltozás kinetikáját és újbóli kiválthatóságát húgyhólyag simaizomsejteken.

40 másodpercig $180 \mu M$ koncentrációjú ATP oldatot adagoltunk a sejteknek 3-szor: közvetlenül a mérés kezdetén, valamint 3 és 6 perccel később, hogy aktiváljuk a P2 receptorokat, és ezáltal Ca^{2+} -tranzienst váltunk ki a sejteken. Az ismételt ATP-adagolás hatására kialakuló első, második és harmadik tranzienst jellemző paraméterekben nem jelentkezték szignifikáns különbségek. (7. ábra)



8. ábra

Purinerg és kolinerg agonisták hatása felnőtt (20 napos) patkány húgyhólyag simaizomsejt intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációjára. Felnőtt patkány bázisából származó sejt ATP-re reagált, önmagában nikotinra, illetve karbakolra nem. Ha az ATP-t nikotinnal együtt adagoltuk, akkor körülbelül akkora Ca^{2+} -tranzienst kaptunk, melyet az ATP önmagában hozott létre. Viszont, ha karbakolt adtunk az ATP-hez, a válasz elmaradt.

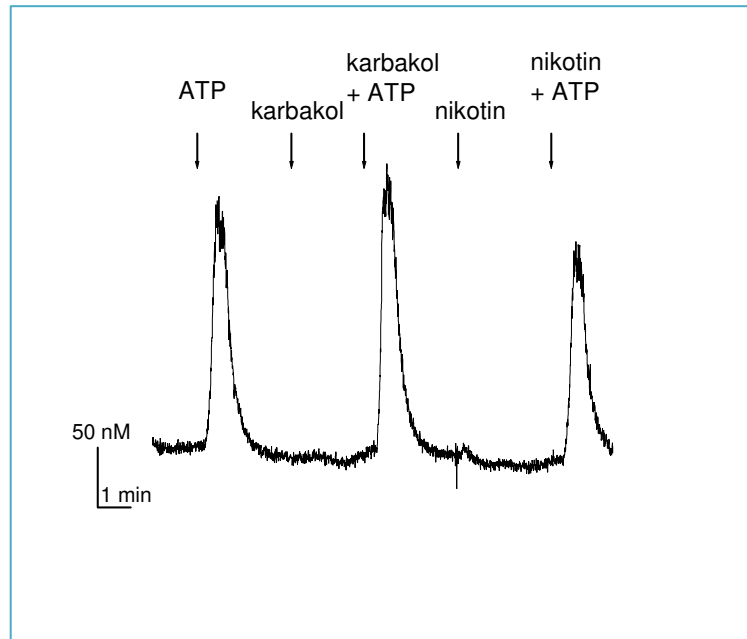
3.2.2. ATP, karbakol és nikotin hatása az

intracelluláris kalciumkoncentráció változására felnőtt patkány húgyhólyag simaizomsejtjein

A purinerg és kolinerg jelátviteli útvonalak közötti esetleges kölcsönhatások vizsgálatához elsőként felnőtt (8-12 hetes) patkány húgyhólyagból tenyésztett simaizomsejteket használtunk. A paraszimpatikus agonista karbakol, illetve nikotin önmagában történő adagolása nem váltott ki intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációnövekedést. Amikor az ATP-t együtt adagoltuk a 10 μM koncentrációjú karbakollal, a karbakol megakadályozta az ATP által kiváltott Ca^{2+} -tranzienst a patkány húgyhólyag bázisából származó simaizomsejteken, a húgyhólyag kupola részén azonban nem. Ez a gátlás nem volt megfigyelhető, ha az ATP-t 5 μM nikotinnal együtt alkalmaztuk. (8. ábra)

3.2.3. ATP, karbakol és nikotin hatása az intracelluláris kalciumkoncentráció változására fiatal patkány húgyhólyag simaizomsejtjein

Következő lépésben a purinerg és kolinerg jelátviteli útvonalak közötti kölcsönhatások életkorfüggésének megítéléséhez fiatal (4-15 napos) patkány húgyhólyagból tenyésztett simaizomsejteket vizsgáltunk. A paraszimpatikus agonista karbakol, illetve nikotin önmagában történő adagolása itt sem váltott ki intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációnövekedést. Az ATP 10 μM koncentrációjú karbakol jelenlétében is Ca^{2+} -tranzienst váltott ki, mind bázis, mind kupola eredetű sejteken, azaz fiatal patkány esetén a karbakol nem képes gátló hatást kifejteni. Hasonló eredményeket kaptunk, ha az ATP-t 5 μM nikotinnal együtt alkalmaztuk. A 180 μM koncentrációjú ATP önmagában, valamint karbakol vagy nikotin jelenlétében is hasonló paraméterekkel jellemezhető kalciumtranzienst vált ki.



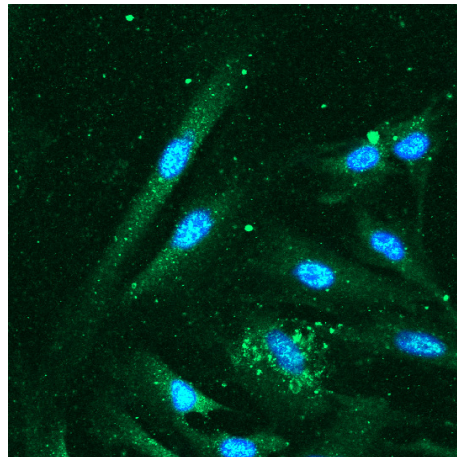
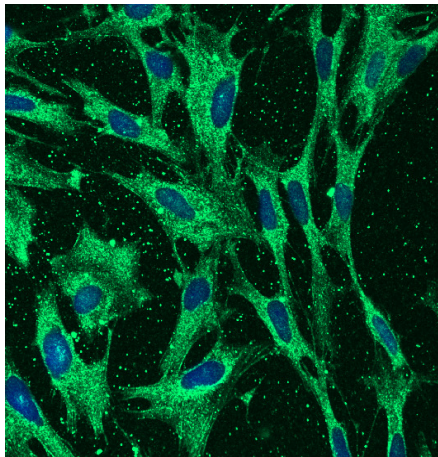
9. ábra

Purinerg és kolinerg agonisták hatása fiatal (4 napos) patkány húgyhólyag simaizomsejt intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációjára. Fiatal patkány kupolából származó sejt ATP-re reagált, önmagában nikotinnal, illetve karbakollal nem. Ha az ATP-t nikotinnal vagy karbakollal együtt adagoltuk, akkor körülbelül akkora Ca^{2+} -tranzienst kaptunk, melyet az ATP önmagában hozott létre.

3.3. Simaizom sejtenyészetek és húgyhólyagból származó szövettani metszetek purinoreceptorainak és nikotinos receptorainak immunfestése

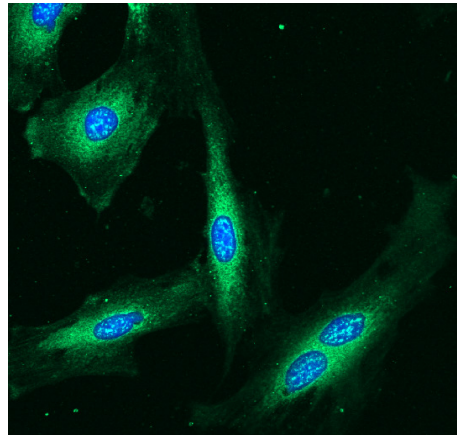
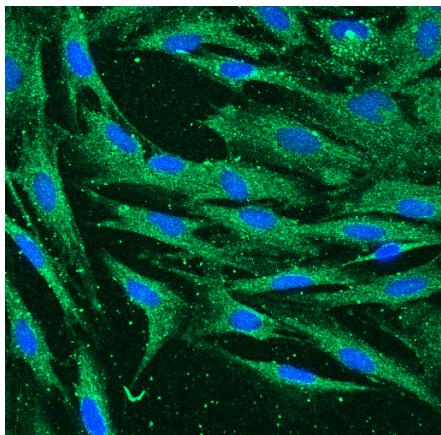
A purinoreceptorok közül P2X_2 és P2X_3 receptorok jelenlétét és eloszlását vizsgáltuk, fiatal és idős patkányokból származó húgyhólyag simaizomtenyészeteken és metszeteken. Mind fiatal, mind felnőtt patkány húgyhólyagján kimutatható mindkét purinoreceptor, a bázison és a kupolán is. Minden mintát azonos körülmények között dolgoztunk fel, a festéseket azonos protokoll alapján végeztük. Mindemellett a P2X_3 pozitívitas határozottan erősebbnek tűnt, mint a P2X_2 jelölődés, minden esetben. Ezenkívül megfigyelhető, hogy az idősebb patkányból származó mintákon szintén kifejezettebbnek tűnik a pozitívitas, mint fiatal patkányból származó tenyészeteken, illetve metszeteken.

Az $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$ és $\alpha 9$ nikotinos receptorok érzékenyek karbakolra, és közülük az $\alpha 1$ -nek, $\alpha 7$ -nek és az $\alpha 9$ -nek nagyobb az affinitásuk a karbakolra, mint nikotinra. Ahhoz, hogy meghatározzuk a nikotinos receptor α alegységeinek eloszlását, patkány húgyhólyagból nyert primer simaizomtenyészeteket, valamint szöveti metszeteket használtunk. A receptoralegységek eloszlását vizsgáltuk a területi különbségeket figyelembe véve (a húgyhólyag bázisán és kupoláján), valamint az életkor függvényében (fiatal és idős állatban). A 8 hetes patkány húgyhólyagból származó simaizomsejteken $\alpha 7$ -es nikotinos receptort sikerült kimutatni, hasonlóan a felnőtt patkány húgyhólyag szöveti metszeteiben kimutatott $\alpha 7$ immunpozitivitáshoz. A receptor a húgyhólyag bázisán és kupoláján egyaránt jelen van, de a jelölődés kifejezettebbnek tűnik a bázison. Ugyanezt tapasztaljuk fiatal (7 napos) patkány húgyhólyagját vizsgálva is, azzal a különbséggel, hogy itt minden esetben gyengébbnek tűnik a jelölődés, mint idősebb állatból származó mintákon. (10-13. ábrák).



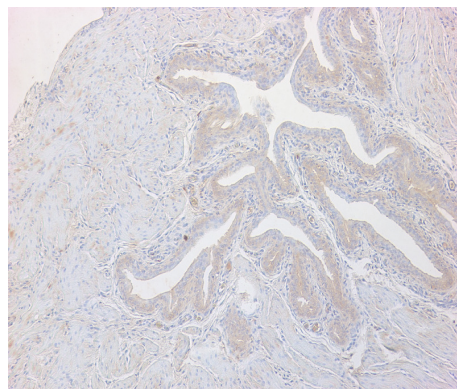
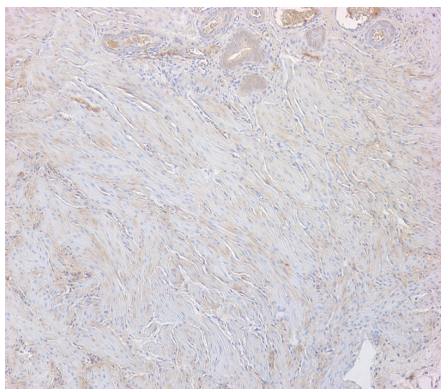
10. ábra

Patkány húgyhólyag simaizomtenyészet $\alpha 7$ nikotinos receptor elleni immunfestése. A bal oldali képen a húgyhólyag bázisából, a jobboldal a kupolájából származó simaizomsejtek $\alpha 7$ nikotinos receptor pozitivitása látható, FITC-cel jelölve. A sejtmagokat DAPI-val jelöltük.



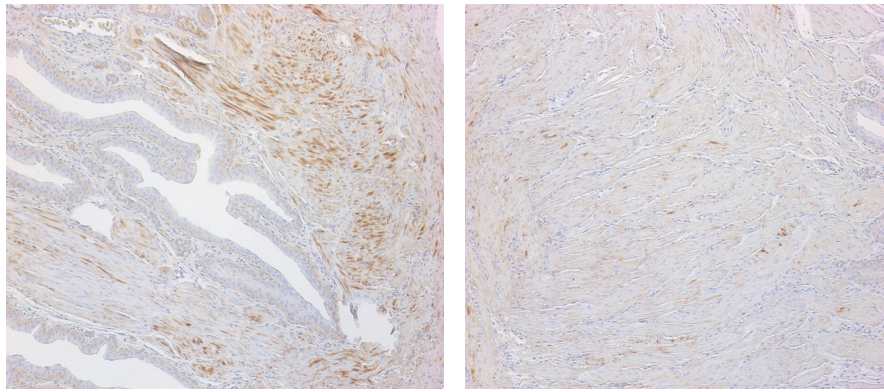
11. ábra

Patkány húgyhólyag simaizomtenyészet P2X₂ receptor elleni immunfestése. A baloldali képen a húgyhólyag bázisából, a jobboldal a kupolájából származó simaizomsejtek P2X₂ receptor pozitivitása látható, FITC-cel jelölve. A sejtmagokat DAPI-val jelöltük.



12. ábra

Patkány húgyhólyag szövettani metszet $\alpha 7$ nikotinos receptor elleni immunfestése. A baloldali képen a húgyhólyag bázisából, a jobboldal a kupolájából származó simaizomsejtek $\alpha 7$ nikotinos receptor pozitivitása látható, a barna színreakciót a DAB adta. A sejtmagokat hematoxilinnel festettük.



13. ábra
Patkány húgyhólyag szövettani metszet P2X₃ receptor elleni immunfestése. A baloldali képen a húgyhólyag bázisából, a jobboldalin a kupolájából származó simaizomsejtek P2X₃ receptor pozitívítása látható, a barna színreakciót a DAB adta. A sejtmagokat hematoxilinnel festettük.

4. Megbeszélés

Kísérleteink azt igazolták, hogy az elektromos téringerlés az ingerlés hosszától és az alkalmazott frekvenciától függő izomkontrakciót képes létrehozni. Míg az alacsonyabb frekvenciájú, de hosszabb ideig tartó ingerlés egy kevert, kezdetben fázisos, majd tónusos izomösszehúzódást alakít ki, addig a nagyobb frekvenciájú, de rövidebb ideig tartó ingerlés kizárólag fázisos választ hoz létre. A téringerléssel létrehozott kontrakciók atropin érzékenysége jelentős életkor- és húgyhólyagterület függést mutattak. Az életkor előrehaladtával csökkent az atropinérzékenység, utalva a kolinerg folyamatok jelentőségének csökkenésére. Ez a hatás leginkább a kupola területen mutatható ki. A kevert (fázisos-tónusos) választ kialakító ingerlés esetén az életkorral együtt megváltozik a kétféle kontrakció egymáshoz viszonyított részaránya is. A kupola területéből származó izomdarabok esetében a tónusos válasz részaránya egyre kifejezettebbé válik. Megvizsgáltuk a fázisos-tónusos izomösszehúzódások fázisos és tónusos tagjainak atropinérzékenységét is. A tónusos kontrakció minden vizsgált esetben érzékenyebb volt atropinra, ami arra utal, hogy a korábbi elképzelésekkel ellentétben (Somogyi és mtsai, 1994, Somogyi és de Groat, 1999) a kolinerg hatások inkább a tónusos kontrakció kialakításáért felelősek, míg a fázisos választ inkább a purinerg hatások hozzák létre. Az idősebb állatokban talált tónusos kontrakció részarány növekedés, valamint atropinérzékenység csökkenés szintén arra utal, hogy a kolinerg folyamatok szerepe csökken az életkor előrehaladtával és ez a csökkenés leginkább a húgyhólyag kupolát érinti. Ezt támasztják alá az α - β -metil ATP-vel végzett méréseink is, melyek szerint a purinerg válaszok részaránya növekszik az életkor előrehaladtával. Igen érdekes és további spekulációkra vezető megfigyelés volt a kevert (muscarinos-nicotinos) kolinerg receptor agonista carbachollal végzett mérésorozat. Ebben az esetben azt kaptuk, hogy a carbachol stimuláció alatt végzett elektromos ingerlés esetén a fázisos kontrakció megnövekedet, míg a tónusos lecsökkent a carbachol mentes közegben végzett mérésekhez viszonyítva. Ezen hatások leginkább az idősebb patkányok húgyhólyagbázisán voltak a legkifejezettebbek. Ez a carbachol hatására jelentkező bifázisos hatás felvetette a két jelátviteli útvonal közötti interakció lehetőségét is.

A patkány húgyhólyag idegi szabályozásában mind adrenerg, mind kolinerg, mind pedig nem-adrenerg-nem kolinerg (NANC) mechanizmusok részt vesznek (de Groat és mtsai, 1975, de Groat és mtsai, 1998, Maggi és mtsai, 1985, Sibley 1984, Szigeti és mtsai, 2005). Más szövetekből, sejtekből ismert, hogy ezen folyamatok jelentős mértékben képesek befolyásolni, serkenteni és gátolni, egymás működését (Araki és de Groat, 1997, Kruse és de Groat, 1990, Kruse és mtsai, 1990, Sugaya és de Groat, 2002). Tudjuk, hogy az adrenerg folyamatok jelentős mértékben képesek módosítani a kolinerg válaszreakciót (Széll és mtsai, 2000), valamint az acetilkolin is képes módosítani a szimpatikus jelátvitelt (Széll és mtsai, 2000). Néhány korábbi eredmény alapján azonban az is feltételezhető (Salas és mtsai, 2005), hogy negatív interakció lehet a hólyag simaizomzatban található két ionotróp vegetatív receptor, az

a₇ nikotinos acetilkolin és a P_{2X1} purinoreceptor között. Más sejteken már kimutatták a nikotinos és a purinerg jelátvitel egymásra hatását, és megfigyelték, hogy a két jelátviteli útvonal együttes stimulációja kisebb ionáramot hoz létre, mint ha azokat külön-külön aktiváltuk és összegeztük volna (Barajas-Lopez és mtsai, 1998, Keirstead és mtsai, 2005, Searl és mtsai, 1998). Korábbi eredmények arra utalnak, hogy hasonló kereszt-gátlás a hólyag simaizomban is kimutatható.

A folyamat további érdekességét az jelenti, hogy ismert a kolinerg és a purinerg jelátvitel dominanciájának életkorfüggése (de Groat és mtsai, 1998, Szigeti és mtsai, 2005, Yoshida és mtsai, 2001). A jelenleg elfogadott nézet szerint az újszülött patkányokban az első hetekben a kolinerg, majd a purinerg hatásokra kialakuló kontrakciók dominálnak. Ezen módosulások feltételezik a két jelátviteli folyamat egymásra hatásának módosulását is. A patkány hólyag kontraktilitásának életkorfüggése azért is jelentős, mivel a 2-3 hetes állatok hólyagját a humán OAB legjobb modelljének tekintik, ezért az interakciók feltérképezése a továbbiakban az OAB terápiájának tökéletesítéséhez is elengedhetetlen. Érdekes a humán hólyag purinerg szabályozása is. A P₂ receptorok jelenléte kimutatható a humán húgyhólyagban is, azonban egészséges körülmények között a NANC idegvégződésekből felszabaduló ATP-nek nincs szabályozó szerepe, mivel a junctionalis térben azonnal lebomlik (Fry és mtsai, 2004). Bizonyos OAB-t eredményező kórállapotok esetén azonban lecsökken, esetleg meg is szűnik az ATP lebontása, ezáltal a purinerg jelátvitel szerepe felértékelődik.

A fentebb vázolt interakciók a Hirahara és mtsai által 2006-ban bemutatott 4-D ultrahangos eredmények alapján válnak igazán érdekessé. Az említett kutatócsoport egészséges és BPH-ban szenvedő betegek húgyhólyagjának ürülését vizsgálták meg 4-D ultrahangkészülék segítségével. Azt találták, hogy míg egészséges hólyag esetén a micturitio alatt a hólyag egészén hasonló mértékű rövidülés figyelhető meg, addig azokban a hólyagokban, ahol a vizelet elfolyása akadályoztatott volt, a csúcsi terület összehúzódott, ezzel szemben az urethra-szfinkter környéki izomzat egyáltalán nem, vagy csak kis mértékben mutatott kontrakciót. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy ebben az esetben a hólyag ürülésének szabályozása, vagy gerincvelői, vagy szervi, esetleg egyszerre mindkét szinten megváltozott. Nem kizárt, hogy a gerincvelői micturitios központ szervterület-specifikus innervációja módosult. Az a lehetőség is fennáll, hogy a ICC-szerű (pacemaker) sejtek szervkontrakciók szinkronitását meghatározó aktivitása módosult. Nem hagyhatjuk ki annak a lehetőségét sem, hogy az uroepithel sejtek NO-termelése is megváltozhatott szervterület specifikusan. Végül nem kizárt egy olyan receptorális interakció sem, amikor két jelátviteli útvonal (kolinerg és purinerg) együttes aktiválódása megakadályozza a simaizomsejtek kontrakcióját bizonyos húgyhólyagterületeken. Korábban, igaz csak 3-D ultrahangvizsgálat alkalmazásával, felvetették, hogy micturitio alatt a fiatal patkány hólyagjában is asszimmetrikus hólyagkontrakciók alakulnak ki, miszerint a csúcsi területek sokkal inkább összehúzódnak, míg a sfinkter környéki izomzat összehúzódása elenyésző (Keirstead és mtsai, 2005). Mindezek a megfigyelések megerősítik azt, hogy a patkány hólyag ürítésének sejt szintű szabályozását érdemes tanulmányozni, hiszen a kapott eredmények humán adatokkal történő hasonlósága elősegítheti a humán folyamatok pontosabb megismerését és a terápia tökéletesítését.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az atropin jobban gátolja mind a spontán hólyagkontrakciókat, mind a téringerléssel kiváltott választ idősebb patkányok húgyhólyagjában. Ráadásul a hólyagcsúcs atropinérzékenysége fokozottabban csökken az életkor előrehaladásakor. Ezzel párhuzamosan a carbachol stimuláló hatása hasonló életkor és hólyagterület függést mutat. Az α - β -metil ATP hatásának időfüggése alternál az előzőekkel, ami a purinerg jelátvitel jelentőségének fokozódását mutatja az idősebb állatokban. A bemutatott kísérletek klinikai jelentősége kettős. Egyrészt az adatok alapján úgy tűnik, hogy a húgyhólyag telődés és ürülés szabályozásának klasszikus leírását felül kell vizsgálnunk. Másrészt a 2-3 hetes patkány húgyhólyag az un. „túlstimulált” hólyag (overactive bladder)

kórképét mutatja. Ennek következtében a patkány hólyag szabályozási folyamatainak feltérképezése, mint állatmodell, alapvető jelentőségű lehet az emberekben kialakuló „túlstimulált” hólyag mechanizmusának megismerésében és terápiájának továbbfejlesztésében.

A bemutatott munka alapján 3 TDK előadás, 1 TDK dolgozat és 3 diplomamunka készült.

7. Irodalomjegyzék

1. Araki I, and de Groat WC. Developmental synaptic depression underlying reorganization of visceral reflex pathways in the spinal cord. *J Neurosci* 17, 8402-8407, 1997.
2. Barajas-Lopez, C., Luna-Espinosa, R. and Zhu, Y. Functional interactions between nicotinic and P2X channels in short term cultures of guinea-pig submucosal neurons. *J Physiol* 513, 671-683, 1998.
3. Cahncellor M., Yoshimura N., In Campbell's Urology 8th Edition, Editors: Patrick C. Walsh, MD, Alan B. Retik, MD, E. Darracott Vaughan, Jr., MD, Alan J. Wein, MD, Louis R. Kavoussi, MD, Andrew C. Novick, MD, Alan W. Partin, MD, PhD and Craig A. Peters, MDW B Saunders, 831-886, 2002.
4. Christ G.J., Liebert M. Proceedings of the Baltimore smooth muscle meeting: identifying research frontiers and priorities for the lower urinary tract. *J. Urol.* 173(4): 1406-1409, 2005.
5. Fry CH, Hussain M, McCarthy C, Ikeda Y, Sui GP, Wu C. Recent advances in detrusor muscle function. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.* 215: 20-25, 2004.
6. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol. Sci.* 22(1): 32-39, 2001.
7. de Groat W.C. Plasticity of bladder reflex pathways during postnatal development. *Physiol. Behav.* 77(4-5): 689-92, 2002.
8. de Groat W.C., Araki I., Vizzard M.A., Yoshiyama M., Yoshimura N., Sugaya K., Tai C., Roppolo J.R. Developmental and injury induced plasticity in the micturition reflex pathway. *Behav. Brain Res.* 92: 127-140, 1998.
9. de Groat W.C., Douglas J.W., Glass J., Simonds W., Weimer B., Werner P. Changes in somato-vesical reflexes during postnatal development in the kitten. *Brain Res.* 94: 150-154, 1975.
10. de Groat W.C., Yoshiyama M., Ramage A.G., Yamamoto T., Somogyi G.T. Modulation of voiding and storage reflexes by activation of 1 adrenoceptors. *Eur. Urol.* 36(suppl. 1): 68-73, 1999.
11. Hourani S.M.O. Postnatal development of purinoreceptors in rat visceral smooth muscle preparations. *Gen Pharmac.* 32: 3-7, 1999.
12. Kageyama S, Fujita K, Suzuki K, Shinbo H, Masuda N, Uchida W. Effect of age on the responses of rat bladder detrusor strips to adenosine triphosphate. *BJU Int.* 85: 899-904, 2000.
13. Keirstead HS, Fedulov V, Cloutier F, Steward O, Duel BP. A noninvasive ultrasonographic method to evaluate bladder function recovery in spinal cord injured rats. *Exp Neurol.* 194, 120-7, 2005.
14. Kruse M.N., and de Groat W.C. Micturition reflexes in decerebrate and spinalized neonatal rats. *Am. J. Physiol.* 258: R1508-R1511, 1990.
15. Kruse M.N., Noto H, Roppolo J.R., and de Groat W.C. Pontine control of the urinary bladder and external urethral sphincter in the rat. *Brain Res.* 532: 182-190, 1990.
16. Longhurst P. Developmental aspects of bladder function. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.* 215: 11-19, 2004.
17. Maggi C.A., Santicioli P., Meli A. Postnatal development of myogenic contractile activity and excitatory innervation of rat urinary bladder. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 247: R972-R978, 1984.
18. Maggi C.A., Santicioli P., Meli A. Pharmacological evidence for existence of two components in twitch response to field stimulation of detrusor strips from the rat urinary bladder. *J. Auton. Pharmacol.* 5: 221-229, 1985.
19. Maggi C.A., Santicioli P., Meli A. Postnatal development of micturition reflex in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 250: R926-R931, 1986.
20. Mattiasson A., Andersson K-E., Elbadawi A., Morgan E., Sjögren C. Interaction between adrenergic and cholinergic nerve terminals in the urinary bladder of rabbit, cat and man. *J. Urol.* 137: 1017-1019, 1987.
21. Mills I.W., Greenland J.E., McMurray G., McCoy R., Ho KM., Noble J.G., Brading A.F. Studies of the pathophysiology of idiopathic detrusor instability: the physiological properties of the detrusor smooth muscle and its pattern of innervation. *J Urol.* 163: 646-651 2000.
22. Oh S.J., Lee K.H., Kim S.J., Kim K.W., Kim K.M., Choi H. Active properties of the urinary bladder: in vitro comparative studies between adult and neonatal rats. *BJU Int.* 85: 1126-1133, 2000.
23. Rosenblatt J.S., Lehrman D.S. Maternal behavior of the laboratory rat. In: Maternal Behavior in Mammals, edited by Rheingold HL. New York: Wiley, 1963.

24. Salas NA, Smith CP, Kiss S, Boone TB, and Somogyi GT. Intravesical cholinergic receptor activated spinal ATP release in normal and chronic spinal cord injured rats. *J Urology* 167Suppl., 45, 2005.
25. Searl TJ, Redman RS, and Silinsky EM. Mutualocclusion of P2X ATP receptors and nicotinic receptors on sympathetic neurons of guinea-pig. *J. Physiol* 510, 783-791, 1998.
26. Sibley GNA. A comparison of spontaneous and nerve mediated activity in bladder muscle from man, pig, and rabbit. *J Physiol* 354, 431-443, 1984
27. Somogyi G.T., de Groat W.C. Function, signal transduction mechanisms and plasticity of presynaptic muscarinic receptors in the urinary bladder. *Life Sci.* 64: 411-418, 1999.
28. Somogyi G.T., Tanowitz M., de Groat W.C. M-1 muscarinic receptor mediated facilitation of acetylcholine release in the rat urinary bladder. *J. Physiol.* 480: 81-89, 1994.
29. Somogyi G.T., Zernova G.V., Yoshiyama M., Yamamoto T., de Groat W.C. Frequency dependence of muscarinic facilitation of transmitter release in the urinary bladder strips from neurally intact or chronic spinal cord transected rats. *Br. J. Pharmacol.* 125: 241-246, 1998.
30. Sugaya K, and de Groat WC. Inhibitory control of the urinary bladder in the neonatal rat in vitro spinal cord-bladder preparation. *Dev. Brain. Res.* 138: 87-95, 2002.
31. Szell EA, Yamamoto T, de Groat WC, Somogyi GT. Smooth muscle and parasympathetic nerve terminals in the rat urinary bladder have different subtypes of alpha(1) adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 130, 1685-91, 2000.
32. Szigeti GP, Somogyi GT, Csernoch L, Szell EA. Age-dependence of the spontaneous activity of the rat urinary bladder. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 26(1): 23-9, 2005.
33. Testa R, Guarneri L, Angelico P, Velasco C, Poggesi E, Cilia A, Leonardi A. Effect of different 5-hydroxytryptamine receptor subtype antagonists on the micturition reflex in rats. *BJU Int.* 87(3): 256-64, 2001.
34. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv. Physiol. Educ.* 27(1-4): 201-6, 2003.
35. Yoshida M, Homma Y, Inadome A, Yono M, Seshita H, Miyamoto Y, Murakami S, Kawabe K, Ueda S. Age-related changes in cholinergic and purinergic neurotransmission in human isolated bladder smooth muscles. *Exp Gerontol* 36: 99-109, 2001.
36. Zoubek J., Somogyi G.T., de Groat W.C. A comparison of inhibitory effects of neuropeptide Y on rat urinary bladder, urethra and vas deferens. *Am. J. Physiol.* 265: R537-R543, 1993.