

Kinaza Rho – nowy cel dla leczenia farmakologicznego pęcherza nadreaktywnego

Rho kinase – a new target for pharmacological treatment of an overactive bladder

Wróbel Andrzej, Adamiak Aneta, Skorupski Paweł, Rechberger Tomasz

II Katedra i Klinika Ginekologii Akademii Medycznej w Lublinie

Streszczenie

Kinaza Rho odgrywa kluczową rolę w mechanizmie skurczu mięśni gładkich, w tym wypieracza pęcherza moczowego. Szlak metaboliczny kinazy Rho moduluje poziom fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny, głównie poprzez hamowanie fosfatazy miozyny.

Wyniki badań eksperymentalnych wskazują, że jej rola jest szczególnie wyraźna w stanach dysfunkcji pęcherza moczowego.

Wydaje się, że inhibitory kinazy Rho, takie jak Y27632, mogą okazać się efektywną grupą leków w farmakoterapii pęcherza nadreaktywnego, która będzie oddziaływać na fazę gromadzenia moczu, natomiast nie będzie interferować w funkcję pęcherza w warunkach fizjologicznych.

Słowa kluczowe: **kinaza Rho / pęcherz nadreaktywny / leczenie farmakologiczne /**

Abstract

Rho kinase plays a key role in the regulation of smooth muscles contraction, including those of the urinary bladder detrusor. Rho kinase pathway modulates the level of phosphorylation of the myosin light chain, mainly through the inhibition of myosin phosphatase.

Recent experimental data indicate that its role might be exacerbated in local and systemic pathological conditions which affect the bladder.

It seems that Rho kinase inhibitors, such as Y27632, may turn out to be an effective group of drugs in pharmacotherapy of an overactive bladder (OAB), which will influence the storage phase of the micturition cycle, without interfering with the physiological voiding.

Key words: **Rho kinase / overactive bladder / pharmacotherapy /**

Adres do korespondencji:

Andrzej Wróbel
II Katedra i Klinika Ginekologii Akademii Medycznej w Lublinie,
20-954 Lublin, ul. Jaczewskiego 8
e-mail: t.rechberger@am.lublin.pl
tel. 081 72 44 268

Otrzymano: 03.06.2007

Zaakceptowano do druku: 25.04.2008

Efektywność leczenia nadreaktywności pęcherza moczowego (OAB) zależy od precyzyjnej identyfikacji potencjalnych celów dla interwencji farmakologicznej [1, 2].

Większość z obecnie stosowanych leków w terapii OAB wydaje się działać obwodowo. Mogą być one sklasyfikowane jako leki, których główny mechanizm działania polega na redukcji kurczliwości wypieracza pęcherza moczowego oraz oddziaływaniu na nerwy czuciowe. Prowadzone są również prace nad wykorzystaniem mechanizmów ośrodkowych w farmakoterapii OAB [3].

Lekami pierwszego rzutu są antagoniści receptorów muskarynowych. Ich zastosowanie kliniczne jest jednak ograniczone poprzez dobrze znane efekty uboczne, a także nie zawsze satysfakcjonujący efekt kliniczny, co jest przyczyną zaprzestania terapii u znacznej grupy pacjentek [4].

Ograniczenia zastosowania obecnie wykorzystywanych leków są impulsem do poszukiwania nowych kierunków leczenia farmakologicznego tego schorzenia oraz do zgłębiania wiedzy dotyczącej podstaw fizjologicznych oraz dysfunkcji dolnych dróg moczowych. Jedną z nowych opcji farmakologicznego leczenia nadreaktywności pęcherza moczowego wydają się być kinazy Rho.

Kinazy Rho (ROCKs) są kinazami seryny/treoniny o masie około 160kDa. Biorą one udział w wielu funkcjach komórki, m.in. w regulacji kurczliwości mięśni gładkich, apoptozie komórki, przepuszczalności endotelium, adhezji i agregacji leukocytów, czy modulacji proliferacji komórek nowotworowych [5]. Dotychczas zidentyfikowano dwie izoformy ROCK: ROCK-I (znana także jako ROK β lub p160ROCK) i ROCK-II (ROK α lub kinaza Rho). ROCK-I i ROCK-II, a także i ich aktywator – RhoA, występują w wielu tkankach, w tym w pęcherzu moczowym, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka [6].

Kinazy Rho składają się z N-końcowej domeny katalitycznej, spiralnej domeny centralnej, która zawiera domenę łączącą oraz domeny C-końcowej, która jest przedzielona przez region bogaty w cysteinę.

Kluczową rolę w aktywacji wypieracza pęcherza moczowego odgrywa acetylocholina (ACh). (Rycina 1). Łączy się ona z receptorami muskarynowymi (M) związanymi z białkiem G, i oprócz uruchomienia napływu jonów Ca²⁺ z przestrzeni pozakomórkowej, aktywuje równocześnie kaskadę fosfatydyloinozytolu pośrednicząc w produkcji trifosforanu inozytolu (IP3), który indukuje uwalnianie Ca²⁺ z retikulum sarkoplazmatycznego. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca²⁺ nasila jego wiązanie z kalmoduliną. Kompleks Ca²⁺-kalmodulina aktywuje kinazę lekkich łańcuchów miozyny (MLC-K), która fosforyluje MLC. Ich fosforylacja pozwala na interakcję aktyny z miozyną i skurcz mięśni gładkich. Spadek wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca²⁺ inaktywuje MLC-K. Fosfataza miozyny natomiast defosforyluje MLC, co indukuje relaksację wypieracza pęcherza moczowego [3].

Związanie ACh z receptorem M prowadzi również do aktywacji GEF (*guanine-nucleotide-exchange factors*), co skutkuje powstaniem Rho-GTP czyli aktywatora kinazy Rho (RhoA). Ten aktywuje kinezę Rho, która z kolei fosforyluje fosfatazę miozyny, prowadząc do jej inaktywacji. Kinaza Rho fosforyluje także bezpośrednio MLC co, jak opisano powyżej, wywołuje skurcz wypieracza.

Receptory M stymulują fosfolipazę C (PLC) głównie poprzez białko Gaq prowadząc do mobilizacji Ca²⁺ i aktywacji kinazy białkowej C (PKC). Receptory te mogą również aktywować „małą” GTPazę Rho – głównie poprzez białko Ga12, lecz także Gaq i Gas stymulując RhoGEF, który katalizuje powstawanie GTP [7]. Hydroliza GTP i inaktywacja RhoA jest regulowana przez RhoGAP (*GTPase-activating protein*), podczas gdy RhoGDI (*guanine-nucleotide-dissociation inhibitor*) utrzymuje RhoA w nieaktywnym stanie związania z GDP. RhoA związane z GTP wchodzi w interakcję ze swoim głównym efektem – ROCK, który może modulować skurcz mięśni gładkich na drodze wielu mechanizmów [4].

Uważa się, że w komórkach mięśniowych gładkich w stanie relaksacji Rho jest obecne w cytozolu jako kompleksy Rho-GDP-GDI, a aktywacja w obecności GTP jest katalizowana przez Rho-GEF i prowadzi do translokacji RhoA do błony komórkowej. RhoA aktywuje enzym kinazę związaną z Rho. Jej aktywacja prowadzi do fosforylacji podjednostki łączącej MLC i skurczu komórki mięśniowej [5]. (Rycina 2).

Interakcja pomiędzy RhoA zależnym od GTP z domeną wiążącą ROCK prowadzi do uwolnienia kinaz z autoinhibitorowego, C-końcowego regionu. ROCKs mogą być również, niezależnie od Rho, aktywowane przez kwas arachidynowy na drodze, która jest również aktywowana przez bodźce komórkowe, m.in. receptory muskarynowe.

Na poziomie molekularnym wskazuje się na cztery efektor ROCKs: lekkie łańcuchy miozyny (MLC), fosfatazę MLC (MLCP), inhibitor fosfatazy CPI-17 i LIM-kinazę. Fosforylacja MLC aktywuje ATPazę miozyny i nasila kurczliwość komórki. Dlatego też stan fosforylacji MLC, który jest regulowany przez kinazę MLC, enzym zależny od Ca²⁺/kalmoduliny oraz MLCP – jest istotny dla tonusu mięśni gładkich. Istnieją dowody, że ROCKs bezpośrednio fosforylują MLC, lecz znaczenie fizjologiczne tego faktu nie zostało dotychczas określone. Zakłada się, że zasadniczy wpływ ROCKs na fosforylację MLC wynika z bezpośredniej inhibicji MLCP.

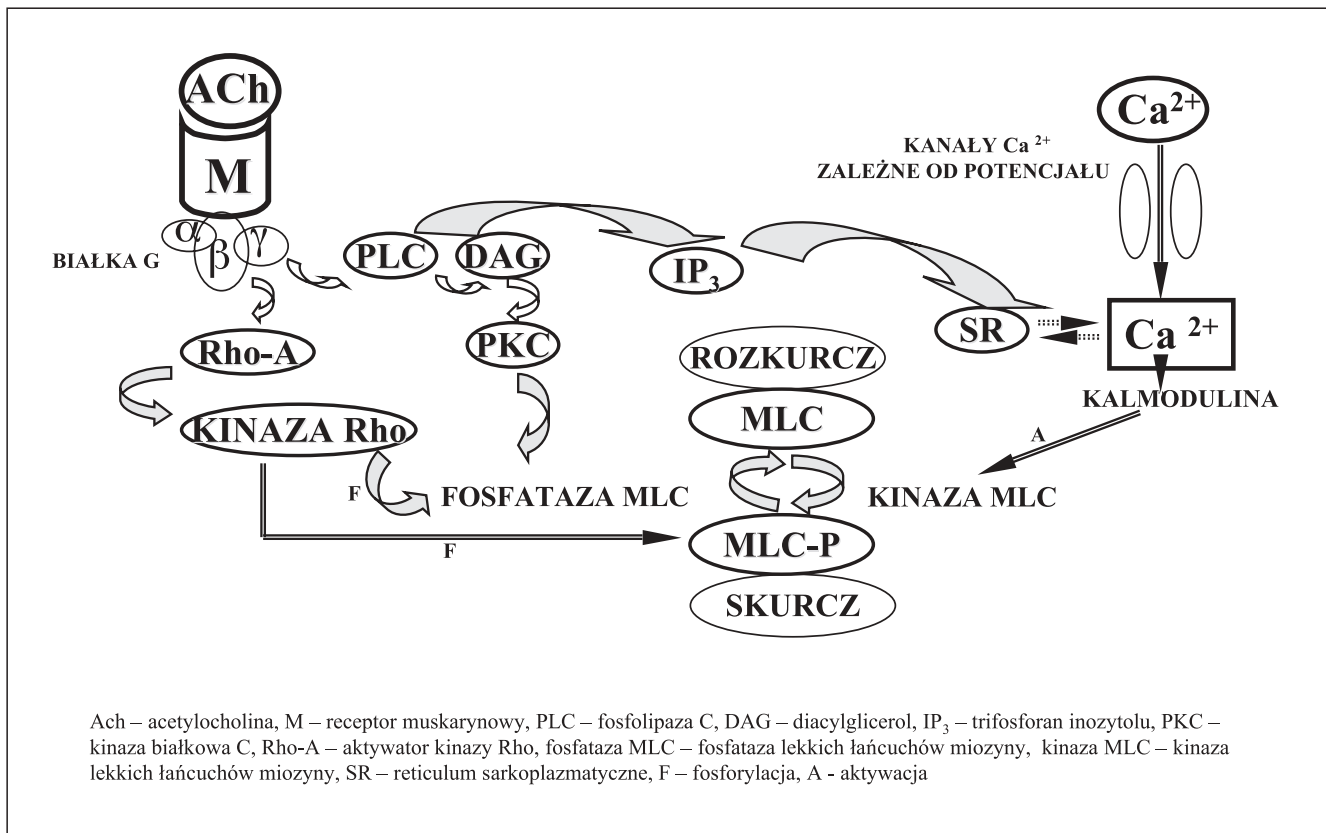
Ponadto ROCKs mogą hamować aktywność MLCP pośrednio, poprzez fosforylację, a więc aktywację CPI-17, który ulega również fosforylacji przez kinazę białkową C. ROCKs mogą także modulować cytoszkielet aktyny poprzez aktywację kinaz seryny/treoniny z rodziny LIM, która fosforyluje i inaktywuje kofilinę – czynnik depolimeryzujący aktynę, co prowadzi do nasilonej polimeryzacji aktyny. (Rycina 3).

ROCKs odgrywają istotną rolę w fizjologicznych skurczach pęcherza moczowego. Skurcz te są pośredniczone głównie przez receptory muskarynowe. Mimo, że dominującymi receptorami pod względem gęstości w ścianie pęcherza są receptory M2, odpowiedź skurczowa pęcherza na podanie agonistów receptorów M jest pośredniczona głównie, jeśli nie wyłącznie przez receptory M3.

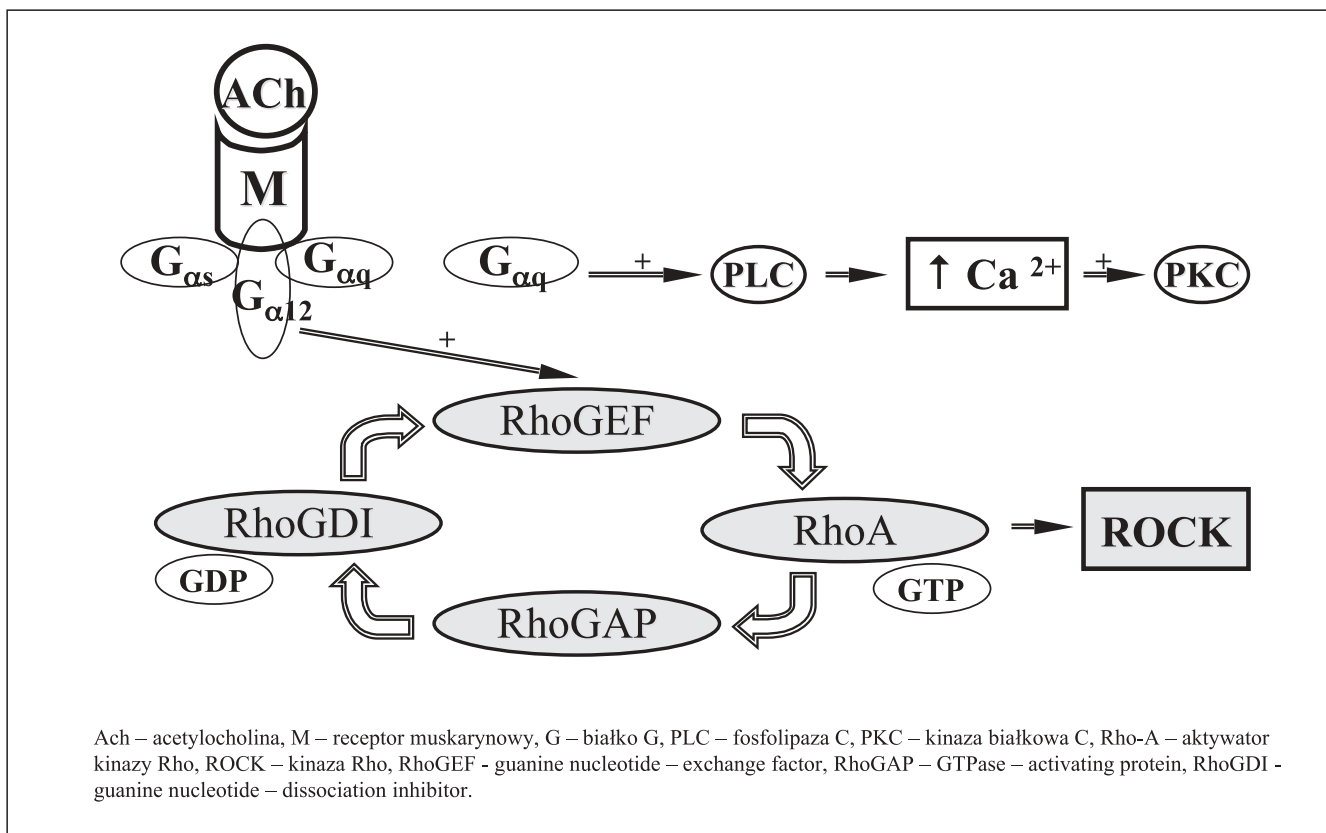
Chociaż wszystkie podtypy receptorów M mogą promować wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca²⁺, czynią to na drodze różnych mechanizmów, co odzwierciedla fakt, że receptory M1, M3 i M5 są związane głównie z Gq/11, podczas gdy M2 i M4 – głównie z Gi/o.

Wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego Ca²⁺ może wynikać z mobilizacji wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych oraz być wynikiem napływu wapnia z przestrzeni pozakomórkowej.

Kinaza Rho – nowy cel dla leczenia farmakologicznego pęcherza nadreaktywnego.

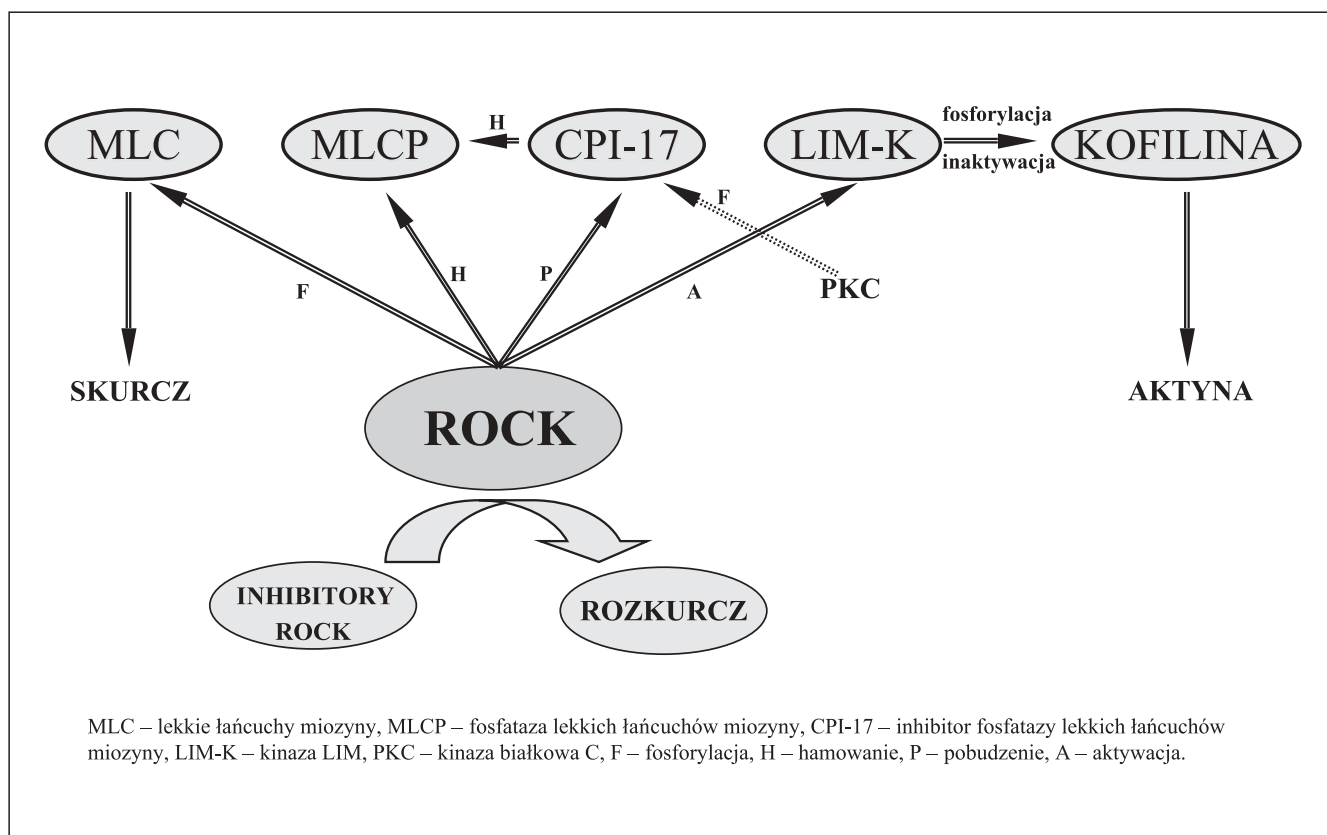


Rycina 1. Aktywacja wypieracza pęcherza moczowego.



Rycina 2. Szlak Kinazy Rho.

Wróbel A, et al.



Rycina 3. Efektory Kinazy Rho.

Podczas gdy funkcjonalna rola napływu wapnia z przestrzeni pozakomórkowej została udokumentowana poprzez hamowanie skurczy pęcherza przez blokery kanałów wapniowych, rola mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego jest nadal niejasna, jako że badania z wykorzystaniem inhibitorów fosfolipazy C doprowadziły do przeciwnych wyników [8]. Podobnie niejasna pozostaje rola PKC, innego mediatora receptorów M w generowaniu skurczy mięśni gładkich pęcherza. W większości doniesień nie wykazano jej wpływu na pośredniczone przez receptory M skurcze pęcherza. Jednakże PKC może być istotnym czynnikiem potencjalizującym wpływ ROCK [6].

Rola ROCK w kurczliwości pęcherza nie ogranicza się tylko do ich relacji z receptorami M. Wykazano ich wpływ również na receptory purynergiczne (P2X), receptory dla neurokinin (NK) i bradykinin (BK) [9].

Niektóre z opisanych mechanizmów ulegają istotnym zmianom w warunkach patologicznych, co sugeruje funkcjonalne zmiany aktywności ROCK.

Przeszkoda podpęcherzowa indukuje hipertrofię pęcherza i taką przebudowę jego ściany, aby dostarczyć siły niezbędnej do pokonania zwiększonego oporu i inicjacji mikcji. W części przypadków przeszkody podpęcherzowej hipertrofia pęcherza oraz towarzyszący remodeling ściany są wystarczające do utrzymania funkcji pęcherza zbliżonej do normalnej (kompensacja), podczas gdy w innych przypadkach dochodzi do dysfunkcji pęcherza tj. wzrostu częstości mikcji, zmniejszonej objętości mikcji i wzrostu objętości zalegającej (PVR) [10].

Dekompensacja wypieracza wywołuje zmiany w charakterystyce skurczy, co może wynikać ze zmienionej ekspresji receptorów M, składu izoform miozyny czy kaldesmonu – białka związanego z aktyną. Co więcej, ekspresja RhoA i ROCK jest zwiększona w hipertrofii pęcherza i towarzyszy jej zmniejszona aktywność fosfatazy miozyny. Może to tłumaczyć fakt przedłużonej depolaryzacji indukowanej podaniem KCl w stanach hipertrofii pęcherza [8]. W zgodzie z tymi danymi pozostają wyniki badań, w których wykazano nasilenie relaksacyjnego wpływu inhibitora ROCK - Y27632 w hipertrofii pęcherza. Y27632 osłabia wpływ karbacholu na odnerwiony, hipertroficzny pęcherz, nie wpływa natomiast na siłę działania karbacholu u zwierząt kontrolnych [11].

U zwierząt kontrolnych podanie KCl prowadzi do powstania fazowych skurczy, podczas gdy u zwierząt z przeszkodą podpęcherzową wypieracz wykazywał powolny wzrost długo utrzymującego się napięcia i powolną relaksację (zmiana charakterystyki skurczy). Inhibitory ROCK nasilały relaksację u zwierząt z hipertrofią, co było związane z nasileniem defosforylacji MLC. Wykazano podobną ekspresję kinazy MLC i ROK α , natomiast ekspresja ROK β była istotnie zwiększona u zwierząt z hipertrofią wypieracza [12]. Wyniki te wskazują, że szlak metaboliczny pośredniczony przez ROCK jest częściowo odpowiedzialny za długie utrzymywanie się wzmoczonego napięcia hipertroficznego wypieracza oraz jego powolną relaksację. Sensytyzacja Ca²⁺ pośredniczona przez kaskadę ROCK umożliwia skurcz pęcherza przy niskim poziomie Ca²⁺ - u zwierząt z dekompenacją wypieracza [13].

Kinaza Rho – nowy cel dla leczenia farmakologicznego pęcherza nadreaktywnego.

Badania kliniczne wykazały, że nadciśnienie tętnicze u pacjentów z łagodnym przerostem prostaty często współistnieje z nasileniem objawów ze strony układu moczowego. U szczurów z nadciśnieniem bardzo często obserwuje się objawy OAB – zmniejszoną objętość pęcherza, objętość mikcji i częste skurcze pęcherza [14]. Wykazano również zwiększoną aktywność ROCK w naczyniach krwionośnych i innych tkankach u wyżej wymienionych zwierząt. Wykazanie podobnego zachowania się kaskady kinazy Rho w pęcherzu mogłoby oznaczać, że zmiany ROCK przyczyniają się do częstszego występowania objawów nadreaktywności pęcherza u pacjentów z nadciśnieniem. Jednak jak dotąd nie zbadano ekspresji ROCK w pęcherzu moczowym. Jedynie badania immunohistochemiczne przeprowadzone u zwierząt z nadciśnieniem wykazały nasiloną ekspresję RhoA w mięśni wypieracza pęcherza moczowego [15]. Stwierdzono również, że dotętnicze podanie Y27632 normalizuje częstość mikcji i próg inicjacji mikcji, co potwierdzono badaniem urodynamicznym u szczurów z nadciśnieniem. Jest to zgodne z obserwacjami, w których stwierdzono, że inhibitory kinazy Rho obniżają ciśnienie krwi u zwierząt z nadciśnieniem, nieznacznie jedynie wpływając na ciśnienie u osobników z normotensją. Z drugiej strony, Y27632 hamuje skurcze pęcherza indukowane karbacholem zarówno u zwierząt z nadciśnieniem, jak i z normotensją [8].

Wydaje się więc, że zwiększona ekspresja kinazy Rho może odgrywać istotną rolę w OAB związanym z nadciśnieniem. Identyfikacja specyficznych dla pęcherza izoform kinazy Rho i ich selektywnych inhibitorów pozwoli rozdzielić wpływ hipotensyjny od wpływu na skurcze pęcherza [7].

Objawy dysfunkcji pęcherza występują często również u pacjentów z cukrzycą. Stwierdzono zwiększoną aktywność szlaku Rho w wielu tkankach u pacjentów z cukrzycą. U zwierząt z cukrzycą indukowaną alloxanem wykazano zwiększoną ekspresję w pęcherzu ROCK i CPI-17 na poziomie mRNA i białka, czemu towarzyszyła nasilona fosforylacja MLC. Y27632 okazał się hamować ten proces. Inhibitor ten hamował również skurcze pęcherza indukowane przy pomocy betanechołu. Wydaje się więc, że zmiany funkcji ROCK mogą przyczynić się do dysfunkcji pęcherza moczowego u pacjentów z cukrzycą [16].

Obecnie w badaniach eksperymentalnych wykorzystuje się dwa inhibitory ROCK: Y27632 oraz fasudil. Ich mechanizm działania polega na hamowaniu sensytyzacji Ca^{2+} oraz fosforylacji MLC [1].

Badania eksperymentalne wykazują, że inhibitory ROCK redukują agonistyczny wpływ karbacholu na receptory muskarynowe w pęcherzu moczowym. Obniżają także napięcie podstawowe przy braku stymulacji.

Zastosowanie inhibitora ROCK Y27632 podczas czynności skurczowej pęcherza nie wywołanej stymulacją receptorową, lecz depolaryzującym działaniem KCl, prowadziło do obniżenia napięcia podstawowego mięśnia wypieracza, natomiast okazało się nie wpływać na skurcze terminalne. Wzrostowi napięcia ściany pęcherza indukowanego przez jego rozciąganie, towarzyszy nasilona fosforylacja MLC. Wykazano, że wpływ hamujący inhibitora ROCK Y27632 na napięcie ściany pęcherza jest szczególnie widoczny podczas rozciągania pęcherza. Inhibitor ten zmniejsza również tonus wypieracza pęcherza moczowego.

Wydaje się, że wpływ ROCK na napięcie pęcherza moczowego jest uzależniony od tzw. sensytyzacji Ca^{2+} . Fosforylacja MLC jest prawdopodobnie nasilana raczej poprzez hamowanie MLCP, niż przez aktywację kinazy MLC. Dotychczas niewiele wiadomo na temat mechanizmów wiązania się ROCK z receptorami w pęcherzu moczowym. Sugeruje się, że w oddziaływaniu ROCK na skurcze pęcherza pośredniczą receptory M2. Sugestie te oparte są na wynikach badań, w których wykazano potencjalizację działania darifenacyny (selektywny antagonist receptorów M3) w obecności Y27632 (inhibitor ROCK), ale odkrycia te są trudne do pogodzenia z ogólnym przekonaniem, że za skurcze pęcherza moczowego odpowiadają głównie receptory M3.

Sensytyzacja Ca^{2+} to proces wiodący do skurczu mięśnia gładkiego, w którym nie są niezbędne zmiany stężenia Ca^{2+} . Wykazano, że ROCK fosforyluje (=inaktywuje) fosfatazę miozyny, co zapobiega defosforylacji MLC i prowadzi do sensytyzacji Ca^{2+} w komórkach mięśni gładkich.

Wykazano, że pęcherz moczowy zawiera obie izoformy kinazy Rho (ROCK I i ROCK II) oraz że jej inhibitory hamują skurcze mięśni gładkich pęcherza indukowane przez stymulację elektryczną, podanie betanechołu, karbacholu czy neurokininy A. Sugeruje to, że szlak kinazy Rho jest zaangażowany w proces pobudzenia i skurczu związanego z receptorami M i tachykininowymi NK1 [9]. Co ciekawe inhibitory kinazy Rho hamują zarówno napięcie spoczynkowe, jak i reakcję pęcherza na podanie agonistów receptorów P2X [17]. Może to odzwierciedlać wpływ inhibitorów na inne procesy w komórce lub oznaczać, że napięcie spoczynkowe pęcherza oraz reakcja na aktywację receptorów P2X w pęcherzu są zależne od aktywności kinazy Rho. Wykazano również, że antagoniści receptorów P2X3 działają synergistycznie w stosunku do inhibitorów kinazy Rho [18].

Wnioski

Reasumując, dostępne wyniki badań wskazują, że hamowanie ROCK osłabia skurcze wypieracza *in vitro* w warunkach fizjologicznych i w przypadkach dysfunkcji pęcherza. Dla kontrastu inhibitor ROCK Y27632 nie działa *in vivo* na czynność pęcherza u zwierząt kontrolnych, ale przywraca prawidłową funkcję wypieracza u zwierząt z nadreaktywnością pęcherza, co uwypukla rolę ROCK w stanach dysfunkcji pęcherza moczowego. Dlatego też wydaje się, że w farmakoterapii OAB inhibitory ROCK mogą okazać się efektywną grupą leków, która będzie wpływać na fazę gromadzenia moczu, natomiast nie będzie oddziaływać na proces mikcji w warunkach fizjologicznych. Potencjalną korzyścią tego faktu mogłoby być to, że inhibitory ROCK przeciwdziałałyby nie tylko fazowym skurczom wypieracza pośredniczonym przez receptory muskarynowe, lecz również indukowanym przez inne bodźce. Bez odpowiedzi pozostaje dotychczas pytanie, czy związki te nie będą cechować się podobnymi efektami niepożądanymi jak antagoniści receptorów muskarynowych.

Wróbel A, et al.

Piśmiennictwo

1. Nowara A, Witek A, Wilk K. Diagnostic and treatment of overactive bladder. *Ginekol Pol.* 2007, 78, 549-553.
2. Nowara A, Witek A, Wilk K. Overactive bladder - definition, epidemiology, pathogenesis. *Ginekol Pol.* 2007, 78, 484-487.
3. Andersson K, Wein A. Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. *Pharmacol Rev.* 2004, 56, 581-631.
4. Eglen R, Hegde S, Watson N. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol Rev.* 1996, 48, 531-565.
5. Andersson K, Arner A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2004, 84, 935-986.
6. Chang S, Hypolite J, DiSanto M, [et al.]. Increased basal phosphorylation of detrusor smooth muscle myosin in alloxan - induced diabetic rabbit is mediated by upregulation of Rho - kinase beta and CPI-17. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006, 290, 650-656.
7. Caulfield M, Birdsall N. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* 1998, 50, 279-290.
8. Bing W, Chang S, Hypolite J, [et al.]. Obstruction - induced changes in urinary bladder smooth muscle contractility: a role for Rho kinase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003, 285, 990-997.
9. Su X, Changolkar A, Chacko S, [et al.]. Diabetes decreases rabbit bladder smooth muscle contraction while increasing levels of myosin light chain phosphorylation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004, 287, 690-699.
10. Andersson K. LUTS treatment: future treatment options. *Neurol Urodyn.* 2007, 26, 934-947.
11. Peters S, Schmidt M, Michel M. Rho kinase: a target for treating urinary bladder dysfunction? *Trends Pharmacol Sci.* 2006, 27, 492-497.
12. Samogyi G, de Groat W. Function, signal transduction mechanisms and plasticity of presynaptic muscarinic receptors in the urinary bladder. *Life Sci.* 1999, 64, 411-418.
13. Rajasekaran M, Wilkes N, Kuntz S, [et al.]. Rho-kinase inhibition suppresses bladder hyperactivity in spontaneously hypertensive rats. *Neurol Urodyn.* 2005, 24, 295-300.
14. Riento K, Ridley A. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003, 4, 446-456.
15. Somlyo A, Somlyo A. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol.* 2000, 522, 177-185.
16. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci.* 2001, 22, 32-39.
17. Ishizaki T, Vehata M, Tamechika J, [et al.]. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of Rho-associated kinases. *Mol Pharmacol.* 2000, 57, 976-983.
18. Zhao D, Kuhnt-Moore S, Zeng H, [et al.]. Substance P - stimulated interleukin - 8 expression in human colonic epithelial cells involves Rho family small GTPases. *Biochem J.* 2002, 368, 665-672.
19. Rapp D, Lyon M, Bales G, [et al.]. A role for the P2X receptor in urinary tract physiology and in the pathophysiology of urinary dysfunction. *Eur Urol.* 2005, 48, 303-308.
20. Wibberley A, Chen Z, Hu E, [et al.]. Expression and functional role of Rho - kinase in rat urinary bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 2003, 138, 757-766.