

БИОФИЗИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ПАРАСИМПАТИЧЕСКОГО ВОЗБУЖДЕНИЯ ГЛАДКОМЫШЕЧНОЙ КЛЕТКИ ДЕТРУЗОРА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ: МОДЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Поступила 16.09.13

С использованием формализма Ходжкина–Хаксли разработана компьютерная модель гладкомышечной клетки (ГМК) детрузора мочевого пузыря, включающая в себя присущие клеткам-прототипам основные типы ионных каналов и насосов, а также механизмы регуляции внутриклеточного кальция. На модели исследованы биофизические механизмы генерации потенциалов действия (ПД), необходимых для инициации сокращения, и кальциевых транзиентов в ответ на парасимпатическую активацию метаботропных M2/M3-холинорецепторов и коактивацию ионотропных P2X-пуринорецепторов. Модельная ГМК в ответ на толчок деполяризующего тока генерировала ПД, по ряду признаков подобный реальным ПД и сопровождающийся преходящим увеличением внутриклеточной концентрации кальция. Показана возможность генерации таких же ПД в ответ на преходящее увеличение проводимости каналов кальцийзависимого хлорного тока, сопровождаемое увеличением проводимости каналов, которые связаны с P2X-рецепторами (соотношение проводимостей 95 к 5 %, как у прототипа). Для генерации ПД существенными были временные соотношения процессов нарастания указанных проводимостей, имитирующих конечный эффект активации M2/M3- и P2X-рецепторов. Эти результаты, полученные на данной весьма упрощенной модели, позволяют рассматривать ее как приемлемую отправную точку для разработки более полных моделей (в частности, отображающих каскады метаболических реакций, которые запускаются парасимпатическим воздействием).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гладкомышечная клетка (ГМК), детрузор мочевого пузыря (ДМП), метаботропная активация, математическая модель

ВВЕДЕНИЕ

Раскрытие биофизических механизмов, обеспечивающих нервную регуляцию гладкомышечных клеток (ГМК) детрузора мочевого пузыря (ДМП), является актуальной фундаментальной задачей клеточной физиологии и биофизики; решение данной задачи имеет существенное теоретическое и практическое значение. Значимость данной проблемы для медицины обусловлена тем, что функциональные расстройства нижних мочевыводящих

путей, в том числе неврогенные (например, гипер[1] или гипоактивность [2] ДМП), широко распространены [3–5], а диагностика и эффективное лечение этих расстройств затруднены в значительной мере из-за неполноты представлений о механизмах иннервации ГМК названных путей в норме и патологии [3, 6, 7]. Многие биофизические и физиологические аспекты возбуждения и сокращения ГМК остаются малоизученными из-за методических ограничений; соответствующим препаратам по своей природе присуща подвижность, затрудняющая устойчивую регистрацию электрических и концентрационных процессов. Возбуждение и сокращение ГМК ДМП связаны с активацией метаботропных мускариновых рецепторов ацетилхолином (АХ), выделяющимся из окончаний парасимпатических эфферентов [4, 8–10] – аксонов постганглионарных нейронов, расположенных в тазовом сплетении и стенке пузыря. Небольшой вклад (3–5 % в

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

²Коммунальное учреждение «Детская городская клиническая больница № 3 им. проф. М. Ф. Руднева» Днепропетровского областного совета (Украина).

Эл. почта: dnipro@biph.kiev.ua (С. М. Корогод);

kochenov_artem@yahoo.com (А. В. Коченов);

igor_makedonsky@yahoo.com (И. А. Македонский).

норме и несколько больший при некоторых видах патологии [11, 12]) обеспечивает также выделяющийся из окончаний парасимпатических постганглионарных нервов АТФ, который действует на пуринаргические ионотропные рецепторы [9, 12]. В описанной выше картине недостает многих принципиальных деталей. Не вполне ясна зависимость функционирования каналов входящего тока (в частности, кальциевого, обеспечивающего генерацию деполяризационных потенциалов действия – ПД) от активации метаболитных мускариновых рецепторов. Остаются предметом дискуссии роли, которые могут играть в генерации ПД и инициации сокращения ГМК разные рецепторы (холин- и пуринаргические), и пути повышения цитозольной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_i$) [8, 13]. Эти обстоятельства послужили основным мотивом для выполнения настоящей работы. Результаты, полученные одним из соавторов [14–18] в процессе диагностики, лечения и реабилитации детей с тяжелейшими врожденными пороками (комплексом «экстрофия мочевого пузыря + тотальная эписпадия» – КЭМПТЭ – и клоакальными формами атрезии прямой кишки), также указывали на высокую актуальность подобного исследования. По этим данным, в ДМП новорожденных как с экстрофией, так и с атрезией мускариновые рецепторы М2- и М3-типов по сравнению в нормой малочисленны (с преобладанием типа М2) или отсутствуют. Если при хирургической коррекции упомянутых пороков выявлялась сохранность парасимпатической иннервации тазовых органов [16, 17], становился возможным курс медицинской реабилитации с использованием электростимуляции мышц тазового дна и ЭМГ-контроля [18]. Успешность такого реабилитационного подхода показала необходимость дальнейшего совершенствования соответствующей программы, в частности определения физиологически и биофизически обоснованных мишеней и параметров электростимуляции, направленной на компенсацию дефицита парасимпатической иннервации мышц мочевого пузыря и предотвращение дегенеративных изменений. Все изложенное выше определило следующие задачи настоящей работы: 1) построить компьютерную модель ГМК ДМП, включающую в себя основные типы ионных каналов, насосов и кальциевых депо, присущих биологической клетке-прототипу, и отображающую процессы, которые связаны с активацией холинэргических и пуринаргических рецепторов; 2) определить реакции модельной ГМК на электрическую и парасимпатическую стимуля-

цию (в частности, выяснить возможную роль метаболитной активации каналов кальцийзависимого хлорного тока [19] в инициации ПД и повышении $[Ca^{2+}]_i$, обеспечивающем сократительную функцию ГМК).

ОПИСАНИЕ МОДЕЛИ

Модель ГМК мочевого пузыря, разработанная нами в программной среде «NEURON» [20], представляла собой мембранный цилиндр, длина и диаметр которого ($L = 100$ мкм и $d = 5$ мкм) соответствовали размерам прототипа [21–23] и были фиксированными (изометрический режим). Модель включала в себя характерные для прототипа ионные каналы и насосы основных типов, а также механизмы регуляции внутриклеточной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_i$). Отнесенный к единице площади мембраны ионный ток I_i (мкА/см²) через каналы каждого типа i описывали уравнениями типа Ходжкина–Хаксли: $I_i = g_i \cdot m^x \cdot h \cdot (E - E_i)$, где g_i – максимальная удельная проводимость, m и h – кинетические переменные активации и инактивации соответственно, x – порядок кинетической переменной, E – мембранный потенциал (мВ), E_i – потенциал инверсии (равновесия) тока (мВ). Кинетические переменные ($p = m, h$) описывали дифференциальными уравнениями вида $dp/dt = (p - p_\infty(E))/\tau_p(E)$, где $\tau_p = 1/(\alpha_p(E) + \beta_p(E))$ – постоянная времени активации или инактивации, а $p_\infty(E) = \alpha_p(E) \cdot \tau_p$ – стационарное значение переменной, описываемое алгебраическими уравнениями, которые включают в себя потенциалзависимые (или кальцийзависимые) константы скоростей прямого и обратного процессов – $\alpha_p(E)$ и $\beta_p(E)$ соответственно. Для кальциевого тока Т-типа $I_{CaT} = g_{CaT} \cdot m \cdot h \cdot (E - E_{Ca})$; $g_{CaT} = 6.74$ мСм/см²; $dm/dt = (m - m_\infty)/\tau_m$, $m_\infty = 1/(1 + \exp((-19.944 - E)/4))$, $\tau_m = 40 - 39.9/(1 + \exp((-77 - E)/20))$; $dh/dt = (h - h_\infty)/\tau_h$, $h_\infty = 1/(1 + \exp((-29.9303 - E)/5))$, $\tau_h = 44.241 - 30.896/(1 + \exp((-48.922 - E)/3.0929))$. Для кальциевого тока L-типа $I_{CaL} = g_{CaL} \cdot m \cdot h_E \cdot h_{Ca} \cdot (E - E_{Ca})$, где h_E – переменная медленной потенциалзависимой инактивации, h_{Ca} – переменная быстрой кальцийзависимой инактивации; $g_{CaL} = 35.9$ мСм/см²; $dm/dt = (m - m_\infty)/\tau_m$; $m_\infty = 1/(1 + \exp((4 - E)/6))$; $\tau_m = 14.617 - 13.692/(1 + \exp((-49.042 - E)/14.057))$; $dh_E/dt = (h - h_{E,\infty})/\tau_{hE}$, $h_{E,\infty} = 1/(1 + \exp((-24.4362 - E)/7))$, $\tau_{hE} = 312$ мс; $dh_{Ca}/dt = (h - h_{Ca,\infty})/\tau_{hCa}$, $h_{Ca,\infty} = 1/(1 + ([Ca^{2+}]_i/0.00026)^{3.9})$, $\tau_{hCa} = 21.4$ мс. Для натриевого тока $I_{Na} = g_{Na} \cdot m \cdot (E - E_{Na})$; $g_{Na} = 0.0016667$

См/см²; $dm/dt = (m - m_\infty)/\tau_m$, $\tau_m = 1/(\alpha_m + \beta_m)$, $m_\infty = \alpha_m \tau_m$, $\alpha = 1.74 \cdot (-E - 11)/(\exp((-E - 11)/12.94) - 1)$, $\beta = 0.06 \cdot (E - 5.9)/(\exp((E - 5.9)/4.47) - 1)$; $\tau_{m(Na)} = 1 - \exp(-0.025 \cdot (\alpha + \beta))$. Для калиевого тока задержанного выпрямления $I_K = g_K \cdot m^4 \cdot (E - E_K)$, $g_K = 6$ мСм/см²; $dm/dt = (m - m_\infty)/\tau_m$, $\tau_m = 1/(\alpha_m + \beta_m)$, $m_\infty = \alpha_m \tau_m$, $\alpha = 0.01 \cdot (-E + 55)/(\exp(-E + 55)/10) - 1$, $\beta = 0.125 \cdot \exp(-(E + 65)/80)$, $\tau_{m(K)} = 1 - \exp(-0.025 \cdot (\alpha + \beta))$. Для кальцийзависимого калиевого тока типа ВК $I_{K(Ca)} = g_{K(Ca)} \cdot m^2 \cdot (E - E_K)$; $g_{K(Ca)} = 4.5$ мСм/см²; $dm/dt = (m - m_\infty)/\tau_m$, $m_\infty = ([Ca^{2+}]_i/0.025)^2 / (1 + ([Ca^{2+}]_i/0.025)^2)$, $\tau_m = 33.3 / (1 + ([Ca^{2+}]_i/0.025)^2)$, $\tau_m \geq 0$. Для калиевого тока подсемейства Kir2.1 $I_{Kir2.1} = g_{Kir2.1} \cdot m \cdot h^2 \cdot (E - E_K)$, $g_{Kir2.1} = 1.6$ мСм/см²; $dm/dt = (m - m_\infty)/\tau_m$, $\tau_m = 1/(\alpha_m + \beta_m)$, $m_\infty = 1/(1 + \exp((E + 96.48)/23.26))$; $\tau_m = 3.7 - 3.37/(1 + \exp((E + 32.9)/27.93))$; $dh/dt = (h - h_\infty)/\tau_h$, $h_\infty = 1/(1 + \exp((E - 168.28)/44.13))$; $\tau_h = 0.85 + 306.3/(1 + \exp((E - 118.29)/27.23))$. Для тока утечки $I_{leak} = g_{leak} \cdot (E - E_{leak})$, $g_{leak} = 1,6667$ мСм/см². Для кальцийзависимого хлорного тока $I_{Cl(Ca)} = g_{Cl(Ca)} \cdot A(t) \cdot (E - E_{Cl})$, где $g_{Cl(Ca)} = g_{Cl(Ca),f} \cdot m \cdot p_f + g_{Cl(Ca),s} \cdot m \cdot p_s$. Указанная проводимость была подробно описана в нашей предыдущей работе [19]; она имеет две составляющие с максимальными значениями $g_{Cl(Ca),f} = g_{Cl(Ca),s} = 16.7$ мСм/см² (эти значения были фиксированными при электростимуляции), общей кинетикой кальцийзависимой активации (m), но разными кинетиками потенциалзависимой активации – быстрой (p_f) и медленной (p_s). В случае моделирования парасимпатической активации пороговой интенсивности максимальные значения $g_{Cl(Ca),f}$ и $g_{Cl(Ca),s}$ принимались одинаковыми и равными 3.629 мСм/см². Для неспецифического тока через пуринорецепторные каналы $I_{P2X} = g_{P2X} \cdot (E - E_{P2X})$; $g_{P2X} = 0.191$ мСм/см², что составляло 5 % общей максимальной проводимости каналов, активируемых при парасимпатических воздействиях; $g_{P2X}/(g_{Cl(Ca),f} + g_{Cl(Ca),s} + g_{P2X}) = 0.05$.

Потенциалы равновесия токов были следующими: $E_{Ca} = 40$ мВ [24, 25], $E_{Na} = 50$ мВ, $E_K = -77$ мВ, $E_{Cl} = -32$ мВ, $E_{P2X} = -7$ мВ и $E_{leak} = -70$ мВ.

Изменения мембранного потенциала E (мВ) определялись отнесенными к единице поверхности мембраны парциальными токами I_i (мкА/см²) через ионные каналы и насосы, а также током стимуляции I_{st} согласно уравнению

$$dE/dt = (I_{CaT} + I_{CaL} + I_{Na} + I_K + I_{K(Ca)} + I_{Kir2.1} + I_{SERCA} + I_{Cl(Ca)} + I_{P2X} + I_{leak} - I_{st})/C_m$$

где $C_m = 1.426$ мкФ/см² – удельная емкость мембраны, рассчитанная по экспериментальным данным [26], $I_{st} = I \cdot A(t)$, I – амплитуда тока, $A(t)$ – функ-

ция времени, определяющая форму импульса (см. ниже).

Изменения $[Ca^{2+}]_i$ в примембранном слое цитозоля (толщина $\delta = 0.1$ мкм) определялись потоками через каналы ($J_{Channels}$) и насосы (J_{PMCA}) сарколеммы и саркоплазматического ретикулума (J_{SERCA}), а также обобщенным потоком обмена с буферами и диффузии вглубь цитозоля (J_{Buff}):

$$d[Ca^{2+}]_i/dt = J_{Channels} + J_{SERCA} + J_{PMCA} + J_{Buff}$$

где $J_{Channels} = -(I_{CaT} + I_{CaL})/(2 \cdot F \cdot \delta)$, F – постоянная Фарадея; $J_{PMCA} = 0.0125 \cdot [Ca^{2+}]_i / ([Ca^{2+}]_i + 0.0015)$; $J_{SERCA} = 0.00833333 \cdot ([Ca^{2+}]_i/0.00026)^{0.75} - ([Ca^{2+}]_{SR} / 1.8)^{0.75} / (1 + ([Ca^{2+}]_i/0.00026)^{0.75} + ([Ca^{2+}]_{SR}/1.8)^{0.75})$, $[Ca^{2+}]_{SR}$ – концентрация Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме; $J_{Buff} = ([Ca^{2+}]_i - [Ca^{2+}]_{i,0})/\tau$, $\tau = 1$ мс – постоянная времени возврата $[Ca^{2+}]_i$ к базальному уровню $[Ca^{2+}]_{i,0}$.

В качестве стимулов использовали одиночные толчки деполяризирующего тока или параметрические изменения в виде преходящих увеличений проводимостей $g_{Cl(Ca)}$ и g_{pur} , имитирующих метаболическую и ионотропную составляющие парасимпатического действия соответственно. Форма импульса $A(t)$ была либо П-образной (стандартной для теоретических исследований регуляторных процессов разной природы, $A(t) = 1$ при $t_0 \leq t \leq t_{st}$, $A(t) = 0$ при $t < t_0$ или $t > t_{st}$), либо асимметричной колоколообразной, описываемой так называемой альфа-функцией (эта функция широко используется для описания синаптических процессов) [27]:

$$A(t) = 0, \text{ если } t < t_{act} \text{ или}$$

$$A(t) = ((t - t_0)/\tau_s) \cdot \exp(-(t - t_0)/\tau_s), \text{ если } t \geq t_{act}, \quad (1)$$

где t_0 – момент начала импульса, τ_s – время достижения пика, равного единице.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии вычислительных экспериментов выясняли способность модельной ГМК генерировать ПД с необходимым для сокращения повышением концентрации цитозольного кальция в условиях стимуляции деполяризирующим током в отсутствие парасимпатических воздействий. Такой протокол стимуляции использовали для имитации эффекта электростимуляции клеток-прототипов с частичным или полным дефицитом парасимпатической иннервации, что отмечается при некоторых

видах патологии, в частности КЭМПТЭ. Потенциал покоя модельной ГМК (–55 мВ) был близок к значениям, наблюдаемым в клетках-прототипах [28, 29]. В ответ на пороговый П-образный толчок тока (0.33 нА, 2 мс; рис. 1, А, вверху) клетка генерировала ПД амплитудой 55 мВ, за которым следовали следовые деполяризация и гиперполяризация

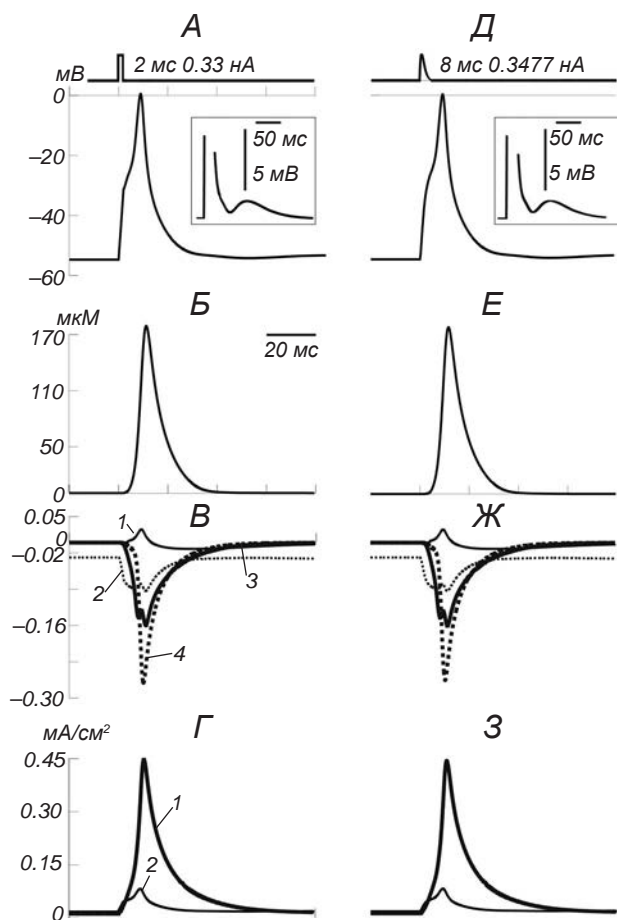


Рис. 1. Реакции модельной гладкомышечной клетки детрузора мочевого пузыря на стимуляцию толчком деполяризующего тока П-образной (А–Г) или колоколообразной (Д–Е) формы. А – потенциал действия – ПД (внизу), генерируемый в ответ на действие порогового П-образного толчка тока (0.33 нА, 2 мс) (вверху); на вставке – тот же отклик в увеличенном масштабе для наглядной демонстрации следовых процессов. Б–Г – сопровождающие ПД изменения внутриклеточной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_i$), плотностей входящих (хлорного, натриевого и кальциевых) и выходящих (калиевого и тока утечки) токов соответственно. Д–З – то же, что и А–Г, но форма толчка тока соответствовала альфа-функции (уравнение 1, пороговая амплитуда $A = 0.3477$ нА). На В, Ж: 1 – $I_{Cl(Ca)}$, 2 – I_{Na} , 3 – I_{CaT} , 4 – I_{CaL} ; на Г, З: 1 – I_K , 2 – I_{leak} . Калировка времени 20 мс общая для А–З везде, кроме вставок.

Рис. 1. Реакції модельної гладеньком'язової клітини детрузора сечового міхура на стимуляцію поштовхом деполяризуючого струму П-подібної (А–Г) та колоколоподібної (Д–Е) форми.

(А, внизу). Наблюдаемое при этом пиковое смещение мембранного потенциала до 0 мВ также соответствовало диапазону величин, описанных у ГМК детрузора морской свинки (–9 мВ [30]) и человека (20 мВ [8, 31]). Генерация ПД сопровождалась значительным (до 170 мкМ) преходящим повышением примембранной концентрации $[Ca^{2+}]_i$ (Б), обусловленным входящими кальциевыми токами (В). На пике деполяризации ПД компоненты L- и T-типов в общем кальциевом токе составляли 61.44 и 38.56 % соответственно, что близко к экспериментальным данным. Согласно последним, вклад тока T-типа в детрузоре составляет 20–30 % [32]. Среди выходящих токов (Г) суммарный ток через калиевые каналы всех типов в несколько раз превышал ток утечки. Следовые процессы после ПД, также присущие прототипам, были приурочены к интервалам доминирования соответствующих токов – кальцийзависимого хлорного, направленного внутрь в фазу следовой деполяризации (В, указано тонкой сплошной линией), и многокомпонентного калиевого, имеющего выходящее направление в фазу гиперполяризации (Г, указано толстой линией). Колоколообразный пороговый толчок тока (Д, вверху) вызывал отклики (Е–З), сходные с описанными выше.

Таким образом, набор ионных каналов плазматической мембраны модельной ГМК позволял воспроизвести как генерацию полноценного ПД, так и значительное повышение внутриклеточной концентрации кальция в ответ на электростимуляцию деполяризующими толчками тока разной формы.

В следующей (основной) серии вычислительных экспериментов проверяли пока не поддающиеся прямой экспериментальной верификации положения гипотезы о механизмах возбуждения ГМК ДМП в результате парасимпатической активации метаболотропных м-холинорецепторов и коактивации ионотропных P2X-пуринорецепторов. Метаболотропное действие упрощенно представляли преходящим увеличением проводимости кальцийзависимых хлорных каналов, т. е. конечным эффектом последовательности метаболических реакций, опуская на этом этапе подробное описание каждого из звеньев указанной цепи. Экспериментальные же данные о соотношении холин- и пуринергического компонентов (95 к 5 %) реакции ГМК-прототипа на парасимпатическую стимуляцию [12] отображали в модельной ГМК таким же соотношением соответствующих названным компонентам парциальных проводимостей $(g_{Cl(Ca),f} + g_{Cl(Ca),s})/(g_{P2X})$ в суммарной максимальной проводимости $(g_{Cl(Ca),f} + g_{Cl(Ca),s} + g_{P2X})$.

Преходящее увеличение последней и рассматривалось как результат парасимпатического действия.

В ответ на колоколообразное повышение такой суммарной проводимости до порогового уровня

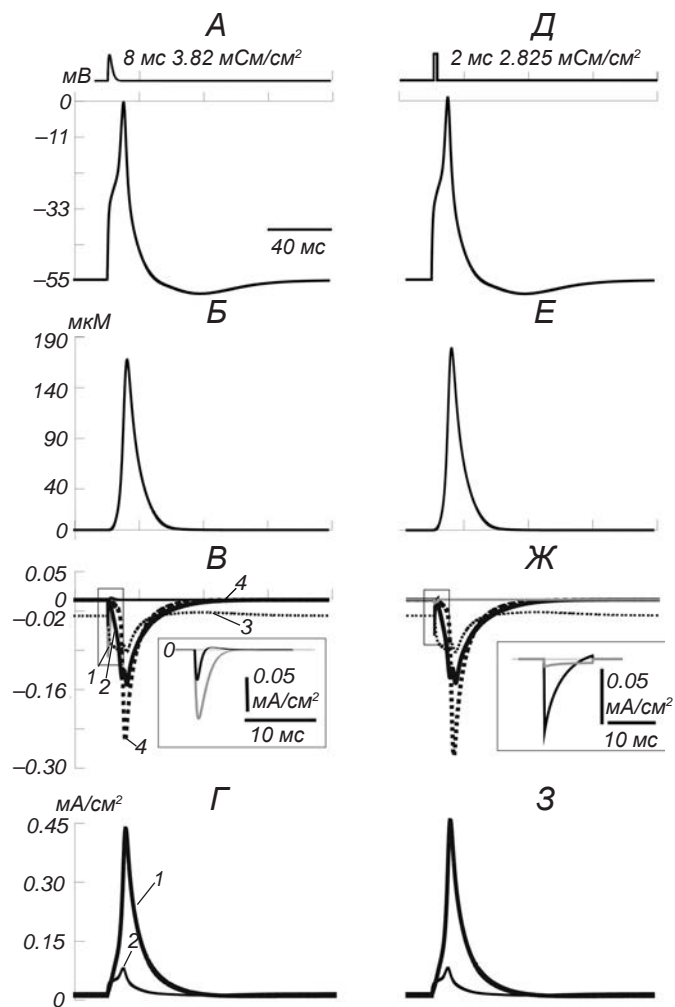


Рис. 2. Реакции модельной гладкомышечной клетки детрузора мочевого пузыря на импульсное увеличение проводимости каналов кальцийзависимого хлорного тока и неспецифического тока через пуринергические рецепторные каналы. Вверху на *A* и *Д* показаны воздействия, соответствующие альфа-функции и П-образные, которые вызвали реакции (*A*–*Г*) и изменения проводимости (*Д*–*З*); внизу – изменения мембранного потенциала. *Б*, *Е* – изменения внутриклеточной примембранной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_i$). *В*, *Ж* – входящие токи; на вставке – выделенный фрагмент в увеличенном масштабе (видны разные соотношения I_{P2X} и $I_{Cl(Ca)}$), а также изменение направления $I_{Cl(Ca)}$. *Г*, *З* – выходящие токи. На *В*, *Ж*: 1 – I_{P2X} , 2 – $I_{Cl(Ca)}$, 3 – I_{Na} , 4 – I_{CaT} , 5 – I_{CaL} ; на *Г*, *З* – то же, что и *Г*, *З* на рис. 1. Калибровка времени 40 мс общая для *A*–*З* везде, кроме вставок.

Рис. 2. Реакції моделі гладеньком'язової клітини детрузора сечового міхура на імпульсне збільшення провідності каналів кальційзалежного хлорного струму та неспецифічного струму через пуринергічні рецепторні канали.

3.82 мСм/см² (рис. 2, *A*, вверху) модельная ГМК генерировала ПД приблизительно такой же амплитуды (54.4 мВ) и формы (*A*, внизу), как и при электрической стимуляции (ср. с рис. 1). Такая амплитуда несколько выше, чем зарегистрированная в ГМК прототипа (40 мВ [30], рис. 1, *Вс*). Следует отметить, что цитируемые данные [30] относятся к ПД, который генерировался в процессе непрерывной импульсной активности ГМК, а не активности, вызванной действием одиночного парасимпатического стимула. В наших модельных экспериментах амплитуда ПД также становилась ниже при приложении серии стимулов. Связанное с одиночным ПД (рис. 2, *A*) преходящее повышение примембранной концентрации $[Ca^{2+}]_i$ до пикового значения 167.3 мкМ (*Б*) обеспечивалось кальциевым током, в котором нормированные значения измеренных на пике ПД компонентов L- и T-типов соответствовали 60.77 и 39.23 % (*В*). Это было также достаточно близко к уже упомянутому соотношению у клеток-прототипов [32]. Входящее направление кальцийзависимого хлорного тока менялось на выходящее, когда связанное с ПД деполяризационное смещение мембранного потенциала превосходило уровень $E_{Cl} = -32$ мВ, а пиковое значение указанного тока было почти вдвое меньшим, чем таковое у тока через пуринергические рецепторные каналы (I_{P2X}). Пиковая проводимость последних в 19 раз меньше, чем у каналов кальцийзависимого хлорного тока (*В*, вставка). Данное обстоятельство обусловлено существенно более значительным деполяризационным потенциалом равновесия I_{P2X} ($E_{P2X} = -7$ мВ). Как и при электрической стимуляции (рис. 1, *Г*, *З*), калиевый компонент выходящего тока во много раз превосходил компонент утечки (рис. 2, *Г*).

Были исследованы также реакции модельной ГМК на увеличение тех же, что и в предыдущей серии, проводимостей, но в виде короткого П-образного смещения (рис. 2, *Д*–*З*). Такой подход заимствован из теории систем регулирования объектов небиологической природы, где реакции на действие подобного «стандартного стимула», известные как импульсные переходные характеристики, изучаются с целью выявления характерных свойств системы, трудно выявляемых по отклику на входные сигналы сложной (произвольной) формы. Применение подобного не имеющего физиологической аналогии воздействия выявило следующие заслуживающие внимания особенности регулирования возбудительных процессов в ГМК. Прежде всего, была обнаружена характерная чувствитель-

ность трансмембранных токов к временным параметрам парасимпатической активации, в частности к скорости увеличения проводимости. Несмотря на внешнее сходство электрических (ср. *А* и *Д*) и концентрационных (ср. *Б* и *Е*) откликов, можно видеть, что вызванные действием П-образного (т. е. нарастающего мгновенно) стимула входящие токи через кальциевые каналы L-типа, кальцийзависимые хлорные каналы и неспецифические P2X-рецепторные каналы (*В*) существенно отличаются от таковых, вызванных нарастающим за конечное время толчком тока, который соответствовал альфа-функции (*Ж*). Предельное сокращение времени нарастания в условиях П-образного воздействия приводит к одновременной быстрой активации $I_{Cl(Ca)}$ и I_{P2X} , соотношение амплитуд которых в данном случае близко к соотношению соответствующих пиковых проводимостей (95:5), так как движущие потенциалы для обоих токов в начале отклика сравнимы. Однако при этом быстрее, чем при колоколообразном стимуле, активируется ток L-типа, заметное увеличение которого вслед за таковым тока Т-типа приводит к соответствующему увеличению концентрационного отклика (*Е*) и небольшому увеличению амплитуды ПД (*Д*).

Результаты ряда вспомогательных модельных экспериментов (здесь они не иллюстрируются, поскольку будут предметом отдельной работы) дали дополнительные сведения о том, сколь значима для возбудимости ГМК чувствительность деполяризационных механизмов к временным характеристикам парасимпатического стимула, его холинергической и пуринергической составляющих, выявленная с помощью П-образной стимуляции. Это позволило обозначить направления дальнейших исследований. Характерные изменения откликов (рис. 2, *А–Г*) наблюдались в условиях модификации параметров альфаобразного парасимпатического стимула. Так, при задержке активации холинергической составляющей относительно P2X-составляющей проводимости даже на 1 мс или блокировании последней клетка генерировала не ПД, а лишь локальный ответ почти вдвое меньшей амплитуды. В данном случае генерацию ПД можно было возобновить, увеличивая максимальную P2X-проводимость и замедляя ее нарастание так, чтобы ее максимум достигался приблизительно в одно и то же время с максимумом «задержанной» холинергической составляющей. В условиях полной блокады P2X-проводимости ГМК могла генерировать ПД при небольшом деполяризационном смещении потенциала равновесия каль-

цийзависимого хлорного тока (от -32 до -30.7 мВ) и приложении повторных холинергических стимулов, следующих с интервалами до 750 мс. В этом случае первый отклик в серии был локальным, а за ним следовали ПД амплитудой 45.6–43.1 мВ, в процессе генерации которых наблюдалось доминирование кальциевого тока Т-типа. Заслуживает внимания также снижение порога генерации ПД, вызванного приложением толчка тока на фоне увеличенной P2X-проводимости и неизменной проводимости каналов $I_{Cl(Ca)}$; уменьшение порогового тока было близким к линейному с крутизной около 0.52 нА/(мСм/см²).

Полученные результаты в целом дают основания для следующего заключения. Разработанная модель ГМК, весьма упрощена и требует дальнейшего совершенствования и более детального исследования (в частности того, как режимы ее активности зависят от соотношения компонентов мембранной проводимости и их кинетических параметров). Тем не менее, она способна воспроизводить генерацию ПД в ответ как на приложение деполяризующего тока извне (рис. 1), так и на увеличение проводимости каналов, являющихся мишенями комбинированного метаботропного и ионотропного парасимпатического действия (рис. 2). Отмеченная выше близость откликов модельной ГМК по ряду признаков к таковым, описанным у клеток-прототипов в сходных условиях, позволяет считать ее приемлемой отправной точкой для разработки более сложных моделей (с возможностью дополнения пока не учтенными или не детализированными механизмами, присутствующими прототипу). В этом плане речь может идти о внутриклеточных сигнальных процессах, начиная от активации метаботропных рецепторов и кончая зависимой от действия внутриклеточных метаболитов активацией ионных каналов. Возможны также спецификация и расширение набора ионных каналов, в частности добавление в модель описанных у прототипа каналов аноктаминового семейства.

Предложенная модель дает основания для суждений о предпочтительности одних положений гипотезы относительно механизмов метаботропного возбуждения ГМК (увеличение проводимости каналов кальцийзависимого хлорного тока) по сравнению с другими (обусловленное фосфорилированием изменение лишь кинетических характеристик потенциалзависимых кальциевых каналов) (рис. 2). Результаты, полученные на модели, также привлекают внимание к новым теоретическим аспектам парасимпатической иннервации ГМК детрузора –

таким, как соотношения скоростей «одноступенчатой» реакции активации ионотропных P2X-каналов и «многоступенчатых» реакций на пути от активации метаболитных M2/M3-холинорецепторов до изменения состояния ионных каналов входящего тока. Наконец, модель имеет также определенное практическое значение. Полученные результаты указывают на направления разработки биофизически обоснованных методов и средств реабилитации больных с патологией парасимпатических механизмов возбудимости ГМК детрузора, связанной с дефицитом м-холинорецепторов. В частности, полученные на модели предварительные данные о снижении порога ПД, который вызывался электростимуляцией на фоне изолированной активации P2X-каналов, позволяют говорить о новых подходах к методам такой реабилитации с использованием комбинированной электростимуляции и пурино-миметической премедикации, а также биофизически и физиологически обоснованной оптимизации этих комбинированных воздействий.

Авторы выражают благодарность проф. Я. М. Шубе за конструктивные критические замечания.

Авторы настоящей работы – С. М. Корогод, А. В. Коченов и И. А. Македонский – подтверждают, что у них нет конфликта интересов.

С. М. Корогод¹, А. В. Коченов¹, И. О. Македонский²

БИОФИЗИЧНИЙ МЕХАНІЗМ ПАРАСИМПАТИЧНОГО ЗБУДЖЕННЯ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВОЇ КЛІТИНИ ДЕТРУЗОРА СЕЧОВОГО МІХУРА: МОДЕЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

¹Міжнародний центр молекулярної фізіології (Дніпропетровське відділення) НАН України (Україна).

²Комунальний заклад «Дитяча міська клінічна лікарня № 3 ім. проф. М. Ф. Руднева» Дніпропетровської обласної ради (Україна).

Резюме

З використанням формалізму Ходжкіна–Хакслі розроблено комп'ютерну модель гладеньком'язової клітини (ГМК) детрузора сечового міхура, що включає в себе притаманні клітинам-прототипам основні типи іонних каналів і насосів, а також механізми регуляції внутрішньоклітинного кальцію. На моделі досліджені біофізичні механізми генерації потенціалів дії (ПД), необхідних для ініціації скорочення, та кальцієвих транзєнтів у відповідь на парасимпатичну активацію метаболитних M2/M3-холинорецепторів та коактивацію іонотропних P2X-пуринорецепторів. Модельна ГМК у відповідь на поштовх деполяризуючого струму генерува-

ла ПД, за низкою ознак подібний до реальних ПД і супроводжуваний тимчасовим збільшенням внутрішньоклітинної концентрації кальцію. Показана можливість генерації таких самих ПД у відповідь на короткочасне збільшення провідності каналів кальційзалежного хлорного струму, супроводжуване збільшенням провідності каналів, які зв'язані з P2X-рецепторами (співвідношення провідностей 95 до 5 %, як у прототипу). Для генерації ПД істотними були часові співвідношення процесів зростання вказаних провідностей, котрі імітували кінцевий ефект активації M2/M3- та P2X-рецепторів. Ці результати, отримані на даній вельми спрощеній моделі, дозволяють розглядати її як прийнятну відправну точку для розробки більш повних моделей, зокрема відображуючих каскади метаболічних реакцій, що запускаються парасимпатичною дією.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. A. Ruffion, D. Castro-Diaz, H. Patel, et al., "Systematic review of the epidemiology of urinary incontinence and detrusor overactivity among patients with neurogenic overactive bladder," *Neuroepidemiology*, **41**, Nos. 3/4, 146-155 (2013).
2. N. I. Osman, C. R. Chapple, P. Abrams, et al., "Detrusor underactivity and the underactive bladder: a new clinical entity? A review of current terminology, definitions, epidemiology, aetiology, and diagnosis," *Eur. Urol.*, **65**, No. 2, 389-398 (2014).
3. E. Cortes and C. Kelleher, "The cost of not treating overactive bladder," *Eur. Urol. Rev.*, **2**, No. 1, 70-72 (2007).
4. D. J. Sellers and R. Chess-Williams, "Muscarinic agonists and antagonists: effects on the urinary bladder," in: *Muscarinic Receptors. Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 208, A. D. Fryer, A. Christopoulos, and N. M. Nathanson (eds.), Springer, Heidelberg, Dordrecht, London, et al. (2012), pp. 375-400.
5. С. Н. Зоркин, Т. Н. Гусарова, С. А. Борисова, "Нейрогенный мочевой пузырь у детей. Возможности фармакотерапии", *Мед. науч.-практ. журн. «Лечащий врач»*, **1**, № 1, 37-39 (2009).
6. K. E. Andersson, "New roles for muscarinic receptors in the pathophysiology of lower urinary tract symptoms," *BJU Int.*, **86**, No. 2, 36-42 (2000).
7. S. S. Hegde, "Muscarinic receptors in the bladder: from basic research to therapeutics," *Br. J. Pharmacol.*, **147**, No. 2, 80-87 (2006).
8. K. E. Andersson and A. Arner, "Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology," *Physiol. Rev.*, **84**, No. 3, 935-986 (2004).
9. C. J. Fowler, D. Griffiths, and W. C. de Groat, "The neural control of micturition," *Nat. Rev. Neurosci.*, **9**, No. 6, 453-466 (2008).
10. 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, Heidelberg, Dordrecht, London, et al. (2011), pp. 376-389.
11. G. Burnstock, "Expanding field of purinergic signaling," *Drug. Dev. Res.*, **52**, No. 1, 1-10 (2001).
12. G. Burnstock, "Purinergic signalling in the gastrointestinal

- tract and related organs in health and disease,” *Purinerg. Signal.*, **10**, No. 1, 3-50 (2014).
13. E. P. Frazier, S. L. Peters, A. S. Braverman, et al., “Signal transduction underlying the control of urinary bladder smooth muscle tone by muscarinic receptors and beta-adrenoceptors,” *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **377**, Nos. 4/6, 449-462 (2008).
 14. I. 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, “Морфологічні та функціональні властивості сечового міхура у дітей з аноректальними аномаліями”, *Хірургія дит. віку*, **4**, № 4, 46-52 (2007).
 16. І. О. Македонський, “Профілактика ураження органів сечостатевої системи під час хірургічної корекції аноректальних вад у дітей”, *Урологія*, **15**, № 2 (57), 28-31 (2011).
 17. Пат. 63684 Україна, МПК (2011.01) А61В 17/00, *Способ лікування аноректальних вад розвитку*, І. О. Македонський, опубл. 10.10.11, Бюл. № 19.
 18. 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).
 19. С. М. Корогод, А. В. Коченов, “Математическая модель кальцийзависимого хлорного тока в гладкомышечной клетке”, *Neurophysiology/Нейрофизиология*, **45**, № 5/6, 369-378 (2013).
 20. M. L. Hines and N. T. Carnevale, “The NEURON simulation environment,” *Neural. Comput.*, **9**, No. 6, 1179-1209 (1997).
 21. *Физиология человека*, под ред. В. М. Покровского и Г. Ф. Коротько, Медицина, Москва (2003).
 22. *Физиология человека*, под ред. Р. Шмидта и Г. Тевса, Мир, Москва (2005).
 23. F. Martini, J. Lindsley Nath, and E. F. Bartholomew, *Fundamentals of Anatomy & Physiology*, Publ. Pearson Educat. Inc., San Francisco (2011).
 24. D. Lipscombe, “L-type calcium channels: highs and new lows,” *Circ. Res.*, **90**, No. 9, 933-935 (2002).
 25. M. A. Hollywood, S. Woolsey, I. K. Walsh, et al., “T- and L-type Ca²⁺ currents in freshly dispersed smooth muscle cells from the human proximal urethra,” *J. Physiol.*, **550**, Part 3, 753-764 (2003).
 26. K. L. Hristov, M. Chen, W. F. Kellett, et al., “Large-conductance voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channels regulate human detrusor smooth muscle function,” *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **301**, No. 4, 903-912 (2011).
 27. N. T. Carnevale and M. L. Hines, *The NEURON Book*, Cambridge Univ. Press, Cambridge (2006).
 28. H. Hashitani and A. F. Brading, “Tonic basis for the regulation of spontaneous excitation in detrusor smooth muscle cells of the guinea-pig urinary bladder,” *Br. J. Pharmacol.*, **140**, No. 1, 159-169 (2003).
 29. N. J. Bramich and A. F. Brading, “Electrical properties of smooth muscle in the guinea-pig urinary bladder,” *J. Physiol.*, **492**, Part 1, 185-198 (1996).
 30. H. Hashitani and A. F. Brading, “Electrical properties of detrusor smooth muscles from the pig and human urinary bladder,” *Br. J. Pharmacol.*, **140**, No. 1, 146-158 (2003).
 31. G. P. Sui, C. Wu, and C. H. Fry, “The electrophysiological properties of cultured and freshly isolated detrusor smooth muscle cells,” *J. Urol.*, **165**, No. 2, 627-632 (2001).
 32. C. H. Fry, G. Sui, and C. Wu, “T-type Ca²⁺ channels in non-vascular smooth muscles,” *Cell Calcium*, **40**, No. 2, 231-239 (2006).