

ВЛИЯНИЕ СООТНОШЕНИЯ МЕТАБОТРОПНОГО И ИОНОТРОПНОГО КОМПОНЕНТОВ ПАРАСИМПАТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НА ВОЗБУДИМОСТЬ ГЛАДКОМЫШЕЧНОЙ КЛЕТКИ ДЕТРУЗОРА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ: МОДЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Поступила 28.06.14

На компьютерной модели гладкомышечной клетки (ГМК) детрузора мочевого пузыря (ДМП) с соответствующим набором ионных каналов и внутриклеточных сигнальных механизмов исследовали влияния ионотропного пуринового (Р-) и метаботропного мускаринового (М-) компонентов парасимпатического стимула на мембранный потенциал клетки и концентрацию Ca^{2+} в ней ($[Ca^{2+}]_i$). Р- и М-компоненты стимула имитировались соответственно увеличением проводимости P2X-рецепторных каналов мембраны ГМК (G_{P2X}) и проницаемости кальциевых каналов саркоплазматического ретикулума, активируемых инозитолтрифосфатом (P_{IP3}); учитывалось, что IP3 является конечным звеном метаботропной цепи, идущей от M3-холинорецепторов. Величины G_{P2X} и P_{IP3} , латентные периоды (ЛП) их активации и соотношения этих параметров были подобраны так, чтобы приложении одиночного стимула вызывало в ГМК ответ с Р- и М-компонентами, близкими к таковым у прототипа. Величина и ЛП М-компонента концентрационного ответа (кальциевого транзientа) в норме были значительно больше, чем аналогичные параметры Р-компонента; М-компонент сопровождался генерацией потенциала действия (ПД) с характерными для прототипа следовыми процессами. Уменьшение P_{IP3} , имитировавшее дефицит M3-рецепторов в ряде патологических состояний, приводило к уменьшению электрического и концентрационного ответов ГМК вплоть до прекращения генерации ПД и изменений $[Ca^{2+}]_i$. В таком состоянии значительное увеличение G_{P2X} могло обеспечивать увеличение $[Ca^{2+}]_i$ до значений, близких к нормальным. Использование парной парасимпатической стимуляции с разными межстимульными интервалами ΔT позволяло получать ситуации, когда М-ответу на действие первого стимула (M1) предшествовал Р-ответ на предъявление второго стимула (P2) с коротким варьируемым интервалом. Применение такой стимуляции при определенных значениях ΔT и проводимости пуриnergических каналов G_{P2X} позволяло компенсировать ослабление М-компонента за счет его взаимодействия с Р-компонентом, вызванным нанесением второго стимула. Таким образом, в клинической практике патологическое ослабление М-компонента эффекта парасимпатической стимуляции может быть компенсировано (по крайней мере частично) путем применения пуриномиметиков и использования парных раздражений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: математическая модель, гладкомышечная клетка (ГМК), детрузор мочевого пузыря (ДМП), парасимпатическая стимуляция, пуринорецепторы, мускариновые холинорецепторы, внутриклеточный кальций.

¹ Днепропетровское отделение Международного центра молекулярной физиологии НАН Украины (Украина).

² Государственное учреждение «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины» (Украина).

Эл. почта: kochenov_artem@yahoo.com (А. В. Коченов);
dnipro@biph.kiev.ua (С. М. Корогод).

ВВЕДЕНИЕ

Опорожнение мочевого пузыря (МП) обеспечивается сокращением гладкомышечных клеток (ГМК) его детрузора (ДМП) в результате поступления импульсации по парасимпатическим нервным волокнам. Возбуждение и сокращение ГМК ДМП связано с повышением концентрации цитозольного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), что обеспечивается коактивацией мембранных ионотропных P2X-пуринорецепторов и метаболитных мускариновых M2/M3-холинорецепторов под действием выделяемых парасимпатическими эфферентами АТФ и ацетилхолина соответственно [1]. Согласно существующим представлениям, пуриновый (P-) путь – это открывание P2X-рецепторных каналов деполяризующего тока, генерация возбуждающего потенциала нервно-мышечного соединения (excitatory junction potential) и активация кальциевого тока L-типа, переносящего Ca^{2+} из внешней среды [2, 3]. Мускариновый же путь (M-путь) – это цепь биохимических реакций, конечным продуктом которых является инозитол-3-фосфат (IP3). Действие последнего ведет к открыванию IP3-чувствительных каналов саркоплазматического ретикулума (СР), в результате чего Ca^{2+} высвобождается из депо и выходит в цитозоль. Повышение $[Ca^{2+}]_i$ обеспечивает инициацию сокращения ГМК и, параллельно, активацию кальцийзависимых каналов хлорного тока, что усиливает деполяризацию клеточной мембраны [4].

Интенсивные исследования упомянутых процессов пока не дали исчерпывающего ответа на вопрос об относительных вкладах M- и P-путей в сокращение ГМК ДМП [5, 6]. Подобная ситуация обусловлена тем, что одновременная регистрация механического, электрического и концентрационного ответов ГМК в натурном эксперименте практически невозможна из-за очевидных методических ограничений. Кроме того, опыты, направленные на разрешение упомянутого вопроса, ставились на животных разных видов [7], различного возраста [8] и с отсутствием или наличием патологий [9, 10]. Известно, что M-компонент сократительного ответа ГМК ДМП (далее M-ответ) на действие одиночного парасимпатического стимула характеризуется приблизительно на порядок большими латентным периодом (ЛП) и величиной, чем соответствующие параметры P-компонента (далее P-ответа) [5, 6, 11]. Относительный вклад P-компонента (3–5 % в норме) несколько увеличивается с возрастом [1, 12]; при наличии патологии (напри-

мер, при интерстициальном цистите, обструкции и нейропатии МП) он может достигать 40 % [1, 13]. Одной из причин меньшего, чем в норме, преобладания M-компонента может быть дефицит M2/M3-рецепторов. Подобный дефицит наблюдается при врождённых пороках развития у детей (атрезии прямой кишки и экстрофии МП–тотальной эписпадии) [14, 15]. Причинами нарушений соотношения P- и M-компонентов могут быть недостаточная продукция ацетилхолина или, наоборот, чрезмерная продукция АТФ (что наблюдается в случае воспаления МП [16]). Возможной причиной представляется также увеличение экспрессии пуринорецепторов, однако данные о подобной молекулярной патологии ДМП отсутствуют.

Очевидно, что упомянутые выше ограничения, с которыми встречаются натурные эксперименты, могут быть в существенной степени преодолены в вычислительных экспериментах на моделях ГМК ДМП. С использованием такого подхода становятся возможными варьирование в широких пределах интенсивностей и временных характеристик ионотропного и метаболитного действия и сравнение развивающихся одновременно электрических и концентрационных процессов в ГМК.

В настоящей работе на модели ГМК ДМП [17] мы исследовали особенности электрических и концентрационных событий, инициируемых в этих клетках действием парасимпатических стимулов с разными соотношениями M- и P-компонентов. Данные компоненты представлены соответственно величиной проводимости P2X-рецепторных каналов сарколеммы и уровнем проницаемости IP3-чувствительных каналов СР. При этом в центре внимания были условия, способствующие синергии ионотропного и метаболитного компонентов парасимпатического действия. Подобный аспект представляется особо важным для выяснения возможных путей компенсации сократительной функции ГМК в случае молекулярной патологии рецепторов нервно-мышечного соединения.

ОПИСАНИЕ МОДЕЛИ

Исследования были выполнены на разработанной нами в программной среде «NEURON» и подробно описанной ранее модели ГМК ДМП [17, 18]. M- и P-компоненты парасимпатического стимула представлялись параметрическими воздействиями на модель – увеличением удельных величин, со-

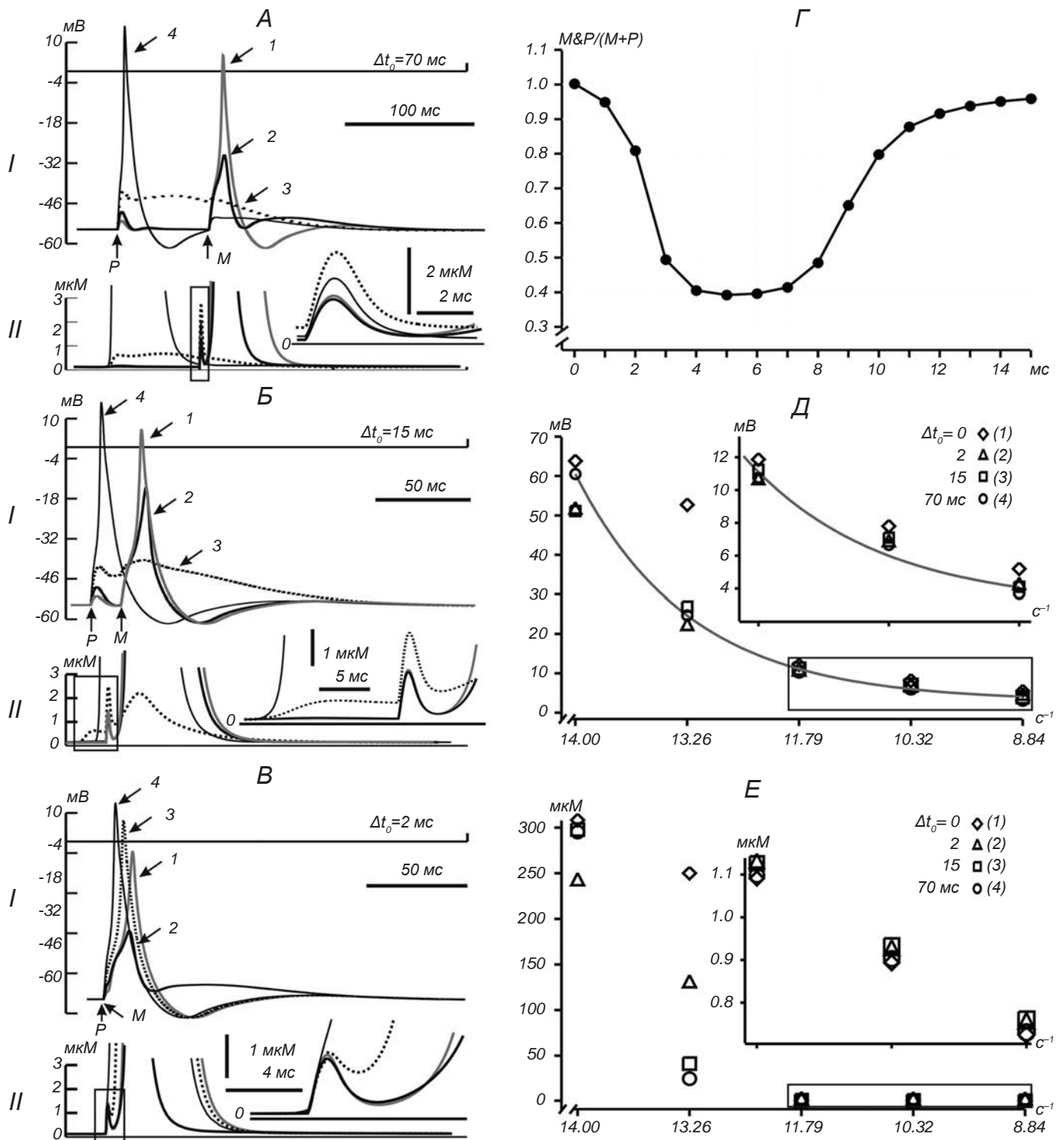
ответственно, проницаемости IP3-чувствительных каналов CP (P_{IP3} , c^{-1}), отнесенной к единице длины клетки, и максимальной проводимости P2X-рецепторных каналов (G_{P2X} , $мкСм/см^2$) [17]. Размерность величины P_{IP3} (c^{-1}), которая эквивалентна константе скорости освобождения Ca^{2+} из CP, следует из уравнения измеряемой в моль/см²·с плотности молярного потока вещества $\Phi_{IP3} = -P_{IP3}^* \cdot \Delta c$, где P_{IP3}^* (см/с) – проницаемость IP3-чувствительных каналов единицы поверхности CP, $\Delta c = ([Ca^{2+}]_{депо} - [Ca^{2+}]_i)$ – разность концентраций Ca^{2+} в CP и цитозоле ($M = \text{моль/см}^3$) и уравнением, описывающим вклад в изменение $d[Ca^{2+}]_i/dt$ (M/с) со стороны полного потока Ca^{2+} , J_{IP3} (моль/с) через поверхность CP площадью S (см²) в цитозоль объемом V (см³), т.е. $d[Ca^{2+}]_i/dt = J_{IP3} = \Phi_{IP3} \cdot (S/V) = P_{IP3}^* \cdot (S/V) \cdot \Delta c$ так что удельная величина $P_{IP3} = P_{IP3}^* \cdot (S/V)$ с точностью до постоянного геометрического множителя S/V (см⁻¹) равна физической проницаемости P_{IP3}^* (см/с) и измеряется в c^{-1} (см·с⁻¹·см⁻¹). Изменения G_{P2X} и P_{IP3} имели вид асимметричных колоколообразных импульсов, которые описывались так называемой альфа-функцией [18] с параметрами t_0 и t_s , определяющими, соответственно, момент начала и временной ход нарастания и спада импульса. При одинаковых значениях $t_s = t_{sp2X} = t_{sip3} = 0.8$ мс импульс достигал максимума через 0.8 мс и длился около 8 мс. Задержка М-компонента относительно Р-компонента определялась разностью их ЛП $\Delta t_0 = t_{0P2X} - t_{0IP3}$. Исходное значение этой задержки устанавливали равным 70 мс (соответственно данным литературы [4, 5, 10]).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ответы ГМК на действие одиночного парасимпатического стимула при разных амплитудно-временных соотношениях М- и Р-компонентов. Действие одиночного парасимпатического стимула с разделенными интервалом Δt_0 Р- и М-компонентами, G_{P2X} и P_{IP3} (далее Р- и М-стимулы) вызывало в ГМК сопряженные электрический и концентрационный ответы, каждый из которых имел соответственно Р- и М-компоненты (далее Р- и М-ответы) (рис. 1). Ответ, вызванный предъявлением стимула с параметрами $G_{P2X} = 76.6$ $мкСм/см^2$, $P_{IP3} = 14$ c^{-1} и $\Delta t_0 = 70$ мс (А), был принят в качестве эталонного для последующих сравнительных исследований.

При указанном выборе параметров стимула результирующий ответ модельной ГМК отображал описанные в литературе существенные особенности прототипа – значительно большие ЛП М-ответа и величину связанного с ним кальциевого транзистента (основного фактора, определяющего сокращение ГМК) по сравнению с аналогичными параметрами Р-ответа. Если величины G_{P2X} и P_{IP3} были неизменными, М-ответ зависел от фазы Р-ответа, на которую он приходился, а значит и от задержки Δt_0 – легко варьируемого параметра модели.

При указанных выше исходных параметрах стимула М-ответ развивался после окончания Р-ответа (рис. 1, А, серая кривая) и потому не испытывал влияния последнего. Р- и М-компоненты электрического ответа включали в себя начальные деполяризационные пики длительностью 10.65 и 29.0 мс (время достижения максимумов приблизительно 3.0 и 11.65 мс) соответственно. В данном случае М-пик был фактически потенциалом действия (ПД) амплитудой 60.6 мВ. Р- и М-пики сопровождалась следовыми гиперполяризацией (длительность 8.32 и 50.4 мс) и деполяризацией (18.68 и 93.02 мс). Вызванные действием того же стимула концентрационные Р- и М-ответы (А, внизу, серая кривая) общей длительностью приблизительно 67 и 1500 мс соответственно также имели вид пиков с быстрым нарастанием и медленным спадом $[Ca^{2+}]_i$ к базальному уровню, причем М-пик (295 $мкМ$) многократно (на порядки) превышал Р-пик (0.138 $мкМ$). Если задержку Δt_0 уменьшали до 15, 5 и 2 мс, то М-стимул приходился соответственно, на фазу следовой гиперполяризации (Б), нисходящую фазу и вершину (В) деполяризационного пика Р-ответа. В данном случае электрические М- и Р-ответы суммировались нелинейно: максимальное значение результирующего ответа (М&Р) было меньше алгебраической суммы максимальных значений этих компонентов, наблюдавшихся при их полном разделении, т. е. $(M\&P)/(M + P) < 1$ (Г). Если упомянутые выше проводимость и задержка оставались прежними ($G_{P2X} = 76.6$ $мкСм/см^2$ и $\Delta t_0 = 70$ мс), уменьшение проницаемости P_{IP3} на 5, 15, 25 и 35 % (до 13.26, 11.792, 10.318 и 8.844 c^{-1}), моделирующее частичный дефицит М-холинорецепторов, приводило к резкому снижению пиковых значений электрического и концентрационного М-ответов (Д, Е). Зависимость пика электрического М-ответа от величины P_{IP3} (Д, серая линия) хорошо аппроксимировалась двойной экспоненциальной функцией:



Р и с. 1. Электрические и концентрационные ответы модельной гладкомышечной клетки (ГМК) на приложение одиночных парасимпатических стимулов при разных значениях интенсивностей Р- и М-компонентов и временной задержки (Δt_0) между ними. А–В – изменения мембранного потенциала (мВ) – I и кальциевые транзисты (изменения $[Ca^{2+}]_i$, мкМ – II), которые вызваны приложением стимулов с Р- и М-компонентами (указаны стрелками), разделенными задержкой $\Delta t_0 = 70$ (А), 15 (Б) или 2 (В) мс, для четырех комбинаций интенсивности: $G_{P2X} = 76.6$ мкС/см² и $P_{IP3} = 14$ с⁻¹ (1), $G_{P2X} = 153.2$ мкС/см² и $P_{IP3} = 13.26$ с⁻¹ (2), $G_{P2X} =$ (продолжение на стр. 7)

(Рис. 1)

= 306.4 мкС/см² и $P_{IP3} = 11.792 \text{ с}^{-1}$ (3), $G_{P2X} = 459.6 \text{ мкС/см}^2$ и $P_{IP3} = 10.318 \text{ с}^{-1}$ (4). G – зависимость амплитуды результирующего ответа ГМК (М&Р), нормированной по отношению к сумме амплитуд изолированных М- и Р-компонентов (М+Р), от интервала между этими компонентами (мс). D и E – зависимости соответственно М&Р и $[Ca^{2+}]_i$ от проницаемости IP3-каналов (P_{IP3} , с⁻¹) при фиксированной проводимости пуриновых каналов $G_{P2X} = 76.6 \text{ мкС/см}^2$ и разных задержках Δt_0 (мс, указаны соответствующими маркерами на вставках). Сплошная линия на D – приближающая функция, вычисленная при $\Delta t_0 = 70$ мс. Ограниченные прямоугольниками участки графиков $[Ca^{2+}]_i$ на A , $II-B$, II представлены в увеличенном масштабе на вставках справа, аналогичные участки графиков на D и E – справа вверху.

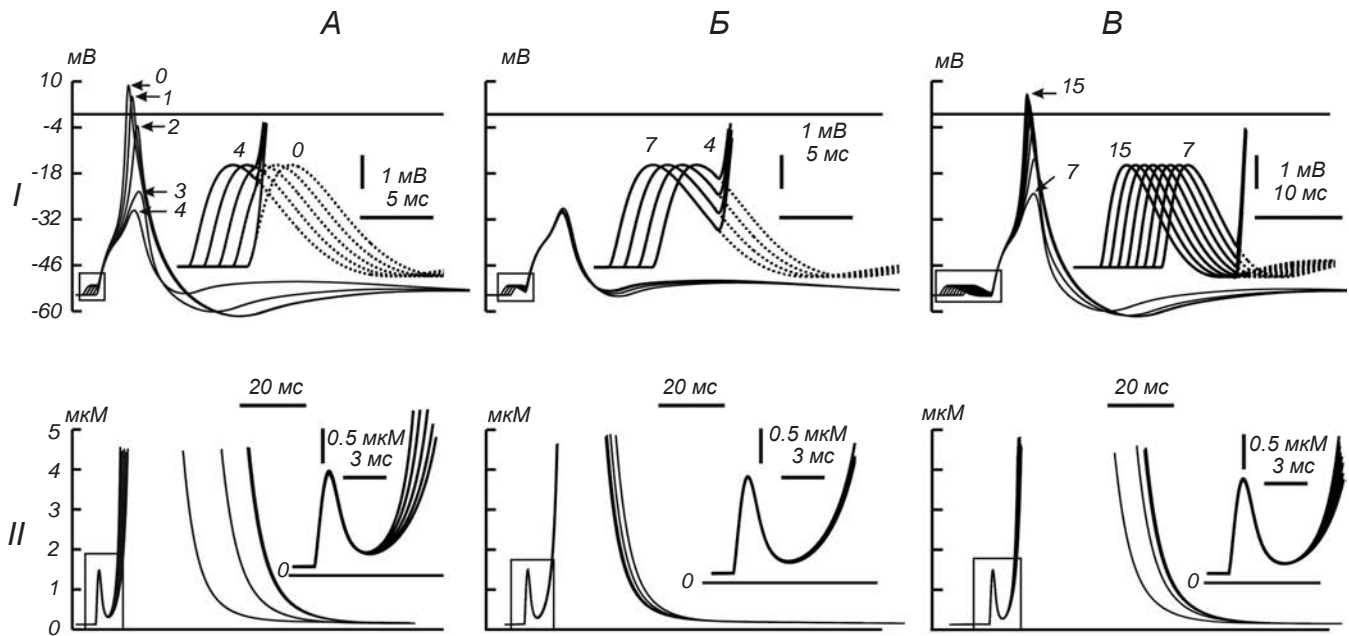
Рис. 1. Электричні та концентраційні відповіді модельної гладенької язової клітини на прикладання поодиноких парасимпатичних стимулів при різних значеннях інтенсивностей Р- і М-компонентів і часової затримки (Δt_0) між ними.

$f(P_{IP3}) = 2.5 + 102.36 \cdot \exp(-0.95418 \cdot P_{IP3}) - 44.412 \cdot \exp(-0.95418 \cdot P_{IP3})$ со среднеквадратическим отклонением $s = 0.00019$.

Особый интерес для нас представляло выяснение возможностей восстановления величины кальциевого транзientа, ослабленного вследствие снижения эффективности М-стимула. В последующих вычислительных экспериментах рассматривали такую возможность, вводя усиление ионотропного действия, т. е. увеличивая Р-стимул (G_{P2X}). Такое увеличение имитировало эффект использования пуриномиметиков или компенсационное увеличение количества пуринорецепторов при фиксированной задержке Δt_0 (70 мс). В случае 5 %-ного ослабления М-стимула ($P_{IP3} = 13.26 \text{ с}^{-1}$) двукратное увеличение G_{P2X} (до 153.2 мкСм/см²) не приводило к заметному восстановлению кальциевого транзientа (пиковое значение $[Ca^{2+}]_i$ не превышало 31.765 мкМ), поскольку при упомянутой задержке $\Delta t_0 = 70$ мс Р-ответ полностью заканчивался перед началом М-ответа (рис. 1, A , 2). При 15 %-ном ослаблении P_{IP3} четырёхкратное увеличение G_{P2X} (до 306.4 мкСм/см²) вызывало продолжительную (>150 мс) деполяризацию (A , 3), сопровождавшуюся повышением пиковой $[Ca^{2+}]_i$ с 0.124 до 0.698 мкМ. Эта деполяризация хотя и обеспечивала активацию каналов входящего кальциевого тока, все же не достигала уровня ПД. К моменту начала М-ответа кальциевые каналы L-типа были инактивированы на ~51 % (в основном за счет кальцийзависимой инактивации), а потенциалзависимая инактивация кальциевых каналов Т-типа составляла всего ~5.5 %, так что увеличение $[Ca^{2+}]_i$ (с максимумом 2.75 мкМ), активирующее деполяризационный ток через кальцийзависимые хлорные каналы, происходило в основном за счёт высвобождения Ca^{2+} из депо СР. Воздействие шестикратно увеличенного Р-стимула ($G_{P2X} = 459.6 \text{ мкСм/см}^2$) уже само по себе вызывало ПД амплитудой 70 мВ. В данном случае и электрическая, и концентраци-

онная составляющие ослабленного М-ответа, приходившегося на окончание следовой гиперполяризации Р-ответа, существенно не изменялись (A , 4).

При задержке Δt_0 , уменьшенной до 15 мс, воздействие парасимпатического стимула с компонентами $P_{IP3} = 14 \text{ с}^{-1}$ и $G_{P2X} = 76.6 \text{ мкСм/см}^2$ вызывало М-ответ, который приходился на фазу следовой гиперполяризации Р-ответа. В этом случае пиковые сдвиги мембранного потенциала и $[Ca^{2+}]_i$ были практически такими же, как и в условиях исходной $\Delta t_0 = 70$ мс (рис. 1, B , 1). Разницы составляли менее 1 мВ для электрического и около 2.5 мкМ для концентрационного компонентов результирующего ответа. Разделенные упомянутой выше задержкой $\Delta t_0 = 15$ мс Р-стимул, увеличенный до $G_{P2X} = 153.2 \text{ мкСм/см}^2$, и М-стимул, уменьшенный до $P_{IP3} = 13.26 \text{ с}^{-1}$, обуславливали результирующий ответ (B , 2) с гораздо более высокими пиковыми значениями как деполяризации мембраны (40.81 мВ), так и $[Ca^{2+}]_i$ (146 мкМ). Это соответствует частичной компенсации эффекта ослабления М-стимула. При $P_{IP3} = 11.792 \text{ с}^{-1}$ и $G_{P2X} = 306.4 \text{ мкСм/см}^2$ результирующий электрический ответ ГМК имел несколько большую, чем при $\Delta t_0 = 70$ мс, амплитуду (на ~2.05 мВ). В то же время пиковое значение концентрационного ответа уменьшалось до 2.48 мкМ (B , 3). К моменту начала М-ответа инактивация кальциевых каналов L- и Т-типов составляла соответственно 16.7 и 3.5 %, причем у каналов L-типа доминировала кальцийзависимая составляющая. В этих условиях ГМК не генерировала ПД, поскольку деполяризационные токи (неспецифический катионный ток через P2X-каналы, токи через потенциалзависимые кальциевые каналы, кальцийзависимый хлорный ток) были меньше гиперполяризационных токов, текущих в основном через потенциалзависимые калиевые каналы. Генерация ПД становилась, однако, возможной при существенном увеличении Р-стимула ($G_{P2X} = 459.6 \text{ мкСм/см}^2$), даже если интенсивность М-стимула была еще меньшей ($P_{IP3} =$



Р и с. 2. Изменения мембранного потенциала гладкомышечной клетки и $[Ca^{2+}]_i$ в зависимости от временной задержки (Δt_0) между Р- и М-компонентами парасимпатического стимула. А–В – записи изменений мембранного потенциала (I, мВ) и транзиевтов $[Ca^{2+}]_i$ (II, мкМ) при разных величинах интервала между Р- и М-компонентами: 0–4 (А), 4–7 (Б) и 8–15 (В) мс. Ограниченные прямоугольниками фрагменты записей представлены в увеличенном масштабе на вставках справа; над вставками на фрагментах I указаны значения упомянутых выше интервалов (мс).

Р и с. 2. Зміни мембранного потенціалу гладком'язової клітини та $[Ca^{2+}]_i$ залежно від часової затримки (Δt_0) між Р- і М-компонентами парасимпатичного стимулу.

= 10.318 s^{-1}) (Б, 4). Этот ПД амплитудой 70.64 мВ, который сопровождался кальциевым транзиевтом, достигающим 330 мкМ, фактически соответствовал регенеративному ответу на действие Р-стимула; М-стимул же был ослаблен настолько, что не оказывал заметного влияния на мембранный потенциал и $[Ca^{2+}]_i$.

Воздействие Р- и М-стимулов, наносимых при тех же, что и ранее, комбинациях интенсивности (рис. 1, А, Б, 1–4), но с минимальным интервалом ($\Delta t_0 = 2$ мс), вызывало результирующие ответы, имевшие и общие черты, и определенные особенности. Общим феноменом было прогрессивное уменьшение электрического и концентрационного ответов по сравнению с реакциями, наблюдаемыми в условиях $\Delta t_0 = 15$ и 70 мс и комбинаций интенсивностей 1, 2 и 4. В случае же комбинации 3 ($P_{IP3} = 11.792 s^{-1}$ и $G_{P2X} = 306.4 \mu C m / cm^2$) отмечались противоположные изменения – значительное увеличение как электрического (до 62.38 мВ), так и концентрационного (до 306 мкМ) ответов (3) по

сравнению с тем, что наблюдалось при больших задержках. Данная особенность связана с тем, что более ранняя активация тока через кальцийзависимые хлорные каналы, обусловленная высвобождением Ca^{2+} из депо, усиливает деполяризацию, генерируемую натриевым током. Это в свою очередь усиливает активацию потенциалзависимых кальциевых каналов и приводит к генерации ПД.

В целом в условиях Δt_0 от 0 до ~4 мс М-ответ приходился на фазу нарастания деполяризации, вызванной действием Р-стимула, причем чем большей была данная деполяризация (когда она находилась ближе к пику), тем меньшими становились результирующие ответы (рис. 1, Г; 2, А). Если задержка Δt_0 варьировалась от ~4 до 7 мс (что соответствовало началу спада деполяризации, вызванной действием Р-стимула), то результирующие ответы были наименьшими (рис. 2, Б). В диапазоне Δt_0 от 8 до 15 мс, когда деполяризация составляла менее 29 % максимума, результирующие ответы увеличивались (В). Примечательно, что увеличение

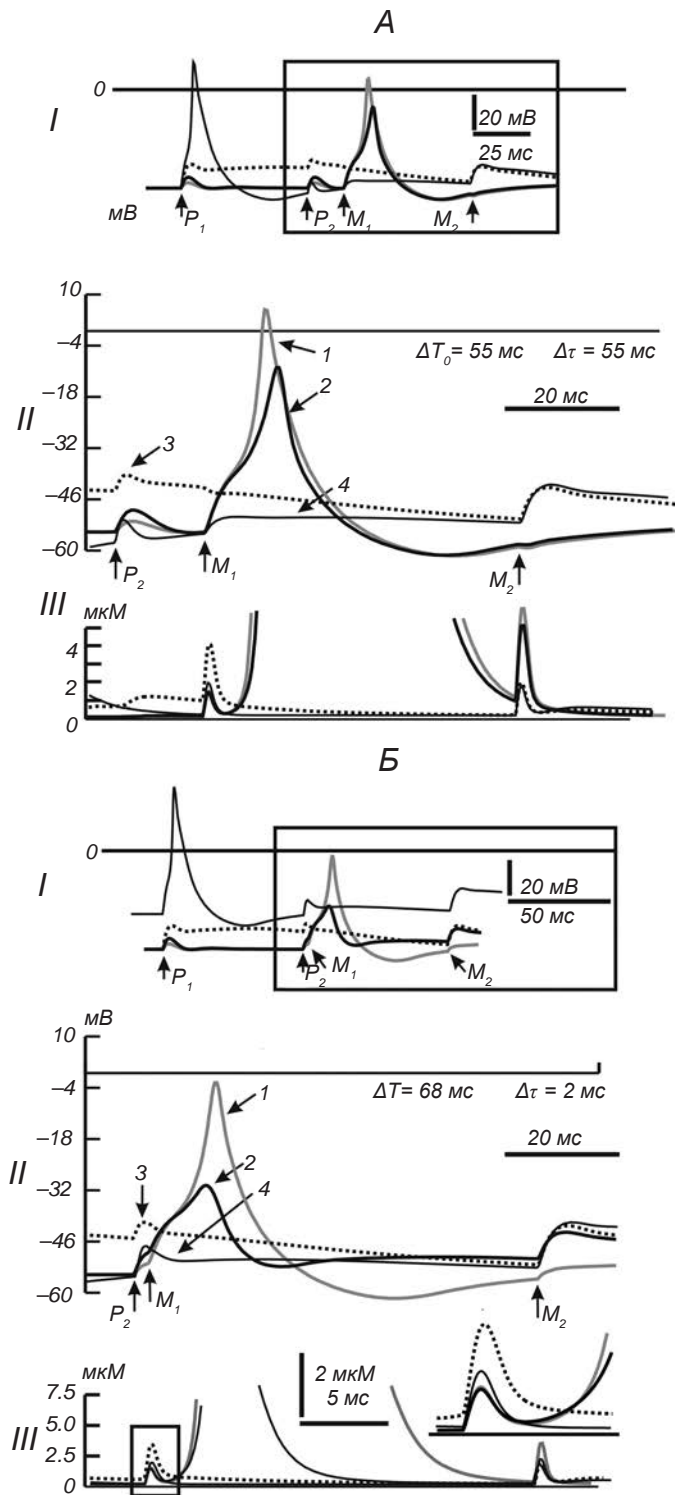
$G_{P_{2X}}$ параллельно с уменьшением P_{IP_3} приводило к возникновению ПД в условиях меньших значений Δt_0 . Например, в случае $P_{IP_3} = 13.26 \text{ с}^{-1}$ и $G_{P_{2X}} = 153.2 \text{ мкСм/см}^2$ ПД амплитудой 54 мВ возникал при $\Delta t_0 = 1 \text{ мс}$, а в случае $P_{IP_3} = 11.792 \text{ с}^{-1}$ и $G_{P_{2X}} = 306.4 \text{ мкСм/см}^2$ ПД амплитудой 51.29 мВ развивался при $\Delta t_0 = 3 \text{ мс}$.

Представленные выше результаты показывают, что кальциевый транзист, ослабленный в результате дефицита М-холинорецепторов, можно существенно увеличить путем повышения интенсивности Р-стимула – либо значительного (шести-кратного) в случае большой задержки ($\Delta t_0 = 70 \text{ мс}$), либо умеренного (двух–четырёхкратного) в случае значительных меньших задержек ($\Delta t_0 \leq 15 \text{ мс}$). Компенсаторный эффект уменьшения данного параметра, выявленный с помощью вариации задержки Δt_0 между Р- и М-компонентами одиночного парасимпатического стимула, заслуживает особого внимания. Очевидно, что существующие методы не позволяют реализовать требуемые для этого изменения ЛП Р- и М-ответов на действие одиночного парасимпатического стимула в условиях физиологического эксперимента. Однако обойти указанные методические ограничения оказалось возможным в условиях модели, если использовалось нанесение парных парасимпатических стимулов, разделенных управляемым интервалом времени.

Ответы ГМК на парную парасимпатическую стимуляцию. Парную стимуляцию осуществляли, нанося идентичные парасимпатические воздействия, разделенные интервалом ΔT . У каждого из таких воздействий мускариновый компонент (M_1 и M_2) был задержан относительно пуринового (P_1 и P_2) на одно и то же время $\Delta t_0 = 70 \text{ мс}$. Заметим, что межстимульный интервал ΔT можно подобрать так, что М-ответу, вызванному приложением первого стимула (M_1), будет предшествовать Р-ответ на действие второго стимула (P_2) с интервалом $\Delta \tau = \Delta t_0 - \Delta T$, сколь угодно меньшим, чем интервал между P_2 - и M_2 -ответами ($\Delta \tau < \Delta t_0$). Таким образом, парная стимуляция позволяет в определенном смысле преодолеть «физиологические» ограничения одиночной стимуляции, связанные с невозможностью уменьшать природный ЛП М-ответа в биологическом эксперименте (приближать эту реакцию к Р-ответу) (рис. 1). Так, в случае $\Delta t_0 = 70 \text{ мс}$ межстимульные интервалы $\Delta T = 68$ и 55 мс обеспечивали интервалы между P_2 - и M_1 -ответами, равные $\Delta \tau = 2$ и 15 мс соответственно (т. е. такие же, как и использовавшиеся в описанных выше вычислитель-

ных экспериментах с одиночной стимуляцией интервалы между Р- и М-ответами Δt_0 , уменьшенные по сравнению с физиологическими). Для облегчения сопоставления результатов парной стимуляции (рис. 3) с таковыми, полученными при одиночной стимуляции (рис. 1), мы использовали те же четыре комбинации интенсивностей Р- и М-компонентов каждого из двух парасимпатических стимулов. Ответы на парную стимуляцию с комбинациями интенсивностей 1 ($P_{IP_3} = 14 \text{ с}^{-1}$, $G_{P_{2X}} = 76.6 \text{ мкСм/см}^2$) и 2 ($P_{IP_3} = 13.26 \text{ с}^{-1}$, $G_{P_{2X}} = 153.2 \text{ мкСм/см}^2$) были подобны тем, которые наблюдались при одиночной стимуляции, поскольку все процессы, вызванные нанесением P_1 -стимула, заканчивались до начала как P_2 -, так и M_1 -ответов (рис. 3, А, Б). Однако у ответов на приложение стимулов с комбинациями интенсивностей 3 и 4 наблюдались примечательные особенности.

Так, в случае стимуляции с интенсивностями компонентов $P_{IP_3} = 11.792 \text{ с}^{-1}$ и $G_{P_{2X}} = 306.4 \text{ мкСм/см}^2$ (комбинация 3) при межстимульном интервале $\Delta T = 55 \text{ мс}$ ($\Delta \tau = 15 \text{ мс}$) ответом на нанесение P_2 -стимула был деполяризационный «всплеск» с максимумом 4.43 мВ, который не сопровождался сколько-нибудь заметным изменением $[Ca^{2+}]_i$. Следующий за ним M_1 -ответ характеризовался смещением $[Ca^{2+}]_i$ до максимума 4.14 мкМ и отсутствием заметного изменения мембранного потенциала (рис. 3, А, 3). Такая картина определяется развитием кальцийзависимой инактивации кальциевых каналов. К моменту начала P_2 -ответа такая инактивация каналов L-типа составляла около 42.5, а к моменту начала M_2 -ответа – 50.2 %. Потенциалзависимая инактивация была менее существенной, составляя для каналов L- и T-типов соответственно около 2.0 и 5.9 % на момент начала P_2 -ответа и 2.3 и 7.7 % к началу M_2 -ответа. В случае же стимуляции с теми же интенсивностями компонентов, но с большим межстимульным интервалом ($\Delta T = 68 \text{ мс}$, что соответствует наиболее короткому интервалу $\Delta \tau = 2 \text{ мс}$) пиковое значение результирующего электрического ответа становилось несколько большим (4.6 мВ), а концентрационного – меньшим (3.43 мкМ) (Б, 3). Определяющая такую картину кальцийзависимая инактивация каналов L-типа увеличивалась до 48.8 % к началу P_2 -ответа, но уменьшалась до 49.6 % к началу M_1 -ответа. Потенциалзависимая инактивация на момент начала P_2 -ответа увеличивалась до 2.2 % у L-каналов, но уменьшалась до 5.6 % у T-каналов. В момент же начала M_1 -ответа такая инактивация уменьшалась у каналов и



Р и с. 3. Электрические и концентрационные ответы гладкомышечной клетки на приложение двух парасимпатических стимулов при разных значениях интенсивностей Р- и М-компонентов и межстимульного интервала (ΔT).

А, Б – записи изменений мембранного потенциала (*I* и *II*, мВ) и транзитентов $[Ca^{2+}]_i$ (*III*, мкМ), вызванных приложением пары стимулов с Р- и М-компонентами, при межстимульном интервале $\Delta T = 55$ (А) и 68 (Б) мс для четырех комбинаций интенсивностей: $G_{P_{2X}} = 76.6$ мкС/см² и $P_{IP_3} = 14$ с⁻¹ (1), $G_{P_{2X}} = 153.2$ мкС/см² и $P_{IP_3} = 13.26$ с⁻¹ (2), $G_{P_{2X}} = 306.4$ мкС/см² и $P_{IP_3} = 11.792$ с⁻¹ (3), $G_{P_{2X}} = 459.6$ мкС/см² и $P_{IP_3} = 10.318$ с⁻¹ (4). Ограниченные прямоугольниками участки фрагментов *I* представлены в увеличенном масштабе на фрагментах *II*; ограниченный прямоугольником участок фрагмента Б, *III* приведен также в увеличенном масштабе справа.

Р и с. 3. Електричні та концентраційні відповіді гладеньком'язової клітини на прикладання двох парасимпатичних стимулів при різних значеннях інтенсивностей Р- і М-компонентів та міжстимульного інтервалу (ΔT).

на воздействие шестикратно увеличенного стимула представлял собой полноценный ПД, а Р₂- и М₁-стимулы приходились на фазу следовой гиперполяризации, сопровождающей этот потенциал. Такая гиперполяризация была более глубокой при меньшем межстимульном интервале ($\Delta T = 55$ мс; интервал между компонентами $\Delta \tau = 15$ мс) и меньшей при большем ΔT (68 мс, что соответствует $\Delta \tau = 2$ мс) (рис. 3, А, 4, Б, 4). По сравнению с тем, что наблюдалось в случае комбинации 3, результирующие ответы характеризовались более высокими пиковыми значениями сдвигов мембранного потенциала – 6.2 и 8.5 мВ (рис. 3, А, II, 4, Б, II, 4 соответственно) и более низкими пиковыми концентрациями $[Ca^{2+}]_i$ – 1.96 и 2.05 мкМ (А, III, 4, Б, III, 4 соответственно).

Представленные данные свидетельствуют о том, что величина результирующего ответа ГМК ДМП на действие парасимпатического стимула характерным образом зависит от соотношения интенсивностей Р- и М-компонентов последнего. С увеличением интенсивности Р-компонента и уменьшением М-компонента стимула электрическая и концентрационная составляющие Р₁-ответа увеличиваются, что делает более глубокой потенциал- и кальций-зависимую инактивацию кальциевых каналов к моменту начала Р₂- и М₁-компонентов результирующего ответа.

Известно, что определяющую роль в сокращении МП у здорового человека играют эффекты активации М-холинорецепторов, а активация пуринорецепторов обеспечивает инициацию ПД [4]. Во

L-, и T-типа до 2.2 и 5.9 % соответственно.

В случае же стимуляции с интенсивностями компонентов, соответствовавшими комбинации 4 ($P_{IP_3} = 10.318$ с⁻¹, $G_{P_{2X}} = 459.6$ мкС/см²), Р₁-ответ

время развития последнего в ГМК ДМП извне поступает кальций, что также способствует сокращению этих клеток. Результаты натуральных экспериментов на ГМК МП крыс показали возможность формирования локальных кальциевых транзиентов, обусловленных активацией пуринорецепторов [3]. Однако количественные соотношения величин и ЛП Р- и М-компонентов парасимпатической нейротрансдачи все еще требуют уточнения – нам не удалось обнаружить конкретных данных литературы на этот счет. На основе общих соображений можно предположить, что соотношение Р- и М-компонентов может меняться при разнонаправленных изменениях экспрессии соответствующих рецепторов и/или интенсивности продукции нейротрансмиттеров, воздействующих на указанные рецепторы. Различные упомянутые во Введении врожденные пороки развития у детей характеризуются полным или частичным дефицитом М-холинорецепторов ГМК МП [14, 15]; определенных же сведений об экспрессии P2X-рецепторных каналов в условиях подобных патологий мы не обнаружили. У мышей полный дефицит М3-холинорецепторов в МП получали в условиях нокаута соответствующего гена [21]. Цистометрические исследования у М3-нокаутных мышей показали, что обнаруженные в данном случае функциональные нарушения были менее выражены, чем наблюдаемые в условиях атропиновой блокады М3-рецепторов у мышей без указанной генетической модификации [21]. Это может свидетельствовать о наличии некоего нехолинергического компенсаторного механизма, многие аспекты которого остаются неизвестными. Что же касается количественного соотношения высвобождаемых из парасимпатических нервных волокон ацетилхолина и АТФ, то для данного показателя характерны значительные вариации, в частности основанные на межвидовых различиях. Так, доминирование ацетилхолина характерно для здорового МП человека, тогда как у кошек и морских свинок преобладает выделение АТФ; у крыс же и собак количества этих передатчиков приблизительно равны [1].

Результаты, полученные на нашей модели, позволяют предположить, что активация пуринергических рецепторов может играть существенную компенсаторную роль в условиях дефицита М-холинорецепторов. Об этом говорят представленные выше данные о том, что ослабленный таким дефицитом М-компонент ответа может быть усилен путем умеренного (в два–четыре раза) по-

вышения интенсивности Р-компонента парасимпатического стимула. Подобный эффект более выражен при малых временных задержках между Р- и М-компонентами ответа. Такая ситуация невозможна в случае одиночной парасимпатической стимуляции, но может быть достигнута в условиях парной стимуляции. Значительное (пяти-шестикратное) повышение интенсивности Р-компонента позволяло получить в ГМК ДМП регенеративный ответ, сопровождавшийся необходимым для развития сокращения значительным повышением $[Ca^{2+}]_i$, даже в случае имитирования тотального дефицита М-холинорецепторов. До какой же степени возможно усиление Р-компонента с использованием существующих фармако-физиологических методов (например, с помощью воздействия пуриномиметиками)? Решение этого вопроса весьма актуально, как и установление точных временных соотношений Р- и М-компонентов ответа на действие парасимпатического стимула. В последующих работах мы планируем более детально отобразить в модели процессы поступления и обмена Ca^{2+} , в частности обусловленные кальциевыми токами через пуриновые каналы подтипов P2X1 и P2X3, которые присутствуют клеткам-прототипам [12, 19]. Предполагается учесть свойственные каждому подтипу кинетики и относительные вклады Ca^{2+} в общий ионный ток [20]. Это позволит более точно отображать изменения мембранного потенциала ГМК и кальциевые транзиенты в них при разных соотношениях ионотропных и метаботропных влияний, обусловленных парасимпатической стимуляцией.

Настоящее исследование не было связано с какими-либо экспериментами на животных или тестах с участием людей; ввиду этого подтверждения соответствия существующим этическим стандартам в данном случае не требуется.

А. В. Коченов и С. М. Корогод подтверждают, что в процессе работы отсутствовали конфликты любого рода, касающиеся коммерческих или финансовых отношений, отношений с организациями или лицами, которые каким-либо образом могли быть связаны с исследованием, и взаимоотношений соавторов статьи.

А. В. Коченов^{1,2}, С. М. Корогод¹,

ВПЛИВ СПІВВІДНОШЕННЯ МЕТАБОТРОПНОГО ТА ІОНОТРОПНОГО КОМПОНЕНТІВ ПАРАСИМПАТИЧНОЇ ДІЇ НА ЗБУДЛИВІСТЬ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВОЇ КЛІТИНИ

ДЕТРУЗОРА СЕЧОВОГО МІХУРА: МОДЕЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

¹ Дніпропетровське відділення Міжнародного центру молекулярної фізіології НАН України (Україна).

² Державний заклад «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (Україна).

Резюме

На комп'ютерній моделі гладеньком'язової клітини (ГМК) детрузора сечового міхура (ДСМ) із відповідним набором іонних каналів та внутрішньоклітинних сигнальних механізмів досліджували впливи іонотропного пуринового (Р-) і метаботропного мускаринового (М-) компонентів парасимпатичного стимулу на мембранний потенціал клітини і концентрацію Ca^{2+} у ній ($[Ca^{2+}]_i$). Р- і М-компоненти стимулу імітувалися відповідно збільшенням провідності P2X-рецепторних каналів мембрани ГМК (G_{P2X}) і проникності кальцієвих каналів саркоплазматичного ретикула, які активуються інозитолтрифосфатом (P_{IP3}); враховувалося, що IP3 є кінцевою ланкою метаботропного ланцюга, котрий іде від М3-холінорецепторів. Величини G_{P2X} і P_{IP3} , латентні періоди (ЛП) їх активації та співвідношення цих параметрів були підібрані так, щоби прикладання поодинокого стимулу викликало в ГМК відповідь із Р- і М-компонентами, близькими до таких у прототипу. Величина і ЛП М-компонента концентраційної відповіді (кальцієвого транзєнта) в нормі були значно більшими, ніж аналогічні параметри Р-компонента; М-компонент супроводжувався генерацією потенціалу дії (ПД) із характерними для прототипу слідовими процесами. Зменшення P_{IP3} , що імітувало дефіцит М3-рецепторів у низці патологічних станів, призводило до зменшення електричної і концентраційної відповідей ГМК аж до припинення генерації ПД і змін $[Ca^{2+}]_i$. У такому стані значне збільшення G_{P2X} могло забезпечувати збільшення $[Ca^{2+}]_i$ до значень, близьких до нормальних. Застосування парної парасимпатичної стимуляції з різними міжстимульними інтервалами ΔT дозволяло отримувати ситуації, коли М-відповіді на дію першого стимулу (М1) передувала Р-відповідь на прикладання другого стимулу (Р2) з коротким змінюваним інтервалом. Використання такої стимуляції при певних значеннях ΔT і провідності пуринергічних каналів G_{P2X} дозволяло компенсувати послаблення М-компонента за рахунок його взаємодії із Р-компонентом, що був викликаний дією другого стимулу. Таким чином, у клінічній практиці патологічне послаблення М-компонента ефекту парасимпатичної стимуляції може бути компенсовано (принаймні частково) за рахунок застосування пуриноміметиків та використання парних подразнень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. G. Burnstock, "Purinergetic signalling in the urinary tract in health and disease," *Purinergetic Signal.*, **10**, No. 1, 103-155 (2014).
2. J. S. Young, E. Meng, T. C. Cunnane, and K. L. Brain, "Spontaneous purinergetic neurotransmission in the mouse urinary bladder," *J. Physiol.*, **586**, Part 23, 5743-5755 (2008).
3. T. J. Heppner, A. D. Bonev, and M. T. Nelson, "Elementary purinergetic Ca^{2+} transients evoked by nerve stimulation in rat urinary bladder smooth muscle," *J. Physiol.*, **564**, Part 1, 201-212 (2005).
4. A. F. Brading and K. L. Brain, "Ion channel modulators and urinary tract function," in: *Urinary Tract. Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 202, K.-E. Andersson and M. C. Michel (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Dordrecht, et al. (2011), pp. 376-389.
5. T. J. Heppner, M. E. Werner, B. Nausch, et al., "Nerve-evoked purinergetic signalling suppresses action potentials, Ca^{2+} flashes and contractility evoked by muscarinic receptor activation in mouse urinary bladder smooth muscle," *J. Physiol.*, **587**, Part 21, 5275-5288 (2009).
6. T. B. Bolton, "Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle," *Physiol. Rev.*, **59**, No. 3, 606-718 (1979).
7. K. E. Andersson and A. Arner, "Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology," *Physiol. Rev.*, **84**, No. 3, 935-986 (2004).
8. D. M. Daly, L. Nocchi, M. Liaskos, et al., "Age-related changes in afferent pathways and urothelial function in the male mouse bladder," *J. Physiol.*, **592**, Part 3, 537-549 (2014).
9. P. Uvin, M. Boudes, A. Menigoz, et al., "Chronic administration of anticholinergics in rats induces a shift from muscarinic to purinergetic transmission in the bladder wall," *Eur. Urol.*, **64**, No. 3, 502-510 (2013).
10. A. Kageyama, T. Fujino, Y. Taki, et al., "Alteration of muscarinic and purinergetic receptors in urinary bladder of rats with cyclophosphamide-induced interstitial cystitis," *Neurosci. Lett.*, **436**, No. 1, 81-84 (2008).
11. H. Hashitani, N. J. Bramichand, and G. D. Hirst, "Mechanisms of excitatory neuromuscular transmission in the guinea-pig urinary bladder," *J. Physiol.*, **524**, Part 2, 565-579 (2000).
12. A. P. D. W. Ford and D. A. Cockayne, "ATP and P2X purinoceptors in urinary tract disorders," in: *Urinary Tract, Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 202, K.-E. Andersson and M. C. Michel (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Dordrecht, et al. (2011), pp. 375-393, 487-515.
13. K. E. Creed, R. A. Loxleyand, and J. K. Phillips, "Functional expression of muscarinic and purinoceptors in the urinary bladder of male and female rats and guinea pigs," *J. Smooth Muscle Res.*, **46**, No. 4, 201-215 (2010).
14. A. Makedonsky, "Immunohistochemical investigation of the M2 and M3 muscarinic receptors in patients with bladder exstrophy," *Eur. Urol.*, **4**, No. 2, 182 (2004).
15. І. О. Македонський, О. П. Піддубна, "Клінічні можливості систем з біологічним зворотним зв'язком у лікуванні нетримання сечі у дітей з екстрофією сечового міхура", *Мед. перспективи*, **16**, № 2, 59-65 (2011).
16. C. P. Smith, V. M. Vemulakonda, S. Kiss, et al., "Enhanced ATP release from rat bladder urothelium during chronic bladder inflammation: effect of botulinum toxin A," *Neurochem. Int.*, **47**, No. 4, 291-297 (2005).
17. А. В. Коченов, Е. П. Поддубная, И. А. Македонский,

- С. М. Корогод, “Биофизические процессы в гладкомышечной клетке детрузора мочевого пузыря при реабилитационной стимуляции парасимпатических эфферентов: модельное исследование,” *Neurophysiology/Нейрофизиология*, **47**, № 4, 215-226 (2015).
18. N. T. Carnevale and M. L. Hines, *The NEURON Book*, Cambridge Univ. Press, Cambridge (2006).
19. G. D’Agostino, A. M. Condino, V. Calvi, et al., “Purinergic P2X3 heteroreceptors enhance parasympathetic motor drive in isolated porcine detrusor, a reliable model for development of P2X selective blockers for detrusor hyperactivity,” *Pharmacol. Res.*, **65**, No. 1, 129-136 (2012).
20. T. M. Egan and B. S. Khakh, “Contribution of calcium ions to P2X channel responses,” *J. Neurosci.*, **24**, No. 13, 3413-3420 (2004).
21. Y. Igawa, X. Zhang, O. Nishizawa, et al., “Cystometric findings in mice lacking muscarinic M2 or M3 receptors,” *J. Urol.*, **172**, No. 6, Part 1, 2460-2464 (2004).