

А. В. КОЧЕНОВ^{1,3}, Е. П. ПОДДУБНАЯ^{2,3}, И. А. МАКЕДОНСКИЙ²,
С. М. КОРОГОД¹

БИОФИЗИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ГЛАДКОМЫШЕЧНОЙ КЛЕТКЕ ДЕТРУЗОРА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ ПРИ РЕАБИЛИТАЦИОННОЙ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИИ: МОДЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Поступила 18.03.2014

Работа была направлена на поиск подходов, обеспечивающих биофизически обоснованный выбор параметров электростимуляции гладкомышечных клеток (ГМК) детрузора мочевого пузыря (ДМП). Такая стимуляция широко применяется при реабилитации пациентов, оперированных по поводу врожденных пороков развития. Исследования были выполнены на компьютерной модели с учетом экспериментальных данных о присущих биологическому прототипу ионных каналах и насосах сарколеммы и механизмах регуляции внутриклеточной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_i$). Изучали сопряженные изменения мембранного потенциала (МП), парциальных трансмембранных токов и $[Ca^{2+}]_i$, которые вызывались толчками деполяризующего тока, организованными соответственно протоколам реабилитационной стимуляции (в пачки или «конверты» с постоянной или трапецидально модулированной амплитудой). Модельная ГМК ДМП отвечала на действие одиночного стимула генерацией потенциала действия (ПД), близкого к таковому у прототипа. Раздражение как пачками, так и «конвертами» одинаковых стимулов приводило к установлению одинаковых **вынужденных электрических и концентрационных колебаний** с параметрами, зависящими от длительности межстимульных интервалов (МСИ). Такие колебания и регенеративные ответы, вызванные стимуляцией с типичными для реабилитационных протоколов МСИ 5 и 50 мс (сопоставимыми с длительностями абсолютной и относительной рефрактерности модельной ГМК), существенно различались; размах и средний уровень деполяризационных изменений МП и $[Ca^{2+}]_i$ были более высокими при высокочастотной стимуляции. В случае коротких МСИ $[Ca^{2+}]_i$, не успевая возвращаться к базальному уровню, колебалась в диапазоне значений, которые в других возбудимых клетках превышают физиологическую норму. Эти данные подчеркивают необходимость точного устранения кинетических характеристик механизмов, определяющих поступление и экструзию Ca^{2+} в ГМК ДМП, для предотвращения возможных побочных цитотоксических влияний высоких уровней $[Ca^{2+}]_i$. Существенным для наблюдавшихся процессов биофизическим параметром ГМК ДМП был также потенциал инверсии (E_{Cl}) кальцийзависимого хлорного тока, активирующегося, в частности, парасимпатическими влияниями на М2/М3-холинорецепторы. При периодическом превышении значения E_{Cl} высокочастотными колебаниями МП указанный ток изменял свое основное (деполяризующее) направление на противоположное (гиперполяризующее).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: математическая модель, гладкомышечная клетка, детрузор, электростимуляция, ионные каналы, внутриклеточный кальций.

¹ Международный центр молекулярной физиологии (Днепропетровское отделение) НАН Украины (Украина).

² Днепропетровский областной специализированный клинический медицинский центр матери и ребенка им. проф. М.Ф. Руднева (Украина).

³ Государственное учреждение «Днепропетровская медицинская академия МОЗ Украины» (Украина).

Эл. почта: kochenov_artem@yahoo.com (А. В. Коченов);
piddubna.olena@gmail.com (Е. П. Поддубная);
igor_makedonsky@yahoo.com (И. А. Македонский);
dnipro@biph.kiev.ua (С. М. Корогод).

ВВЕДЕНИЕ

Чрезтканевая электростимуляция мышц тазового дна и детрузора мочевого пузыря (ДМП) как важная составляющая процедур медицинской реабилитации показала весьма высокую эффективность у пациентов, оперированных в связи с тяжелыми врожденными

ми пороками развития органов малого таза (атрезией прямой кишки – АПК и экстрофией мочевого пузыря – тотальной эписпадией – ЭМПТЭ) [1–3]. Распространенность и тяжесть упомянутых пороков обуславливают необходимость углубленных исследований физиологических и биофизических механизмов функционирования мускулатуры органов малого таза в норме и при патологии, а также совершенствования соответствующих методов лечения и реабилитации, включая электростимуляцию. Применяемые в клинической практике стандартные протоколы электрического раздражения предусматривают воздействие на стимулируемые органы стимулами, организованными в пачки или так называемые конверты с регулируемой амплитудой и частотой следования. Однако обоснованный выбор параметров электростимулов осложнен неизвестностью характеристик вызванных ими в клетках-мишенях биофизических и физиологических процессов. К тому же, экспериментальные исследования подобных процессов, порождаемых в гладкомышечных клетках (ГМК) ДМП электрическими и парасимпатическими воздействиями, чрезвычайно затруднены из-за ограничений как методического, так и этического (в случае клинической практики) плана. В таких условиях важным инструментом получения информации об указанных процессах становится компьютерное моделирование как важный комплементарный метод, приобретающий все более широкое распространение в клеточной биофизике и физиологии. Именно этот инструмент использован в данной работе. Возможные клеточные эффекты реабилитационной электростимуляции исследованы на описанной нами ранее [4, 5] компьютерной модели ГМК ДМП (с небольшими дополнениями, см. ниже). Очевидно, при электростимуляции в зависимости от взаимного расположения электрода и ГМК-мишеней возбуждение последних может достигаться разными путями – либо действием на мембранные рецепторы ацетилхолина и АТФ – медиаторов, высвобождаемых окончаниями парасимпатических нервных волокон в результате прихода вызванных стимулами потенциалов действия (ПД), либо прямым деполяризующим действием стимулирующего тока на мембрану ГМК, либо комбинацией того и другого. Кроме того, электростимуляция может затрагивать постганглионарные симпатические нервные волокна, выделяющие норадреналин – медиатор торможения ГМК ДМП. В настоящей работе мы ограничились рассмотрением эффектов прямого возбуждающего действия, оказываемого на ГМК электрическими стимулами, оставляя для дальнейших исследований эффекты парасим-

патических и/или симпатических воздействий и их комбинаций с прямыми электрическими воздействиями. Полученные нами данные впервые иллюстрируют электрические и концентрационные процессы в ГМК ДМП при разных применяемых в клинике протоколах электростимуляции, позволяют выделить характерные особенности этих процессов, а также определяющие их параметры и кинетические характеристики клеточных механизмов. Выделены требующие углубленного исследования характеристики, существенные для биофизически обоснованной оптимизации параметров клинической электростимуляции, в частности такой, которая предотвращала бы возможность развития кальциевых цитотоксических эффектов в условиях высоких частот следования электростимулов.

ОПИСАНИЕ МОДЕЛИ

Исследования были выполнены на разработанной нами в программной среде «НЕЙРОН» и подробно описанной ранее [4–6] модели ГМК ДМП, в которую были дополнительно включены каналы кальцийзависимого калиевого тока двух типов – ВК и СК. Каналы типа ВК [7] обладали дополнительной регулировочной субъединицей [8, 9], а свойства каналов типа СК соответствовали опубликованным экспериментальным данным [10–12]. ГМК была представлена мембранным цилиндром, размеры которого (длина 100, диаметр 5 мкм) были фиксированы, что соответствовало изометрическому режиму исследования [13, 14]. Модель включала в себя характерные для прототипа ионные каналы, насосы, а также механизмы регуляции уровня внутриклеточного кальция. В мембране присутствовали каналы пассивной утечки, кальциевые каналы типов L и T, неинактивирующиеся натриевые каналы, калиевые каналы четырех типов (задержанного выпрямления и относящиеся к подсемейству Kir2.1 и упомянутым выше типам ВК и СК). Имелись также каналы, активируемые парасимпатическими воздействиями на метаболитные M2/M3-холинорецепторы, и ионотропные пуринорецепторы – кальцийзависимые хлорные каналы и P2X-рецепторные каналы неспецифического входящего тока соответственно. Регуляцию внутриклеточной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_i$) обеспечивали насосы сарколеммы и эндосаркоплазматического ретикулума, а также внутриклеточные буферы; учитывали также диффузию Ca^{2+} из примембранного слоя в глубинные слои цитозоля. Си-

стема уравнений модели, представленная ранее [4], была дополнена уравнениями ВК- и СК-токов: $I_{BK} = g_{BK} \cdot m \cdot (V - E_K)$; $g_{BK} = 6 \text{ мСм/см}^2$; $dm/dt = (m - m_{\infty})/t_m$, $m_{\infty} = 1/(1 + \exp(V_h - V)/(25/1.6))$, $V_h = -56.449 + 104.52 \cdot \exp(-0.22964 \cdot [Ca^{2+}]_i \cdot 1000) + 295.68 \cdot \exp(-2.1571 \cdot [Ca^{2+}]_i \cdot 1000)$, $t_m = (p(Ca) - 1) \cdot (f(V) - 0.2)/0.8 + 11$, $p(Ca) = 13.7 + 234 \cdot \exp(-0.72 \cdot [Ca^{2+}]_i \cdot 1000)$, $f(V) = 1/((10 - (\exp(-V/63.6) + \exp(-(150 - V)/63.6))) - 5.2)$; $I_{SK} = g_{SK} \cdot m^2 \cdot (V - E_K)$; $g_{SK} = 0.6 \text{ мСм/см}^2$; $dm/dt = (m - m_{\infty})/t_m$, $m_{\infty} = 1/(1 + (0.0005/[Ca^{2+}]_i)^{1.3})$, $t_m = 48 \text{ мс}$.

Исследовали реакции модельной ГМК на предъявление прямоугольных толчков деполяризующего тока [5]. Применяли также протоколы стимуляции, которые соответствовали используемым в процедурах реабилитации пациентов с урологическими и аноректальными дисфункциями [15], причем множественные толчки деполяризующего тока были организованы в пачки или «конверты» (см. соответственно рис. 2, А, Б или В, Г). Варьировались амплитуда, длительность (0.2–0.5 мс) и частота следования стимулов внутри пачек (5–200 с⁻¹, что соответствовало межстимульным интервалам (МСИ) 200–5 мс), длительность пачек (до 65 с) и длительности фаз нарастания, постоянства и снижения амплитуды импульсов в «конверте» (до 10, 65 и 10 с соответственно); при этом изменения амплитуды следовали линейному закону.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ответы модельной ГМК на стимуляцию импульсом тока пороговой амплитуды. В ответ на стимуляцию прямоугольным толчком тока пороговой интенсивности (длительность 0.2 мс, амплитуда 140.6 мкА/мкФ) модельная клетка генерировала ПД амплитудой 64.35 мВ (относительно потенциала покоя (ПП), равного -54.6 мВ) с последующими следовыми гиперполяризацией и деполяризацией, отклонявшимися от уровня ПП на -9 и 1.3 мВ соответственно (рис. 1, А). Генерация ПД сопровождалась значительным (до 262 мкМ) преходящим

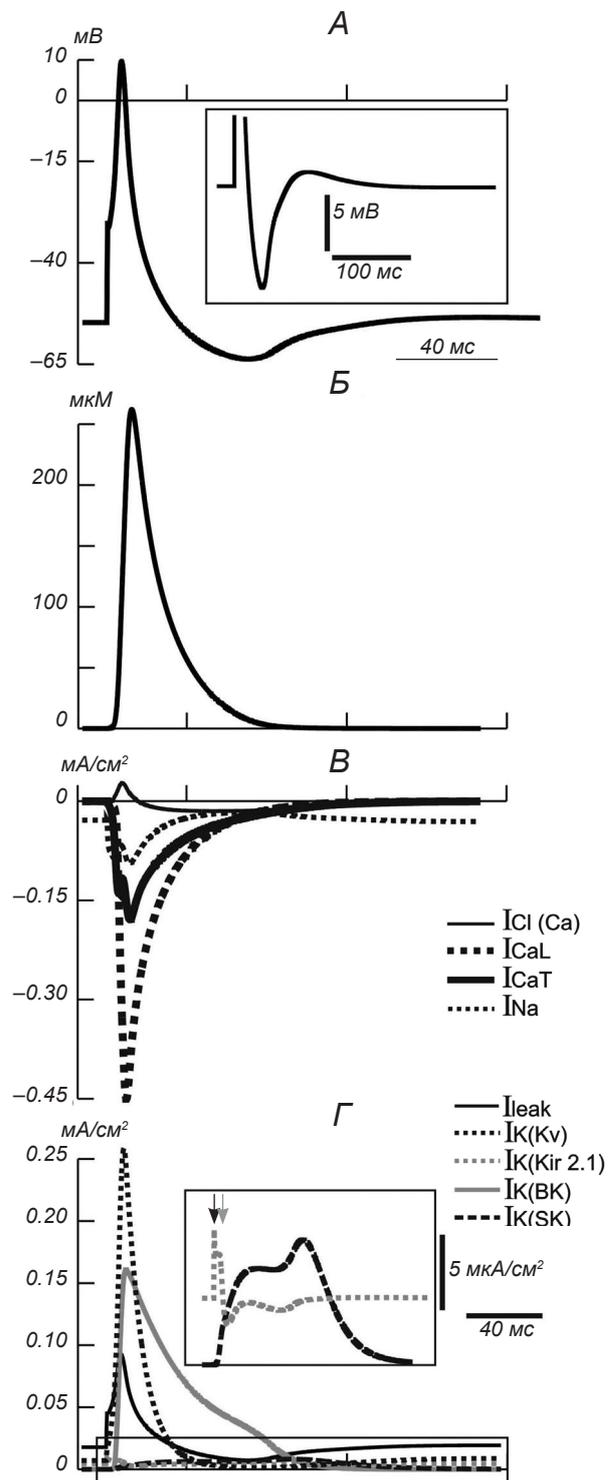


Рис. 1. Реакция модельной гладкомышечной клетки на воздействие одиночного прямоугольного стимула. А–Г – изменения во времени мембранного потенциала (мВ; на вставке – та же реакция в увеличенном масштабе для более наглядной демонстрации следовых процессов), внутриклеточной концентрации кальция (мкМ), а также плотности парциальных токов (мА/см²) – входящих I_{Na} , $I_{Cl(Ca)}$, I_{CaT} и I_{CaL} и выходящих I_{Leak} , I_{BK} , I_{SK} , $I_{Kir2.1}$ и I_{Kv} . На вставке в увеличенном масштабе представлены $I_{Kir2.1}$ и I_{SK} ; стрелками (слева направо) отмечены начало стимула и момент максимума потенциала действия. На $B I_{Cl(Ca)}$ – знак переменной. Калибровка времени 40 мс общая для всех записей, кроме таковых на вставках.

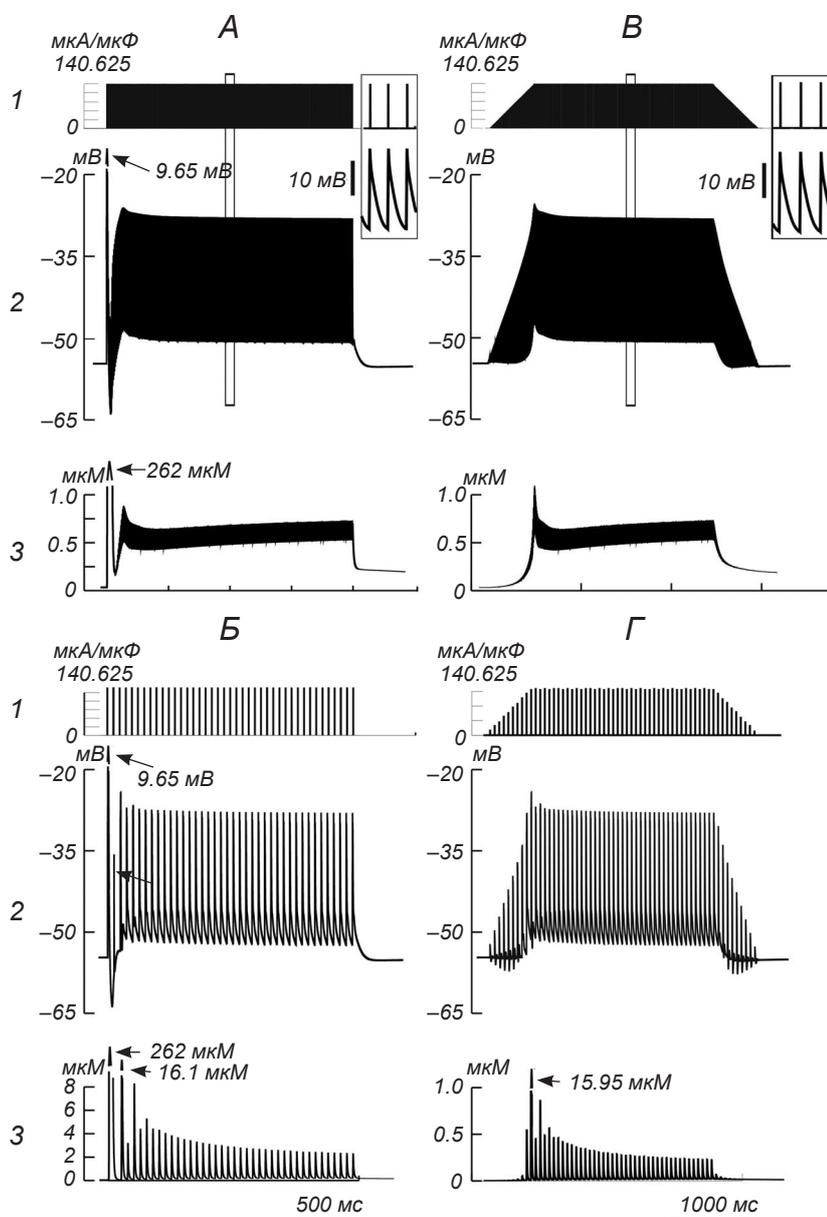
Рис. 1. Реакція модельної гладеньком'язової клітини на дію поодинокого прямокутного стимулу.

повышением примембранной концентрации $[Ca^{2+}]_i$ (Б), обусловленным входящими кальциевыми токами (В). На пике развития ПД компоненты L- и Т-типов (I_{CaL} и I_{CaT}) в общем кальциевом токе составляли 71.41 и 28.59 % соответственно. Это соотношение близко к экспериментальным данным, согласно которым в клетках ДМП вклад тока Т-типа в суммарный кальциевый ток составляет 20–30 % [16]. Среди выходящих токов (Г) преобладал ток I_{Kv} через потенциалзависимые калиевые каналы. Вторым по величине был ток I_{BK} через кальцийзависимые калиевые каналы типа ВК, максимум которого практически совпадал с пиком $[Ca^{2+}]_i$. Третьим по величине был ток утечки I_{leak} , динамика которого соответствовала форме ПД. Гораздо меньшими были токи через калиевые каналы

типов Kir2.1 и SK – $I_{Kir2.1}$ и I_{SK} . Развивающиеся после ПД следовые процессы, также присущие прототипу, были приурочены к интервалам доминирования соответствующих токов – кальцийзависимого хлорного $I_{Cl(Ca)}$ направленного внутрь во время развития следовой деполяризации (В, указано тонкой сплошной линией), и многокомпонентного калиевого, направленного в пределах фазы гиперполяризации наружу (Г).

Таким образом, набор ионных каналов модельной ГМК позволял воспроизвести как генерацию ПД, характерного для клеток-прототипов, так и необходимое для мышечного сокращения существенное повышение внутриклеточной концентрации кальция в ответ на стимуляцию деполяризующим толчком тока.

Подобно тому, что было описано в предыдущей



Р и с. 2. Типичные реакции модельной гладкомышечной клетки на стимуляцию пачкой (А, Б) и «конвертом» (В, Г) деполяризующих стимулов разной амплитуды и частоты следования.

Длительность стимулов 0.2 мс, частота следования 200 (А, Б) или 20 (В, Г) с⁻¹, амплитуда постоянная – 140.6 мкА/мкФ (А, Б) или линейно изменяющаяся от 0 до 140.6 мкА/мкФ (В, Г). Длительность пачки 2 с (А, Б); длительности фаз нарастания, постоянства и спада амплитуды стимулов в «конверте» (В и Г) – соответственно 0.5, 1.2 и 0.5 с. 1–3 на А–Г – соответственно стимулы (мкА/мкФ), мембранный потенциал (мВ) и кальциевые транзиенты (мкМ). Фрагменты записей на А, В слева, ограниченные прямоугольниками, представлены на вставках справа в увеличенном масштабе. Калибровки времени 500 и 1000 мс для А, Б и В, Г общие.

Р и с. 2. Типові реакції модельної гладеньком'язової клітини на стимуляцію пачкою (А, Б) та «конвертом» (В, Г) деполяризуючих стимулів різної амплітуди та частоти слідування.

работе (см. [5], рис. 1), в данной модификации модели ГМК ДМП тоническое повышение проводимости P2X-рецепторных каналов, которое может рассматриваться как имитация действия пурино-миметиков, также приводило к снижению порога электрической возбудимости (не иллюстрируется).

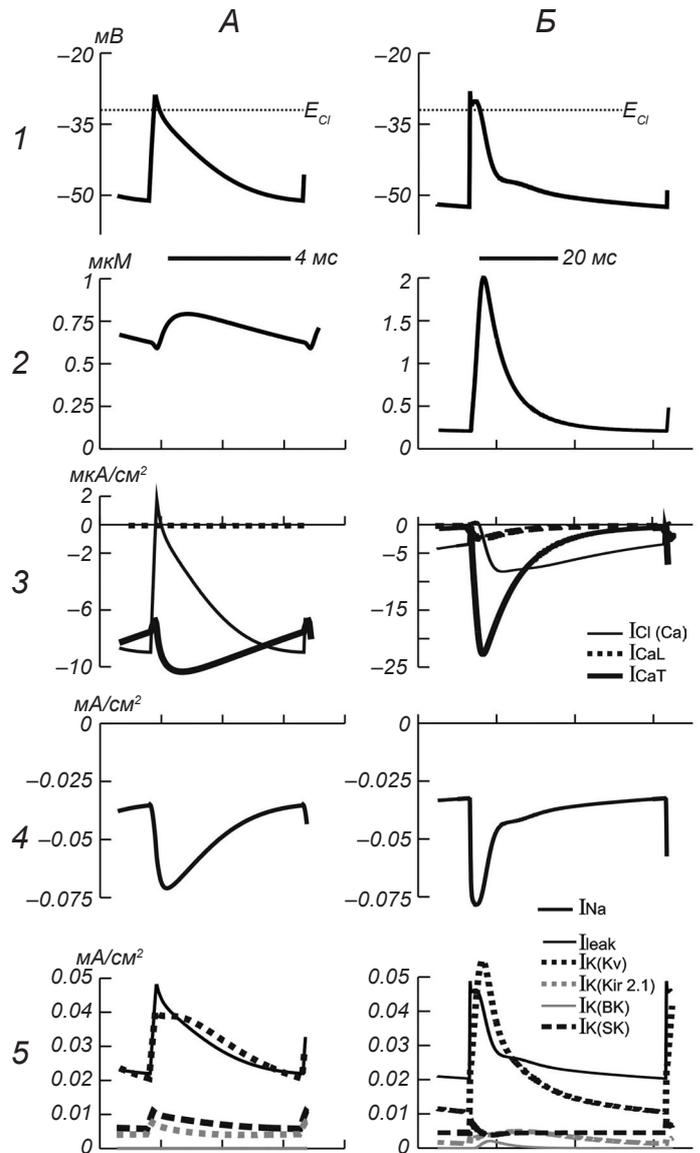
Ответы модельной ГМК на множественную стимуляцию. Множественную стимуляцию (рис. 2; 3) осуществляли толчками тока с такими же параметрами (140.6 мкА/мкФ, 0.2 мс), как и у одиночного стимула, порогового для вызова полномасштабного одиночного ПД (рис. 1). Сравнивали процессы, развивавшиеся в модельной ГМК при такой стимуляции в четырех вариантах, которые соответствовали стандартным протоколам реабилитационной стимуляции (см. [15], а также руководство к аппарату «UroStym» («Laborie Medical Technologies», Канада)). Для краткости подобные последовательности стимулов будут обозначены как высоко- или низкочастотные пачки (ВП или НП) и высоко- или низкочастотные «конверты» (ВК или НК). Амплитуда стимулов в пачках (ВП; рис. 2, А и НП; Б) была постоянной, а в «конвертах» (ВК; В и НК; Г) – трапецеидально модулированной. В таких «конвертах» амплитуда импульсов вначале в течение 0.5 с линейно нарастала от 0 до 140.6 мкА/мкФ (кроме некоторых специально оговоренных случаев), далее удерживалась на этом уровне в течение 2.0 с и линейно спадала до нуля за 0.5 с. Отдельные стимулы следовали с частотой 200 с⁻¹ в составе ВП и ВК или 20 с⁻¹ – в составе НП и НК, что соответствовало МСИ 5 или 50 мс. Для процессов, наблюдавшихся при всех вышеуказанных вариантах стимуляции, общим было то, что после некоторого переходного процесса ответы на предъявление идентичных последовательных стимулов становились одинаковыми, причем вынужденные колебания МП и внутриклеточной концентрации кальция (соответственно верхние и нижние записи на А–Г) следовало считать стационарными. Наблюдавшиеся переходные процессы можно рассматривать как комбинации вынужденного колебательного процесса и затухающего собственного процесса, что, вообще говоря, типично для (био)физических систем разной природы.

Установившиеся колебания, наблюдаемые в модельной ГМК, характеризовались следующими особенностями. Параметры этих колебаний были практически одинаковыми в условиях стимуляции как пачкой, так и «конвертом» одинаковой частоты (ср. ВП и ВК на рис. 2, А и В и НП и НК на Б и Г).

Они, однако, заметно различались при разной частоте стимулов в пачке или «конверте» (ср., напр., ВП и НП на рис. 1, А и Б или ВК и НК на В и Г). На это указывали такие параметры колебаний МП и внутриклеточной концентрации кальция $[Ca^{2+}]_i$, как размах (диапазон) изменений и средний уровень. МП колебался с размахом 22.86 мВ (от –51.13 до –28.27 мВ) и средним значением –44.47 мВ при стимуляции ВП. В условиях стимуляции ВК размах составлял 22.86 мВ (от –51.13 до –28.27 мВ), а среднее значение равнялось –44.47 мВ. Иными словами, различия размаха и среднего уровня МП составляли всего 0.0004 и 0.00045 % соответственно. При низкочастотной стимуляции упомянутые параметры имели следующие значения. Размах в условиях стимуляции НП был несколько больше (24.43 мВ, диапазон от –52.57 до –28.13 мВ), а средний уровень соответствовал меньшей деполяризации (–48.44 мВ). То же было характерно и для эффектов стимуляции НК: размах составлял 24.43 мВ (от –52.57 до –28.13 мВ), а средний уровень соответствовал –48.44 мВ. Иными словами, колебания, вызванные низкочастотной стимуляцией в формах НП и НК, практически не различались по размаху и среднему уровню. Следует отметить, что процесс перехода колебаний $[Ca^{2+}]_i$ в установившийся режим был существенно продолжительнее процесса становления стационарных электрических колебаний. Установившиеся высокочастотные вынужденные колебания $[Ca^{2+}]_i$ происходили с амплитудой (размахом) 0.2 мкМ (от 0.59 до 0.79 мкМ) и средним уровнем 0.71 мкМ при стимуляции в виде ВП, а при стимуляции в виде ВК размах составлял 0.2 мкМ (от 0.59 до 0.79 мкМ) со средним уровнем 0.71 мкМ, т. е. размах был практически одинаков, а средние уровни различались всего на 0.004 %. Соответствующие вынужденные колебания в условиях низкой частоты в пределах НП характеризовались бóльшим размахом (1.8 мкМ, от 0.2 до 2.01 мкМ) и меньшим средним значением (0.51 мкМ). Параметры колебаний при стимуляции в виде НК отличались всего на 0.00019 и 0.0002 % по среднему уровню и размаху соответственно. Подобные результаты представляют особый интерес, поскольку в случае раздражения и пачками, и «конвертами» интенсивность стимулов постоянна в пределах длительных (10–20 с) интервалов времени, а отрезки непостоянства амплитуды (нарастания и спада) в условиях стимуляции «конвертами» короче в несколько раз – 0.5–1.0 с (см. описание протоколов стимуляции, упомянутых выше).

Переходные процессы, ведущие к становлению стационарных вынужденных колебаний потенциалов и концентраций, были примечательны следующим. Длительность переходного процесса при низкочастотной стимуляции была значительно меньше (около 1.6 с), чем при высокочастотной (около 5 с). В случае одной и той же частоты переходной процесс для концентрационных колебаний был почти на порядок длительнее, чем для электрических. Переходной процесс в условиях стимуляции «конвертом» имел особенность, указывавшую на адаптационное повышение порога генерации полноценного ПД в интервале постепенного нарастания амплитуды стимулов. Так, интенсивность стимула 140.625 мкА/мкФ (при неизменной длительности 0.2 мс), которая была пороговой для генерации полномасштабного ПД в условиях стимуляции пачкой (рис. 1, А), становилась подпороговой в пределах фазы нарастания в случае стимуляции «конвертом». Для того чтобы последний стимул в данной фазе (он же – первый стимул в фазе постоянства амплитуды) стал пороговым (т. е. вызывал ПД амплитудой 61.33 мВ), необходимо было увеличивать его интенсивность до 625 мкА/мкФ (не иллюстрируется). Это означает, что в пределах полусекундного линейного нарастания интенсивности при стимуляции «конвертом» с частотой следования внутри последнего 200 с⁻¹ (МСИ 5 мс) происходило адаптационное повышение порога генерации ПД в 4.45 раза. В случае же стимуляции с низкой частотой (20 с⁻¹, МСИ 50 мс) ПД с амплитудой 62.14 мВ возникал лишь с увеличением интенсивности стимула до 200.89 мкА/мкФ (что соответствовало повышению порога в 1.43 раза).

Парциальные токи при генерации ответов ГМК в установившемся режиме. Чтобы получить представление о биофизических механизмах, определяющих возникновение в модельной ГМК установившихся вынужденных колебаний МП и [Ca²⁺]_i, выделяли ответ на предъявление одного из множества стимулов, следующих с той или иной частотой в составе пачек или «конвертов» (рис. 2), и определяли сопровождающие такой ответ парциальные ионные токи (рис. 3). Данные, представленные на рис. 3, характеризуют ответы, зарегистрированные через 20 с после начала раздражения пачкой с высокой (А) или низкой (Б) частотой следования стимулов, т. е. после завершения всех переходных процессов, когда вынужденные колебания становились стационарными. Стационарные вынужденные колебания потенциала, концентрации и токов при сти-



Р и с. 3. Сопряженные электрические и концентрационные процессы в модельной гладкомышечной клетке (в режиме установившихся вынужденных колебаний) при генерации ответа, вызванного предъявлением отдельного деполаризирующего стимула, который подавался с частотой следования 200 (А) и 20 (Б) с⁻¹ в составе пачки или «конверта» (А, Б).

Представлены изменения во времени мембранного потенциала, мВ (1), внутриклеточной концентрации кальция, мкМ, а также плотности парциальных токов – входящих I_{Na^+} , мА/см², $I_{Cl(Ca)}$, I_{CaT} , I_{CaL} , мкА/см² и выходящих I_{Kv} , $I_{Kir2.1}$, I_{BK} , I_{SK} и I_{Leak} , мА/см² (3–5). На В и Г ток $I_{Cl(Ca)}$ знакопеременный. Калибровки времени 5 (А, В) и 10 (Б, Г) мс, потенциала – 10 мВ (А–Г).

Р и с. 3. Сполучені електричні та концентраційні процеси в модельній гладеньком'язовій клітині (в режимі сталих вимушених коливань) при генерации відповіді, викликаной пред'явленням окремого деполаризуючого стимулу, що подавався з частотою слідування 200 (А) та 20 (Б) с⁻¹ у складі пачки або «конверта» (А, Б).

муляции «конвертами» соответствующей частоты практически не отличались от тех, которые представлены на рис. 2. Поэтому они не иллюстрируются, а дальнейшее описание результатов относится к обоим протоколам стимуляции.

При высокочастотной стимуляции, будь то ВП или ВК (рис. 2, *A* или *B*), стимулы следовали с интервалами 5 мс, т. е. меньшими, чем длительности абсолютной рефрактерности (см. [5], рис. 2, *B*), которую связывают с инактивацией каналов деполяризационного тока. Вызванный в этих условиях электрический ответ представлял собой быстрый (время нарастания 0.2 мс, равное длительности стимула) всплеск деполяризации относительно исходного уровня -51.13 мВ. Он имел амплитуду 22.87 мВ и сопровождался спадом, вначале (за первую миллисекунду) более крутым, затем более пологим, почти линейным (рис. 3, *A*, *1*). Чем больше было такое деполяризационное смещение, тем более МП приближался к потенциалам равновесия кальциевых и натриевых токов (их движущие потенциалы становились меньше). Соответственно, МП все более удалялся от потенциалов равновесия выходящих токов (кальциевых и утечки, движущие потенциалы которых при этом увеличивались). Траектория МП (*1*) дважды, по восходящей и нисходящей, пересекала уровень равновесия (инверсии) кальцийзависимого хлорного тока ($E_{Cl} = -32$ мВ). Соответственно, знакопеременными оказывались и движущий потенциал, и сам этот ток (3). Упомянутый ток уменьшался по абсолютной величине до нуля; далее, сменив знак на противоположный, он увеличивался, достигал максимума в момент окончания действия стимула, после чего претерпевал обратные изменения с меньшей скоростью. Таким образом, данный ток, будучи в основном деполяризационным, на короткое время (в интервале от 0.2 до 0.4 мс после начала стимула) становился гиперполяризационным. Среди входящих токов доминировал натриевый (4, I_{Na}), почти вчетверо превосходивший второй по величине кальциевый ток Т-типа (3, I_{CaT}), а кальциевый ток L-типа (I_{CaL}) был пренебрежимо мал. Для всех входящих токов характерным было двухфазное изменение относительно соответствующего исходного уровня (того, который наблюдался на момент начала действия стимула). Первая фаза уменьшения абсолютной величины входящего тока начиналась в момент начала действия стимула и не превосходила последний по длительности; минимумы токов I_{Na} , I_{CaT} и I_{CaL} достигались спустя 0.025, 0.125 и 0.15 мс (3 и 4). Вслед

за этим наступала фаза роста абсолютных величин парциальных токов, продолжавшаяся и после завершения стимула. Максимумы вышеназванных токов достигались соответственно через 0.55, 1.0 и 1.35 мс после начала действия 0.2-миллисекундного стимула, что соответствовало различной кинетике потенциалзависимой активации каналов – самой быстрой у натриевых, более медленной у кальциевых Т-типа и самой медленной у кальциевых каналов L-типа. Далее, до поступления очередного стимула, токи возвращались к исходному уровню. В то же время динамика выходящего тока утечки I_{leak} через постоянную пассивную мембранную проводимость (5) практически повторяла траекторию МП (*1*), что было вполне закономерным ввиду постоянства его равновесного потенциала. Приблизительно на 20 % меньший ток через потенциалзависимые калиевые каналы (I_{Kv} , 5) изменялся аналогично, отличаясь несколько более медленным спадом. Следующими по величине были токи через калиевые каналы типов SK и Kir2.1 (I_{SK} и $I_{Kir2.1}$), пиковая амплитуда отмечалась в момент окончания стимула (5). При этом ток через калиевые каналы типа ВК ($I_{K(SK)}$) был пренебрежимо мал.

В аспекте важного функционального значения кальциевого транзистента не только для электрогенеза в ГМК, но и для сократительной активности указанной клетки данный транзистент представляет особый интерес (рис. 3, *A*, 2). Значение $[Ca^{2+}]_i$ после кратковременного падения, наблюдавшегося в фазе начального уменьшения входящих кальциевых токов (на фоне продолжающейся экструзии кальция насосами и т. п.), нарастало и достигало максимума 0.793 мкМ через 1.2 мс после начала действия стимула. За время, оставшееся до начала действия очередного стимула, $[Ca^{2+}]_i$ спадала до исходного уровня (0.628 мкМ). Последнее значение многократно превышало базальный уровень (34.28 нМ), наблюдавшийся перед началом стимуляции. Следует отметить, что максимум $[Ca^{2+}]_i$ достигался несколько позже максимумов кальциевых токов (ср. *1* и 2), т. е. спад концентрации начинался при таком уменьшении названных токов, когда связанный с ними приток кальция в цитозоль становился меньше экструзионного оттока.

В условиях низкочастотной стимуляции в виде как НП (рис. 2, *B*), так и НК (*Г*), когда МСИ = 50 мс соответствовали ранней фазе периода относительной рефрактерности (см. [5], рис. 2, *B*, *B*), установившиеся ответы (рис. 3, *B*) существенно отличались от описанных выше (*A*). Общей чертой было

лишь почти линейное нарастание степени деполяризации мембраны. МП достигал значения -28.13 мВ (т. е. смещался на 24.43 мВ от более низкого исходного уровня -52.56 мВ) в пределах длительно-сти действия стимула, после чего деполяризация спадала (Б, 1). Однако этот спад был неглубоким и коротким, после чего мембранная деполяризация возобновляла рост; МП достигал значения -30.28 мВ через 1.4 мс после окончания стимула. Далее деполяризация спадала, причем на нисходящей фазе наблюдалось короткое плато, которое могло рассматриваться как второй редуцированный пик (-47.1 мВ через 8.9 мс после окончания действия стимула). Выходящий ток утечки (I_{leak} ; Б, 5), как и при высокочастотной стимуляции, повторял траекторию МП. Другой выходящий ток, через потенциалзависимые калиевые каналы (I_{Kv} ; Б, 5), демонстрировал медленную активацию, достигая максимума через 3.2 мс, т. е. практически одновременно с максимумом $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (ср. 2). Следующими по величине были токи через калиевые каналы типов SK и Kir2.1. Пиковая амплитуда $I_{\text{Kir2.1}}$ приходилась на момент окончания стимула (5), тогда как ток I_{SK} достигал максимума через 12.6 мс после окончания стимула. Ток через калиевые каналы типа BK (I_{BK}) был существенно больше, чем при высокочастотной стимуляции, и достигал максимума спустя 5 мс после окончания стимула. Входящие токи (в том числе кальцийзависимый хлорный ток $I_{\text{Cl(Ca)}}$, практически не менявший данное направление в случае низкочастотной стимуляции) после окончания стимула демонстрировали выраженную активацию с характерной для каждого из них скоростью (Б, 3). Так, наиболее высокоамплитудный натриевый ток I_{Na} достигал пика (максимума абсолютной величины) через 1.6 мс, кальциевые токи I_{CaT} и I_{CaL} (последний – намного больший, чем при высокочастотной стимуляции) – через 2.9 и 3.4 мс соответственно, а $I_{\text{Cl(Ca)}}$ – через 8.5 мс после окончания стимула. Как следует отметить, соответственно медленной активации каналов (максимум через 8.5 мс) кальцийзависимый хлорный ток $I_{\text{Cl(Ca)}}$ был наибольшим в интервалах времени, совпадавших с плато (вторым пиком) мембранной деполяризации (Б, 1), когда деполяризующие кальциевые токи спадали до 52.6 – 57.29 % (2), а натриевый – до 55.03 (4) % своих пиковых значений. Это обстоятельство указывает на возможную важную роль именно данного тока ($I_{\text{Cl(Ca)}}$) в формировании установившихся ответов на низкочастотную стимуляцию.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основные клеточные эффекты при реабилитационной электростимуляции. Электрическая стимуляция органов и тканей, мишенью которой являются электровозбудимые нервные и мышечные клетки, давно и широко применяется в медицине. В частности, при хирургических вмешательствах электростимуляция позволяет выявить в оперируемой ткани те участки, где залегают нервные волокна, и предотвратить нежелательную денервацию органов и связанные с этим тяжелые функциональные последствия. Такого рода превентивная зондирующая интраоперационная электростимуляция нервов (ИЭСН) используется в орган- и нервосберегающей (nerve-sparing) простатэктомии [17], хирургии рака прямой кишки [18–21] и матки [22], а в последние годы успешно применяется также в ходе хирургической коррекции таких врожденных аноректальных и урологических пороков у детей, как АПК и ЭМПТЭ [23, 24]. Широкое использование электростимуляции при хирургических вмешательствах и послеоперационной реабилитации ставит на повестку дня вопрос о биофизическом и физиологическом обосновании выбора адекватных протоколов и параметров воздействий этого вида. Для этого необходимы ясные представления о вызываемых подобной стимуляцией биофизических и физиологических процессах в клетках-мишенях, в частности в ГМК ДМП. В нашей работе была предпринята попытка внести вклад в построение данных представлений с помощью компьютерного моделирования реакций ГМК на электростимуляцию, осуществляемую согласно протоколам, которые применяются в процессе реабилитации детей, прооперированных по поводу АПК и ЭМПТЭ [1].

Результаты наших модельных исследований (рис. 2; 3) показали следующие наиболее существенные черты ответов ГМК на характерную для реабилитационных протоколов стимуляцию множественными толчками тока, организованными в пачки или «конверты».

Во-первых, через большее или меньшее время после начала стимуляции вынужденные колебания МП и $[\text{Ca}^{2+}]_i$, частота которых равна частоте следования стимулов, становятся стационарными. Эти колебания одинаковы при стимуляции как пачками, так и «конвертами» равной частоты, хотя в пачках амплитуда стимулов постоянна изначально, а в «конвертах» достигается постепенно за некое конечное время.

Во-вторых, параметры установившихся ответов

проявляют характерную зависимость от частоты следования стимулов в пачке или «конверте». Чем больше частота (т. е. короче МСИ), тем меньше размах колебаний и больше деполяризационное смещение среднего уровня МП относительно ПП ($E_r = -54.7$ мВ). Этот размах в условиях нашей модели составлял 6.26 и 10.23 мВ при частотах 20 и 200 с⁻¹ соответственно.

В-третьих, длительность переходных процессов в ГМК различна. Электрические колебания становятся стационарными многократно быстрее, чем концентрационные. Переход в установившийся режим и тех, и других процессов реализуется более быстро при меньшей частоте стимуляции.

В-четвертых, порог возбуждения ГМК на начальном этапе стимуляции «конвертом» проявляет адаптационное повышение. В долговременном плане это, однако, не сказывалось на параметрах установившихся колебаний.

Рассчитанные для каждого случая парциальные токи и кальциевые транзиенты, сопровождающие вызванные электростимуляцией изменения МП, позволяют охарактеризовать природу наблюдавшихся реакций ГМК. Как и любое модельное исследование, данная работа вызывает ряд естественных вопросов. Насколько адекватна модель? Каковы ее ограничения и возможности в плане отображения процессов, реально происходящих в клетках-прототипах? Какие особенности изучаемых процессов выявляются с помощью модели? Как можно использовать полученные результаты для совершенствования процедур реабилитационной электростимуляции?

Адекватность, возможности и ограничения модели. Используемая в данном исследовании модель ГМК ДМП, несмотря на ряд неизбежных упрощений и ограничений, способна адекватно воспроизводить характерные для клеток-прототипов ПД, генерируемые в ответ на приложение одиночных электрических стимулов (см. [5], рис. 1). На этом основании можно полагать, что и полученные характеристики ответов модельной ГМК на множественную стимуляцию с параметрами, соответствующими протоколам реабилитационной стимуляции (рис. 2; 3), также адекватно отображают особенности реакций клеток-прототипов.

Поскольку нам не удалось обнаружить в литературе точных данных о концентрации Ca^{2+} в ГМК ДМП при возбуждении, трудно оценить, насколько близки к прототипу пиковые и средние уровни $[Ca^{2+}]_i$, наблюдавшиеся в нашей модельной ГМК

в условиях стимуляции. Если, однако, учесть доступные данные относительно клеток других типов (нервных и мышечных), наблюдавшиеся нами вынужденные колебания концентрации несколько превышают физиологический уровень, особенно в случае высокочастотной стимуляции (рис. 2, Б, Г; 3, А). Это обстоятельство требует отнестись с особым вниманием как к параметрам, определяющим поступление в цитозоль и экструзию кальция, так и к протоколам стимуляции. Последнее важно в плане выбора таких параметров реабилитационной электростимуляции, которые исключали бы длительное чрезмерное повышение уровня свободного Ca^{2+} , способное привести к нежелательным побочным цитотоксическим эффектам.

Другим принципиальным ограничением было рассмотрение в данной работе только тех процессов, которые вызывались в модельной ГМК исключительно прямым электрическим воздействием приложенного извне деполяризующего тока. При чрезклеточной электростимуляции, однако, клетка может испытывать и воздействия нейромедиаторов/трансмисмиттеров, выделяемых из окончаний возбужденных теми же стимулами парасимпатических и/или симпатических нервных волокон. Эффекты парасимпатических и симпатических воздействий, прилагаемых изолированно или в комбинации с прямыми электрическими стимулами являются предметом наших дальнейших исследований, выходящих за рамки настоящей работы.

С учетом отмеченных ограничений модель ГМК ДМП открывает, однако, пока недоступную для экспериментальных и клинических исследований возможность одновременного наблюдения вызванных стимуляцией изменений МП, парциальных токов и внутриклеточной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_i$). Сопоставление этих электрических и концентрационных процессов позволяет охарактеризовать механизмы реагирования клеток на стимуляцию, определить роли, которые в функционировании данных механизмов играют токи через ионные каналы разных типов, потоки поступления и экструзии кальция – важнейшего фактора, влияющего как на возбудимость, так и на сократимость ГМК. Полученные результаты (рис. 1) позволяют высказать следующие суждения о функциях разных парциальных ионных токов. Неинактивирующийся натриевый ток, первым реагируя на деполяризационный толчок и достигая своего максимума, обеспечивает первичную регенеративную деполяризацию, которая активирует кальциевые каналы Т-типа. Ток

через Т-каналы поддерживает смещение МП до уровня активации кальциевых каналов L-типа. Активация последних вместе с эффектами вышеназванных токов приводит к формированию полноценного ПД, во время которого кальций поступает в клетку; связанное с этим продолжительное повышение $[Ca^{2+}]_i$ приводит к активации кальцийзависимых хлорных каналов. Деполяризационный хлорный ток на пике ПД меняет своё направление на гиперполяризационное и тем самым ограничивает амплитуду ПД. По окончании деполяризационного максимума, обусловленного генерацией ПД, концентрация Ca^{2+} некоторое время остается достаточной для активации кальцийзависимых хлорных каналов, вследствие чего ток через эти каналы вновь меняет своё направление. Становясь деполяризационным, он формирует продолжительную следовую деполяризацию. Роль токов через потенциалзависимые калиевые каналы и калиевые каналы типа Kir2.1 заключается в формировании ПП и ограничении амплитуды ПД, тогда как ток через кальцийзависимые калиевые каналы типа BK (активация которых происходит несколько позже) также ограничивает амплитуду ПД и определяет его продолжительность, а также амплитуду следовой гиперполяризации. Ток через кальцийзависимые калиевые каналы типа SK, которые активируются наиболее поздно (спустя ~42.8 мс после пика ПД), определяет продолжительность следовой гиперполяризации (см. вставку на рис. 1, Г). Благодаря тому, что мы включили в модель SK-ток и подвергли адекватной модификации BK-ток, в условиях данной модели следовая гиперполяризация была более длительной и глубокой, чем наблюдавшаяся на модели ГМК ДМП в нашей предыдущей работе [5]. Таким образом, следовые процессы находились в лучшем соответствии с характерными для прототипа.

Биофизические основы для анализа и выбора протоколов реабилитационной электростимуляции ДМП. Как отмечалось выше, электростимуляция ДМП является важной составляющей процедур реабилитации у детей, прооперированных по поводу врожденных пороков (АПК и ЭМПТЭ), которые часто сопровождаются дефицитом M2/M3-холинорецепторов [1]. Протоколы и параметры такой электростимуляции устанавливаются более или менее жестко в используемых для данных целей аппаратно-программных комплексах, например таком, как «Urostym» («Laborie Medical Technologies», Канада), который широко используется в медицинской практике, в том числе и нами [1]. При этом в

соответствующей документации не раскрываются медико-биологические обоснования тех или иных параметров. В настоящей работе мы попытались найти подход к обоснованию выбора таких параметров реабилитационной электростимуляции с использованием модельных расчетов электрических и концентрационных процессов, вызываемых в клетках-мишенях. В нашем случае процессы в ГМК ДМП рассмотрены с учетом особенностей вышеупомянутых патологий, а параметры стимуляции приближены к применяемым для этого контингента реабилитационным протоколам. Именно такая особенность, как дефицит M2/M3-холинорецепторов, обусловила то обстоятельство, что в данной работе внимание было сосредоточено на эффектах прямого воздействия электрических импульсов на клетки. Полагали, что даже если стимуляция возбуждает парасимпатические нервные волокна, то при упомянутой молекулярной патологии функционирование метаботропного холинергического пути возбуждения ГМК ослаблено или отсутствует. Вместе с тем особенности дефицита пуринергических рецепторов в условиях рассматриваемой патологии пока не описаны. Поэтому нельзя исключить возможность ионотропного действия выделяемой возбужденными парасимпатическими окончаниями АТФ на P2X-рецепторные каналы, а следовательно, и возможность вклада токов через указанные каналы в формирование деполяризации и возбудимость ГМК.

Анализ процессов, развивающихся в ГМК ДМП в случае электростимуляции используемыми в упомянутых реабилитационных процедурах пачками и «конвертами» деполяризующих стимулов с разными частотами следования (рис. 2; 3), показал следующее.

Как оказалось при стимуляции как пачками, так и «конвертами» одинаковых стимулов с одинаковыми частотами следования, по окончании переходного процесса, длительность которого (сотни миллисекунд) намного меньше общей длительности стимуляции (минуты или десятки минут), ответы ГМК становятся практически одинаковыми. Поэтому проблема альтернативного выбора между двумя названными протоколами фактически отпадает. По нашему мнению, стимуляция пачками предпочтительнее, поскольку она не требует задания дополнительных параметров (таких, как длительность фаз нарастания и спада амплитуды стимулов при раздражении «конвертами»).

Характерные для высокочастотной стимуляции в

установившемся режиме (рис. 2, А, В; 3, А) весьма высокие уровни $[Ca^{2+}]_i$ заставляют учитывать возможность развития существенных побочных цитотоксических эффектов, если чрезмерно высокая концентрация поддерживается чрезмерно долго. Очевидно, что возникает вопрос о предельных частотах и длительности электростимуляции. Для решения этого вопроса необходимо более точное, чем существует на сегодня, знание величин, от которых зависят количества и скорости поступления кальция в цитозоль (вход из внешней среды через потенциалзависимые кальциевые каналы мембраны, высвобождение из депо, дебуферизация) и его экстружии и демобилизации («выкачка» насосами, депонирование, буферизация). Практическая потребность в таких сведениях указывает на перспективность и востребованность соответствующих экспериментальных исследований. В нашей модели при заданных параметрах перечисленных механизмов, подробно описанных в ранее опубликованных работах [4, 5], $[Ca^{2+}]_i$ может возвращаться к низкому (практически базальному) уровню (<100 нМ) лишь в условиях частот следования стимулов менее 3.57 с^{-1} (МСИ >280 мс). Эта оценка может быть скорректирована по мере уточнения параметров, характеризующих свойства механизмов экстружии кальция (кальциевых насосов и обменников сарколеммы и депо, внутриклеточных буферов и т. п).

Снижение порога генерации ПД в случае прямого действия электрического стимула в условиях повышенной проводимости P2X-рецепторных каналов (данные не иллюстрируются; см. [5], рис. 1), пропускающих входящий ток, привлекает внимание к возможности функционально равноэффективной реабилитационной стимуляции при пониженной (соответственно, скорее всего, менее дискомфортной) интенсивности стимулов на фоне премедикации пуринометиками. Соответствующие биофизические предпосылки явятся предметом нашего дальнейшего модельного исследования реакций ГМК на парасимпатическое возбуждение, включая комбинацию последнего с прямым электрическим возбуждением.

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

А. В. Коченов, Е. П. Поддубная, И. А. Македонский и С. М. Корогод подтверждают, что в процессе работы отсут-

ствовали 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^{1,3}, О. П. Піддубна^{2,3}, І. О. Македонський², С. М. Корогод¹

БІОФІЗИЧНІ ПРОЦЕСИ В ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВІЙ КЛІТИНІ ДЕТРУЗОРА СЕЧОВОГО МІХУРА ПРИ РЕАБІЛІТАЦІЙНІЙ ЕЛЕКТРОСТИМУЛЯЦІЇ: МОДЕЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

¹Міжнародний центр молекулярної фізіології (Дніпропетровське відділення) НАН України (Україна).
²Дніпропетровський обласний спеціалізований клінічний медичний центр матері та дитини ім. проф. М. Ф. Рудневої (Україна).
³Державний заклад «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (Україна).

Резюме

Робота була спрямована на пошук підходів, які забезпечують біофізично обґрунтований вибір параметрів електро-стимуляції гладеньком'язових клітин (ГМК) детрузора сечового міхура (ДСМ). Така стимуляція широко застосовується при реабілітації пацієнтів, оперованих з приводу вроджених вад розвитку. Дослідження були виконані на комп'ютерній моделі з урахуванням експериментальних даних щодо притаманних біологічному прототипу іонних каналів і насосів сарколеми та механізмів регуляції внутрішньоклітинної концентрації кальцію ($[Ca^{2+}]_i$). Вивчали сполучені зміни мембранного потенціалу (МП), парціальних трансмембранних струмів та $[Ca^{2+}]_i$, котрі викликалися поштовхами деполаризуючого струму, організованими відповідно до протоків реабілітаційної стимуляції (в пакки або «конверти» з постійною або трапецеїдално модульованою амплітудою). Модельна ГМК ДСМ відповідала на дію поодинокого стимулу генерацією потенціалу дії (ПД), близького до такого у прототипу. Подразнення як пачками, так і «конвертами» однакових стимулів призводило до встановлення однакових вимушених електричних і концентраційних коливань з параметрами, залежними від тривалості міжстимульних інтервалів (МСІ). Такі коливання та регенеративні відповіді, викликані стимуляцією з типовими для реабілітаційних протоколів МСІ 5 і 50 мс (порівняними з тривалостями абсолютної та відносної рефрактерності модельної ГМК), істотно розрізнялися; розмах і середній рівень деполаризаційних змін МП і $[Ca^{2+}]_i$ були більш високими при високочастотній стимуляції. В разі коротких МСІ $[Ca^{2+}]_i$, не встигаючи повертатися до базального рівня, коливалась у діапазоні значень, які в інших збудливих клітинах перевищують фізіологічну норму. Ці дані підкреслюють необхідність точного встановлення кінетичних характеристик механізмів, що визначають надходження та екстружію Ca^{2+} у ГМК ДСМ для запобігання можливим побічним цитотоксичним впливам

високих рівнів $[Ca^{2+}]_i$. Істотним для спостережних процесів біофізичним параметром ГМК ДСМ був також потенціал інверсії (E_{Cl}) кальційзалежного хлорного струму, що активується, зокрема, парасимпатичними впливами на М2/М3-холінорецептори. При періодичному перевищенні значення E_{Cl} високочастотними коливаннями МП вказаний струм змінював свій основний (деполяризаційний) напрямок на протилежний (гіперполяризаційний).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. 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).
2. I. A. Makedonsky, "Immunohistochemical investigation of the M2 and M3 muscarinic receptors in patients with bladder exstrophy," *Eur. Urol.*, **4**, No. 2, 182 (2004).
3. І. О. Македонський, "Морфологічні та функціональні властивості сечового міхура у дітей з аноректальними аномаліями", *Хірургія дит. віку*, **4**, № 4, 46-52 (2007).
4. S. M. Korogod, A. V. Kochenov, and I. A. Makedonsky, "Biophysical mechanism of parasympathetic excitation of urinary bladder smooth muscle cells: a simulation study," *Neurophysiology*, **46**, No. 4, 199-205 (2014).
5. А. В. Коченов, Е. П. Поддубная, И. А. Македонский, С. М. Корогод, "Характеристики возбудимости гладкомышечной клетки детрузора мочевого пузыря как основа выбора параметров реабилитационной электростимуляции: модельное исследование", *Neurophysiology/Нейрофизиология*, **47**, № 2, 114-122 (2015).
6. M. L. Hines and N. T. Carnevale, "The NEURON simulation environment," *Neural Comput.*, **9**, No. 6, 1179-1209 (1997).
7. D. B. Jaffe, B. Wang, and R. Brenner, "Shaping of action potentials by type I and type II large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels," *Neuroscience*, **192**, 205-218 (2011).
8. G. V. Petkov, "Role of potassium ion channels in detrusor smooth muscle function and dysfunction," *Nat. Rev. Urol.*, **9**, No. 1, 30-40 (2011).
9. G. V. Petkov, "Central role of the BK channel in urinary bladder smooth muscle physiology and pathophysiology," *Am. J. Physiol. Regulat. Integr. Comp. Physiol.*, **307**, No. 6, R571-R584 (2014).
10. N. Bronstein-Sitton, " Ca^{2+} -dependent K^{+} channels at the crossroads of cell metabolism," *Modulator*, No. 5, 10-14 (2005).
11. G. M. Herrera and M. T. Nelson, "Differential regulation of SK and BK channels by Ca^{2+} signals from Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in guinea-pig urinary bladder myocytes," *J. Physiol.*, **541**, Part 2, 483-492 (2002).
12. F. Vogalis and R. K. Goyal, "Activation of small conductance Ca^{2+} -dependent K^{+} channels by purinergic agonists in smooth muscle cells of the mouse ileum," *J. Physiol.*, **502**, Part 3, 497-508 (1997).
13. J. Laforet, D. Guiraud, D. Andreu, et al., "Smooth muscle modeling and experimental identification: application to bladder isometric contraction," *J. Neural Eng.*, **8**, No. 3, 1-13 (2011).
14. R. S. White, B. G. Zemen, Z. Khan, et al., "Evaluation of mouse urinary bladder smooth muscle for diurnal differences in contractile properties," *Front. Pharmacol.*, **5**, No. 293, 1-8 (2015).
15. J. Haslam and J. Laycock, *Therapeutic Management of Incontinence and Pelvic Pain. Pelvic Organ Disorders*, Springer-Verlag, London (2008).
16. C. H. Fry, G. Sui, and C. Wu, "T-type Ca^{2+} channels in non-vascular smooth muscles," *Cell Calcium*, **40**, No. 2, 231-239 (2006).
17. T. F. Lue, C. A. Gleason, G. B. Brock, et al., "Intraoperative electrostimulation of the cavernous nerve: technique, results and limitations," *J. Urol.*, **154**, No. 4, 1426-1428 (1995).
18. N. N. Hanna, J. Guillem, A. Dosoretz, et al., "Intraoperative parasympathetic nerve stimulation with tumescence monitoring during total mesorectal excision for rectal cancer," *J. Am. Coll. Surg.*, **195**, No. 4, 506-512 (2002).
19. G. M. da Silva, O. Zmora, L. Borjesson, et al., "The efficacy of a nerve stimulator (CaverMap) to enhance autonomic nerve identification and confirm nerve preservation during total mesorectal excision," *Dis. Colon. Rectum*, **47**, No. 12, 2032-2038 (2004).
20. W. Kneist, A. Heintz, and T. Junginger, "Intraoperative identification and neurophysiologic parameters to verify pelvic autonomic nerve function during total mesorectal excision for rectal cancer," *J. Am. Coll. Surg.*, **198**, No. 1, 59-66 (2004).
21. W. Kneist and T. Junginger, "Validity of pelvic autonomic nerve stimulation with intraoperative monitoring of bladder function following to talmesorectal excision for rectal cancer," *Dis. Colon. Rectum.*, **48**, No. 2, 262-269 (2005).
22. A. Katahira, H. Niikura, Y. Kaiho, et al., "Intraoperative electrical stimulation of the pelvic splanchnic nerves during nerve-sparing radical hysterectomy," *Gynecol. Oncol.*, **98**, No. 3, 462-466 (2005).
23. І. О. Македонський, "Профілактика ураження органів сечостатевої системи під час хірургічної корекції аноректальних вад у дітей", *Урологія*, **15**, № 2 (57), 28-31 (2011).
24. Пат. 63684 Україна, МПК (2011.01) А61В 17/00, *Спосіб лікування аноректальних вад розвитку*, І. О. Македонський, опубл. 10.10.11, Бюл. № 19.