

**Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski**

Kajetan Juszcak

**BADANIA DOŚWIADCZALNE NAD ROLĄ
CZUCIOWYCH WŁÓKIEN TYPU C W PATOGENEZIE
NADAKTYWNEGO
PĘCZERZA MOCZOWEGO**

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Piotr J. Thor

**Praca została wykonana w Katedrze Patofizjologii
Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
Kierownik Katedry i Zakładu: Prof. dr hab. n. med. Piotr J. Thor**

Kraków 2009

**Promotorowi
Panu Prof. dr hab. n. med. Piotrowi J. Thorowi
składam serdeczne podziękowanie
za cenną pomoc, życzliwość i trud**

włożony w opracowanie niniejszej pracy.

Spis treści:

1.	WSTĘP	5
1.1.	Neurofizjologiczne aspekty funkcjonowania dolnych dróg moczowych.....	7
1.1.1.	Unerwienie i kontrola neuronalna pęcherza moczowego.....	8
1.1.2.	Udział czuciowych włókien nerwowych typu C w regulacji procesu mikcji.....	10
1.2.	Rola receptorów waniloidowych (TRPV1) czuciowych zakończeń nerwowych pęcherza moczowego.....	14
1.3.	Patofizjologia pęcherza nadaktywnego.....	16
1.4.	Doświadczalne modele nadaktywnego pęcherza moczowego.....	23
1.5.	Wyniki dotychczasowych badań.....	25
1.5.1.	Kapsaicyna a czynność włókien typu C i aktywność motoryczna pęcherza moczowego ...	25
1.5.2.	Lidokaina a czynność włókien typu C i aktywność motoryczna pęcherza moczowego.....	28
2.	ZAŁOŻENIA PRACY	31
3.	CEL PRACY	32
4.	MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ	33
4.1.	Zwierzęta.....	33
4.2.	Znieczulenie.....	33
4.3.	Grupy badawcze.....	34
4.4.	Procedura chirurgiczna.....	35
4.4.1.	Implantacja cewnika cystometrycznego do pęcherza moczowego.....	35
4.4.2.	Pobranie pęcherza moczowego do badania histologicznego.....	36
4.5.	Podaż środków farmakologicznych.....	36
4.5.1.	Zwierzęcy model nadaktywnego pęcherza moczowego.....	36
4.5.2.	Desensytyzacja aferentnych włókien nerwowych typu C.....	36
4.5.3.	Podaż środka miejscowo znieczulającego – lidokainy (LDK).....	37
4.6.	Schemat badania.....	38
4.6.1.	Ocena aktywności motorycznej pęcherza moczowego.....	38
4.6.2.	Ocena stopnia nasilenia stanu zapalnego w obrębie ścian pęcherza moczowego w różnych protokołach patofizjologicznych.....	42
5.	ANALIZA STATYSTYCZNA WYNIKÓW	45
6.	OMÓWIENIE WYNIKÓW	46
6.1.	Wpływ cyklofosfamidu na aktywność motoryczną pęcherza moczowego...	46
6.2.	Wpływ kapsaicyny oraz lidokainy na aktywność motoryczną pęcherza moczowego.....	51
6.3.	Wpływ kapsaicyny oraz lidokainy na stopień nadreaktywności przewlekłego nadaktywnego pęcherza moczowego.....	56
6.4.	Wpływ cyklofosfamidu na stopień nasilenia stanu zapalnego i aktywność mastocytów w obrębie ścian pęcherza moczowego.....	60

7.	DYSKUSJA.....	62
8.	WNIOSKI.....	72
9.	STRESZCZENIE (<i>Summary</i>).....	73
10.	PIŚMIENNICTWO.....	75
11.	SPIS RYCIN I TABEL.....	84

1. WSTĘP

Nadaktywny pęcherz moczowy (*OAB – overactive bladder*) został zdefiniowany przez Międzynarodowe Towarzystwo Kontynencji (*ICS – International Continence Society*) jako zespół objawów klinicznych charakteryzujący się parciem nagłym, z lub bez nietrzymania moczu z powodu parcia nagłego, częstomoczem oraz nokturią, przy nieobecności lokalnych czynników patologicznych tłumaczących powstawanie takich objawów. Z pojęcia nadaktywności wyłączone zostały zaburzenia czynności pęcherza moczowego

spowodowane przez np. nowotwór, kamice pęcherza moczowego, infekcje dróg moczowych, przeszkodę podpęcherzową (np. łagodny rozrost gruczołu krokowego) oraz zaleganie moczu po mikcji [1, 2]. Zgodnie z definicją ICS do postawienia rozpoznania OAB nie jest konieczne wykonanie badania urodynamicznego. Składowymi obrazu OAB są na przykład nadaktywność wypieracza, dyssynergizm wypieraczowo-zwieraczowy, ostry lub przewlekły ból towarzyszący fazie napełniania, bądź też fazie opróżniania pęcherza moczowego.

Patofizjologia pęcherza moczowego nadal pozostaje stosunkowo słabo poznana, mimo iż mechanizmy kontrolujące czynność dolnych dróg moczowych zostały opisane. Bogate unerwienie aferentne i eferentne dolnych dróg moczowych, wielopoziomowość kontroli neuronalnej procesu mikcji, różnorodność neuroprzekaźników autonomicznego układu nieadrenergiczno-niecholinergicznego (*NANC – non-adrenergic, non-cholinergic*), jak również „czynność neuronalna” urotelium sprawia, iż OAB stanowi poważny problem diagnostyczno - terapeutyczny wymagający odpowiedniego leczenia, gdyż często objawy towarzyszące OAB prowadzą u tych chorych do ograniczenia codziennej aktywności, zaburzenia snu, zaburzeń emocjonalnych (*np. depresja*) oraz spadku jakości życia.

Większość stosowanych leków w terapii OAB ma działanie obwodowe. Ich działanie polega głównie na redukcji kurczliwości mięśnia wypieracza pęcherza moczowego, bądź oddziaływaniu na nerwy aferentne. Charakter i rola unerwienia eferentnego, jak również ich receptorów została dobrze poznana. Dzięki temu obecnie leki antycholinergiczne stanowią leczenie pierwszego rzutu w przypadku OAB, mimo to ich zastosowanie jest ograniczone z uwagi na występowanie szeregu działań niepożądanych (tj. suchość w jamie ustnej, zaburzenia widzenia,

zaparcia, senność, upośledzenie funkcji poznawczych) prowadzących do zaprzestania terapii. Ograniczona liczba leków stosowana w leczeniu OAB, stała się impulsem do poszukiwania nowych kierunków leczenia farmakologicznego i do zgłębienia wiedzy dotyczącej fizjologii i patofizjologii OAB. Problem tkwi jednak nie w tym, aby zahamować kurczliwość pęcherza moczowego, lecz aby wyeliminować nadaktywność oddziałującą na aferentne drogi nerwowe odruchów z dolnych dróg moczowych, jednocześnie nie wpływając na prawidłowy przebieg cyklu mikcyjnego. Ostatnio duże zainteresowanie budzą możliwości oddziaływania farmakologicznego na czuciowe mechanizmy regulujące odruch mikcji, w szczególności na receptory waniloidowe TRPV1 (*Transient Receptor Potential ion channel of the Vanilloid type 1*) [3]. Mimo dość dobrze poznanego charakteru unerwienia aferentnego pęcherza moczowego, warunkiem koniecznym stwarzającym szansę opracowania właściwych metod leczniczych OAB eliminujących jego nadaktywność jest dogłębne poznanie patofizjologii tegoż unerwienia. W chwili obecnej istnieje zgodność poglądów, iż podłoże OAB ma głównie charakter neurogeny. Dotychczasowe badania wskazują na wzmożony rdzeniowy odruch mikcji na tle aktywacji aferentnych włókien nerwowych typu C, jak również rozwój zapalenia neurogennego, jako mechanizmy wiodące w patogenezie OAB.

1.1. Neurofizjologiczne aspekty funkcjonowania dolnych dróg moczowych

Mocz nieustannie produkowany przez nerki jest stale przemieszczany do pęcherza moczowego dzięki regularnej aktywności perystaltycznej moczowodów. Przeciwnie oddawanie moczu jest fizjologicznym procesem zachodzącym

okresowo. Prawidłowa czynność dolnych dróg moczowych wymaga właściwej organizacji dwóch zasadniczych faz cyklu mikcyjnego: wypełniania i magazynowania moczu oraz opróżniania pęcherza moczowego. W procesach tych bierze udział mięsień wypieracz pęcherza moczowego, mięśnie gładkie i zwieracz (mięśnie poprzecznie prążkowane) cewki moczowej oraz mięśnie dna miednicy [4]. Właściwa koordynacja czasowa pracy tych mięśni jest złożona i wymaga wzajemnego, wielopoziomowego współdziałania struktur centralnego systemu nerwowego, wstępujących i zstępujących szlaków unerwienia somatycznego oraz autonomicznego układu nerwowego [5]. Struktury te sprawują świadomą (za pośrednictwem kory mózgowej), jak i odruchową (ośrodki w moście i lędźwiowo-krzyżowym odcinku rdzenia kręgowego) kontrolę nad prawidłowym przebiegiem cyklu mikcyjnego [6]. Fizjologicznie w fazie wypełniania i magazynowania moczu w pęcherzu mięsień zwieracz zewnętrzny i wewnętrzny cewki moczowej, jak również mięsień dźwigacz odbytu pozostają w ciągłym napięciu. Natomiast mięsień wypieracz jest w stanie rozluźnienia, co umożliwia zwiększenie pojemności pęcherza przy niewielkim wzroście ciśnienia śródpecherzowego z zachowaniem prawidłowego czucia (tzw. zjawisko akomodacji). W warunkach prawidłowych mięsień wypieracz nie powinien wykazywać spontanicznej aktywności skurczowej podczas tej fazy cyklu mikcyjnego. Jeśli okoliczności nie pozwalają na oddanie moczu, hamujący wpływ ośrodków nadmostowych na ośrodek mikcji w istocie szarej mostowo-śródmózgowej zapobiega automatycznemu rozpoczęciu mikcji w momencie wypełnienia pęcherza, przy którym odczuwana jest pierwsza potrzeba oddania moczu. U zdrowej osoby prowadzi to do rozkurczu wypieracza pęcherza oraz skurczu cewki moczowej i mięśni dna miednicy, co umożliwia utrzymanie moczu

przez pewien czas. Dopiero w dogodnych warunkach dochodzi do opróżnienia pęcherza moczowego dzięki skoordynowanemu skurczowi mięśnia wypieracza i rozluźnienia aparatu zwieraczowego pęcherza moczowego i cewki moczowej. Ta ścisła zależność następujących po sobie zdarzeń zapewniających prawidłową organizację cyklu mikcyjnego uzmysławia wagę powiązań neurologicznych, które warunkują właściwą czynność dolnych dróg moczowych.

1.1.1. Unerwienie i kontrola neuronalna pęcherza moczowego

Struktury i drogi nerwowe kontrolujące czynność pęcherza moczowego można podzielić na 4 zasadnicze łuki (pętle) odruchowe oddawania moczu [7]. Pętla I przebiega pomiędzy jądrami istoty siatkowatej mostu a grzbietowo-przyśrodkową częścią płata czołowego. Pozostaje ona pod wpływem hamującym zwojów podstawy, mózdzku, układu limbicznego. Natomiast okolica przednia mostu i tylna część podwzgórza pobudza jej aktywność. Pętla ta odpowiada za dowolną kontrolę procesu mikcji podczas gdy, właściwie funkcjonująca pętla II warunkuje prawidłowy czas trwania odruchu mięśnia wypieracza, aż do momentu całkowitego opróżnienia pęcherza. Składa się z aferentnych (proprioceptywnych, rdzeniowo-opuszkowych) szlaków nerwowych biegnących od pęcherza do tworów siatkowatego mostu oraz eferentnych (siatkowato-rdzeniowych) szlaków dochodzących do jąder pośrednio-bocznych odcinka krzyżowego rdzenia kręgowego i mięśnia wypieracza. Pętlę III stanowią drogi dośrodkowe z wypieracza dochodzące do jąder nerwów sromowych w rdzeniu kręgowym i alfa-motoneurony unerwiające zwieracz zewnętrzny cewki moczowej. Pętla ta odpowiada za prawidłową koordynację wypieraczowo-zwieraczową. Dodatkowo nadrdzeniowe i segmentowe unerwienie zwieracza zewnętrznego cewki moczowej tworzy IV pętlę. Aktywność poszczególnych pętli odruchowych może

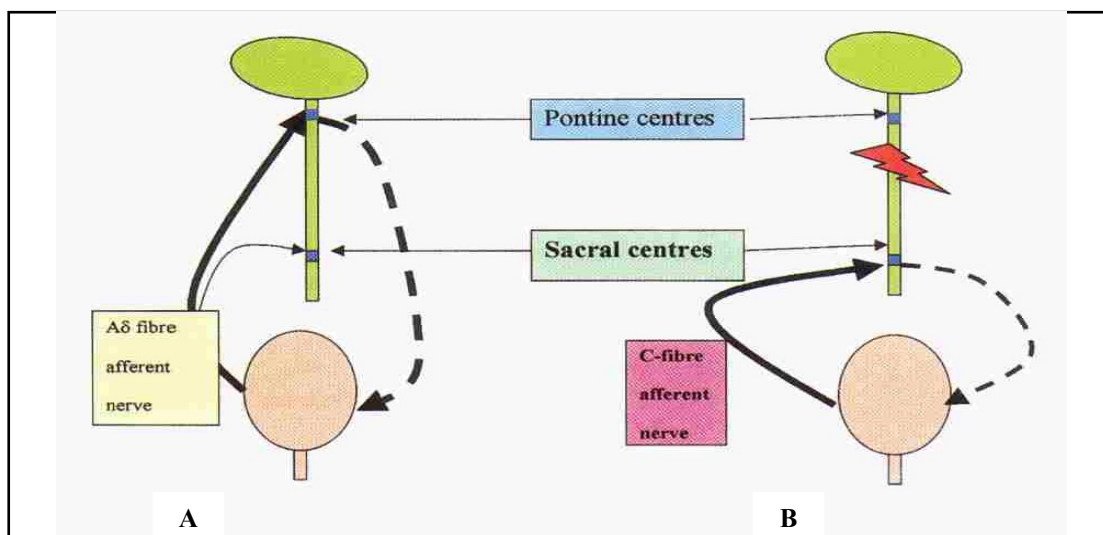
ulec zmianie na skutek uwalniania szeregu neuromodulatorów układu NANC zmieniających odpowiedź postsynaptyczną, szczególnie komponenty czuciowej układu nerwowego. Należą do nich: substancja P, peptyd kodowany genem kalcytoniny, wazoaktywny peptyd jelitowy, tlenek azotu, neuropeptyd Y, serotonina, peptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylową, galanina, adenozynotrójfosforan [8-11].

Unerwienie obwodowe pęcherza moczowego składa się ze zintegrowanego zespołu nerwów czuciowych i ruchowych. W obrębie błony śluzowej i mięśniówki pęcherza stwierdzono obecność wielu receptorów czuciowych, z których informacja przebiega głównie zmielinizowanymi włóknami grupy A podgrupy delta i bezmielinowymi grupy C. Większość tych drugich w warunkach prawidłowych nie wykazuje aktywności elektrycznej (tzw. włókna „nieme”). Charakteryzuje je wolne przewodzenie dośrodkowych sygnałów (około 2 m/s), co jest związane z brakiem osłonek mielinowych oraz ich niewielką średnicą (około 0,2 μm) [12]. Impulsacja eferentna przewodzona jest włóknami wysoce zmielinizowanymi - alfa-motoneuronami. Obecność aferentnych włókien nerwowych wykazano w nerwach somatycznych i autonomicznych unerwiających dolne drogi moczowe. Obwodowe unerwienie czuciowe ściany pęcherza moczowego i cewki moczowej biegnie drogami aferentnymi głównie poprzez nerwy podbrzusne oraz w mniejszym stopniu przez nerwy miednicze i sromowe. Drogi aferentne są odpowiedzialne za odbiór i przekazywanie informacji dotyczącej stopnia wypełnienia pęcherza moczowego [4, 6]. W zakresie unerwienia czuciowego stwierdza się w pewnym stopniu jego specjalizację w zakresie odbieranych bodźców. Rozciąganie pęcherza powoduje wzrost przepływu informacji z mechanoreceptorów w nerwach

parasympatycznych (nn. miedniczne, w mniejszym stopniu nn. podbrzuszne). Aktywacja nocycceptorów zwiększa przewodnictwo w nerwach sympatycznych oraz parasympatycznych. Natomiast informacja dośrodkowa dotycząca rozciągania, przepływu moczu, temperatury i bólu ze zwieracza i cewki moczowej przewodzona jest nn. sromowymi.

1.1.2. Udział czuciowych włókien nerwowych typu C w regulacji procesu mikcji

Dotychczasowe obserwacje wykazały, iż odruch mikcji jest indukowany z sygnałów pochodzących z włókien A delta, gdyż większość włókien dośrodkowych grupy C w warunkach prawidłowych nie wykazuje aktywności elektrycznej [13]. Włókna C są odpowiedzialne za odczucia związane z

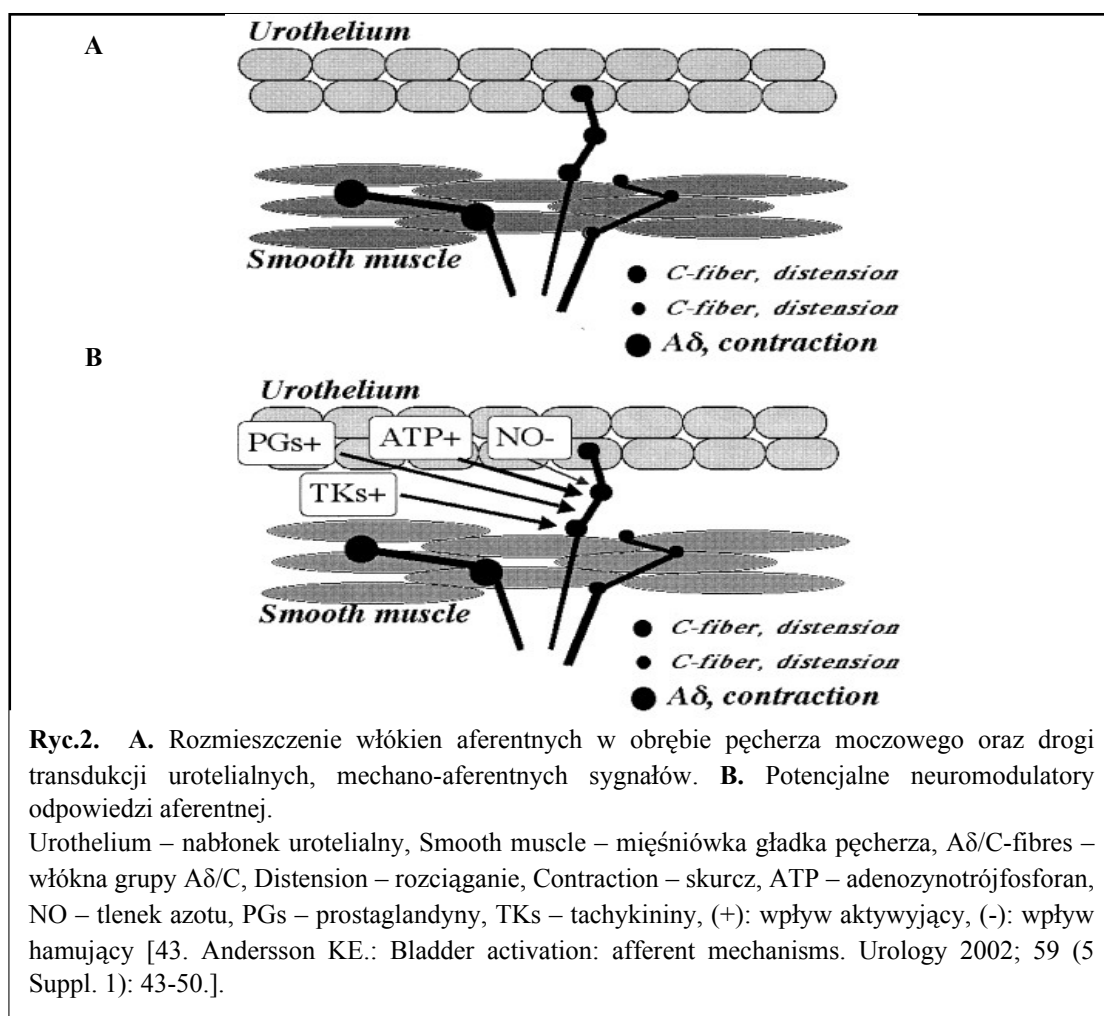


Ryc.1. A. Prawidłowe unerwienie aferentne pęcherza moczowego przez włókna A delta, z niewielką aktywnością synaptyczną włókien C na poziomie rdzeniowym. **B.** Aktywacja „wtórnego szlaku przewodzącego” przy braku wpływu ośrodków nadrdzeniowych na ośrodek krzyżowy mikcji (np. po urazie rdzenia kręgowego).

Pontine centers – ośrodki mostowe, Sacral centers – ośrodki krzyżowe, Aδ fibre afferent nerve – aferentne włókna grupy A podgrupa δ, C-fibre afferent nerve – aferentne włókna grupy C [36. de Ridder D, Baert L.: Vanilloids and the overactive bladder. BJU Int. 2000, 86: 172 - 180].

wypełnieniem pęcherza moczowego - mechanorecepcją oraz odbiorem „sygnałów podrażnieniowych” - nocycepcją (drażnienie chemiczne, termiczne – zimno, bodźce potencjalnie uszkodzające barierę śluzówkową) [14, 15]. Ich stymulacja prowadzi do aktywacji mikcji. Ten „alternatywny system przewodzący” mediowany włóknami C, zamykany na poziomie rdzenia kręgowego, jest jednym z wiodących mechanizmów patogenezy OAB, jak również jest „nadrzędnym szlakiem” aktywującym mikcję u chorych po urazie rdzenia kręgowego, u których ośrodek krzyżowy mikcji pozostaje poza modulującym wpływem ośrodkowego systemu nerwowego (Ryc.1.).

U ludzi i zwierząt włókna aferentne zostały zidentyfikowane w warstwie podśluzowej oraz w obrębie mięśniówki wypieracza. Włókna podśluzowe tworzą sploty nerwowe leżące między warstwami nabłonka, urotelium, niektóre z nich zlokalizowane są nawet w części podstawnej urotelium. Największą ich koncentrację stwierdzono w obrębie szyi i trójkąta pęcherza moczowego [16-19] (Ryc.2.). Jeszcze kilka lat temu urotelium i błona podśluzowa były uważane za bierną barierę mocz/krew. Obecnie urotelium jest uważane za główną strukturę czuciową. Wiele substancji zawartych w moczu działa na urotelium i za jego pośrednictwem na mięśniówkę pęcherza dzięki obecności na jego powierzchni



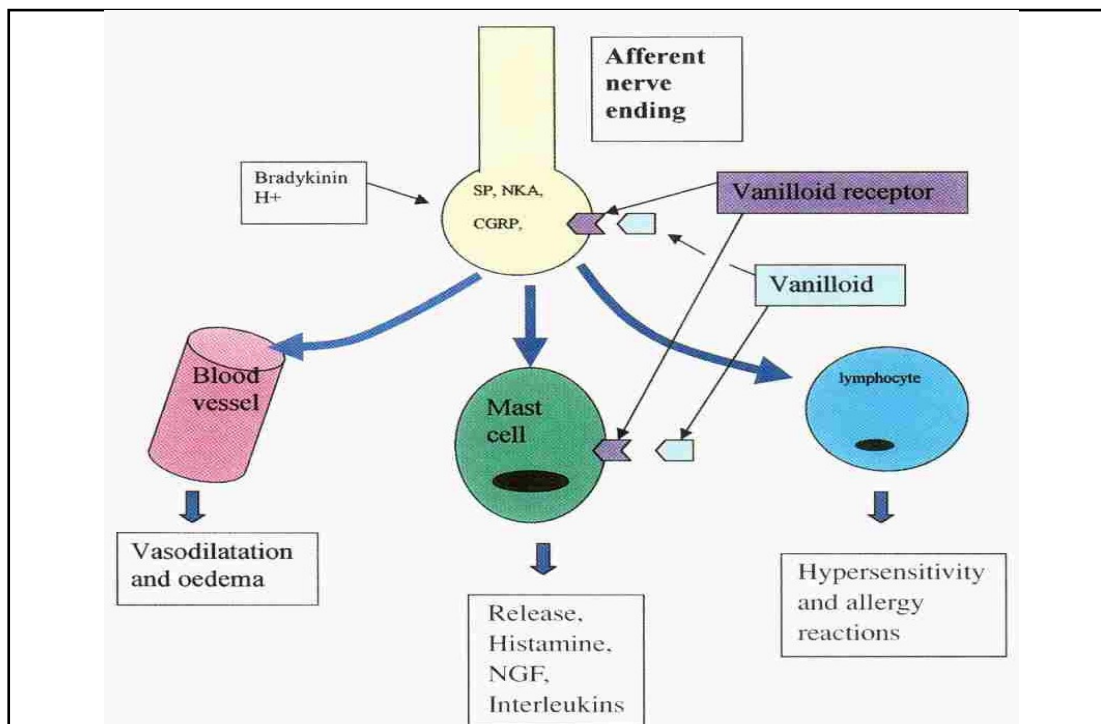
szeregu receptorów i kanałów jonowych [5, 20].

Urotelium moduluje funkcje aferentnych i eferentnych włókien nerwowych oraz mięśni gładkich za pośrednictwem uwalnianych mediatorów stanu zapalnego (neurokinin, prostaglandyn), czynników wzrostu (NGF – *nerve growth factor*) oraz neuropeptydów w odpowiedzi na bodziec mechaniczny i nocyceptywny. Powyższe czynniki sprawiają, że urotelium moduluje aktywność (i prawdopodobnie „kodowanie chemiczne”) obwodowych włókien nerwowych [21, 22]. Obecnie coraz większą rolę w patogenezie OAB przypisuje się purynergicznym włóknom czuciowym, których zasadniczym transmiterem jest ATP, oddziałujący w pęcherzu i cewce moczowej na szereg podtypów receptorów purynergicznych, zarówno klasy PX jak i PY. Ważną rolę spełniają włókna nerwowe wykazującym ekspresję polimodalnych receptorów waniloidowych klasy TRPV1 [9, 23, 24]. Ponadto istotne wydają się być receptory tachykinowe (NK-1 i NK-2) oraz receptory dla prostacykliny zidentyfikowane na zakończeniach włókien nerwowych typu C [25, 26]. Odkryte ostatnio przez Du i wsp. [27] receptory TRPA1 (*Transient Receptor Potential ion Channel of the Ankyrin type A1*) zlokalizowane na aferentnych włóknach typu C unerwiających pęcherz moczowy prawdopodobnie także biorą udział w mechano- i/lub nocycepcji. Wykazano, iż podaż agonistów TRPA1 prowadzi do rozwoju nadaktywności pęcherza za pośrednictwem łuku nerwowego mediowanego włóknami typu C. Dodatkowo, obserwacje Strenga i wsp. potwierdzają ich prawdopodobny udział w transdukcji impulsacji aferentnej [28]. Mimo to rola tych receptorów w patogenezie OAB pozostaje niewyjaśniona.

Wydaje się, że czułość włókien C zależy od stopnia ekspresji receptorów dla mediatorów stanu zapalnego i czynników wzrostu. W patogenezie rozwoju nadaktywności oraz nasilenia dolegliwości w przebiegu OAB odgrywają istotną

rolę dwa zjawiska: proces sensytyzacji oraz lokalna efektorowa czynność włókien nerwowych typu C. W procesie sensytyzacji dochodzi do zwiększenia czułości tych włókien na szereg bodźców działających na urotelium. Natomiast wzmożona aktywacja włókien C, a co za tym idzie nasilona lokalna efektorowa czynność tych włókien prowadzi do rozwoju tzw. „zapalenia neurogenego” (Ryc.3.).

Wiadomo, że nadwrażliwość włókien aferentnych w przebiegu OAB objawia się nadmierną odpowiedzią na działanie agonistów, co może intensyfikować dolegliwości zgłaszane przez pacjentów z OAB. Yokoyama i wsp. [29] wykazali zwiększoną odpowiedź na działanie agonistów muskarynowych. Również Harrison i wsp. [30] zaobserwowali wystąpienie nadwrażliwości po podaniu agonistów cholinergicznym oraz substancji otwierających kanały potasowe w mięśniówce wypieracza.



Ryc.3. Lokalna, efektorowa czynność aferentnych włókien nerwowych typu C. Aktywacja (waniloidy, bradykinina, jony H^+ , etc.) włókien nerwowych wykazujących ekspresję receptorów waniloidowych (TRPV1) prowadzi do uwolnienia szeregu mediatorów (substancja P - SP, peptyd kodowany genem kalcytoniny – CGRP, neurokinina A – NKA, etc.). Uwolnione neuromediatory wpływają m.in. na czynność naczyń krwionośnych, mastocytów oraz limfocytów prowadząc do rozwoju tzw. „zapalenia neurogennego” i alergicznych reakcji o typie nadwrażliwości.

Afferent nerve endings – zakończenia nerwu czuciowego, Vanilloid receptor – receptor waniloidowy (TRPV1), Vanilloid – waniloid (np. kapsaicyna, resiniferotoksyna), Blood vessel – naczynie krwionośne, Vasodilatation and oedema – rozszerzenie naczyń i obrzęk, Mast cell – mastocyt, Lymphocyte – limfocyt, Release: histamine, NGF – nerve growth factor, interleukins – uwolnienie: histaminy, czynnika wzrostu nerwów, interleukin, Hypersensitivity and allergy reactions – nadwrażliwość i reakcje alergiczne.

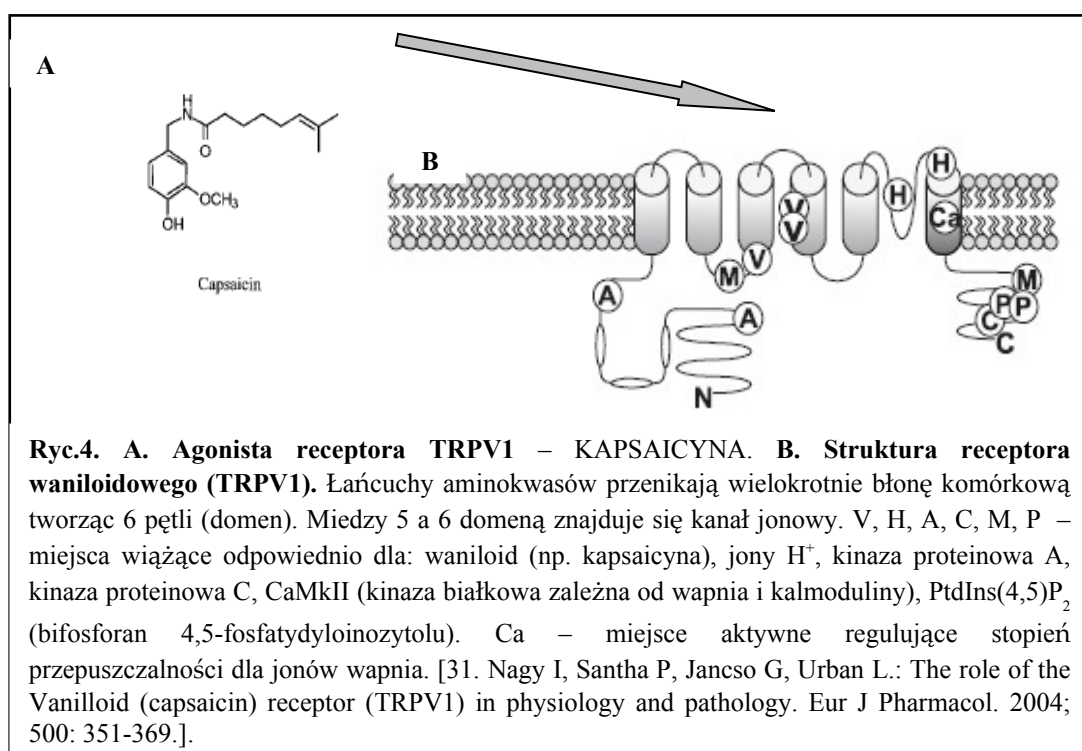
[97. Szallasi A, Blumberg PM.: Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. Pharmacol Rev 1999; 51: 159-212.].

1.2. Rola receptorów waniloidowych (TRPV1) czuciowych zakończeń nerwowych pęcherza moczowego

Polimodalne receptory uszkodzeniowe neuronów aferentnych TRPV1 są czujnikami potencjalnie uszkodzających bodźców takich jak: jony H^+ , anandamid, produkty lipooksygenazy, temperatura ($> 43^{\circ}C$), zmiany składu moczu (spadek pH do 4,5 w przebiegu kwasicy ketonowej, wysoka osmolarność: 2000mOsm/kg na skutek cukromoczu). Te błonowe integralne receptory waniloidowe, których naturalnym ligandem jest 8-metyl-N-vanillyl-6-nonamid (KAPSAICYNA), zlokalizowane są na nieselektywnych kanałach jonowych o

wysokiej przepuszczalności dla Ca^{++} (Ryc.4.). Ich aktywacja poza indukcją napływu jonów wapnia, doprowadza do aktywacji mastocytów, kinazy proteinowej C, NADH-oksydoreduktazy oraz czynnika transkrypcji jądrowej Bkqa-1-kwaśnej glikoproteiny [31]. Receptory TRPV1 są nie tylko czujnikami stopnia uszkodzenia śluzówki pęcherza moczowego. Ich zwiększona ekspresja na neuronach czuciowych (tzw. włóknach kapsaicyno-wrażliwych) spowodowana przez mediatory bólowe, jak adenylozotrójfosforan, bradykinina, prostaglandyny (PGE_2), prowadzi do sensytyzacji włókien czuciowych (rozwój nadwrażliwości trzewnej), w konsekwencji prowadząc do zaburzeń czynnościowych ze strony dolnych dróg moczowych (w szczególności pęcherza moczowego).

Mechanizmy odpowiedzialne za sensytyzację i aktywację kapsaicyno-wrażliwych włókien typu C nie zostały w pełni wyjaśnione. Doświadczenia Chuanga i wsp.



[32] oraz Vizzarda i wsp. [33] wskazują na udział mediatorów stanu zapalnego, głównie czynnika wzrostu nerwów w procesie sensytyzacji tych włókien. Mediatorzy te również prowadzą do zmian potranslacyjnych receptorów TRPV1,

co może skutkować zmniejszeniem progu pobudliwości tych receptorów i prowadzić do ich sensytyzacji lub aktywacji. Fakt ten potwierdzają badania na myszach wykonane przez Caterinę i wsp. [34] oraz Davisa i wsp. [35]. W obu przypadkach autorzy oceniali wpływ szeregu bodźców nocycyptywnych na reakcję bólową zwierząt wykazując, iż stan zapalny tkanek obwodowych zmniejsza próg bólowy na bodziec termiczny, natomiast nie ma wpływu u zwierząt pozbawionych receptorów TRPV1.

Jak dotąd uważano, iż bezmielinowe włókna czuciowe typu C wykazujące pozytywną ekspresję TRPV1 nie biorą udziału w regulacji cyklu mikcyjnego w warunkach fizjologii, gdyż są niewrażliwe na bodźce mechaniczne [36]. Birder i wsp. [37] w pracy na myszach pozbawionych receptora TRPV1 wykazali, że u takich zwierząt dochodzi do zwiększonej częstości oddawania moczu oraz zwiększonej częstości skurczów o niskiej amplitudzie nie wywołujących mikcji. Obserwacje te jednoznacznie wskazują na udział receptorów TRPV1 w procesie mikcji nie tylko w stanach patologicznych (np. stan zapalny pęcherza moczowego), ale również w warunkach prawidłowych.

1.3. Patofizjologia pęcherza nadaktywnego

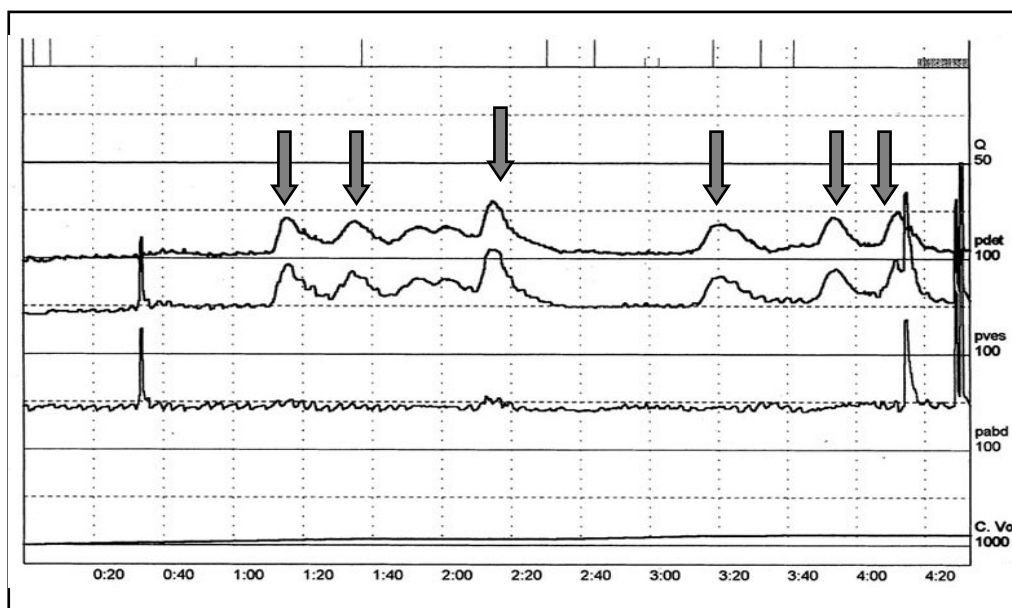
Termin „pęcherz nadaktywny” zawiera w sobie takie pojęcia jak częstomocz (*wielokrotne oddawanie niewielkich ilości moczu spowodowane bolesnymi parciami, wywołanymi patologicznymi skurczami pęcherza podczas jego wypełniania*), nokturia (*częste oddawanie moczu w nocy*), parcie naglące (*nagła, niepohamowana potrzeba oddania moczu spowodowana nieprawidłowymi skurczami pęcherza, pojawiającymi się w trakcie jego wypełniania*) czy też nietrzymanie moczu z powodu parcia naglącego

(mimowolny, niedający się powstrzymać wyciek moczu spowodowany parciaми nagłącymi) lub obserwowane w badaniu urodynamicznym skurcze fazowe wypieracza o dowolnej amplitudzie i czasie trwania. ICS opisuje dwa rodzaje nadaktywności wypieracza: terminalną *(jako pojedynczy niekontrolowany skurcz wypieracza pojawiający się przy pojemności cystometrycznej pęcherza, który nie może być zahamowany i w wyniku, którego następuje nietrzymanie moczu)* oraz fazową *(jako charakterystyczny obraz fal w zapisie krzywych urodynamicznych, mogący prowadzić do nietrzymania moczu)* [2].

Zaproponowana niedawno przez Flissera i wsp. [128] urodynamiczna klasyfikacja pacjentów z OAB, opierająca się na ocenie obecności nadaktywności wypieracza, odczuwania skurczu przez pacjenta i zdolności do zahamowania skurczu, stała się przydatna w wyborze metody leczenia OAB. Określa ona 4 typy OAB. Typ 1: pacjent ma objawy OAB, ale brak niekontrolowanych skurczów wypieracza. Typ 2: stwierdza się niekontrolowane skurcze wypieracza, pacjent je czuje i jest w stanie skurczyć zwieracz, przez co zapobiega wyciekowi i hamuje skurcz wypieracza. Typ 3: występują niekontrolowane skurcze wypieracza, pacjent je czuje i jest w stanie skurczyć zwieracz i zapobiec wyciekowi, ale nie potrafi zahamować skurczu wypieracza. W chwili, gdy zwieracz zmęczy się, następuje wyciek. Typ 4: występują niekontrolowane skurcze wypieracza. Pacjent nie jest w stanie ani skurczyć zwieracza, ani zahamować skurczu wypieracza. Oddaje mocz w niekontrolowany sposób.

Pojęcie „pęcherz nadaktywny” lub „pęcherz nadreaktywny” bywa używane wymiennie z „nadreaktywnością wypieracza”. Jakkolwiek pierwsze określa zespół objawów klinicznych, drugie natomiast oznacza obiektywnie stwierdzone w badaniu urodynamicznym skurcze pęcherza podczas jego

napękania (Ryc.5). Rozbieżność terminologii dotyczącej „pęcherza nadaktywnego” i „pęcherza nadreaktywnego” charakteryzującą de facto tę samą jednostkę chorobową, jaką jest OAB, wydaje się wynikać z odmiennych patofizjologicznych mechanizmów wywołujących objawy OAB tj. „zbyt częstą reakcję”, bądź „zbyt intensywną reakcję” pęcherza na działające bodźce [38].



Ryc.5. Wielokanałowy zapis cystometryczny u pacjenta z idiopatycznym nadaktywnym pęcherzem moczowym, ukazuje szereg mimowolnych skurczów mięśnia wypieracza (strzałki). C.Vol – ilość podanego płynu infuzyjnego, P_{abd} – ciśnienie śródbrzuszne, P_{det} – ciśnienie wypieracza, P_{ves} – ciśnienie śródpęcherzowe. [119. Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ: „Campbell’s Urology”. 8th Edition Vol.2. Chapter 25. Urodynamic evaluation Saunders, ElsevierScience, 2002.]

Patofizjologia OAB jest nadal stosunkowo mało poznana. Wśród wielu mechanizmów prowadzących do rozwoju nadaktywności najistotniejsze wydają się być: zmniejszenie hamującego działania kory mózgowej, zwiększenie aktywności unerwienia aferentnego, zmniejszenie wrażliwości wypieracza na uwalnianą acetylocholinę oraz nieprawidłowa kurczliwość wypieracza – niezależna od układu nerwowego [39].

Etiopatogeneza nadreaktywności jest złożona. Istnieje wiele teorii powstawania nadreaktywności. Dwie najbardziej uznane to teoria miogenna, sugerująca zaburzenia w czynności skurczowej mięśnia wypieracza i jego nadwrażliwości na

bodźce oraz neurogenna, sugerująca zaburzenia w unerwieniu pęcherza moczowego jako pierwotną przyczynę nadreaktywności [40, 41]. Poznanie modulującego wpływu urotelium na aktywność zakończeń nerwowych i komórek mięśniowych potwierdza, iż w każdym przypadku nadreaktywności bierze udział czynnik neuronalny (receptory, szlaki nerwowe) oraz mięśniowy (miofibroblasty) [42, 43]. Ponadto nadreaktywność może mieć podłoże psychosomatyczne (np. w przebiegu depresji, nerwic lękowych), zapalne (z powodu nawracających infekcji dolnych dróg moczowych) lub nieznane - nadreaktywność idiopatyczna.

Pierwsze doświadczenia z chorymi z poważnymi dolegliwościami ze strony dolnych dróg moczowych dotyczyły pacjentów z uszkodzeniem rdzenia kręgowego. Teoria neurogenna nadreaktywności znalazła swoje potwierdzenie w przypadku pacjentów po urazie rdzenia kręgowego, u których dochodzi do aktywacji włókien nerwowych typu C i powstania krótkiego (rdzeniowego) odruchu miki, bez modulującego wpływu ośrodkowego układu nerwowego [23]. Podobnie nadmierna aktywność wypieracza może wystąpić w przebiegu uszkodzenia kory mózgowej, demencji, bądź choroby Parkinsona na skutek zniesienia centralnego hamowania fazy wypełniania i magazynowania procesu miki. U około 58% chorych z chorobą Parkinsona lub zespołami Parkinsonowskimi w badaniu urodynamicznym stwierdza się nadreaktywność wypieracza [47]. Yokoyama i wsp. wykazali u szczurów z zawałem niedokrwiennym kory mózgowej spadek pojemności cystometrycznej o 50% w porównaniu z grupą kontrolną [48]. Także w przypadku stwardnienia rozsianego, na skutek zmian demielinizacyjnych w obrębie centralnego systemu nerwowego, dochodzi do zmniejszenia pojemności cystometrycznej pęcherza oraz pojawienia skurczów nadreaktywnego wypieracza.

Zgodnie z teorią miogenną, nadaktywność może rozwinąć się na skutek podpęcherzowego utrudnienia w odpływie moczu (przeszkody) spowodowanego łagodnym rozrostem gruczołu krokowego, zastawką cewki tylnej, dysfunkcją szyi pęcherza, nieprawidłowym działaniem zwieraczy podczas mikcji (brak synergii wypieraczowo-zwieraczowej), bądź znacznym obniżeniem przedniej ściany pochwy, jak również zmianami pooperacyjnymi po leczeniu zabiegowym z powodu nietrzymania moczu u kobiet [49]. Patofizjologia tych zmian jest wciąż niejasna. Główną przyczynę upatruje się w zaburzeniu funkcji samego mięśnia wypieracza. Wiadomo, iż w przypadku przeszkody podpęcherzowej mięsień wypieracz wykazuje cechy przerostu objętościowego ze zmniejszeniem ilości zakończeń nerwów parasympatycznych – cholinergicznym [30]. Dochodzi do zbliźnowacenia jego ścian, spadku podatności i w konsekwencji do zwiększenia śródpęcherzowych ciśnień w fazie opróżniania procesu mikcji. Prowadzi to do spadku przepływu krwi w obrębie ścian pęcherza i aktywacji mechanizmów odnerwienia spowodowanego ischemicznym uszkodzeniem splotów śródściennych. Odnerwienie ruchowe powoduje sensytyzację mięśniówki gładkiej przez wzrost potencjałów błonowych i częściową depolaryzację błony komórkowej mięśniówki gładkiej, co prowadzi do nadaktywności. W eksperymentalnych modelach przeszkody podpęcherzowej u szczurów wykazano zwiększenie gęstości unerwienia aferentnego i eferentnego oraz obecności czynnika wzrostu nerwów [50]. Przyczyn tych zmian upatruje się w procesach niedokrwiennych i związanej z nimi hipoksją [30, 51].

U podstaw nadaktywności może leżeć tzw. zjawisko „kropli moczu w cewce”. Jest ono szczególnie ważne u kobiet z wysiłkowym nietrzymaniem moczu, u których u ponad 30% przypadków stwierdza się współlistniejącą

nadreaktywność wypieracza (*postać mieszana nietrzymania moczu*). Zjawisko to polega na przedostawaniu się porcji moczu przez niewydolny aparat zwieraczowy pęcherza i cewki moczowej powodując podrażnienie chemiczne prowadzące do odruchowego, nadaktywnego skurczu wypieracza oraz parcia naglącego, któremu towarzyszy lub nie, nietrzymanie moczu. Odruch ten bierze udział w prawidłowej fazie opróżniania pęcherza moczowego. Przepływ moczu przez część proksymalną cewki moczowej, przy rozluźnionym zwieraczu, zwiększa ciśnienie śródpecherzowe, co ułatwia mikcję [52]. Bump wykazał, iż podanie środka miejscowo znieczulającego (*np. lidokainy*) zmniejsza częstość i amplitudę skurczów wypieracza podczas perfuzji cewki moczowej, co potwierdza zjawisko chemorecepcji cewkowej. [53].

Wykazano, że depresja jest jedną z chorób zwiększających ryzyko powstania nadreaktywności. W jej przebiegu szczególnie często dochodzi do zaburzenia czynności szlaków i przewodnictwa serotonergicznego, co przypuszczalnie może mieć wpływ na nieprawidłowe przewodzenie w obrębie szlaków nerwowych unerwiających dolne drogi moczowe i w konsekwencji zaburzać prawidłowy cykl mikcji [54]. Z przeprowadzonych badań doświadczalnych na zwierzętach wynika, że podaż agonistów receptorów serotonergicznym redukuje aktywność układu parasympatycznego a nasila układu sympatycznego i somatycznego, natomiast antagoniści mają działanie przeciwne [55, 56]. Wielu pacjentów leczonych z powodu nerwicy lękowej cierpi na dolegliwości ze strony dolnych dróg moczowych, w tym objawy sugerujące nadaktywność. Jednak rola wymienionych schorzeń w patofizjologii OAB nadal pozostaje niewyjaśniona [57].

Omawiając patofizjologię OAB należy wspomnieć o pojęciu starzejącego się pęcherza jako jednym z przyczyn nadreaktywności. Resnick i wsp. [58] stwierdzili obecność objawów OAB u około 60% populacji starszych mężczyzn i kobiet w ośrodkach opiekuńczych. Na podstawie przeprowadzonych badań urodynamicznych u tych chorych stwierdzono zmniejszoną kurczliwość mięśnia wypieracza oraz jego nadreaktywność. Z wiekiem w pęcherzu moczowym dochodzi do szeregu zmian histopatologicznych, takich jak: zwiększenie ilości nieprawidłowych połączeń międzykomórkowych miocytów gładkich, zmian niedokrwiennych oraz degeneracyjnych miocytów i aksonów komórek nerwowych [59]. German i wsp. [60] wykazali istnienie spontanicznej aktywności mechanicznej wynikającej z nieprawidłowej struktury połączeń międzykomórkowych w przebiegu nadreaktywności spowodowanej denerwacją.

Kolejną hipotezą nadreaktywności jest zmniejszenie aktywności estrogenowej w grupie starszych kobiet [61]. Barta i wsp. [62] zaobserwowali zmniejszoną czułość mięśnia wypieracza na aktywację cholinergiczną i zmniejszoną gęstość receptorów muskarynowych w pęcherzach u szczurów po podaniu estrogenów. Nadal mało poznany jest wpływ hormonów jajnikowych na czynność pęcherza. Ich udział sugeruje obecność receptorów estradiolowych w komórkach zwojów czuciowych korzeni tylnych [63].

Zwiększona aktywacja unerwienia aferentnego w przebiegu nawracających infekcji dolnych dróg moczowych wydaje się być przyczyną zwiększonej częstości występowania objawów OAB w tej grupie pacjentów. Zapalenie może powodować zmiany w przewodzeniu nerwowym na poziomie narządu docelowego, bądź rdzenia kręgowego [64]. Zwiększona ekspresja czynnika wzrostu nerwów, jak również prostaglandyn i tachykin może brać

udział we wzroście impulsacji czuciowej prowadząc do skurczów wypieracza w przypadku zakażenia układu moczowego [64, 65].

1.4. Doświadczalne modele nadaktywnego pęcherza moczowego

Jak dotąd opracowano kilka zwierzęcych modeli pęcherza nadaktywnego. Rozwój nadreaktywności uzyskiwany jest dzięki dopęcherzowej podaży szeregu substancji drażniących, indukujących stan zapalny i/lub uszkodzenia bariery śluzówkowej pęcherza moczowego takich jak: kwas octowy, ksylen, olej musztardowy, terpentyna, dimetylosylofotlenek, siarczan protaminy, chlorek potasu, kapsaicyna, adenozyntrójfosforan i cyklofosfamid [66-72].

Model pęcherza nadaktywnego wywołany dootrzewnową podażą cyklofosfamidu (*CYP – cyclophosphamide*) indukującą stan zapalny ścian pęcherza moczowego jest najlepiej poznanym i najczęściej wykorzystywanym modelem w badaniach doświadczalnych. Wyróżniamy trzy modele: ostry (*rozwój nadaktywności zachodzi po upływie 4 godz. od momentu podania CYP*), podostry (*po 48 godz.*) i przewlekły (*po 7-10 dniach*) [73, 74]. Akroleina, będąca głównym metabolitem cyklofosfamidu, jest wydalana z moczem [75]. W obrębie dróg moczowych pęcherz moczowy jest najbardziej narażonym narządem na drażniące działanie akroleiny z uwagi na jego funkcję rezerwuarną i związaną z tym dłuższą ekspozycję na toksyczne działanie metabolitów CYP. Akroleina indukuje obrzęk, zapalenie i często prowadzi do owrzodzeń nabłonka dróg moczowych. U 40% chorych terapia standardową dawką CYP prowadzi do krwotocznego zapalenia pęcherza moczowego, zaburzeń w oddawaniu moczu oraz niekontrolowanych skurczów pęcherza. Ponadto opisano rzadkie przypadki

nietrzymania moczu, refluksu moczowodowego oraz wtórnych nowotworów z nabłonka urotelialnego [76-78]. Boucher i wsp. [79] zaobserwowali u szczurów po dootrzewnowej podaży CYP częstsze oddawania małych objętości moczu oraz w przypadku modelu ostrego OAB, tzw. „pain-related behaviour” (charakterystyczna pozycja zwierzęcia: zwinięcie w „kłębek”, zmniejszona aktywność motoryczna oraz piloerekcja). Dotychczasowe badania przeprowadzone na szczurach poddanych przewlekłej podaży CYP wskazują na reorganizację kontroli neuronalnej procesu mikcji na skutek zmian czynności neurochemicznej [80, 81], własności elektrofizjologicznych [82, 83] włókien czuciowych oraz reorganizacji szlaków nerwowych na poziomie rdzenia [84]. Ponadto, pęcherze moczowe u szczurów leczonych CYP wykazują znaczne uszkodzenia bariery śluzówkowej, co skutkuje wzrostem przepuszczalności dla wody, mocznika i innych składników zawartych w moczu (szczególnie kinin). Związki te mogą poprzez aktywację podśluzówkowych zakończeń włókien aferentnych (głównie typu C), komórek urotelium oraz miocytów gładkich mięśnia wypieracza, przyczyniać się do nasilenia objawów OAB [74]. Nadreaktywność w przebiegu stanu zapalnego pęcherza moczowego prawdopodobnie spowodowana jest przez sensytyzację mechanoreceptorów włókien aferentnych i/lub aktywację „niemych” włókien aferentnych typu C, które w warunkach prawidłowych są nieaktywne na bodziec mechaniczny [84, 85].

1.5. Wyniki dotychczasowych badań

1.5.1. Kapsaicyna a czynność włókien typu C i aktywność motoryczna pęcherza moczowego

Kapsaicyna, pierwotnie uzyskiwana z pieprzu i ostrej papryki rodzaju *Capsicum annuum* (odpowiedzialna za ostry smak tych przypraw), obecnie jest otrzymywana także za pomocą syntezy chemicznej. Jej właściwości przeciwbólowe były znane i wykorzystywane już przez Inków w XII wieku. Po raz pierwszy została wyizolowana z owocu papryki czerwonej w 1846 roku, a w 1930 roku dokonano jej sztucznej syntezy na drodze chemicznej.

Wykazanie istnienia tzw. aferentnych, kapsaicyno-reaktywnych włókien nerwowych typu C odpowiedzialnych za reorganizację odruchu mikcji po urazie rdzenia kręgowego rozpoczęło erę neurotoksyn w leczeniu zachowawczym zaburzeń czynnościowych dolnych dróg moczowych, w szczególności OAB. To odkrycie umożliwiło zastosowanie neurotoksyny selektywnej wobec włókien typu C – kapsaicyny. Pierwsze doniesienie o dopęcherzowym zastosowaniu kapsaicyny w przypadku OAB zostało opublikowane w 1989 roku [86]. Trzy lata później Fowler i wsp. [87] potwierdzili jej korzystne działanie u chorych z OAB. Dalsze badania doświadczalne na zwierzętach doprowadziły do odkrycia receptora waniloidowego TRPV1. Okazało się, że kapsaicyna działając agonistycznie za pośrednictwem receptora TRPV1 początkowo powoduje pobudzenie aferentnych włókien typu C, a następnie prowadzi do neurolizy i porażenia transmisji czuciowej w zakresie tych włókien [8, 88]. W fazie pobudzenia dochodzi do nagłego, masowego wydzielania neuropeptydów z zakończeń nerwowych, co indukuje ból, wzrost przepływu krwi i przepuszczalności naczyniowej, wzrost aktywności wydzielniczej oraz obrzęk otaczających tkanek. Tę kaskadę szeregu następujących po sobie procesów,

wywołaną nadmiernym „wyrzutem” neuropeptydów z zakończeń nerwowych, określa się mianem zapalenia neurogennego. Faza pobudzenia spowodowana podażą kapsaicyny oczywiście prowadzi do nasilenia dolegliwości pęcherzowych (parć naglących) oraz wzmacnia czucie bólu. To spowodowało poszukiwanie innej neurotoksyny, niemającej działania pobudzającego. Wykryta resiniferotoksyna (*RTX - resiniferotoxin*), działająca także za pośrednictwem receptorów TRPV1 wywołuje jedynie porażenie neuronów i dodatkowo prowadzi do zmiany fenotypu komórek nerwowych (tzw. zjawiska plastyczności neuronalnej - zdolności adaptacyjnej unerwienia do zmian struktury anatomicznej i histologicznej unerwionych przez nie narządów). Dzięki tym właściwościom RTX znalazła szersze niż kapsaicyna zastosowanie, m.in. w leczeniu neurogennej i nieneurogennej nadreaktywności wypieracza oraz śródmiąższowego zapalenia pęcherza moczowego. Efektywność RTX została potwierdzona w wielu badaniach klinicznych i waha się w granicach 45-66% w zależności od rodzaju schorzenia [89, 90].

Dopęcherzowa podaż agonistów receptorów TRPV1 (kapsaicyny, resiniferotoksyny) nasila aktywność skurczową mięśniówki gładkiej pęcherza moczowego i prowadzi do rozwoju zapalenia neurogennego w obrębie jego ścian [91, 92]. Najstarsza powszechnie akceptowana hipoteza tego zjawiska zakłada bezpośrednią aktywację kapsaicyno-wrażliwych aferentnych włókien nerwowych w warstwie podśluzowej (za pośrednictwem receptorów TRPV1), prowadząc do uwalniania substancji P, która to prowadzi do sensytyzacji komórek mięśniowych prowadząc do wzrostu jej kurczliwości [93]. Późniejsze badania prowadzone na zwierzętach przez Fergusoną i wsp. [94] oraz Birdera i wsp. [95] wykazały obecność dodatkowych receptorów TRPV1 w urotelium, których aktywacja

prowadzi do uwalniania ATP i w konsekwencji stymulacji zakończeń aferentnych posiadających na swej powierzchni receptory P2X₃. Rozciąganie mechaniczne pęcherza aktywuje włókna nerwowe wykazujące pozytywną ekspresję TRPV1 bezpośrednio lub za pośrednictwem ATP uwalnianego z urotelium. Wyniki badań przeprowadzonych przez de Groata i wsp. [96] oraz Fowlera [97] wskazują, że u podstaw patogenezy patologicznego odruchu mikcyjnego charakteryzującego się nietrzymaniem moczu z powodu parcia, zmniejszeniem pojemności pęcherza i okresowo refluksem moczowodowym leży proces sensytyzacji kapsaicynowrażliwych włókien nerwowych typu C spowodowany stanami zapalnymi, bądź urazem rdzenia kręgowego. Selektowna denerwacja zakończeń czuciowych wywołana przez dopęcherzową podaż kapsaicyny lub resiniferotoksyny zmniejsza stopień nasilenia dolegliwości w przebiegu wielu chorób czynnościowych pęcherza moczowego na skutek znoszenia rdzeniowego, mediowanego włóknami typu C, odruchu mikcji w rezultacie prowadząc do zmniejszenia częstości opróżniania pęcherza i zwiększenia pojemności pęcherza [98-102].

Skutkiem działania kapsaicyny jest występowanie dolegliwości w trakcie jej dopęcherzowego podawania, pomimo to neurotoksyna ta jest głównie wykorzystywana jako narzędzie farmakologiczne w doświadczalnych badaniach nad czynnością włókien typu C, dzięki jej wysokiej swoistości względem receptorów TRPV1.

1.5.2. Lidokaina a czynność włókien typu C i aktywność motoryczna pęcherza moczowego

Lidokaina jest lekiem przeciwbólowym typu amidowego służącym do miejscowego znieczulania. Mechanizm jej działania polega na odwracalnym zahamowaniu przewodnictwa impulsów we włóknach nerwowych (szczególnie typu C) poprzez blokowanie pompy sodowo-potasowej i zahamowanie przepuszczalności błony neuronu dla jonów sodu oraz poprzez stabilizację błony komórki nerwowej [103, 104].

Liczne obserwacje kliniczne wykazały, że lidokaina zmniejsza stopień nasilenia fazy pobudzenia aferentnych włókien nerwowych typu C, prowadząc do złagodzenia dolegliwości odczuwanych przez pacjenta (ból pęcherza, parcia naglące, uczucie pieczenia/palenia w podbrzuszu) w trakcie dopęcherzowej instylacji kapsaicyny, dzięki czemu znalazła zastosowanie w terapii OAB [105-107]. Ponadto zmniejsza ona ryzyko wystąpienia dysrefleksji autonomicznej indukowanej kapsaicyną, szczególnie u pacjentów po urazie rdzenia kręgowego w odcinku szyjnym [108]. Badania Dasgupta i wsp. [109] przeprowadzone wśród pacjentów z OAB potwierdziły, iż dopęcherzowa podaż lidokainy blokuje przewodnictwo nocyceptywne z pęcherza moczowego zmniejszając nieprzyjemne doznania podczas instylacji kapsaicyny, zarazem nie wpływając na jej skuteczność. Dodatkowo znalazła zastosowanie w terapii śródmiąższowego zapalenia pęcherza moczowego [110]. Badania doświadczalne na zwierzętach oraz urodynamiczne u ludzi po urazie rdzenia kręgowego oraz ze schorzeniami naczyń mózgowych wykazały, że lidokaina zmniejsza aktywność skurczową i zwiększa pojemność pęcherza moczowego [111-113]. Z kolei Oh i wsp. [114] w doświadczeniu in vitro ocenili wpływ anestetyków miejscowych (m.in. lidokainy) na aktywność skurczową mięśniówki ludzkiego pęcherza moczowego. Zaobserwowali ich wpływ hamujący na aktywność skurczową mięśniówki

indukowaną chlorkiem potasu, karbacholem, bądź stymulacją polem elektrycznym. Ponadto wykazali, że mniejsze dawki lokalnego anestetyku hamują odpowiedź skurczową mięśniówki pęcherza indukowaną impulsami nerwowymi, natomiast większe hamują odpowiedź pochodzenia nie-neurogennego (KCl, karbachol). Powyższe obserwacje wskazują na złożoność mechanizmów działania środków znieczulenia miejscowego na czynność mięśniówki pęcherza moczowego.

Z kolei molekularne mechanizmy tłumaczące brak pobudzenia zakończeń nerwowych typu C po ekspozycji na lidokainę nadal pozostają do końca niewyjaśnione. Jak dotąd uważano, że lidokaina wpływa na funkcję komórek nerwowych poprzez zmianę przepuszczalności kanałów jonowych dla sodu i wapnia. Hipoteza zaproponowana, przez Crafta i wsp. [115] mówi, że proces pobudzenia komórki zależy głównie od napływu jonów Na^+ , podczas gdy napływ jonów Ca^{++} przeważa w zjawisku desensytyzacji. Hipotezę tę potwierdzają badania przeprowadzone na zwierzętach. Otóż Craft i wsp. [116] obserwowali, iż niespecyficzny broker kanałów jonowych (czerwień rutenowa - *Rutenium red*) zatrzymuje napływ jonów Ca^{++} i Na^+ do komórki nerwowej jednocześnie zapobiegając jej pobudzeniu i desensytyzacji. Z kolei Catteralla i wsp. [117] wykazali, że blokery kanałów sodowych (lidokaina, tetrakaina) jedynie zapobiegają depolaryzacji komórek nerwowych. Natomiast badania eksperymentalne Lefflera i wsp. [107] wykonane na myszach i szczurach *in vitro* oceniające wpływ lidokainy na czynność włókien czuciowych podważają dotychczasowe tezy tłumaczące brak fazy pobudzenia po podaniu lidokainy. Autorzy ci wykazali, iż lidokaina aktywuje zakończenia aferentne typu C za pośrednictwem receptorów waniloidowych: TRPV1 a w mniejszym stopniu

TRPA1 oraz indukuje uwalnianie peptydu kodowanego genem kalcytoniny z izolowanej skóry i zakończeń nerwowych. Fakty te częściowo tłumaczą przyczynę bólu odczuwanego przez pacjentów podczas podaży lidokainy. Ponadto zaobserwowali „głęboką” desensytyzację włókien typu C po przedłużonej ekspozycji tych włókien na lidokainę, a w przypadku powtarzalnych ekspozycji dochodziło do rozwoju tachyfilaksji, czyli zjawiska utraty wrażliwości receptorów i/lub komórki na czynnik aktywujący.

2. ZAŁOŻENIA PRACY

Wyniki dotychczasowych badań nad doświadczalnym pęcherzem nadaktywnym wskazują na wzmożony rdzeniowy odruch mikcji spowodowany sensytyzacją aferentnych włókien nerwowych typu C oraz rozwój zapalenia neurogennego, jako mechanizmy „wiodące” w patogenezie nadaktywnego pęcherza moczowego [84, 85]. Terapia dopęcherzowa przy użyciu kapsaicyny, bądź lidokainy tylko częściowo zmniejsza dolegliwości pęcherzowe [89, 109]. Obserwacje te sugerują obecność dwóch rodzajów włókien aferentnych typu C: kapsaicyno – wrażliwych i kapsaicyno - opornych w śluzówce pęcherza. W związku z tym, spodziewanym efektem dopęcherzowej podaży kapsaicyny i lidokainy u zwierząt z OAB jest zmniejszenie stopnia nadreaktywności mięśnia wypieracza pęcherza moczowego oraz poprawa parametrów cystometrycznych. Wykazanie tych zależności będzie potwierdzeniem polimodalnego charakteru włókien typu C i ich udziału w patogenezie OAB. Dodatkowo, przedmiotem zainteresowania niniejszej pracy jest ocena tzw. lokalnej „efektorowej” czynności włókien typu C w mechanizmie zapalenia neurogennego, polegającej m.in. na aktywacji szeregu komórek zapalnych za pośrednictwem uwolnionych neurotransmiterów z ich zakończeń [97]. Spodziewany wzrost stopnia nasilenia stanu zapalenia w obrębie ścian pęcherza moczowego dodatkowo potwierdzi rolę tych włókien w patogenezie OAB.

3. CEL PRACY

Celem pracy jest ocena udziału aferentnych włókien nerwowych typu C w patogenezie nadaktywnego pęcherza moczowego i regulacji procesu mikcji w jego przebiegu podczas badania urodynamicznego.

Pomocnicze cele:

Podczas eksperymentu zostały ocenione:

- 1) wpływ ostrej i przewlekłej podaży cyklofosfamidu na aktywność motoryczną pęcherza moczowego i stopień nasilenia stanu zapalnego w obrębie jego ścian,
- 2) wpływ dopęcherzowej instylacji kapsaicyny na aktywność motoryczną pęcherza moczowego u osobników zdrowych oraz z przewlekłym OAB,
- 3) wpływ dopęcherzowej instylacji lidokainy na aktywność motoryczną pęcherza moczowego u osobników zdrowych oraz z przewlekłym OAB.

4. MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Wszystkie opisane poniżej procedury zostały przeprowadzone w laboratorium Katedry Patofizjologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (Polska). Przeprowadzane procedury eksperymentalne zostały zaakceptowane przez Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

4.1. Zwierzęta

Do badań użyto ogółem 66 szczurów rasy Wistar, o masie ciała 200-275g. Wszystkie badania zostały przeprowadzone na osobnikach płci żeńskiej, z uwagi na mniejsze ryzyko uszkodzenia aparatu zwieraczowego cewki moczowej i pęcherza moczowego podczas cewnikowania pęcherza moczowego przez cewkę moczową, w porównaniu z osobnikami płci męskiej. W zgodzie z zasadami protokołu doświadczeń eksperymentalnych zwierzęta przebywały w suchych, klimatyzowanych pomieszczeniach, o stałej temperaturze 25°C i wilgotności oraz 12-godzinnym naświetleniu periodycznym. Zwierzętom zapewniono pojedyncze, codziennie wymieniane klatki oraz swobodny dostęp do wody i standardowej paszy (Labofeed, Kcynia, Polska). Na 16 godzin przed każdą procedurą chirurgiczną zwierzęta były pozbawiane pokarmu.

4.2. Znieczulenie

Zwierzęta były znieczulane przy użyciu wodnego roztworu uretanu, podawanego dootrzewnowo, co zapewniało szybką indukcję oraz łatwe wyprowadzenie zwierzęcia z narkozy [120]. Do zabiegów operacyjnych i badania cystometrycznego stosowano uretan w dawce należącej (1,2 g/kg m.c.). Natomiast

przed dopęcherzową instylacją kapsaicyny w ilości 1/3 dawki należnej (0,4 g/kg m.c.), z uwagi na jego potencjalne toksyczne właściwości. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, iż ten typ znieczulenia w najmniejszym stopniu zaburza fizjologiczny proces mikcji w porównaniu z innymi środkami anestetycznymi, tj. ketamina i ksylazyna, pentobarbital, izofluran, propofol. Jakkolwiek wykazano, iż uretan prowadzi to niewielkiego zmniejszenia pojemność pęcherza moczowego w porównaniu z osobnikami przytomnymi [121]. Natomiast nie wpływa na aktywność skurczową mięśnia wypieracza oraz nie wykazuje działania depresyjnego na fazę opróżniania procesu mikcji [122, 123]. W naszych badaniach wykorzystany został następujący preparat: uretan - Urethane (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

4.3. Grupy badawcze

Wszystkie zwierzęta włączone do eksperymentu zostały losowo przydzielone do ośmiu grup badawczych, u których przeprowadziliśmy badanie cystometryczne w znieczuleniu ogólnym przy użyciu 0,9% roztworu NaCl (z wyłączeniem Grupy VIII – grupa „sham”). Dodatkowo pobrano pęcherze moczowe osobników z grupy I, II, III i VIII celem oceny stopnia nasilenia stanu zapalnego w obrębie ich ścian (Ryc.8.).

Grupa I: grupa kontrolna (n=12).

Grupa II: model ostry OAB (n=12): otrzymywała jednorazowo CYP w dawce 200mg/kg m.c.

Grupa III: model przewlekły OAB (n=12): otrzymywała CYP 4-krotnie: w 1, 3, 5, 7 dniu eksperymentu; w dawce 75 mg/kg m.c.

Grupa IV: model przewlekły OAB z dopęcherzową instylacją kapsaicyny (n=6): otrzymywała CYP 4-krotnie: w 1, 3, 5, 7 dniu eksperymentu; w dawce 75 mg/kg m.c. oraz kapsaicynę jednorazowo w 7 dniu eksperymentu.

Grupa V: model przewlekły OAB z dopęcherzową instylacją lidokainy (n=6): otrzymywała CYP 4-krotnie: w 1, 3, 5, 7 dniu eksperymentu; w dawce 75 mg/kg m.c. oraz lidokainę jednorazowo w 8 dniu eksperymentu.

Grupa VI: grupa kontrolna z dopęcherzową instylacją kapsaicyny (n=6): otrzymywała jednorazowo kapsaicynę.

Grupa VII: grupa kontrolna z dopęcherzową instylacją lidokainy (n=6): otrzymywała jednorazowo lidokainę.

Grupa VIII: grupa kontrolna „sham” (n=6).

4.4. Procedura chirurgiczna

4.4.1. Implantacja cewnika cystometrycznego do pęcherza moczowego

Po zastosowaniu znieczulenia ogólnego i przygotowaniu pola operacyjnego cięciem pośrodkowo-dolnym powłok brzusznych, długości 1,5 cm, dotarto na tępo do przestrzeni przedotrzewnowej i wypreparowano pęcherz moczowy od otaczających tkanek. Następnie w szczycie pęcherza moczowego, ku tyłowi od więzadła pępkowego pośrodkowego, wykonano nacięcie długości 1mm, przez które do światła pęcherza moczowego wprowadzono polietylenowy cewnik (*średnica zewnętrzna: 0,97mm; średnica wewnętrzna: 0,58mm; BALT, Polska*), który został umocowany szwem kapciuchowym przy użyciu nici chirurgicznej 4-0 i igły kłującej: 1/2c, 10 mm (Silkam, BBraun, Tuttlingen), według powszechnie przyjętego schematu [120].

4.4.2. Pobranie pęcherza moczowego do badania histologicznego

Celem procedury było uzyskanie materiału do oceny stopnia nasilenia stanu zapalnego w obrębie ich ścian. Pęcherze moczowe o równej liczebności zostały pobrane w czterech grupach: I, II, III, VIII (n=6). Procedura została wykonana bezpośrednio po zakończeniu badania cystometrycznego, po uprzednim uśmierceniu zwierzęcia przez przedawkowanie leków znieczulających (Pentobarbital 200 mg/kg m.c., dootrzewnowo), zgodnie z wytycznymi American Public Health Service in Bowman School of Medicine [124].

4.5. Podaż środków farmakologicznych

4.5.1. Zwierzęcy model nadaktywnego pęcherza moczowego

Cyklofosfamid - CYP (Endoxan, BaxterOncology, Niemcy) był podawany dootrzewnowo w postaci roztworu wodnego (200mg/5ml) w schemacie ostrym (jednorazowo w dawce 200 mg/kg m.c. [73]) i przewlekłym (4-krotnie w dawce 75 mg/kg m.c w 1, 3, 5, 7 dniu eksperymentu [120]). Powyższe schematy podaży CYP umożliwiły uzyskanie ostrego i przewlekłego stanu zapalnego pęcherza moczowego prowadzącego do rozwoju jego nadaktywności.

4.5.2. Desensytyzacja aferentnych włókien nerwowych typu C

W znieczuleniu ogólnym, dopęcherzowej instylacji 1mM roztworu kapsaicyny (*CAP - capsaicin*) dokonywano przy użyciu polietylenowego cewnika (*średnica zewnętrzna: 0,97mm; średnica wewnętrzna: 0,58mm; BALT, Polska*) wprowadzanego przez cewkę moczową. Każdorazowo podawano dopęcherzowo 1mM roztwór CAP o objętości 0,3 ml (grupa kontrolna), bądź 0,2ml (zwierzęta z OAB) z prędkością podaży 0,15 ml/min. Po upływie 15 minut od momentu zakończenia instylacji ewakuowano roztwór CAP przez delikatny ucisk

podbrzusza, a następnie płukano pęcherz moczowy przy użyciu 0,5 ml soli fizjologicznej (0,9% NaCl) z prędkością 0,15 ml/min. Podaży CAP dokonano według schematu opisanego przez Komiyama i wsp. [125], z własną modyfikacją dotyczącą objętości, szybkości podaży i czasu instylacji roztworu kapsaicyny. Po upływie 24 godzin od momentu zakończenia instylacji rozpoczynano procedurę badania cystometrycznego (Ryc.6.).

Do sporządzenia roztworu kapsaicyny wykorzystane zostały następujące preparaty: kapsaicyna – Capsaicin (Sigma-Aldrich, Niemcy) oraz specjalnie przygotowany rozpuszczalnik z 0,9% roztworu NaCl (BaxterTerpol, Polska) [80%], Tween 80 (Sigma-Aldrich, Niemcy) [10%] oraz absolutnego roztworu alkoholu etylowego [10%]. *W nawiasach kwadratowych podano, wyrażony w procentach, objętościowy udział poszczególnych składników w rozpuszczalniku.*

4.5.3. Podaż środka miejscowo znieczulającego – lidokainy (LDK)

W znieczuleniu ogólnym dokonywano dopęcherzową instylację 0,3 ml (grupa kontrolna), bądź 0,2 ml (zwierzęta z pęcherzem nadaktywnym) 2% roztworu LDK, z prędkością podaży 0,15 ml/min., przy użyciu polietylenowego cewnika (*średnica zewnętrzna: 0,97mm; średnica wewnętrzna: 0,58mm; BALT, Polska*) wprowadzanego przez cewkę moczową. Po upływie 30 minut od momentu zakończenia instylacji ewakuowano roztwór LDK przez delikatny ucisk podbrzusza i rozpoczynano procedurę badania cystometrycznego (Ryc.6.). Podaży LDK dokonano według schematu opisanego przez Avelino i wsp. [126], z własną modyfikacją dotyczącą objętości roztworu lidokainy.

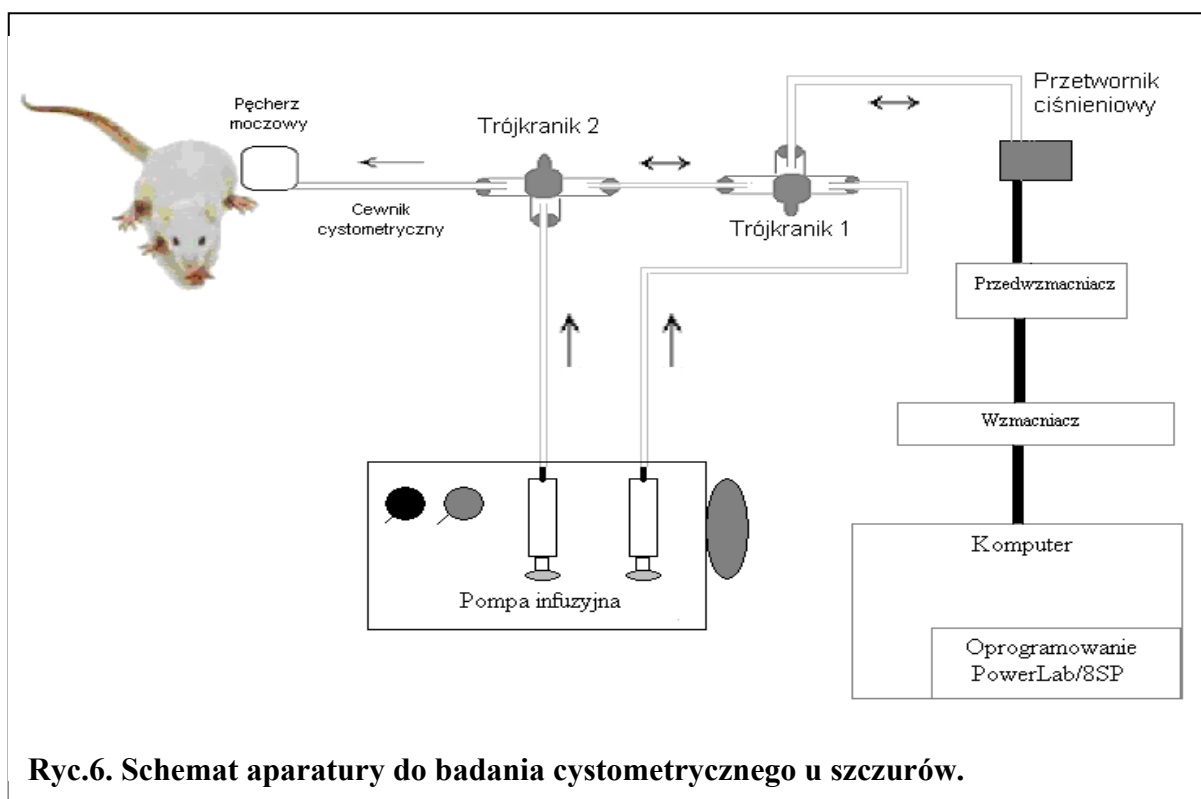
Wykorzystano następujący preparat: lidokaina – roztwór 20mg/ml, Lignocainum hydrochloricum 2% (Polfa, Warszawa, Polska).

4.6. Schemat badania

Podczas eksperymentu oceniona została aktywność motoryczna pęcherza moczowego oraz stopień nasilenia stanu zapalnego w obrębie jego ścian w różnych protokołach patofizjologicznych.

4.6.1. Ocena aktywności motorycznej pęcherza moczowego

W znieczuleniu ogólnym, celem oceny aktywności motorycznej pęcherza moczowego, zostało przeprowadzone badanie cystometryczne po upływie 1 godziny od momentu implantacji cewnika cystometrycznego w pęcherzu.



Ryc.6. Schemat aparatury do badania cystometrycznego u szczurów.

Cewnik połączono za pośrednictwem dwóch trójkraników z pompą infuzyjną (*Unipan340A, Polska*), zapewniającą stałą prędkość podaży płynu infuzyjnego o wartości równej 0,046 ml/min., przetwornikiem ciśnieniowym (*UFI, MorroBay, CA, USA*) oraz systemem wzmacniaczy: wzmacniacza podstawowego ML110-

BridgeAmp (*ADInstruments, Australia*) i przedwzmacniacza DualBioAmp/Stimulator (*ADInstruments, Australia*), przekształcającym wahania ciśnienia śródpecherzowego na impulsy elektryczne. Uzyskane impulsy były monitorowane i analizowane przy użyciu oprogramowania PowerLab/8SP



Ryc.7. Stanowisko badawcze.

(*ADInstruments, Castle Hill, Australia*) (Ryc.6., Ryc.7.) [74].

Badanie cystometryczne zostało przeprowadzone odpowiednio w:

Grupie I: w 1 dniu eksperymentu,

Grupie II: w 1 dniu eksperymentu, po upływie 5h od podania CYP,

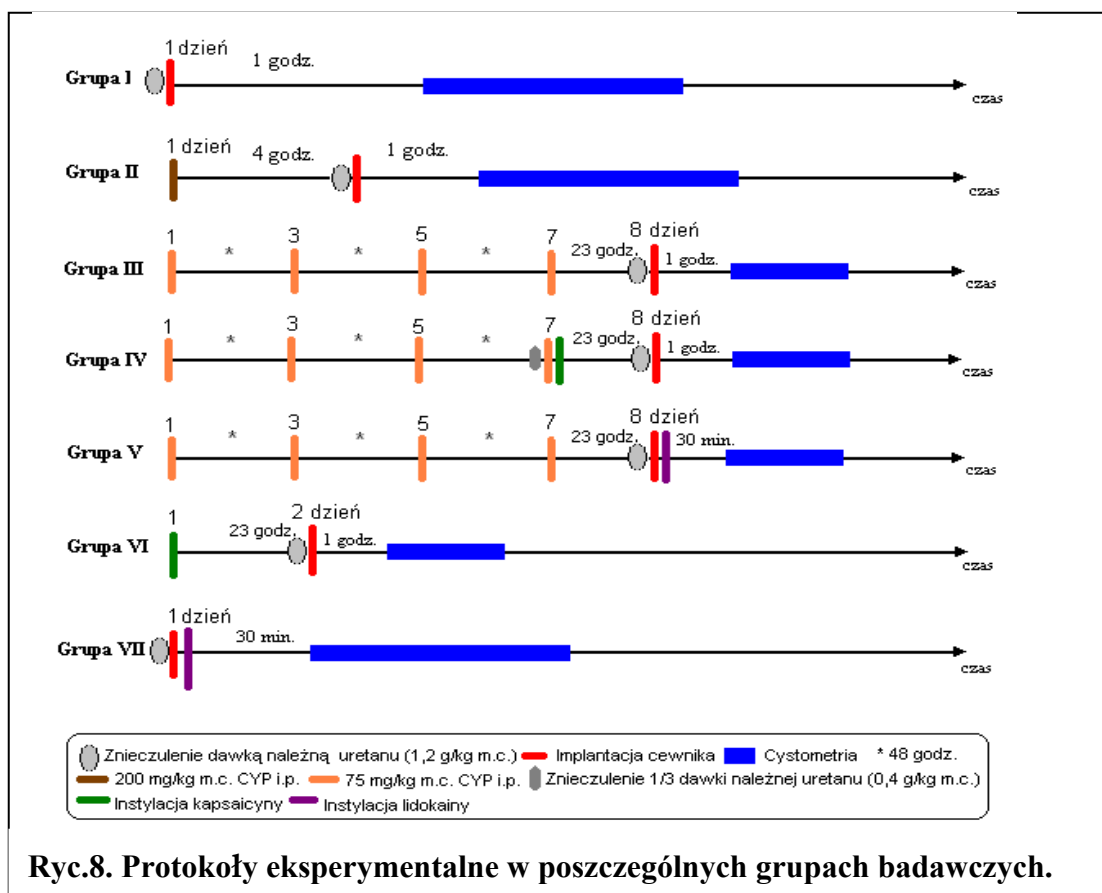
Grupie III: w 8 dniu eksperymentu, po upływie 24h od podania 4-ej dawki CYP

Grupie IV: w 8 dniu eksperymentu, po upływie 24h od podania 4-ej dawki CYP i
dopęcherzowej instylacji CAP,

Grupie V: w 8 dniu eksperymentu, po upływie 24h od podania 4-ej dawki CYP,
w tym 30 min. po dopęcherzowej instylacji LDK,

Grupie VI: w 2 dniu eksperymentu, po upływie 24h od dopęcherzowej instylacji
CAP,

Grupie VII: w 1 dniu eksperymentu, po upływie 30 min. od dopęcherzowej

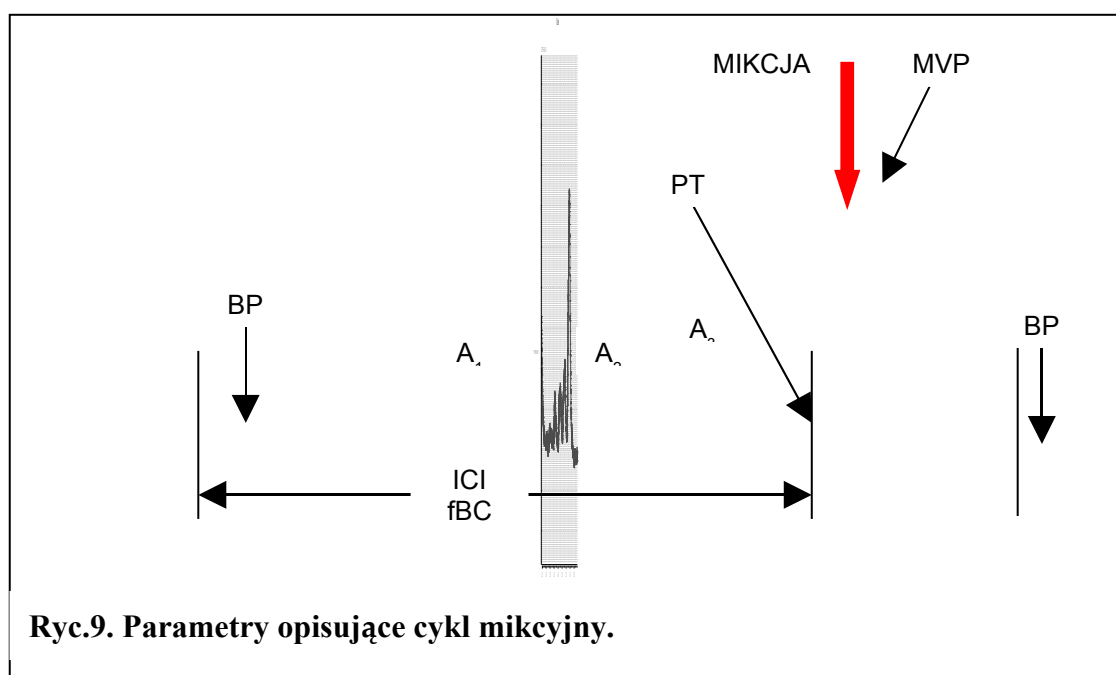


instylacji LDK (Ryc.8.).

Analizie poddano 5 kolejnych cykli mikcyjnych w poszczególnych grupach badawczych (I-V, VII), po uzyskaniu stabilności zapisu, oceniając następujące „podstawowe” parametry cystometryczne (Ryc.9.):

1. śródpęcherzowe ciśnienie bazalne (*BP – basal pressure*): ciśnienie wypieracza bezpośrednio po skurczu wypieracza wywołującego wyciek moczu [cmH₂O],
2. śródpęcherzowe ciśnienie progowe (*PT – threshold pressure*): ciśnienie wypieracza bezpośrednio przed skurczem wypieracza wywołującego wyciek moczu [cmH₂O],
3. śródpęcherzowe ciśnienie szczytowe (*MVP – micturition voiding pressure*): maksymalne ciśnienie generowane przez wypieracz podczas mikcji [cmH₂O],

- okresy międzyskurczowe (*ICI – intercontraction interval*): okres pomiędzy dwoma kolejnymi skurczami wypieracza wywołującymi wyciek moczu [min.],
- podatność ściany pęcherza (*Compliance*): wskaźnik obrazujący relację pomiędzy zmianą objętości pęcherza, a zmianą ciśnienia wypieracza. Obliczamy ją ze wzoru: $Compliance = fBC / TP-BP$ [ml/cmH₂O],



- czynnościową pojemność pęcherza (*fBC – functional bladder capacity*): objętość bezpośrednio przed skurczem wypieracza wywołującego wyciek moczu [ml]. Obliczamy ze wzoru: ICI [min] x V_{inf} [ml/min.]. V_{inf} – prędkość podaży płynu infuzyjnego.

Ponadto oceniono współczynniki („dodatkowe” parametry cystometryczne) jak dotąd nie wykorzystywane do oceny urodynamicznej u zwierząt. Poniższe parametry umożliwiają dokładniejszą ocenę aktywności motorycznej mięśnia wypieracza pęcherza moczowego:

7. indeks motoryczny pęcherza moczowego: rozumiany jako pole powierzchni pod wykresem, w jednostce czasu [$\text{cmH}_2\text{O} \times \text{s/min.}$]. Analizie poddano 10-minutowe przedziały zapisu cystometrycznego,
8. wskaźnik aktywności / nadreaktywności mięśnia wypieracza (*DI - detrusor activity index / DOI - detrusor overactivity index*) [40, 127]: zdefiniowany jako iloraz sumy amplitud wszystkich skurczów w fazie wypełniania procesu mikcji i czynnościowej pojemności pęcherza [$\text{cmH}_2\text{O/ml}$]. Obliczamy ze wzoru: $DI (DOI) = (A_1 + A_2 + \dots + MVP) / fBC$.

Z uwagi na brak prawidłowych cykli mikcyjnych w grupie VI analizie poddano 10-minutowe interwały zapisu cystometrycznego oceniając indeks motoryczny.

4.6.2. Ocena stopnia nasilenia stanu zapalnego w obrębie ścian pęcherza moczowego w różnych protokołach patofizjologicznych

Do badań pobrano fragmenty pęcherza moczowego, które następnie płukano w soli fizjologicznej. Wycinki utrwalano przez 24h w 9% formalinie w roztworze buforu fosforanowego (PBS, $\text{pH}=7,4$). Pobrane wycinki płukano następnie w bieżącej wodzie przez 2 h, a następnie odwadniano przy pomocy roztworów etanolu o wzrastających stężeniach (od 50% do 100%). Przed zatopieniem w parafinie preparaty przeprowadzano przez odpowiednie roztwory ksylenu w celu ich prześwietlenia. Z ksylenu wycinki przeniesiono do mieszaniny ksylenu i parafiny białej, w stosunku 1:1 i inkubowano w temperaturze 37°C przez około 2 godziny. Następnie poszczególne fragmenty tkanek przenoszono dwukrotnie do czystej parafiny białej i inkubowano w temperaturze około 62°C . Po upływie 2h, preparaty zatapiano w bloczki przy pomocy metalowych ramek.

Bloczki parafinowe przechowywano w lodówce. Następnie bloczki krojono na mikrotomie, a skrawki po umieszczeniu na szkiełku podstawowym suszono.

W celu oceny histologicznej nasilenia stanu zapalnego preparaty barwiono rutynowo metodą hematoksylina – eozyna (HE). Analizie poddano dziesięć kolejnych pól widzenia w poszczególnych preparatach przy użyciu mikroskopu świetlnego AXIOPHOT (Zeiss, Niemcy). Celem oceny stopnia nasilenia stanu zapalnego w obrębie pęcherza moczowego posłużono się skalą zaproponowaną przez Cayana i wsp. [133] oraz Bjorlinga i wsp. [132], opierającą się na ocenie 4 parametrów: stopnia abrazji śluzówki pęcherza moczowego, obecności wynaczynienia krwi (wylewy krwawe w preparacie), nasilenia obrzęku oraz stopnia nacieku przez komórki zapalne (neutrofile oraz komórki jednojądrzaste) ściany pęcherza moczowego.

Abrazja śluzówki definiowana jako erozja śluzówki pęcherza moczowego, została oceniona w poszczególnych polach widzenia przy powiększeniu 100x, w skali punktowej 0-1 pkt., odpowiednio 0 pkt.: brak abrazji, 1 pkt.: widoczna abrazja. Ostateczny wynik uzyskiwano pomnażając przez 100, iloraz całkowitego wyniku z dziesięciu pól widzenia i maksymalnego możliwego wyniku.

Wylewy krwawe zostały ocenione w poszczególnych polach widzenia przy powiększeniu 100x, w skali punktowej 0-1 pkt., odpowiednio 0 pkt.: brak wynaczynienia krwi, 1 pkt.: widoczne wynaczynienie krwi.

Ostateczny wynik uzyskiwano pomnażając przez 100, iloraz całkowitego wyniku z dziesięciu pól widzenia i maksymalnego możliwego wyniku.

Obrzęk tkanek w poszczególnych polach widzenia oceniono przy powiększeniu 200x, w skali punktowej 0-3 pkt., odpowiednio 0 pkt.: brak obrzęku, 1 pkt.: łagodny obrzęk (brak zmiany szerokości warstwy podśluzowej), 2 pkt.: umiarkowany obrzęk (wzrost szerokości warstwy podśluzowej, < 2-krotnie), 3

pkt.: ciężki obrzęk (wzrost szerokości warstwy podśluzowej, > 2-krotnie). Ostateczny wynik uzyskiwano pomnażając przez 100, iloraz całkowitego wyniku z dziesięciu pól widzenia i maksymalnego możliwego wyniku.

Naciek ściany pęcherza moczowego przez komórki zapalne (neutrofile oraz komórki jednojądrzaste) został oceniony w poszczególnych polach widzenia przy powiększeniu 400x, w skali punktowej 0-3 pkt., odpowiednio 0 pkt.: brak pozanaczyniowych komórek zapalnych, 1 pkt.: < 20 komórek, 2 pkt.: 20 – 45 komórek, 3 pkt.: > 45 komórek zapalnych w dużych polach widzenia.

Ostateczny wynik uzyskiwano pomnażając przez 100, iloraz całkowitego wyniku z dziesięciu pól widzenia i maksymalnego możliwego wyniku.

Dodatkowo preparaty barwiono metodą błękitu toluidyny, co umożliwiło oznaczenie komórek wykazujących metachromazję (komórki tuczne - mastocyty). Skrawki parafinowe o grubości 3-5 mikronów (mikrotom saneczkowy) suszono na szkiełku podstawowym w temperaturze 37°C, a następnie odparafinowano przy użyciu odpowiednich stężeń ksylenu, uwodniono w roztworach etanolu (malejące stężenia – od 100% do 50%) i wody destylowanej. Tak przygotowane preparaty zanurzano na 1 min. w 0,05% roztworze błękitu toluidyny w buforze weronalowym (roztwór wodny), w temperaturze pokojowej. Kolejno preparaty płukano w wodzie destylowanej, suszono i zamykano w DPX (Dibutyl Polystyrene Xylene, Merck, Niemcy). Analizowano liczbę komórek wykazujących metachromazję, przy użyciu mikroskopu świetlnego AXIOPHOT (Zeiss, Niemcy) w 20 polach widzenia przy powiększeniu 100x.

5. ANALIZA STATYSTYCZNA WYNIKÓW

Wpływ CYP, CAP i LDK na aktywność motoryczną pęcherza moczowego oraz stopień nasilenia jego nadreaktywności w modelu przewlekłym OAB został oceniony przez porównanie analizowanych parametrów cystometrycznych w obrębie badanych grup zwierząt. Uzyskane wyniki odnoszone były do wyników badania kontrolnego. Z uwagi na stwierdzony brak normalności rozkładów badanych parametrów zastosowano następujące nieparametryczne testy statystyczne: test Kruskal-Wallisa oraz test Manna-Whitney'a.

Analizie poddano parametry cystometryczne pięciu kolejnych cykli mikcyjnych, które później uśredniono i na tak uzyskanych wynikach przeprowadzono analizę statystyczną, przy użyciu pakietu statystycznego Statistica 8. W analizie wyników parametrów cystometrycznych i stopnia nasilenia stanu zapalnego w grupie kontrolnej, z ostrym i przewlekłym OAB posłużyliśmy się testem Kruskal-Wallisa, a w przypadku stwierdzenia występowania istotnych różnic przeprowadzono „*post hoc*” test wielokrotnych porównań Duncana. W sytuacji, gdy analiza testem Kruskal-Wallisa nie wykazywała różnic pomiędzy badaniami kończyliśmy wnioskowanie statystyczne. Wyniki grup kontrolnych po CAP i LDK były porównywane testem Manna-Whitney'a. Natomiast analizę średnich wartości indeksu motorycznego przeprowadzono testem Kruskal-Wallisa.

Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci tabel oraz wykresów słupkowych opartych na wartościach średnich z wąsami prezentującymi odchylenie standardowe (*SD - standard deviation*). Za statystycznie znamienne

przyjęliśmy te wyniki testów, dla których poziom prawdopodobieństwa błędu był mniejszy lub równy 0,05 ($p \leq 0,05$).

6. OMÓWIENIE WYNIKÓW

W przeprowadzonych eksperymentach obserwowaliśmy wpływ ostrej i przewlekłej podaży cyklofosfamidu, jak również dopęcherzowych instylacji kapsaicyny oraz lidokainy na aktywność motoryczną pęcherza moczowego i stopień jego nadaktywności. Ponadto oceniliśmy wpływ cyklofosfamidu na stopień nasilenia stanu zapalnego oraz aktywność komórek wykazujących metachromazję w obrębie ściany pęcherza moczowego.

6.1. Wpływ cyklofosfamidu na aktywność motoryczną pęcherza moczowego

Zgodnie z wcześniejszymi obserwacjami badane zwierzęta prezentowały charakterystyczne objawy behawioralne występujące w czasie ostrej podaży CYP. Bezpośrednio po dootrzewnowej iniekcji i kilkuminutowym okresie wzmożonej aktywności motorycznej wszystkie badane osobniki wykazywały zmniejszoną aktywność ruchową, piloerekcję, a następnie przyjmowały specyficzną pozycję ciała, tj. zwinięcie w „kłębek”. Powyższych objawów nie prezentowały zwierzęta poddane przewlekłej podaży cyklofosfamidu.

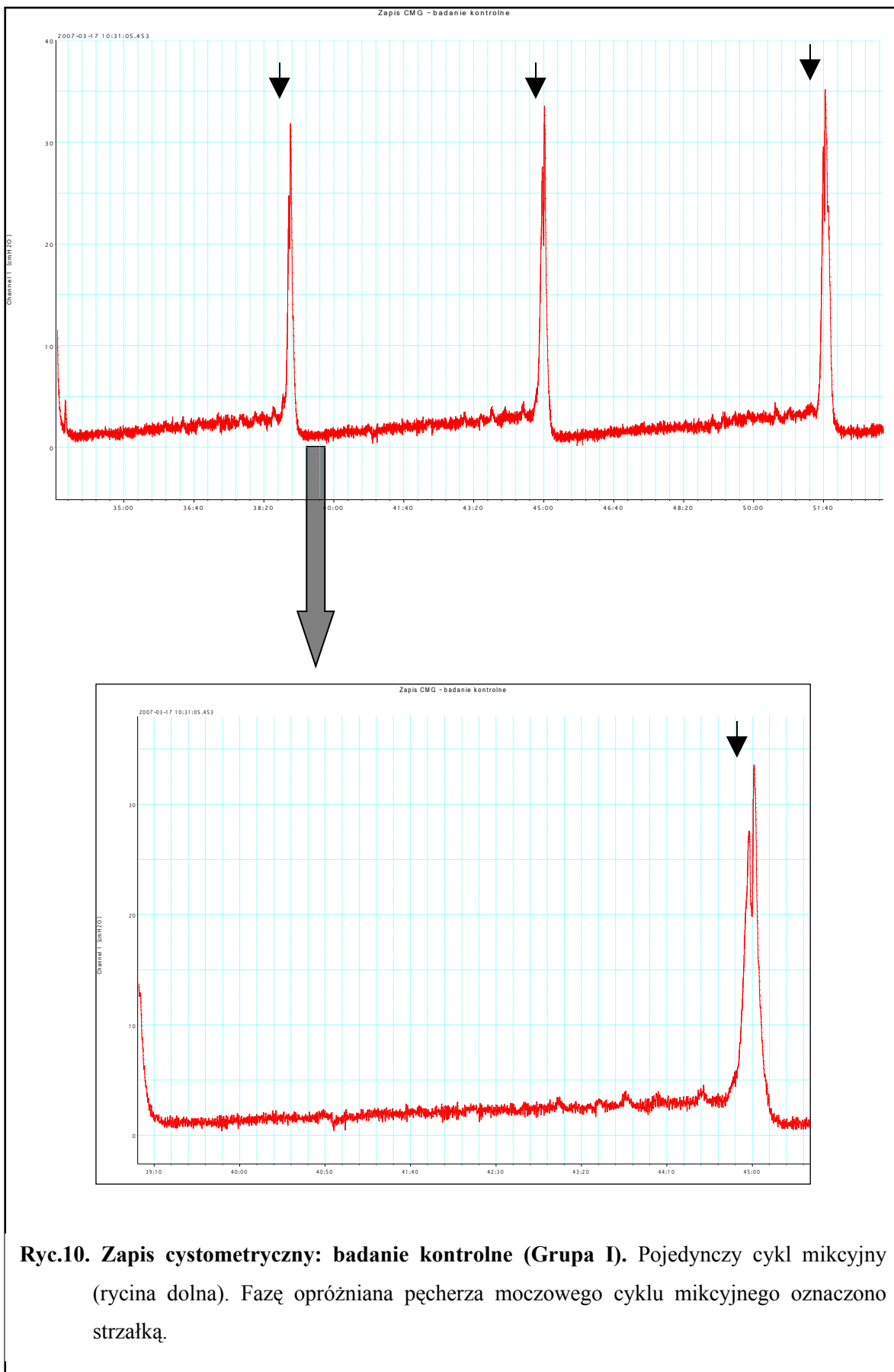
W badanych grupach zwierząt odpowiednio w reakcji na ostrą i przewlekłą podaż CYP obserwowaliśmy rozwój nadaktywności pęcherza moczowego charakteryzującej się spadkiem średnich wartości śródpęcherzowego ciśnienia szczytowego odpowiednio o 21,5% i 21%, okresów międzyskurczowych o 71,5% i 59%, czynnościowej pojemności pęcherza o 71,6% i 59,2% oraz jego podatności o 39% i 49,1%. Jak również, wzrostem średnich wartości

śródpęcherzowego ciśnienia bazalnego odpowiednio o 226,4% i 136,4%, indeksu motorycznego pęcherza moczowego o 66,9% i 40,6% oraz wskaźnika nadreaktywności mięśnia wypieracza o 576,1% i 215%, w stosunku do grupy kontrolnej. Dodatkowo w modelu ostrym OAB obserwowaliśmy wzrost śródpęcherzowego ciśnienia progowego o 32% w stosunku do grupy kontrolnej (Tab.1., Ryc.10-13).

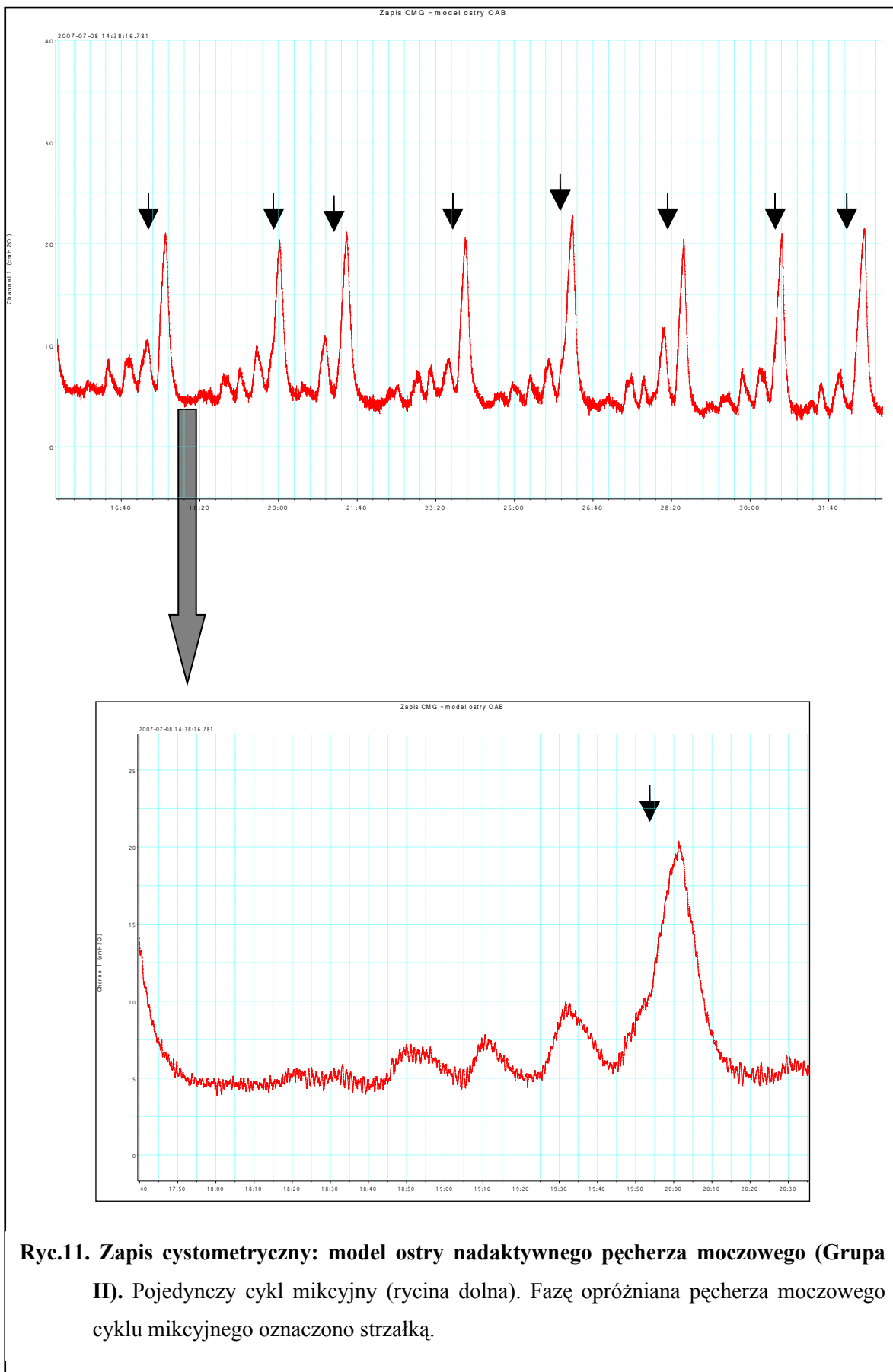
Tabela 1. Podstawowe i dodatkowe parametry cystometryczne osobników zdrowych oraz po ostrej i przewlekłej podaży cyklofosfamidu.

	Grupa I - KONTROLNA	Grupa II – OAB ostry	Grupa III – OAB przewlekły	Istotność różnic ^a
Ciśnienie bazalne: BP [cmH ₂ O]	1,40 ± 0,60	4,57 ± 1,20	3,31 ± 1,85	p<0,001 ***
Ciśnienie progowe: PT [cmH ₂ O]	5,68 ± 1,22	7,50 ± 2,11	6,88 ± 1,93	p=0,050 **
Ciśnienie szczytowe: MVP [cmH ₂ O]	27,41 ± 4,86	21,51 ± 3,12	21,67 ± 1,94	p<0,001 *
Okresy międzyskurczowe: ICI [min.]	5,278 ± 1,549	1,503 ± 0,736	2,149 ± 0,350	p<0,001 *
Podatność: Compliance [ml/cmH ₂ O]	0,059 ± 0,019	0,036 ± 0,031	0,030 ± 0,007	p=0,005 *
Czynnościowa pojemność pęcherza: fBC [ml]	0,243 ± 0,071	0,069 ± 0,034	0,099 ± 0,016	p<0,001 *
Wskaźnik aktywności/ nadreaktywności: DI / DOI [cmH ₂ O/ml]	121,92 ± 32,98	824,36 ± 327,57	384,03 ± 181,68	p<0,001 ***
Index motoryczny: MI [cmH ₂ O x s/min.]	185,64 ± 45,95	309,90 ± 135,03	261,00 ± 33,92	p=0,004 *
a - wyniki testów "post hoc" Duncana przedstawiono na odpowiednich wykresach słupkowych. * statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą I a grupą II i III (p≤0,05). ** statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą I a grupą II (p≤0,05). *** statystycznie znamienne różnice pomiędzy wszystkimi grupami(p≤0,05).				

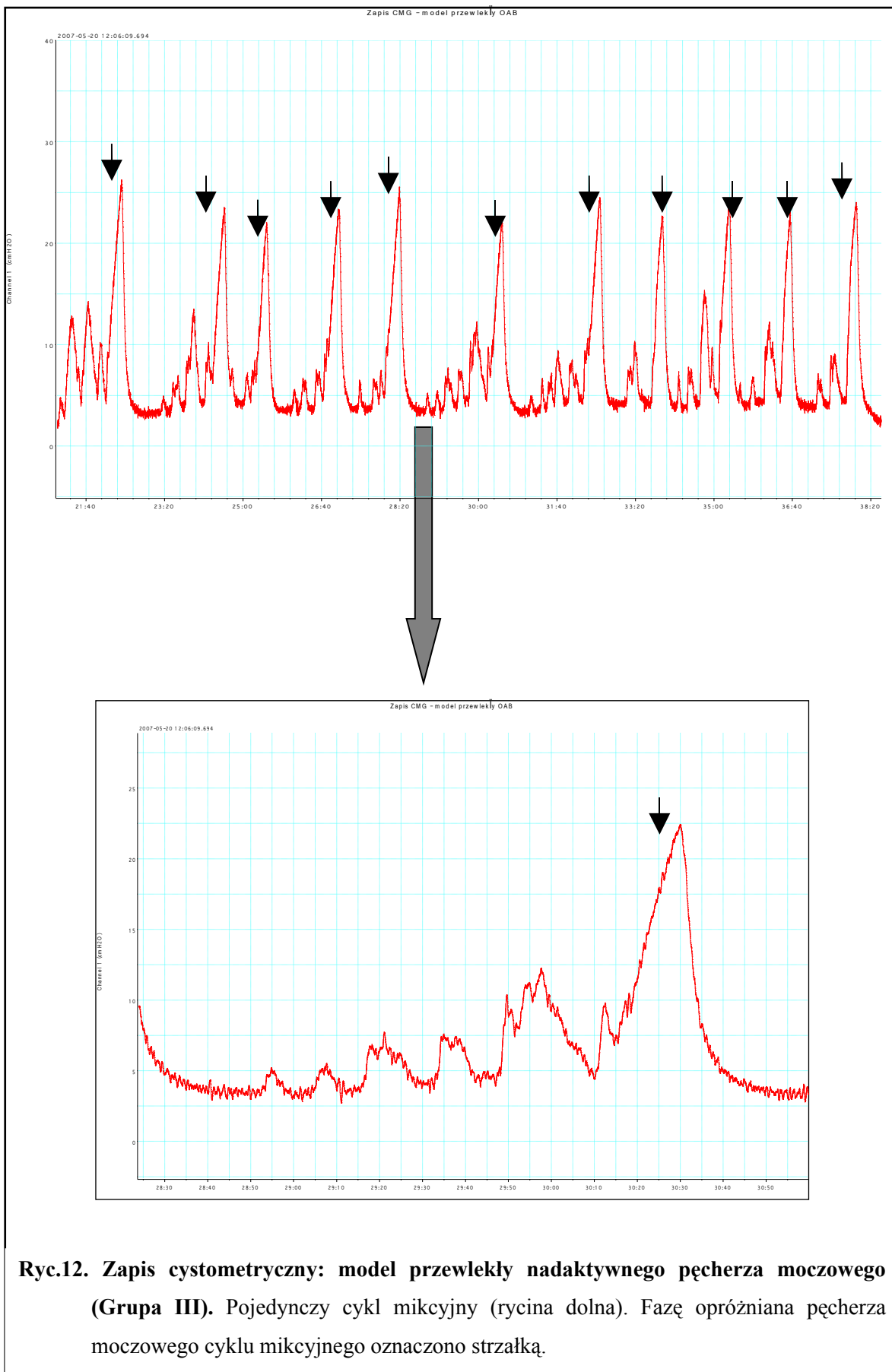
Porównanie zapisów cystometrycznych modelu ostrego i przewlekłego wykazało jedynie różnice w średnich wartościach śródpęcherzowego ciśnienia bazalnego oraz wskaźnika nadreaktywności mięśnia wypieracza.



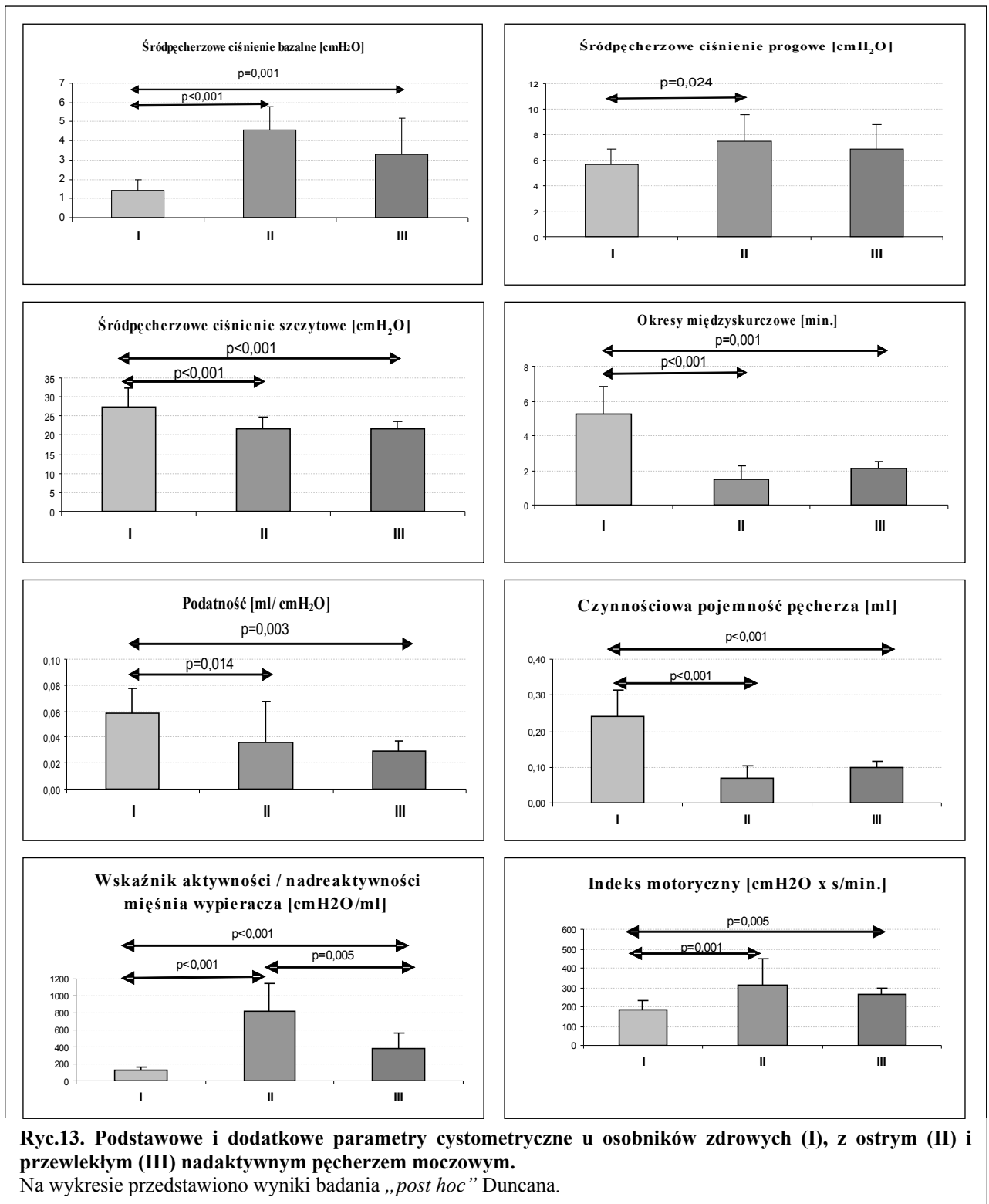
Ryc.10. Zapis cystometryczny: badanie kontrolne (Grupa I). Pojedynczy cykl mikcyjny (rycina dolna). Fazę opróżniania pęcherza moczowego cyklu mikcyjnego oznaczono strzałką.



Ryc.11. Zapis cystometryczny: model ostry nadaktywnego pęcherza moczowego (Grupa II). Pojedynczy cykl mikcyjny (rycina dolna). Fazę opróżniania pęcherza moczowego cyklu mikcyjnego oznaczono strzałką.



Ryc.12. Zapis cystometryczny: model przewlekły nadaktywnego pęcherza moczowego (Grupa III). Pojedynczy cykl mikcyjny (rycina dolna). Fazę opróżniania pęcherza moczowego cyklu mikcyjnego oznaczono strzałką.



6.2. Wpływ kapsaicyny oraz lidokainy na aktywność motoryczną pęcherza moczowego

Podczas naszych doświadczeń u zwierząt poddanych jednorazowej dopęcherzowej instylacji 1mM roztworu kapsaicyny (CAP) stwierdziliśmy

hamujący wpływ tej neurotoksyny na aktywność motoryczną (skurczową) mięśnia wypieracza uniemożliwiający prawidłowe opróżnianie pęcherza moczowego (Tab.2.).

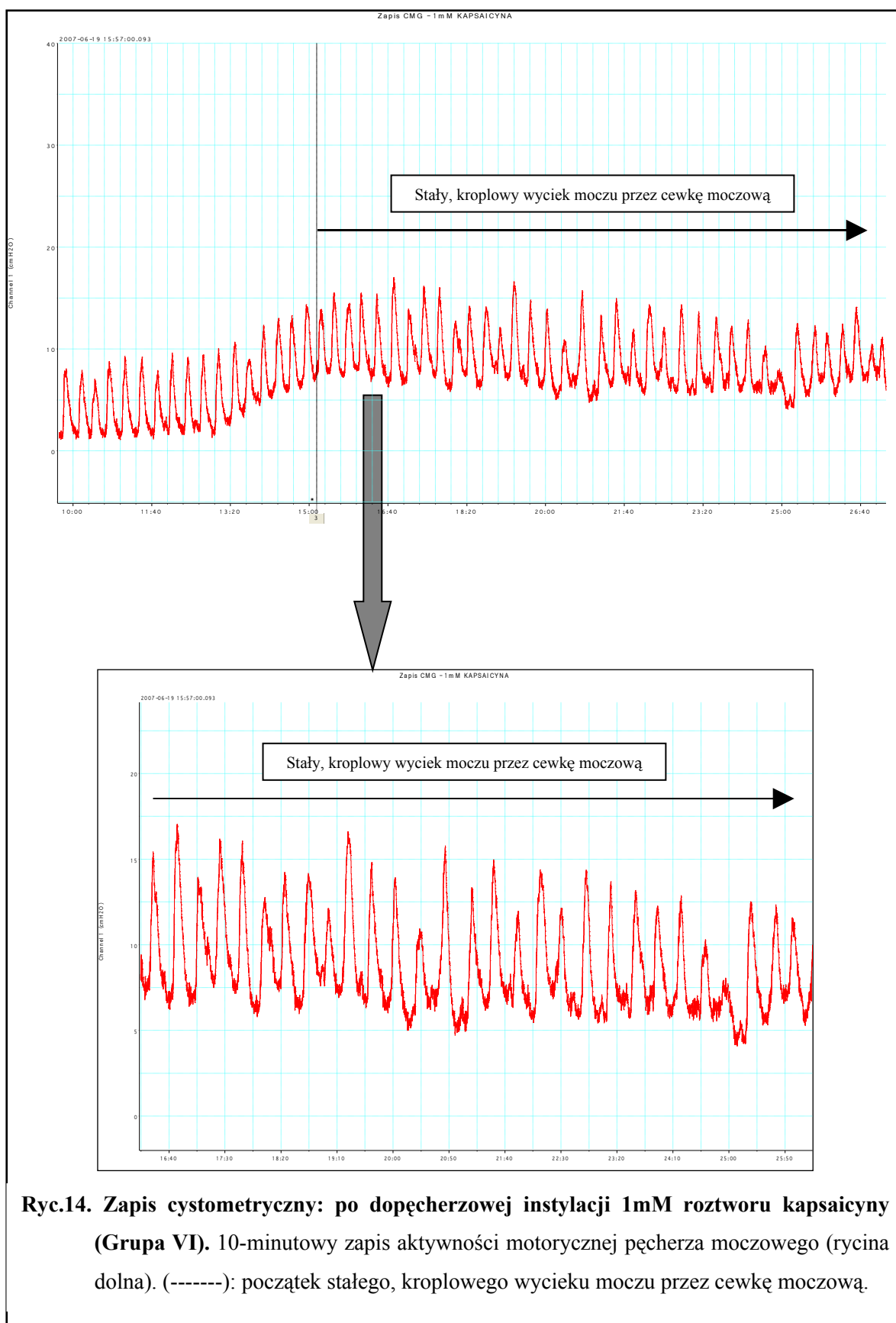
Tabela 2. Podstawowe i dodatkowe parametry cystometryczne osobników zdrowych oraz po dopęcherzowej instylacji 1mM roztworu kapsaicyny i 2% roztworu lidokainy.

	Grupa I - KONTROLNA	Grupa VI – KONTROLNA + KAPSAICYNA	Grupa VII – KONTROLNA + LIDOKAINA	Istotność różnic
Ciśnienie bazalne: BP [cmH ₂ O]	1,40 ± 0,60	---	1,70 ± 0,58	p=0,329 NS
Ciśnienie progowe: PT [cmH ₂ O]	5,68 ± 1,22	---	5,33 ± 0,88	p=0,542 NS
Ciśnienie szczytowe: MVP [cmH ₂ O]	27,41 ± 4,86	---	27,33 ± 0,70	p=0,971 NS
Okresy międzyskurczowe: ICI [min.]	5,278 ± 1,549	---	7,770 ± 1,308	p=0,003 *
Podatność: Compliance [ml/cmH ₂ O]	0,059 ± 0,019	---	0,106 ± 0,029	p<0,001 *
Czynnościowa pojemność pęcherza: fBC [ml]	0,243 ± 0,071	---	0,357 ± 0,060	p=0,004 *
Wskaźnik aktywności/nadreaktywności: DI / DOI [cmH ₂ O/ml]	121,92 ± 32,98	---	182,62 ± 38,75	p=0,003 *
Index motoryczny: MI [cmH ₂ O x s/min.]	185,64 ± 45,95	203,75 ± 54,10	209,98 ± 42,86	Test K-W p=0,543 NS

* statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą I a grupą VII (p≤0,05).

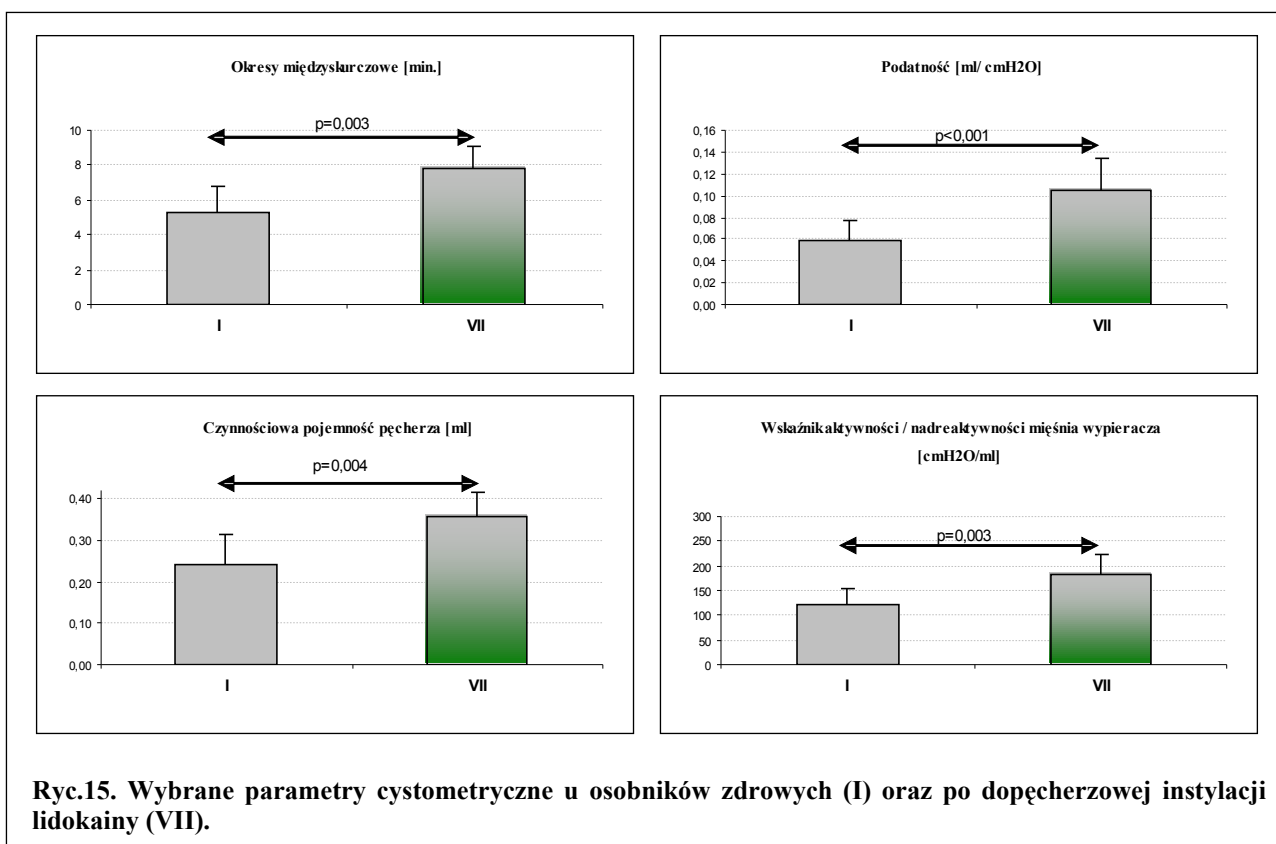
Na podstawie przeprowadzonych badań cystometrycznych zaobserwowaliśmy, iż dopęcherzowa podaż CAP prowadzi do całkowitej dezorganizacji prawidłowego cyklu mikcyjnego (Ryc.14.). W fazie wypełniania i magazynowania moczu stwierdziliśmy zwiększoną spontaniczną aktywność mięśnia wypieracza, zarejestrowaną jako skurcze fazowe wypieracza pęcherza moczowego o niskiej amplitudzie przy towarzyszącym zwiększonym ciśnieniu śródpecherzowym. Podczas gdy, w fazie opróżniania nie obserwowaliśmy prawidłowej aktywności

skurczowej wypieracza (generacji śródpecherzowego ciśnienia szczytowego – MVP).



Na skutek braku okresowo generowanych MVP przez mięsień wypieracz i w konsekwencji niemożności całkowitego opróżnienia pęcherza moczowego z moczu obserwowaliśmy stale utrzymującą się retencję moczu, a w momencie uzyskania krytycznego wypełnienia (*maksymalnej pojemności cystometrycznej*) pęcherza rejestrowaliśmy stały, kroplowy wyciek moczu przez cewkę moczową. W uwagi na brak prawidłowych cykli mikcyjnych w ocenie aktywności motorycznej pęcherza moczowego posłużyliśmy się jedynie indeksem motorycznym.

Odmienne dopęcherzowa podaż 2% roztworu lidokainy (LDK) nie zaburzała prawidłowego przebiegu cyklu mikcyjnego (Ryc.15., Ryc.16.).



W porównaniu z zapisami cystometrycznymi osobników zdrowych, obserwowaliśmy wzrost średnich wartości okresów międzyskurczowych o 47,2%, podatności ścian o 79,7% i czynnościowej pojemności pęcherza moczowego o 47%. Ponadto LDK prowadziła do wzrostu wskaźnika aktywności mięśnia wypieracza o 49,8%. Wydaje się, że obserwacja ta mogła być efektem wynikającym ze wzmożonej aktywności skurczowej mięśnia wypieracza, generacji skurczów o większej amplitudzie w końcowej fazie wypełniania pęcherza moczowego (Tab.2., Ryc.15.).

6.3. Wpływ kapsaicyny oraz lidokainy na stopień nadreaktywności przewlekłego nadaktywnego pęcherza moczowego

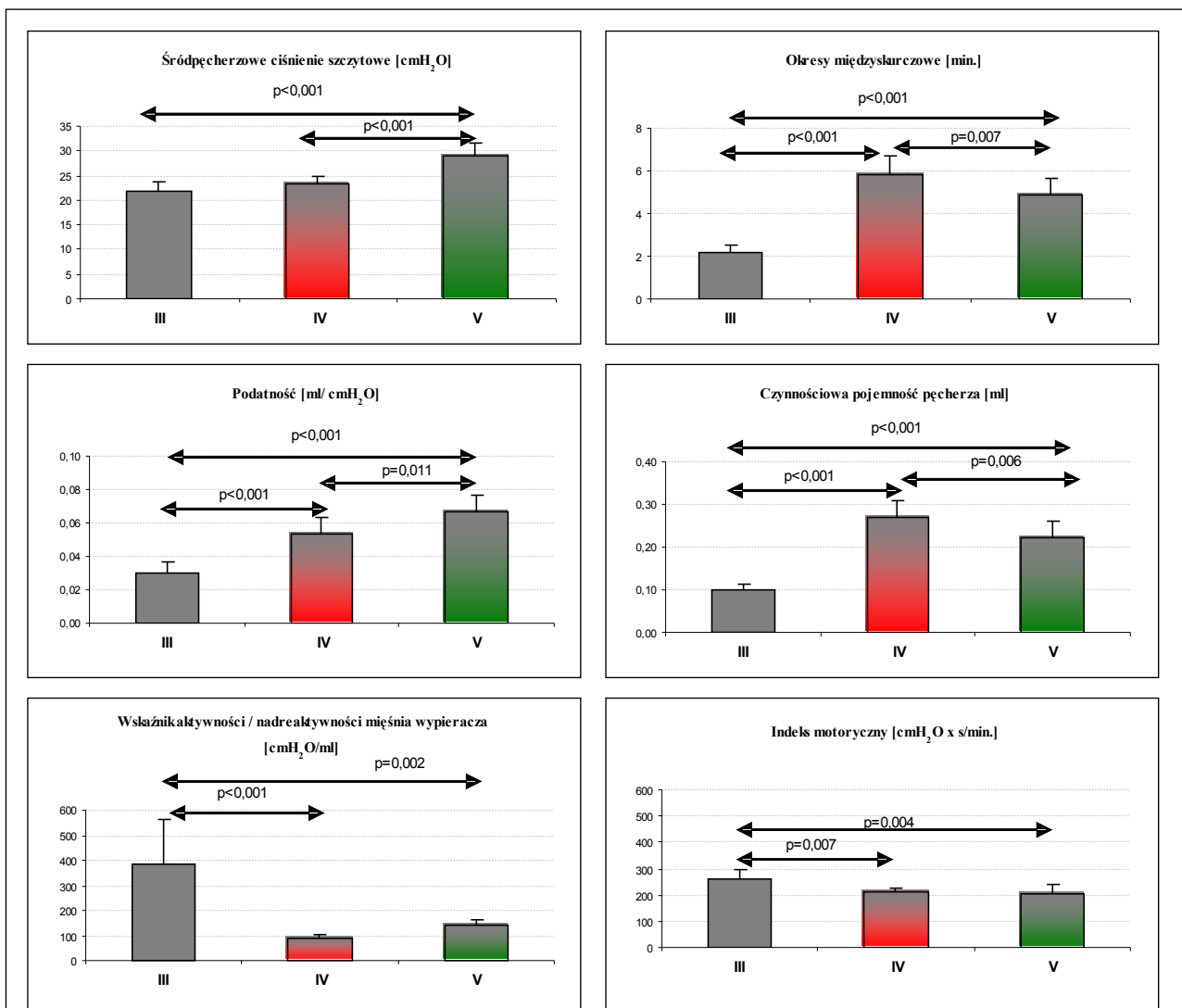
Tabela 3. Podstawowe i dodatkowe parametry cystometryczne osobników z przewlekłym nadaktywnym pęcherzem moczowym bez i po dopęcherzowej instylacji 1mM roztworu kapsaicyny oraz 2% roztworu lidokainy.

	Grupa III – OAB przewlekły	Grupa IV – OAB przewlekły + KAPSAICYNA	Grupa V – OAB przewlekły + LIDOKAINA	Istotność różnic ^a
Ciężnienie bazalne: BP [cmH ₂ O]	3,31 ± 1,85	3,23 ± 0,31	2,02 ± 0,28	Test K-W p=0,163 (NS)
Ciężnienie progowe: PT [cmH ₂ O]	6,88 ± 1,93	8,28 ± 0,770	5,42 ± 0,42	p=0,010 *
Ciężnienie szczytowe: MVP [cmH ₂ O]	21,67 ± 1,94	23,43 ± 1,33	28,93 ± 2,68	p<0,001 **
Okresy międzyskurczowe: ICI [min.]	2,149 ± 0,350	5,852 ± 0,886	4,853 ± 0,792	p<0,001 ***
Podatność: Compliance [ml/cmH ₂ O]	0,030 ± 0,007	0,054 ± 0,010	0,066 ± 0,010	p<0,001 ***
Czynnościowa pojemność pęcherza:	0,099 ± 0,016	0,270 ± 0,040	0,223 ± 0,036	p<0,001 ***

Ryc.16. Zapis cystometryczny: po dopęcherzowej instylacji 2% roztworu lidokainy (Grupa VII). Pojedynczy cykl mikcyjny (rycina dolna). Fazę opróżniania pęcherza moczowego cyklu mikcyjnego oznaczono strzałką.

MI [cmH ₂ O x s/min.]				****
----------------------------------	--	--	--	------

a - wyniki testów "post hoc" Duncana przedstawiono na odpowiednich wykresach słupkowych.
 * statystycznie istotne różnice pomiędzy grupą IV a grupą V (p≤0,05).
 ** statystycznie istotne różnice pomiędzy grupą III a grupą V oraz pomiędzy grupą IV a grupą V (p≤0,05).
 *** statystycznie istotne różnice pomiędzy wszystkimi grupami (p≤0,05).
 **** statystycznie istotne różnice pomiędzy grupą III a grupą IV i V (p≤0,05).

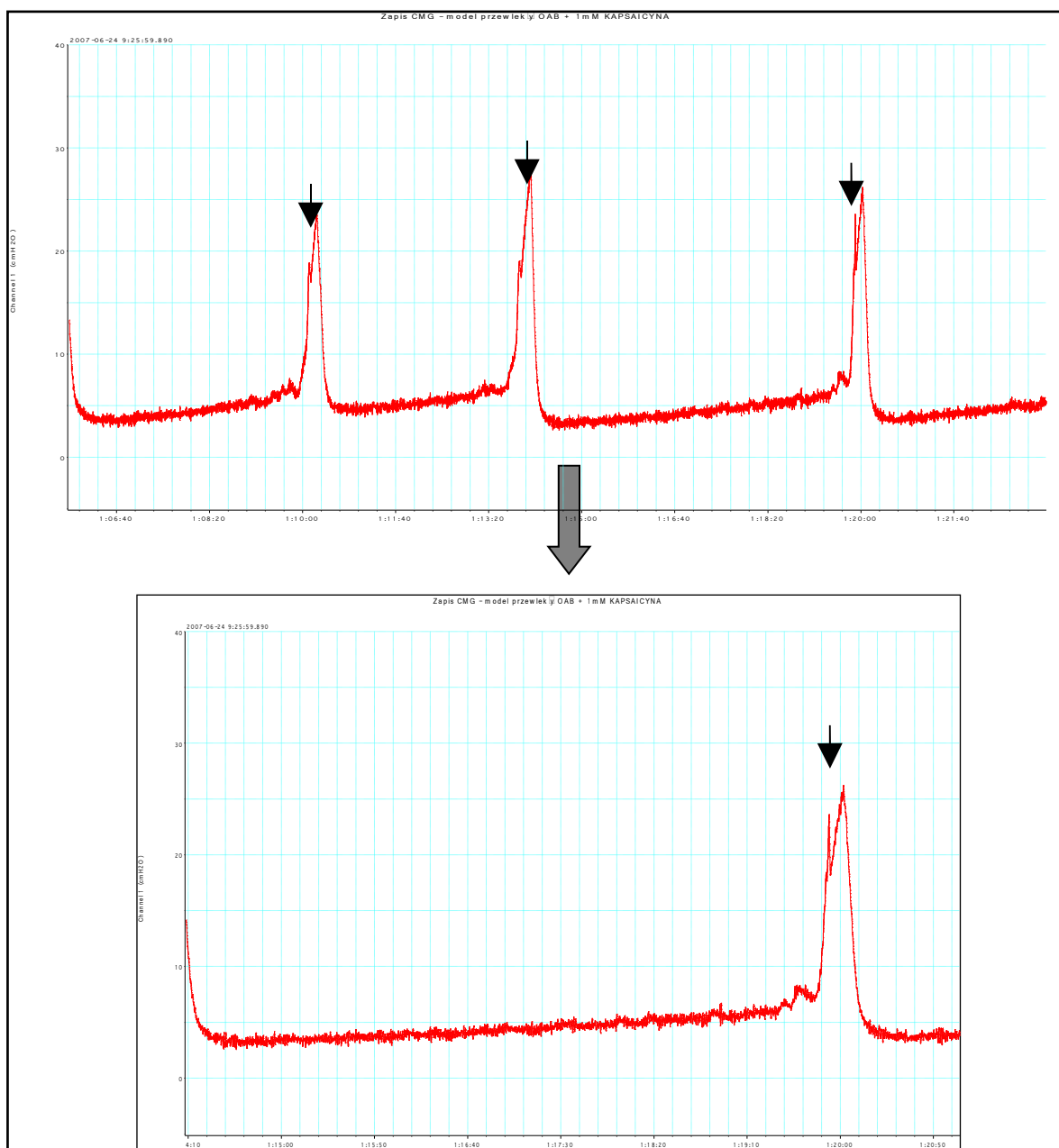


Ryc.17. Wybrane parametry cystometryczne u osobników z przewlekłym pęcherzem nadaktywnym (III) oraz po dopęcherzowej instalacji kapsaicyny (IV) i lidokainy (V).

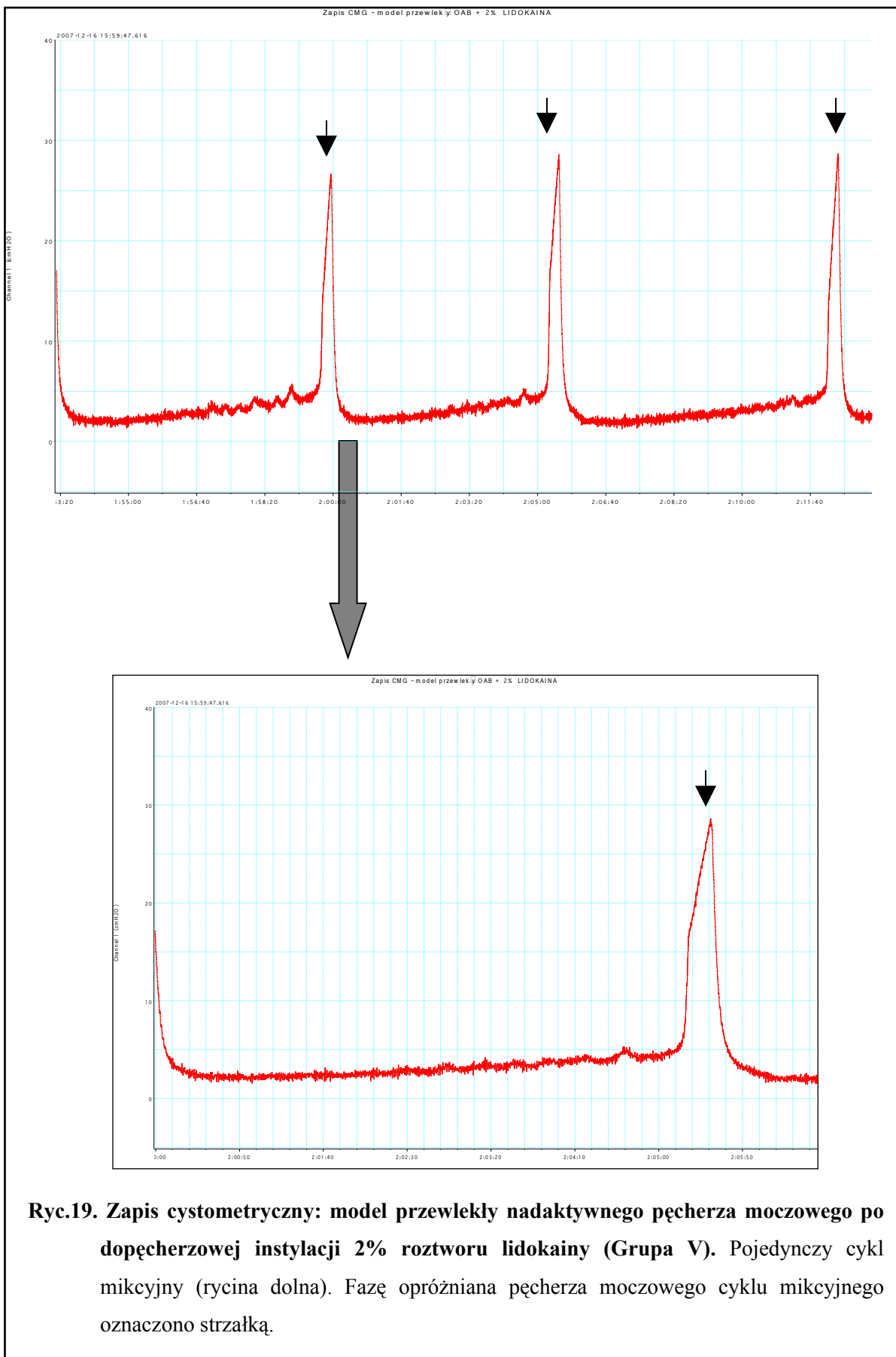
Na wykresie przedstawiono wyniki badania „post hoc” Duncana.

W stosunku do osobników z przewlekłym OAB, dopęcherzowa instalacja kapsaicyny oraz lidokainy prowadziła do wydłużenia okresów międzyskurczowych odpowiednio o 172,3% i 126%, wzrostu podatności ścian o 80% i 120% oraz czynnościowej pojemności pęcherza moczowego o 173% i 125,2%. Obserwowany spadek stopnia nadreaktywności skutkowało zmniejszoną spontaniczną aktywnością skurczową mięśnia wypieracza w fazie wypełniania i magazynowania procesu mikcji, co znalazło odzwierciedlenie w kształcie krzywej cystometrycznej, jak również zostało potwierdzone spadkiem wskaźnika nadreaktywności mięśnia wypieracza odpowiednio o 319,8% i 178,4% oraz

indeksu motorycznego pęcherza moczowego o 23,5% i 27,3%. (Ryc.17., Tab.3.). Zaskakująco u osobników z przewlekłym OAB po LDK obserwowaliśmy wzrost amplitudy skurczów wypieracza inicjujących mikcję (MVP) w porównaniu z osobnikami kontrolnymi z przewlekłym OAB ($28,93 \pm 2,68$ vs. $21,67 \pm 1,94$ cmH₂O, $p < 0,001$).



Ryc.18. Zapis cystometryczny: model przewlekły nadaktywnego pęcherza moczowego po dopęcherzowej instylacji 1mM roztworu kapsaicyny (Grupa IV). Pojedynczy cykl mikcyjny (rycina dolna). Fazę opróżniania pęcherza moczowego cyklu mikcyjnego oznaczono strzałką.



Ryc.19. Zapis cystometryczny: model przewlekły nadaktywnego pęcherza moczowego po dopęcherzowej instylacji 2% roztworu lidokainy (Grupa V). Pojedynczy cykl mikcyjny (rycina dolna). Fazę opróżniania pęcherza moczowego cyklu mikcyjnego oznaczono strzałką.

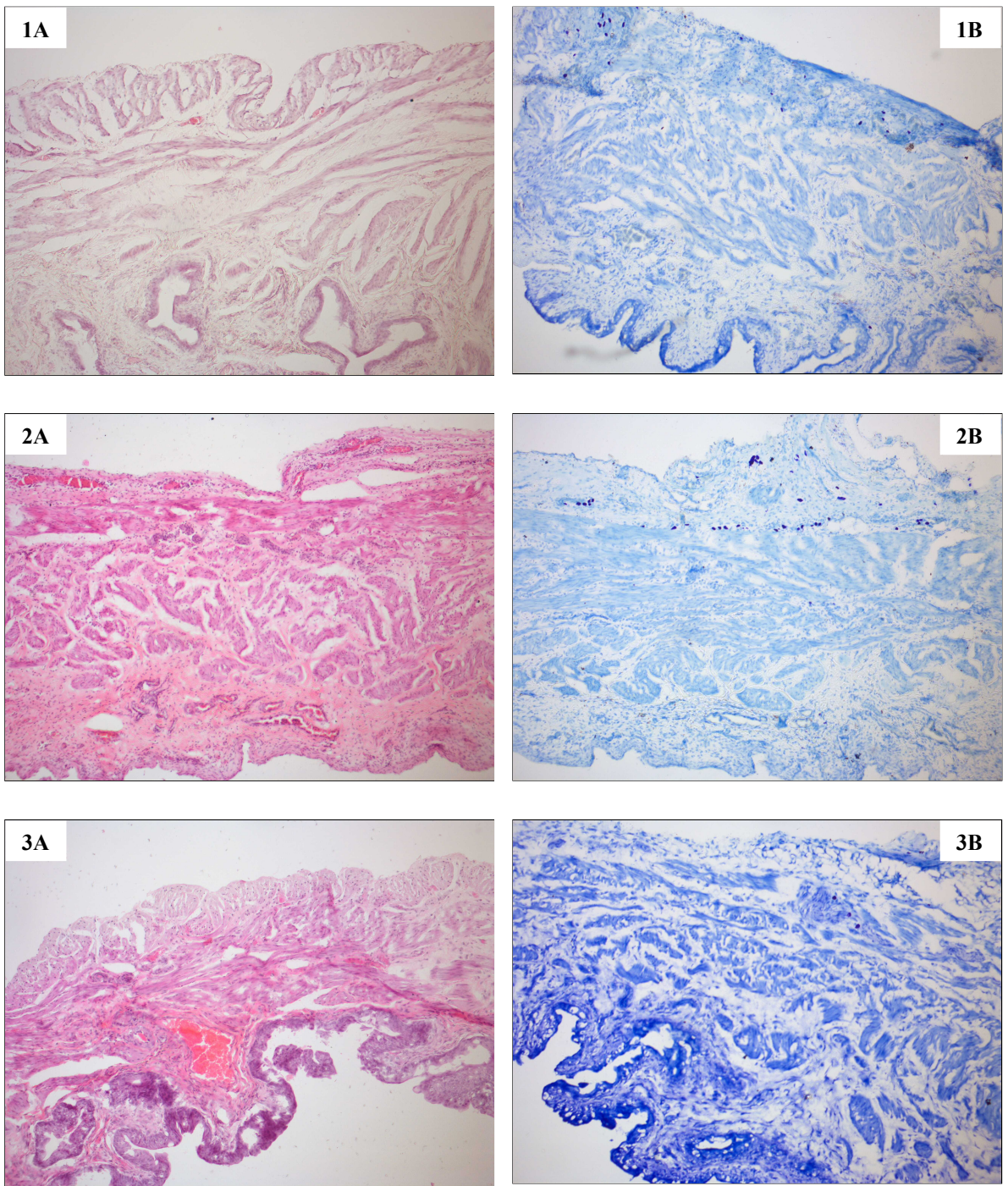
6.4. Wpływ cyklofosfamidu na stopień nasilenia stanu zapalnego i aktywność mastocytów o obrębie ściany pęcherza moczowego

Nasze wyniki potwierdzają, iż ostra i przewlekła podaż cyklofosfamidu prowadzi do wzrostu stopnia nacieku ścian pęcherza moczowego przez komórki zapalne oraz nasilenia obrzęku tkanek (Tab.4.).

Tabela 4. Ocena stopnia nasilenia stanu zapalnego w obrębie ścian pęcherza moczowego osobników zdrowych oraz po ostrej i przewlekłej podaży cyklofosfamidu.

	Grupa I - KONTROLNA	Grupa II – OAB ostry	Grupa III – OAB przewlekły	Istotność różnic
Ilość mastocytów	6,73 ± 2,09	11,97 ± 6,02	1,48 ± 0,71	p=0,002 *
Abrazja śluzówki	8,33 ± 6,45	52,08 ± 16,61	31,25 ± 18,96	p=0,003 **
Wylewy krwawe	16,67 ± 17,08	33,33 ± 24,58	83,33 ± 20,41	p=0,004 ***
Obrzęk tkanek	26,38 ± 11,07	75,70 ± 11,00	82,67 ± 7,18	p=0,002 ****
Ilość komórek zapalnych	32,65 ± 18,14	69,43 ± 18,22	64,58 ± 15,09	p=0,017 ****
* statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą I a grupą II i III oraz pomiędzy grupą II a grupą III (p<0,05). ** statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą I a grupą II (p<0,05). *** statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą I a grupą III oraz pomiędzy grupą II a grupą III (p<0,05). **** statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą I a grupą II i III (p<0,05).				

Przewlekła podaż CYP prowadziła do bardziej nasilonych zmian krwotocznych w obrębie ścian w porównaniu do modelu ostrego. Odmiennie jednorazowa podaż CYP w większej dawce prowadziła głównie do uszkodzeń śluzówki o charakterze abrazji. Analiza stopnia nacieku ścian pęcherza przez mastocyty wskazuje, iż w przebiegu OAB dochodzi do zmian ich aktywności odpowiednio w modelu ostrym do wzrostu, natomiast odmiennie w przebiegu przewlekłego do dramatycznego ich spadku (Ryc.20.).



Ryc.20. Obraz mikroskopowy ściany pęcherza moczowego – barwienie HE (1-3A) oraz obraz mikroskopowy ściany pęcherza moczowego z oceną aktywności komórek wykazujących metachromazję – barwienie błękitem toluidyny (1-3B) w osobnika zdrowego (1A, 1B), z pęcherzem nadaktywnym w modelu ostrym (2A, 2B) i przewlekłym (3A, 3B).

7. DYSKUSJA

Liczne dotychczasowe obserwacje wskazują, iż terapia przy użyciu cyklofosfamidu prowadzi do uszkodzenia ochronnej bariery śluzówkowej i rozwoju chemicznego zapalenia pęcherza moczowego z jego nadaktywnością zarówno u zwierząt, jak i u ludzi. Za najistotniejszy czynnik sprawczy uważany jest jego drażniący metabolit wydalany z moczem – akroleina [75]. Patomechanizmy chemicznego zapalenia indukowane cyklofosfamidem zostały dość dobrze poznane. Jakkolwiek większość dotychczasowych badań eksperymentalnych dotyczy głównie analizy zmian właściwości neurochemicznych [80, 81] i elektrofizjologicznych [82, 83] aferentnych włókien nerwowych unerwiających dolne drogi moczowe, jak i aktywności łuku odruchowego na poziomie rdzenia kręgowego procesu mikcji [84] oraz oceny histologicznej ścian pęcherza moczowego [73, 74, 134]. Nadaktywność ta wydaje się być wynikiem dwóch patomechanizmów, tj. procesu sensytyzacji mechano-wrażliwych aferentnych włókien nerwowych oraz aktywacji “niemych” włókien typu C, które są niewrażliwe w warunkach prawidłowych na rozciąganie pęcherza moczowego [84].

Stosowanie cyklofosfamidu wiąże się z szeregiem działań niepożądanych ze strony dróg moczowych. U szczurów zaobserwowano częstomocz, zmniejszenie objętości pęcherza moczowego indukującej skurcz wypieracza powodującego mikcję oraz spadek amplitudy skurczów mięśnia wypieracza [82, 77, 136]. Opisywane zaburzenia cyklu mikcyjnego obserwowano w różnych protokołach eksperymentalnych indukujących chemiczne zapalenie pęcherza, w zależności od dawki (75 – 200 mg/kg), czasu terapii (4 godziny – 12 dni) i częstości podaży cyklofosfamidu [73, 74, 134]. Większość ewaluacji

urodynamicznych u zwierząt z OAB opisuje częstość mikcji, okresy między skurczami wywołującymi mikcję oraz ich amplitudę.

Podczas naszego eksperymentu, w reakcji na ostrą i przewlekłą podaż cyklofosfamidu, obserwowaliśmy spadek wartości amplitudy śródpecherzowego ciśnienia szczytowego, okresów międzyskurczowych i czynnościowej pojemności pęcherza moczowego. Jak również, wzrost aktywności skurczowej mięśnia wypieracza charakteryzującej się generacją większej ilości skurczów nie wywołujących mikcji (tzw. skurcze NVCs - „non-voiding contractions”). Mimo wprowadzenia niewielkich modyfikacji protokołów eksperymentalnych powyższe obserwacje są zgodne do opisywanych poprzednio [68, 73, 74, 135].

Zaobserwowaliśmy także wzrost śródpecherzowego ciśnienia bazalnego i brak różnic w śródpecherzowych ciśnieniach progowych w obu modelach OAB oraz spadek podatności ścian w modelu przewlekłym.

Przeciwnie Giuliano i wsp. [137] wykazali wzrost śródpecherzowego ciśnienia bazalnego i indukującego mikcję dla skurczów inicjujących i nie inicjujących mikcję u szczurów leczonych cyklofosfamidem, podczas cystometrii w znieczuleniu ogólnym z użyciem izofluranu. Ponadto, Hu i wsp. [134] u przytomnych szczurów w ostrym i podoстрыm modelu OAB opisali istnienie istotnej nadreaktywności ze wzrostem śródpecherzowego ciśnienia bazalnego, progowego i indukującego mikcję.

Obserwowane przez nas zmiany śródpecherzowego ciśnienia bazalnego w przebiegu OAB najpewniej są wynikiem zaburzenia zdolności do relaksacji komórek mięśniowych ściany pęcherza moczowego. Fakt ten może być związany ze zmianami w ekspresji genów kodujących białka receptorowe, jak również z

modulacją stopnia syntezy i uwalniania neurotransmiterów w obrębie pęcherza moczowego i unerwiających go aferentnych włókien nerwowych.

Dodatkowo, Vizzard i wsp. [33] wykazali, iż stopień uwalniania neurotransmiterów z aferentnych zakończeń nerwowych ściśle jest związany ze stanem zapalnym w obrębie ścian pęcherza moczowego. Stan zapalny może prowadzić do zmian właściwości drogi czuciowej prowadząc do redukcji progu bólowego (zjawiska allodynii) oraz wzmocnienia czułości na bodziec bólowy (zjawiska hyperalgezji).

Opisane przez wielu autorów odmienne zachowanie się amplitudy skurczów wypieracza inicjujące mikcję najpewniej są wynikiem modulującego wpływu różnych środków anestetycznych (m.in. uretan, izofluran) na aktywność centralnego i obwodowego system nerwowego kontrolującego czynność dolnych dróg moczowych. Należy przypuszczać, iż środki anestetyczne zaburzają prawidłową czynność nadrdzeniowych ośrodków kontrolujących mikcję i w konsekwencji zmieniają odpowiedź mechanoreceptorów na rozciąganie ścian pęcherza moczowego, prowadząc do osłabienia skurczów mięśnia wypieracza. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, iż uretan w najmniejszym stopniu zaburza fizjologiczny proces mikcji [121].

Jak dotąd do oceny aktywności motorycznej pęcherza moczowego stosowane są tzw. podstawowe parametry cystometryczne tj. śródpęcherzowe ciśnienie bazalne, progowe, szczytowe; okresy międzyskurczowe; pojemność pęcherza i podatność jego ścian. Natomiast w ocenie cystometrycznej stopnia nadreaktywności mięśnia wypieracza u zwierząt, nadal nie posłużono się dodatkowymi parametrami, tj. indeksem aktywności (DI), bądź nadreaktywności (DOI) wypieracza oraz indeksem motorycznym pęcherza moczowego (MI).

Pomimo tego, że jedną ze standardowych metod oceny stopnia nasilenia nadreaktywności wypieracza u ludzi jest właśnie analiza DOI [40]. Również indeks motoryczny jest parametrem szeroko stosowanym w ocenie aktywności skurczowej mięśniówki gładkiej (szczególnie przewodu pokarmowego).

Nasza analiza cystometryczna wykazała wzrost DOI oraz MI w obu modelach OAB, jakkolwiek znacznie bardziej nasilone zmiany DOI obserwowano w modelu ostrym.

Obserwacje aktywności motorycznej pęcherza moczowego podczas badania urodynamicznego skłoniły nas do wprowadzenia nowego parametru “czynnościowej pojemności pęcherza moczowego - fBC” i zastąpienie nim dotychczas używanego w ocenie urodynamicznej u zwierząt, tj. „pojemności pęcherza - BC”. Pojęcie fBC określa dokładnie objętość moczu (pływu infuzyjnego podczas cystometrii) indukującego aktywność skurczową pęcherza moczowego, a zarazem pomija w analizie objętość zalegającego moczu w pęcherzu przed każdym kolejnym cyklem mikcyjnym, której ocena jest wręcz niemożliwa przy jednoczesnym zachowaniu ciągłości badania cystometrycznego.

Liczne kliniczne obserwacje wskazują na ścisły związek objawów zgłaszanych przez pacjentów z OAB z występowaniem mimowolnych skurczów mięśnia wypieracza [138]. Z klinicznego punktu widzenia nasilenie objawów OAB określa stopień nadaktywności pęcherza moczowego, który częściowo jest uzależniony od profilu/charakteru skurczów nie inicjujących i inicjujących mikcję. Wydaje się on być zależnym do stopnia napięcia ściany pęcherza moczowego (ściśle odpowiadającego wartościom ciśnienia bazalnego) i podatności jego ścian, determinowaną zdolnością mięśnia wypieracza do relaksacji. Wartość indeksu DI / DOI zależy od charakteru wszystkich skurczów

w fazie napelniania procesu mikcji, w związku z tym w przeciwieństwie do śródpęcherzowego ciśnienia szczytowego, indeks DI/DOI bardziej precyzyjnie charakteryzuje aktywność skurczową wypieracza. Dodatkowo MI zależy od wartości śródpęcherzowego ciśnienia bazalnego (stopnia napięcia ścian), wszystkich skurczów w fazie napelniania procesu mikcji oraz podatności, co wydaje się być bardziej pomocne przy ocenie aktywności motorycznej pęcherza. Powyższe fakty dobitnie obrazują, iż indeks nadreaktywności, jak i indeks motoryczny są przydatne w ocenie stopnia nasilenia nadreaktywności mięśnia wypieracza pęcherza moczowego.

Poznanie udziału unerwienia aferentnego typu C w regulacji procesu mikcji w przebiegu OAB wydaje się mieć duże znaczenie kliniczne. Właściwa modulacja aktywności aferentnych włókien typu C regulujących działanie dolnych dróg moczowych pozwoli wyeliminować nadreaktywność mięśnia wypieracza pęcherza moczowego, jednocześnie nie wpływając na jego kurczliwość. Liczne dotychczasowe obserwacje, których wyniki zostały przytoczone we wstępie niniejszej pracy wskazują na udział czuciowych włókien typu C, posiadających receptory waniloidowe TRPV1, w regulacji cyklu mikcyjnego w warunkach prawidłowych, jak również w przebiegu pęcherza nadaktywnego.

Kolejnym celem naszej pracy była dokładniejsza ocena udziału aferentnych włókien nerwowych typu C w regulacji procesu mikcji w przebiegu OAB. Wiadomo, iż terapia dopęcherzowa przy użyciu kapsaicyny, bądź lidokainy tylko częściowo zmniejsza dolegliwości pęcherzowe u chorych z OAB [89, 109].

Na podstawie dotychczasowych badań eksperymentalnych wydaje się, iż dwa patomechanizmy są istotne w zmniejszeniu stopnia nasilenia OAB po terapii kapsaicyną, tj. desensytyzacja włókien typu C i osłabienie neurogennej odpowiedzi zapalnej zależnej od aktywności tych włókien. Obserwacje te sugerują obecność w śluzówce pęcherza dwóch rodzajów włókien aferentnych typu C: kapsaicyno – wrażliwych i kapsaicyno - opornych. W związku z tym, w naszych badaniach przyjęliśmy hipotezę, że stwierdzenie zmniejszenia stopnia nadreaktywności mięśnia wypieracza pęcherza moczowego przez poprawę parametrów cystometrycznych w odpowiedzi na dopęcherzową podaż kapsaicyny, bądź lidokainy u zwierząt z OAB, będzie potwierdzeniem polimodalnego charakteru włókien typu C a zarazem dowodem ich udziału w patogenezie pęcherza nadaktywnego.

Obserwowane przez nas zmiany parametrów cystometrycznych u zwierząt z przewlekłym OAB po dopęcherzowej instylacji 1mM roztworu kapsaicyny wykazują, iż desensytyzacja włókien typu C zmniejsza stopień nadreaktywności mięśnia wypieracza przyczyniając się do poprawy parametrów cystometrycznych procesu mikcji – wydłużenia okresów międzyskurczowych, zwiększenia czynnościowej pojemności pęcherza i jego podatności, zmniejszenia indeksu nadreaktywności, indeksu motorycznego oraz częstości skurczów nie inicjujących mikcję. Nasze obserwacje są podobne do tych opisanych przez Komiyama i wsp. [125], którzy wykazali osłabienie rytmicznych skurczów wypieracza, po instylacji dopęcherzowej kapsaicyny i resiniferotoksyny, u zdrowych szczurów i osobników z uszkodzonym rdzeniem kręgowym.

Kliniczne zastosowanie lidokainy w terapii OAB sprowadza się do instylacji dopęcherzowej bezpośrednio przed podażą kapsaicyny w celu

zmniejszenia dolegliwości pęcherzowych związanych z wstępną fazą sensytyzacji włókien typu C.

Podobnie jak kapsaicyna, lidokaina podawana dopęcherzowo w grupie osobników z przewlekłym OAB zmniejszała stopień nasilenia nadaktywności. Obserwowaliśmy wydłużenie okresów międzyskurczowych, wzrost czynnościowej pojemności pęcherza i jego podatności. Przeciwnie do kapsaicyny, podaż lidokainy prowadziła do wzrostu indeksu nadreaktywności (DOI). Wyższe wartości DOI są spowodowane większą amplitudą skurczów wypieracza w końcowym etapie fazy wypełniania procesu mikcji. Zaskakująco w grupie zwierząt z przewlekłym OAB po dopęcherzowej podaży 2% roztworu lidokainy obserwowaliśmy wyższą amplitudę skurczów wypieracza inicjujących mikcję w porównaniu z osobnikami kontrolnymi z przewlekłym OAB. Odmienne kapsaicyna nie wywoływała takiego efektu na amplitudę generowanych śródpecherzowych ciśnień szczytowych. Wydaje się, że za istotne patomechanizmy opisywanych zmian indeksu nadreaktywności oraz śródpecherzowego ciśnienia szczytowego można uznać dwa zjawiska. Pierwszy wynikający z braku wstępnej fazy pobudzenia mięśnia wypieracza, obecnej w reakcji na kapsaicynę, prowadzącej do „częściowego” wyczerpania aktywności mięśniówki pęcherza moczowego i w konsekwencji do osłabienia skurczów wypieracza. Możliwy jest także drugi patomechanizm bezpośrednio związany z przekaźnictwem NANC, tj. desensytyzacją włókien typu C zaburzającą modulujący wpływ NANC na aktywność unerwienia eferentnego pęcherza moczowego w konsekwencji zaburzający właściwą generację skurczów inicjujących mikcję.

Dodatkowo celem dokładniejszego poznania udziału włókien typu C w regulacji procesu mikcji oceniliśmy wpływ modulacji tych włókien na przebieg prawidłowego cyklu mikcyjnego. Nasza analiza urodynamiczna wykazała, iż dopęcherzowa podaż kapsaicyny prowadzi do całkowitej dezorganizacji prawidłowego cyklu mikcyjnego. W fazie wypełniania i magazynowania moczu stwierdziliśmy zwiększoną spontaniczną aktywność mięśnia wypieracza, zarejestrowaną jako skurcze fazowe wypieracza o niskiej amplitudzie przy zwiększonym ciśnieniu śródpecherzowym. Podczas gdy w fazie opróżniania nie obserwowaliśmy prawidłowej aktywności skurczowej wypieracza w konsekwencji uniemożliwiającej całkowite opróżnienia pęcherza moczowego z moczu z następowym stałym, kroplowym wyciekem moczu. Odmienne lidokaina nie zaburzała prawidłowego przebiegu cyklu mikcyjnego u zdrowych osobników. Prowadziła do wzrostu okresów międzyskurczowych, czynnościowej pojemności pęcherza moczowego i jego podatności oraz indeksu aktywności.

Wyżej opisane zmiany przebiegu procesu mikcji oraz parametrów cystometrycznych w reakcji na modulację aktywności włókien typu C przez kapsaicynę i lidokainę u osobników zdrowych oraz z pęcherzem nadaktywnym są dowodem, iż aferentne włókna typu C są istotne w regulacji procesu mikcji w warunkach fizjologicznych oraz w przebiegu pęcherza nadaktywnego.

Aktualne doniesienia wskazują również na udział włókien typu C wykazujących dodatnią ekspresję receptorów waniloidowych - ankyrynowych TRPA1 w regulacji procesu mikcji. Badania Du i wsp. [27] wykazały, iż podaż agonisty receptorów TRPA1 prowadzi do rozwoju nadaktywności pęcherza moczowego. Leffler i wsp. [107] stwierdzili, iż lidokaina aktywuje zakończenia aferentne typu C za pośrednictwem receptorów TRPV1 i w mniejszym stopniu TRPA1. Fakty te

częściowo tłumaczą przyczynę bólu odczuwanego przez pacjentów podczas podaży lidokainy. Ponadto zaobserwowali oni „głębką” desensytyzację włókien typu C po przedłużonej ekspozycji tych włókien na lidokainę. Podobne zjawisko może mieć miejsce w obrębie dolnych dróg moczowych. Powyższe dane pozwalają stwierdzić, iż poprawa parametrów cystometrycznych po podaży lidokainy jest wynikiem, co najmniej dwóch patomechanizmów. Zależy nie tylko, jak dotąd uważano, od blokowania pompy sodowo-potasowej i zahamowania przepuszczalności błony neuronu dla jonów sodu i stabilizacji błony, ale również od modulacji aktywności włókien typu C wykazujących ekspresję receptorów TRPV1 i TRPA1.

Liczne dotychczasowe badania eksperymentalne wykazały, iż aktywacja włókien nerwowych wykazujących ekspresję receptorów waniloidowych TRPV1 prowadzi do uwolnienia szeregu mediatorów, modulujących czynność naczyń krwionośnych, mastocytów oraz limfocytów prowadząc do rozwoju tzw. „zapalenia neurogennego” i w konsekwencji do nadaktywności pęcherza moczowego. Christensen i wsp. [129] oraz Saban i wsp. [130] opisali występowanie dużej liczby mastocytów w ścisłym sąsiedztwie peptydergicznych, bezmielinowych włókien nerwowych typu C, wydzielających substancję P, peptyd kodowany genem kalcytoniny oraz w mniejszym stopniu wazoaktywny peptyd jelitowy. Mimo dobrze poznanych stosunków anatomicznych mastocytów i bezmielinowych włókien nerwowych, nadal w dotychczasowej literaturze nie znajdujemy oceny wpływu cyklofosfamidu na aktywność mastocytów.

Z tego powodu w naszych badaniach przyjęliśmy hipotezę, że dowodem udziału włókien typu C w regulacji procesu mikcji w przebiegu OAB mogą być zmiany stopnia neurogennej odpowiedzi zapalnej w obrębie ściany pęcherza moczowego

w reakcji na podaż cyklofosfamidu. Podczas naszego doświadczenia oceniliśmy stopień nasilenia stanu zapalnego i aktywności komórek wykazujących metachromazję w obrębie ścian pęcherza moczowego w przebiegu ostrego i przewlekłego OAB. Obserwowany przez nas wzrost stopnia nasilenia stanu zapalnego, aktywności komórek zapalnych i mastocytów (*w modelu ostrym OAB*) dobitnie wskazuje na udział włókien typu C w patofizjologii zapalenia neurogennego i rozwoju nadaktywności. Natomiast spadek ilości mastocytów w modelu przewlekłym OAB najpewniej wynika z długotrwałego, toksycznego wpływu cyklofosfamidu i jego metabolitów na te komórki.

Wykazanie przez nas udziału włókien typu C oraz mastocytów w regulacji mikcji w przebiegu OAB oraz istnienia ścisłej zależności pomiędzy stopniem abrazji śluzówki a indeksem nadreaktywności, okresami międzyskurczowymi i funkcjonalną pojemnością pęcherza wydaje się mieć duże znaczenie kliniczne. Pozwala to z dużym prawdopodobieństwem założyć, iż modulacja aktywności unerwienia aferentnego pęcherza moczowego i/lub zmniejszanie stopnia uszkodzenia śluzówki pęcherza (m.in. stosując glikozaminoglikany), jak również osłabienie aktywności mastocytów u chorych z OAB będzie stanowić jedną z alternatywnych metod leczniczych (obok standardowej terapii lekami antycholinergicznymi) mającą na celu zmniejszaniu ciężkości OAB, a zarazem poprawę jakości życia tych chorych.

8. WNIOSKI

1. Terapia przy użyciu cyklofosfamidu prowadzi do rozwoju chemicznego zapalenia pęcherza moczowego i wtórnie do nadreaktywności mięśnia wypieracza pęcherza moczowego.
2. Dopełcherzowa podaż kapsaicyny, jak również lidokainy zmniejsza stopień nadreaktywności mięśnia wypieracza w przebiegu przewlekłego nadaktywnego pęcherza moczowego przyczyniając się do częściowej poprawy parametrów cystometrycznych procesu mikcji. Obserwacje te potwierdzają obecność kapsaicyno – wrażliwych i kapsaicyno – opornych aferentnych włókien typu C.
3. Wpływy modulacji aktywności włókien typu C przez kapsaicynę i lidokainę u osobników zdrowych oraz z przewlekłym pęcherzem nadaktywnym na prawidłowy przebieg procesu mikcji są dowodem, iż aferentne włókna typu C są istotne w regulacji procesu mikcji w warunkach fizjologicznych oraz w przebiegu OAB.
4. Wzrost stopnia nasilenia stanu zapalnego, aktywności komórek zapalnych i mastocytów (*w modelu ostrym OAB*) w reakcji na cyklofosfamidu dobitnie wskazuje na udział włókien typu C w patofizjologii zapalenia neurogennego i rozwoju nadaktywności pęcherza moczowego.

9. STRESZCZENIE (*Summary*)

Cyclophosphamide (CYP) treatment induces chemical cystitis leading to bladder overactivity (OAB) in animals and humans. There is a great number of OAB models evaluations, which consider the bladder histology, as well as alterations in neurochemical, electrophysiological properties of bladder afferent neurons and reflex arcs activity in the spinal cord. The former aim of our study was to investigate the influence of acute and chronic models of CYP-induced cystitis on urinary bladder motor activity in rats.

The pivotal backgrounds for OAB development are as follows: the C-fibres sensitisation or degree of sensitivity to various stimuli acting on the urotelium and local effector function of afferent C-fibres endings leading to neurogenic inflammation. Previous studies have suggested that different types of unmyelinated afferent C-fibres, such as capsaicin-sensitive and capsaicin-resistant mediate the voiding reflex in overactive bladder [5]. Due to the polymodal features of afferent C-fibres, this study also investigates the urodynamic effect of primary afferent neuronal modulation on detrusor activity and the severity of neurogenic inflammatory response within bladder walls in normal and overactive bladder model rats.

Experiments were performed on 66 female rats. OAB was induced by intraperitoneal administration of cyclophosphamide. All the surgical procedures and urodynamic studies were performed under urethane anaesthesia. Cystometry

was done after an hour recovery period from the surgical procedure. All animals were randomly divided into eight groups: control, acute and chronic OAB, chronic OAB after capsaicin or lidocaine instillation, control capsaicin or lidocaine instillation, sham group. The measurements represent the average of five bladder micturition cycles. We analyzed: basal, threshold, micturition voiding pressure; intercontraction interval; compliance; functional bladder capacity; motility index; detrusor overactivity index. After urodynamic evaluation the rats were sacrificed, the bladder was removed through a lower midline abdominal incision. The specimen was split longitudinally and processed for histological examination. The severity of inflammation was examined in each section according to 4 criteria, including mucosal abrasion, hemorrhage, leukocyte infiltration and edema. Additionally we estimated the activity of mastocytes within the bladder's walls.

Our results show that acute and chronic cyclophosphamide administration lead to extent neurogenic inflammation and activity of inflammatory cells then subsequently to OAB development. In healthy rats intravesical instillation of capsaicin causes complete inhibition of detrusor contractility resulting in improper voiding function of the bladder, whereas lidocaine has no influence on micturition cycles in intact animals. In addition, intravesical instillation of capsaicin and lidocaine reduces the severity of detrusor overactivity of OAB rats causing improvement of cystometric parameters.

This observation supports the hypothesis, that in the pathophysiology of an overactive bladder two types of unmyelinated afferent C-fibres: capsaicin-sensitive and capsaicin-resistant play an important role.

10. PIŚMIENNICTWO

1. Chu FM, Dmochowski R.: Pathophysiology of overactive bladder. *Am J Med.* 2006, 119 (3A): 3S-5S.
2. Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, van Kerrebroeck P, Victor A, Wein A.: The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn.* 2002, 21: 167-178.
3. Lecci A, Maggi CA.: Overactive urinary bladder: targeting the sensory pathway. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies.* 2005, 2 (I).
4. Morrison J, Steers WD, Brading A et al.: Basic urological science. Incontinence. Red. Abrams P, Khoury S, Wein A. Health Publication Ltd., Plymbridge Distributors Ltd. Plymouth. 2002, 2: 83-163.
5. de Groat WC, Yoshimura N.: Pharmacology of the lower urinary tract. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001, 41: 691-721.
6. Abrams P, Artibani W.: Lower urinary tract innervation and the normal micturition cycle. "Understanding Stress Urinary Incontinence" red. Abrams P, Artibani W. Ismar Healthcare, Belgium. 2004, 12-14.
7. Thor PJ: Podstawy patofizjologii człowieka. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2001.
8. Andersson KE.: Pharmacology of lower urinary tract smooth muscles and penile erectile tissues. *Pharmacolo Rev.* 1993, 45(3): 253-308.
9. Burnstock G, Cocks T, Kasakov L, Wong HK.: Direct evidence for ATP release from non-adrenergic, non-cholinergic ("purynergic") nerves in guinea-pig taenia coli and bladder. *Eur J Pharmacol.* 1978, 49(2): 145-149.
10. Chapple C, Chess-Williams R.: Latest developments in the field of neurotransmitters. *Eur Urol.* 1998, 34, Suppl 1: 45-47.
11. Radziszewski P, Ekblad E, Sundler F, Mattiasson A.: Distribution of neuropeptide-tyrosine hydroxylase- and nitric oxide synthase containing nerve fibres in the external urethral sphincter of the rats. *Scand J Urol Nephrol.* 1996, 179 Suppl.: 81-85.
12. Holzer P.: Capsaicin as a tool for studying neuron functions. In: Sensory nerves and neuropeptides in gastroenterology: from basis science to clinical perspectives. Eds.: Costa M., Plenum Press, New York 1991, 3-16.
13. Chancellor MB.: New frontiers in the treatment of overactive bladder and incontinence. *Rev Urol.* 2002, 4 (4): S50-S56.

14. Habler HJ, Janig W, Koltzenburg M.: Activation of unmyelinated afferent fibres by mechanical stimuli and inflammation of the urinary bladder in the cats. *J Physiol.* 1990, 425: 545-562.
15. Fall M, Lindstrom S, Mazieres L.: A bladder-to-bladder cooling reflex in the cats. *J Physiol.* 1990, 427: 281-300.
16. Gosling JA, Dixon JS.: Sensory nerves in the mammalian urinary tracts. An evaluation using light and electron microscopy. *J Anat.* 1974, 117: 133-144.
17. Wakabayashi Y, Tomoyoshi T, Fujimiya M, Arai R, Maeda T.: Substance P containing axon terminals in the mucosa of the human urinary bladder: pre-embedding immunohistochemistry using cryostat sections for electron microscopy. *Histochemistry.* 1993, 100: 401-407.
18. Maggi CA.: Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog Neurobiol.* 1995, 45: 1-98.
19. Gabella G, Davis C.: Distribution of afferent axons in bladder of rats. *J Neurocytol.* 1998, 27: 141-155.
20. Birder L.: Role of the urothelium in bladder function. *Scand J Urol Nephrol.* 2004, Suppl. 215: 48-53.
21. Brading FA.: Spontaneous activity of the lower urinary tract muscles: correlation between ion channels and tissue function. *J Physiol.* 2006: 570(Pt 1): 13-22.
22. McCloskey KD.: Characterisation of outward currents in interstitial cells from the guinea pig bladder. *J Urol.* 2005, 173(1): 296-301.
23. Fowler CJ.: Bladder afferents and their role in the overactive bladder. *Urology.* 2002, 59(5), Suppl. 1: 37-42.
24. Vlaskovska M, Kasakov L, Rong W, Bodin P, Bardini M, Cockayne DA, Ford AP, Burnstock G.: P2X3 knock-out mice reveal a major sensory role for urothelially released ATP. *J Neurosci.* 2001, 21(15): 5670-5677.
25. Burcher E, Zeng XP, Strigas J, Shang F, Millard RJ, Moore KH.: Autoradiographic localization of tachykinin and calcitonin gene-related peptide receptors in adult urinary bladder. *J Urol.* 2000, 163: 331-337.
26. Maggi CA.: Prostanoids as local modulators of reflex micturition. *Pharmacol Res.* 1992, 25: 13-20.
27. Du S, Araki I, Yoshiyama M, Nomura T, Takeda M.: Transient Receptor Potential Channel A1 Involved in Sensory Transduction of Rat Urinary Bladder Through C-Fiber Pathway. *Urology.* 2007, 70: 826-831.
28. Streng T, Axelsson HE, Hedlund P, Andersson DA, Jordt SE, Bevan S, Andersson KE, Högestätt ED, Zygmunt PM.: Distribution and Function of the Hydrogen Sulfide-Sensitive TRPA1 Ion Channel in Rat Urinary Bladder. *Eur Urol.* 2008, 53(2): 391-400.
29. Yokoyama O, Nagano K, Kjawaguchi K.: The response of the detrusor muscle to acetylcholine in patients with intravesical obstruction. *Urol Res.* 1991, 19: 117-121.
30. Harrison SC, Hunnam GR, Farman P.: Bladder instability and denervation in patients with bladder outlet obstruction. *Br J Urol.* 1987, 60: 519-522.
31. Nagy I, Santha P, Jancso G, Urban L.: The role of the Vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. *Eur J Pharmacol.* 2004, 500: 351-369.

32. Chuang YC, Fraser MO, Yu Y, Chancellor MB, De Groat WC, Yoshimura N.: The role of bladder afferent pathways in bladder hyperactivity induced by the intravesical administration of nerve growth factor. *J Urol.* 2001, 165: 975–979.
33. Vizzard MA.: Changes in urinary bladder neurotrophic factor mRNA and NGF protein following urinary bladder dysfunction. *Exp Neurol.* 2000, 161: 273–284.
34. Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D.: Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science.* 2000, 288: 306–313.
35. Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown S.: Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature.* 2000, 405: 183–187.
36. de Ridder D, Baert L.: Vanilloids and the overactive bladder. *BJU Int.* 2000, 86: 172-180.
37. Birder LA, Nakamura Y, Kiss S, Nealen ML, Barrick S, Kanai AJ, Wang E, Ruiz G, De Groat WC, Apodaca G, Watkins S, Caterina MJ.: Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nat Neurosci.* 2002, 5: 856–860.
38. Radziszewski P, Szalecki P, Majewski M.: Pęcherz nadreaktywny – patofizjologia, diagnostyka i leczenie. Nietrzymanie moczu u kobiet – Patologia, Diagnostyka, Lecznie. Red. Rechberger T, Jakowicki JA. *Bifolium* 2005 wyd.II. 113-138.
39. Brading A.: A myogenic basis for the overactive bladder. *Urology.* 1997, 50 Suppl. 6A: 57-67.
40. Abrams P.: Describing bladder storage function: overactive bladder syndrome and detrusor overactivity. *Urology.* 2003, 62(5), Suppl.2: 28-37.
41. Andersson KE.: The overactive bladder: pharmacologic basis of drug treatment. *Urology.* 1997, 50(6A): 74-84.
42. De Groat WC.: Integrative control of lower urinary tract: preclinical perspective. *Br J Pharmacol.* 2006, 147, Suppl.2: S25-S40.
43. Andersson KE.: Bladder activation: afferent mechanisms. *Urology.* 2002, 59 (Suppl. 1): 43-50.
44. Guttman L.: Discussion on the treatment and prognosis of traumatic paraplegia. *Proc R Soc Med.* 1947, 40: 219-225.
45. Bors E, Comarr AE.: *Neurological Urology: Physiology of Micturition, Its Neurological disorders and Sequelae.* University Park Press. Baltimore, 1971.
46. Madersbacher H, Wyndaele JJ.: *Conservative management in neuropatic urinary incontinence [w:] Incontinence.* Red. Abrams P, Khoury S, Wein A. 2nd Edition Health Publication Ltd Plymout 2002: 697-754.
47. Mori S, Kojima M, Sakai Y.: Bladder dysfunction in dementia patients showing urinary incontinence: Evaluation with cystometry and treatment with propiverine hydrochloride. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi.* 1999, 36: 489-494.
48. Yokoyama O, Komatsu K, Ishiura Y.: Change in bladder contractility associated with bladder overactivity in rats with cerebral infarction. *J Urol.* 1998, 159: 577-580.
49. De la Rosette JJ, Witjes WP.: Relationships between lower urinary tract symptoms and bladder outlet obstruction. *Neurourol Urodyn.* 1998, 17: 99-108.

50. Steers WD, de Groat WC.: Effect of bladder outlet obstruction on micturition reflex pathways in the rats. *J Urol.* 1988, 140: 864-871.
51. Speakman MJ, Brading AF.: Cystometric, physiological and morphological studies after relief of bladder outflow obstruction in the pig. *Br J Urol.* 1989, 68: 243-247.
52. Mudy AR, Thomas PJ.: Clinical physiology of bladder, urethra and pelvic floor. *Urodynamics – Principles, Practice and Application.* Ed. Mundy AR, Stephenson TP, Wein AJ. Churchill Livingstone, London 1995, 15-27.
53. Bump RC.: The urethrodetrusor facilitative reflex in woman: Results of urethral perfusion studies. *Am J Obstet Gynecol.* 2000, 182: 794-802.
54. Steers WD, Gray M.: Depression: A risk factor for idiopathic urge incontinence? *J Urol.* 1997, 157: 185.
55. Thor KB, Katofiasc MA, Danuser H, Springer J, Schaus JM.: The role of 5-HT_{1A} receptors in control of the lower urinary tract function in cats. *Brain Res.* 2002, 946: 290-297.
56. Burgard EC, Fraser MO, Thor KB.: Serotonergic modulation of bladder afferent pathways. *Urology.* 2003, 62: 10-15.
57. Hunt J.: Psychological approaches to the management of sensory urgency and idiopathic detrusor instability. *Br J Urol.* 1996, 77: 339-341.
58. Resnick NM, Valla SW.: The pathophysiology of urinary incontinence among institutionalized elderly person. *N Eng J Med.* 1989, 320: 1-7.
59. Elbadawi A, Hailemariam S.: Structural basis of geriatric voiding dysfunction. *J Urol.* 1997, 157: 1814-1822.
60. German K, Bedwani J, Davies J.: Physiological and morphometric studies into the pathophysiology of detrusor hyperreflexia in neuropathic patients. *J Urol.* 1994, 153: 1678-1683.
61. Shapiro E.: Effect of estrogens on the weight and muscarinic cholinergic receptor density of rabbit bladder and urethra. *J Urol.* 1986, 135: 1084.
62. Batra S, Andersson KE.: Oestrogen-induced changes in muscarinic receptor density and contractile responses in the female rabbit urinary bladder. *Acta Physiol Skand.* 1989, 137: 135.
63. Bennett HL, Gustafsson JA, Keast JR.: Estrogen receptor expression in lumbosacral dorsal root ganglion cells innervating the female rat urinary bladder. *Auton Neurosci.* 2003, 105: 90-100.
64. Dmietrieva N, McMahon S.: Sensitization of visceral afferents by nerve growth factor in the adult rat. *Pain.* 1996, 68: 87-97.
65. Yoshimura N, de Groat WC.: Neural control of the lower urinary tract. *Int J Urol.* 1997, 4: 111.
66. Yu Y, de Groat WC.: Effects of ZD6196, a K_{ATP} channel opener, on bladder hyperactivity and spinal c-fos expression evoked by bladder irritation in rats. *Brain Res.* 1998, 807: 11-18.
67. Birder LA, de Groat WC.: Increased c-fos expression in spinal neurons after irritation of the lower urinary tract in the rat. *J Neurosci.* 1992, 12: 4878-4889.
68. Ozawa H, Chancellor MB, Jung SY, Yokoyama T, Fraser MO, Yu Y, de Groat WC, Yoshimura N.: Effect of intravesical nitric oxide therapy on cyclophosphamide-induced cystitis. *J Urol.* 1999, 162: 2211-2216.

69. Stein PC, Pham H, Ito T, Parsons CL.: Bladder injury model induced in rats by exposure to protamine sulfate followed by bacterial endotoxin. *J Urol.* 1996, 155: 1133-1138.
70. McMahon SB, Dmitrieva N, Koltzenburg M.: Visceral pain. *Br J Anaesth.* 1995, 75: 132-144.
71. Chuang YC, Chancellor MB, Seki S, Yoshimura N, Tyagi P, Huang L, Lavelle JP, de Groat WC, Fraser MO.: Intravesical protamine sulfate and potassium chloride as a model for bladder hyperactivity. *Urology.* 2003, 61: 664-670.
72. Zhang X, Igawa Y, Ishizuka O, Nishizawa O, Andersson KE.: Effects of resiniferatoxin desensitization of capsaicin-sensitive afferents on detrusor overactivity induced by intravesical capsaicin, acetic acid or ATP in conscious rats. *Arch Pharmacol.* 2003, 367: 473-479.
73. Dinis P, Churrua A, Avelino A, Yaqoob M, Beven S, Nagy I, Cruz F.: Anandamide-evoked activation of vanilloid receptor 1 contributes to the development of bladder hyperreflexia and nociceptive transmission to spinal dorsal horn neurons in cystitis. *J. Neurosci.* 2004, 24(50): 11253-11263.
74. Chopra B, Barrick SR, Meyers S, Beckel JM, Zeidel ML, Ford APDW, de Groat WC, Birder LA.: Expression and function of bradykinin B1 and B2 receptors in normal and inflamed rat urinary bladder urothelium. *J Physiol.* 2005, 562 (Pt3): 859-871.
75. Cox PJ.: Cyclophosphamide cystitis – identification of acrolein as a causative agent. *Biochem Pharmacol.* 1979, 28: 2045-2049.
76. Levine LA, Richie JP.: Urological complications of cyclophosphamide. *J Urol.* 1989, 141: 1063-1069.
77. Watson NA, Notley RG.: Urological complications of cyclophosphamide. *Br J Urol.* 1973, 46: 606-609.
78. Klein FA, Smith MJ.: Urinary complications of cyclophosphamide therapy: Etiology, prevention and management. *Curr Concepts Ther.* 1983, 76: 1413-1416.
79. Boucher M, Meen M, Codron JP, Coudore F, Kemeny JL, Eschaliere A.: Cyclophosphamide-induced cystitis in freely-moving conscious rats: behavioral approach to a new model of visceral pain. *J Urol.* 2000, 164: 203-208.
80. Pelissier N, Doone G, Boyle MM, Vizzard MA.: Changes in growth associated protein (GAP-43), calcitonin gene-related peptide (CGRP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) in L6-S1 spinal cord and dorsal root ganglia (DRG) following cyclophosphamide (CYP)-induced cystitis. *Soc Neurosci.* 1999, Abstract.
81. Vizzard MA, de Groat WC.: Increased expression of neuronal nitric oxide synthase (NOS) in bladder afferent pathways following chronic bladder irritation. *J Comp Neurol.* 1996, 370: 191-202.
82. Yoshimura N, de Groat WC.: Increased excitability of afferent neurons innervating rat urinary bladder following chronic bladder inflammation. *J Neurosci.* 1999, 19: 4644-4653.
83. Jennings LJ, Vizzard MA.: Cyclophosphamide-induced inflammation of the urinary bladder alters electrical properties of small diameter afferent neurons from dorsal root ganglia. *FASEB J.* 1999, 13: A57.

84. Vizzard MA, Boyle MM.: Increased expression of growth-associated protein (GAP-43) in lower urinary tract pathways following cyclophosphamide (CYP)-induced cystitis. *Brain Research*. 1999, 844: 174-187.
85. Sengupta JN, Gebhart GF.: Mechanosensitive properties of pelvic nerve afferent fibres innervating the urinary bladder of the rats. *J Neurophysiol*. 1994, 72: 2420-30.
86. Maggi CA, Barbanti G, Santicioli P, Beneforti P, Misuri D, Meli A, Turini D.: Cystometric evidence that capsaicin-sensitive nerves modulate the afferent branch of micturition reflex in humans. *J Urol*. 1989, 142: 150.
87. Fowler CJ, Jewkes D, McDonald WI, Lynn B, de Groat WC.: Intravesical capsaicin for neurogenic bladder dysfunction (letter). *Lancet*. 1992, 339: 1239.
88. Andersson KE.: New pharmacological targets for the treatment of the overactive bladder: An update. *Urology*. 2004, 63: 32-41.
89. Chancellor MB, De Groat WC.: Intravesical capsaicin and resiniferatoxin therapy: spicing up the ways that we treat the overactive bladder. *J Urol*. 1999, 162: 3.
90. Radziszewski P, Borkowski A.: Intravesical resiniferatoxin for the treatment of overactive bladder, painful bladder and interstitial cystitis. *Int Urogyn J*. 2001, 12 (Suppl.3): 64.
91. Maggi CA, Santicioli P, Meli A.: The effects of topical capsaicin on rat urinary bladder motility in vivo. *Eur J Pharmacol*. 1984, 103: 41–50.
92. Maggi CA, Lippe IT, Giuliani S, Abelli L, Somma V, Geppetti P, Jancso' G, Santicioli P, Meli A.: Topical versus systemic capsaicin desensitization: specific and unspecific effects as indicated by modification or reflex micturition in rats. *Neuroscience*. 1989, 31: 745– 756.
93. Quartara L, Maggi CA.: The tachykinin NK1 receptor: Part II. Distribution and pathophysiological roles. *Neuropeptides*. 1998, 32: 1–49.
94. Ferguson DR, Kennedy I, Burton TJ.: ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes—a possible sensory mechanism? *J Physiol*. 1997, 505(Pt.2): 503– 511.
95. Birder LA, Kanai AJ, De Groat WC, Kiss S, Nealen ML, Burke NE, Dineley KE, Watkins S, Reynolds IJ, Caterina MJ.: Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 2001, 98: 13396–13401.
96. De Groat WC, Kawatani M, Hisamitsu T, Cheng CL, Ma CP, Thor K, Steers W, Roppolo JR.: Mechanisms underlying the recovery of urinary bladder function following spinal cord injury. *J Auton Nerv Syst*. 1990, (Suppl) 30: S71– S77.
97. Szallasi A, Blumberg PM.: Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev*. 1999, 51: 159-212.
98. Cruz F, Guimaraes M, Silva C, Reis M.: Suppression of bladder hyperreflexia by intravesical resiniferatoxin. *Lancet*. 1997, 350: 640– 641.
99. Cruz F, Guimaraes M, Silva C, Rio ME, Coimbra A, Reis M.: Desensitization of bladder sensory fibers by intravesical capsaicin has long lasting clinical and urodynamic effects in patients with hyperactive or hypersensitive bladder dysfunction. *J Urol*. 1997, 157: 585–589.

- 100.de Ridder D, Chandiramani V, Dasgupta P, Van Poppel H, Baert L, Fowler CJ.: Intravesical capsaicin as a treatment for refractory detrusor hyperreflexia: a dual center study with long-term followup. *J Urol.* 1997, 158: 2087–2092.
- 101.Silva C, Rio ME, Cruz F.: Desensitization of bladder sensory fibers by intravesical resiniferatoxin, a capsaicin analog: long-term results for the treatment of detrusor hyperreflexia. *Eur Urol.* 2000, 38: 444–452.
- 102.DeSeze M, Wiart L, Ferrier J.: Intravesical instillation of capsaicin in urology. A review of the literature. *Eur Urol.* 1999, 36: 267-277.
- 103.Catterall WA.: From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron.* 2000, 26:13–25.
- 104.Nau C, Wang GK.: Interactions of local anesthetics with voltage-gated Na⁺ channels. *J Membr Biol,* 2004, 201: 1–8.
- 105.Chandiramani VA, Peterson T, Duthie GS, Fowler C.J.: Urodynamic changes during therapeutic intravesical instillations of capsaicin. *Br J Urol.* 1996, 77: 792.
- 106.Fowler CA, Beck RO, Gerard S, Betts CD, Fowler CG.: Intravesical capsaicin for treatment of detrusor hyperreflexia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1994, 57: 169.
- 107.Leffler A, Fischer MJ, Rehner D, Kienel S, Kistner K, Saper SK, Gavva NR, Reeh PW, Nau C.: The Vanilloid receptor TRPV1 is activated and sensitized by local anesthetics in rodent sensory neurons. *J Clin Invest.* 2008, 2: 1-14.
- 108.Igawa Y, Komiyama I, Nishizawa S, Ogawa A.: Intravesical capsaicin inhibits autonomic dysreflexia in patients with spinal cord injury. *Neurourol Urodyn.* 1996, 16: 374.
- 109.Dasgupta P, Fowler CJ, Stephen RL.: Electromotive drug administration of lidocaine to anesthetize the bladder before intravesical capsaicin. *J Urol.* 1998, 159: 1857-1861.
- 110.Giannakopoulos X, Champilomatos P.: Chronic interstitial cystitis. Successful treatment with intravesical lidocaine. *Arch Ital Urol Nefrol Androl.* 1992, 64: 337.
- 111.Yokoyama O, Komatsu K, Kodama K, Yotsuyanagi S, Niikura S, Namiki M.: Diagnostic value of intravesical lidocaine for overactive bladder. *J Urol.* 2000, 164: 340.
- 112.Yokoyama O, Ishiura Y, Nakamura Y, Kumini K, Mita E, Namiki M.: Urodynamic effects of intravesical instillation of lidocaine in patients with overactive detrusor. *J Urol.* 1997, 157: 1826.
- 113.Oh SJ, Kim SJ, Park EC, Chung HK, Kim KW, Choi H.: Effects of local anesthetics on the contractility of rat bladder. *J Urol.* 2001, 165: 2044-2050.
- 114.Oh SJ, Paick SH, Lim DJ, Lee E, Lee SE.: Effects of local anesthetics on human bladder contractility. *Neurourol Urodyn.* 2005, 24(3): 288-294
- 115.Crafta RM, Porreca F.: Tetracaine attenuates irritancy without attenuating desensitization produced by intravesical resiniferatoxin in the rats. *Pain.* 1994, 57: 351.
- 116.Crafta RM, Carlisi VJ, Matnia A, Herman RM, Porreca F.: Behavioral characterisation of the excitatory and desensitizing effects of intravesical capsaicin and resiniferotoxin in the rat. *Pain.* 1993, 55: 205.

117. Catterall W, Mackie K.: Local anesthetics. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Edited by Hardman JG, Limdeird LE, Milinoff PB, Ruddon RW, Galman AG. New York: McGraw-Hill, 1996: 331-347.
118. Wilson-Pauwels L, Stewart PA, Akesson EJ: *Autonomic nerves - basic science, clinical aspects, case studies*. BC Decker Inc, Hamilton, London 1997.
119. Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ: „*Campbell’s Urology*”. 8th Edition Vol.2. Chapter 25. *Urodynamic evaluation* Saunders, Elsevier Science, 2002.
120. Dinis P, Churrua A, Avelino A, Cruz F.: Intravesical resiniferatoxin decreases spinal c-fos expression and increases bladder volume to reflex micturition in rats with chronic inflamed urinary bladders. *BJU Int*. 2004, 94(1): 153-7.
121. Cannon TW, Damaser MS.: Effects of anesthesia on cystometry and leak point pressure of the female rat. *Life Sciences*. 2001, 69: 1193–1202.
122. Matsuura S, Downie JW.: Effect of anesthetics on reflex micturition in the chronic cannula-implanted rat. *Neurourol Urodyn*. 2000, 19(1): 87-99.
123. Maggi CA, Giuliani S, Santicioli P, Meli A.: Analysis of factors involved in determining urinary bladder voiding cycle in urethan-anesthetized rats. *Am J Physiol*. 1986, 251(2 Pt 2): R250–7.
124. *Principles of Proper Laboratory Use in Research and Teaching*. Wake Forest Univ., Bowman Gray School of Medicine, 1992.
125. Komiyama I, Igawa Y, Ishizuka O, Nishizawa O, Andersson KE.: Effect of intravesical capsaicin and resiniferatoxin on distension-induced bladder contraction in conscious rats with and without chronic spinal cord injury. *J Urol*. 1999, (161): 314-319.
126. Avelino A, Cruz F, Coimbra A.: Lidocaine prevents noxious excitation of bladder afferents induced by intravesical capsaicin without interfering with the ensuing sensory desensitization: an experimental study in rats. *J Urol*. 1998, (159): 567-570.
127. Abrams P.: Bladder instability: concept, clinical associations and treatment. *Scand J Urol Nephrol Suppl*. 1984, 87: 7-12.
128. Flisser AJ, Wamsley K, Blavis JG.: Urodynamic classification of patients with symptoms of overactive bladder. *J Urol*. 2003, 169: 529-533.
129. Christensen M, Keith I, Rhodes P, Graziano F, Madsen PO, Bruskewitz R, Saban R.: A guinea pig model for study of mast cells function: Histamine release and smooth muscle contraction. *J Urol*. 1990, 144: 1293-1300.
130. Saban R, Christensen M, Keith M, Graziano F, Udem B, Bjorling JAD, Bruskewitz RC.: Experimental model for the study of bladder mast cell degranulation and smooth muscle contraction. *Semin Urol*. 1991, 9: 88-101.
131. Ustinova EE, Gutkin DW, Pezzone MA.: Sensitization of pelvic nerve afferents and mast cell infiltration in the urinary bladder following chronic colonic irritation is mediated by neuropeptides. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007, 292: F123-F130.
132. Bjorling DE, Jerde TJ, Zine MJ, Busser BW, Saban MR, Saban R.: Mast cells mediate the severity of experimental cystitis in mice. *J Urol*. 1999; 162: 231-236.

133. Cayan S, Chermansky C, Schlote N, Sekido N, Nunes L, Dahiya R, Tanagho EA.: The bladder acellular matrix graft in a rat chemical cystitis model: functional and histological evaluation. *J Urol.* 2002, 168: 798-804.
134. Hu VY, Malley S, Dattilio A, Folsom JB, Zvara P, Vizzard MA: COX-2 and prostanoid expression in micturition pathways after cyclophosphamide-induced cystitis in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003, 284: R574-R585.
135. Takagi-Matsumoto H, Ng B, Tsukimi Y, Tajimi M: Effects of NSAIDs on Bladder Function in Normal and Cystitis Rats: a Comparison Study of Aspirin, Indomethacin, and Ketoprofen *J Pharmacol Sci.* 2004, (95): 458 – 465.
136. Maggi CA, Lecci A, Santicioli P, Del Bianco E, Giuliani S: Cyclophosphamide cystitis in rats: involvement of capsaicin-sensitive primary afferents. *J Auton Nerv Syst.* 1992, (38): 201-208.
137. Giuliano FA, Denys P, Chartier-Kastler E, Alexandre L, Bernabe J: L6-S1 spinal nerve stimulation reduces micturition frequency in anaesthetized rats with cyclophosphamide-induced cystitis *BJU Int.* 2005, (97): 386-392.
138. Ouslander JG.: Management of overactive bladder. *N Engl J Med.* 2004, 350: 786 - 799.
139. Juszczak K, Królczyk G, Filipek M, Dobrowolski ZF, Thor PJ: Animal model of overactive bladder: cyclophosphamide (CYP)-induced cystitis in rats. *Folia Med Cracov.* 2007, XLVII, 1-4: 113-123.

11. SPIS RYCIN I TABEL

Ryciny:

Rycina	Opis
1	A. Prawidłowe unerwienie aferentne pęcherza moczowego. B. Aktywacja „wtórnego szlaku przewodzącego”.
2	A. Rozmieszczenie włókien aferentnych w obrębie pęcherza moczowego oraz drogi transdukcji urotelialnych, mechano-aferentnych sygnałów. B. Potencjalne neuromodulatory odpowiedzi aferentnej.
3	Lokalna, efektorowa czynność aferentnych włókien nerwowych typu C.
4	A. Agonista receptora TRPV1 – KAPSAICYNA. B. Struktura receptora waniloidowego (TRPV1).
5	Wielokanałowy zapis cystometryczny u pacjenta z idiopatycznym nadaktywnym pęcherzem moczowym.
6	Schemat aparatury do badania cystometrycznego u szczurów.
7	Stanowisko badawcze.
8	Protokoły eksperymentalne w poszczególnych grupach badawczych.
9	Parametry opisujące cykl mikcyjny.
10	Zapis cystometryczny: badanie kontrolne (Grupa I).
11	Zapis cystometryczny: model ostry nadaktywnego pęcherza moczowego (Grupa II).
12	Zapis cystometryczny: model przewlekły nadaktywnego pęcherza moczowego (Grupa III).
13	Podstawowe i dodatkowe parametry cystometryczne u osobników zdrowych (I), z ostrym (II) i przewlekłym (III) nadaktywnym pęcherzem moczowym.
14	Zapis cystometryczny: po dopęcherzowej instylacji 1mM roztworu kapsaicyny (Grupa VI).
15	Wybrane parametry cystometryczne u osobników zdrowych (I) oraz po dopęcherzowej instylacji lidokainy (VII).
16	Zapis cystometryczny: po dopęcherzowej instylacji 2% roztworu lidokainy (Grupa VII).
17	Wybrane parametry cystometryczne u osobników z przewlekłym pęcherzem nadaktywnym (III) oraz po dopęcherzowej instylacji kapsaicyny (IV) i lidokainy (V).
18	Zapis cystometryczny: model przewlekły nadaktywnego pęcherza moczowego po dopęcherzowej instylacji 1mM roztworu kapsaicyny (Grupa IV).
19	Zapis cystometryczny: model przewlekły nadaktywnego pęcherza moczowego po dopęcherzowej instylacji 2% roztworu lidokainy (Grupa V).
20	Obraz mikroskopowy ściany pęcherza moczowego – barwienie HE (1-3A) oraz obraz mikroskopowy ściany pęcherza moczowego z oceną aktywności komórek wykazujących metachromazję – barwienie błękitem toluidyny (1-3B) w osobnika zdrowego (1A, 1B), z pęcherzem nadaktywnym w modelu ostrym (2A, 2B) i przewlekłym (3A, 3B).

Tabele:

Tabela	Opis
1	Podstawowe i dodatkowe parametry cystometryczne osobników zdrowych oraz po ostrej i przewlekłej podaży cyklofosfamidu.
2	Podstawowe i dodatkowe parametry cystometryczne osobników zdrowych oraz po dopęcherzowej instylacji 1mM roztworu kapsaicyny i 2% roztworu lidokainy.
3	Podstawowe i dodatkowe parametry cystometryczne osobników z przewlekłym nadaktywnym pęcherzem moczowym bez i po dopęcherzowej instylacji 1mM roztworu kapsaicyny oraz 2% roztworu lidokainy.
4	Ocena stopnia nasilenia stanu zapalnego w obrębie ścian pęcherza moczowego osobników zdrowych oraz po ostrej i przewlekłej podaży cyklofosfamidu.