

## БИОФИЗИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ГЛАДКОМЫШЕЧНОЙ КЛЕТКЕ ДЕТРУЗОРА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ ПРИ РЕАБИЛИТАЦИОННОЙ СТИМУЛЯЦИИ ПАРАСИМПАТИЧЕСКИХ ЭФФЕРЕНТОВ: МОДЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Поступила 15.04.15

На компьютерной модели гладкомышечной клетки (ГМК) детрузора мочевого пузыря (ДМП) мы исследовали сопряженные изменения мембранного потенциала (МП), парциальных трансмембранных токов и внутриклеточной концентрации кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ), вызванные парасимпатической стимуляцией, с целью определить биофизические основы для выбора параметров медицинской реабилитационной электростимуляции ДМП. Ионно-метаболические эффекты такой стимуляции, имеющие разные латентные периоды (ЛП), имитировали соответственно увеличением проводимости пуринорецепторных каналов сарколеммы и задержанным на 70 мс увеличением проницаемости кальциевых каналов саркоплазматического ретикула (депо), чувствительных к инозитолтрифосфату (IP3) – конечному продукту цепи реакций, которые запускаются активацией мускариновых холинорецепторов. ГМК отвечала на одиночную стимуляцию генерацией потенциала действия (ПД), близкого к таковому у прототипа. Приложение длительной серии одинаковых стимулов вызывало после переходного процесса стационарные вынужденные колебания МП и  $[Ca^{2+}]_i$ , размах которых уменьшался, а средний уровень увеличивался при уменьшении межстимульных интервалов (МСИ). Установлено, что для конечного результата стимуляции определяющими (а значит, нуждающимися в первоочередном экспериментальном уточнении) являются такие параметры парасимпатического действия, как длительности пуринового и мускаринового компонентов и задержка между ними. Показано, что при стимуляции с МСИ, более короткими, чем упоминаемая задержка, приложение очередного стимула активирует P2X-каналы ранее окончания задержки активации IP3-каналов, вызванной действием предшествующего стимула. Это фактически эквивалентно сокращению интервала между последовательными активациями P2X- и IP3-каналов. Получены простые выражения, которые позволяют по известной разности ЛП пуринового и мускариновых эффектов парасимпатической стимуляции рассчитывать МСИ, обеспечивающие более эффективную реабилитационную стимуляцию парасимпатических нервов ДМП.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** математическая модель, гладкомышечная клетка (ГМК), детрузор мочевого пузыря (ДМП), парасимпатическая иннервация, пуринорецепторы, мускариновые холинорецепторы, электростимуляция.

### ВВЕДЕНИЕ

Электрическая стимуляция органов и тканей, мишенью которой являются электровозбудимые нервные и мышечные клетки, широко применяется в медицине. Это обуславливает необходимость углубленного исследования реакций клеток-мишеней на подобную стимуляцию, в частности с использованием компьютерного моделирования [1–3]. Наша работа продолжает модельные исследования процессов, вызываемых в гладкомышечных

<sup>1</sup> Днепропетровское отделение Международного центра молекулярной физиологии НАН Украины, Днепр (Украина).

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

<sup>3</sup> 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).

клетках (ГМК) детрузора мочевого пузыря (ДМП) чрезклеточной электростимуляцией. Последняя используется в ходе реабилитации пациентов, прооперированных по поводу врожденных урологических и аноректальных пороков развития. Известно, что для подобных отклонений характерен дефицит клеточных М2/М3-холинорецепторов [4]. Эффекты прямого действия электростимуляции на данные клетки были детально рассмотрены ранее [3]. Теперь же мы сосредоточили внимание на процессах, вызываемых активацией мембранных рецепторов ГМК ДМП медиаторами, высвобождаемыми из окончаний парасимпатических нервов, возбужденных приложением электрических стимулов. Такими медиаторами являются ацетилхолин и АТФ, которые активируют соответственно метаболитические мускариновые холинорецепторы (типов М2/М3) и ионотропные пуриновые рецепторы (типа Р2Х) [5]. Известно, что активация названных рецепторов играет важную роль в инициации сокращений ДМП человека [6–11]. В здоровом мочевом пузыре человека роль пуриновых рецепторов по сравнению с таковой М-холинорецепторов незначительна, однако она существенно возрастает с возрастом и при ряде патологий [10, 12, 13]. В норме пуринергический компонент парасимпатической котрансмиссии составляет менее 3–5 % общего действия, но в случаях патологии он может достигать 40 % [12]. Многие аспекты парасимпатической иннервации ГМК ДМП остаются пока неизученными из-за неизбежных существенных методических ограничений при экспериментальном исследовании этих клеток.

Полученные нами данные впервые иллюстрируют сопряженные электрические и концентрационные процессы, развивающиеся в ГМК ДМП под действием нейромедиаторов. Такие нейромедиаторы выделяются окончаниями парасимпатических эфферентов после поступления к ним потенциалов действия (ПД), вызванных электростимуляцией разной частоты, которая используется в ходе реабилитационных процедур. Эти процессы пока недоступны наблюдению в натуральных экспериментах. Подобные данные существенно конкретизируют роль, которую в упомянутых процессах играют соотношения временных параметров электростимуляции (т.е. времени активации соответствующих рецепторов), с одной стороны, и кинетических характеристик ионных каналов, насосов и процессов буферизации/диффузии внутриклеточного кальция – с другой. Эти результаты указывают на необ-

ходимость углубленного исследования упомянутых кинетических характеристик и их соотношений, что создаст биофизические основы для оптимизации параметров реабилитационной электростимуляции.

## ОПИСАНИЕ МОДЕЛИ

Исследования были выполнены на разработанной нами в программной среде НЕЙРОН [14] и подробно описанной ранее модели ГМК ДМП [1–3]. Модель была подвергнута некоторым модификациям, позволяющим отображать эффекты парасимпатической активации. В частности, модифицированное уравнение динамики внутриклеточной концентрации кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ), наряду с присутствовавшими в данном уравнении ранее потоками этих ионов через кальциевые каналы L- и T-типа ( $J_{Channels}$ ), насосы сарколеммы ( $J_{PMCA}$ ) и каналы депо саркоплазматического ретикулула ( $J_{SERCA}$ ), а также с обобщенным потоком обмена с буферами и диффузии вглубь цитозоля ( $J_{Buff}$ ) [2, 3], включало в себя также поток высвобождения  $Ca^{2+}$  из депо ( $J_{IP3R}$ ) через каналы, активируемые инозитолтрифосфатом (IP3). Последний является финальным метаболитом цепи реакций, инициируемых приложением парасимпатических стимулов:

$$d[Ca^{2+}]_i/dt = J_{Channels} + J_{SERCA} + J_{PMCA} + J_{Buff} + J_{IP3R}$$

В уравнении потока  $J_{IP3R} = P_{IP3R} \cdot ([Ca^{2+}]_{SER} - [Ca^{2+}]_i)$  коэффициент проницаемости IP3-рецепторных каналов мембраны депо определялся как  $P_{IP3R} = \alpha(t) \cdot P_{IP3Rmax}$ , где  $P_{IP3Rmax} = 0.014 \text{ мс}^{-1}$  соответствует максимальной проницаемости, отнесенной к единице длины клетки,  $\alpha(t)$  – функция, описывающая временной ход изменения проницаемости, вызванного действием парасимпатического стимула (так называемая альфа-функция, см. ниже), а  $[Ca^{2+}]_{SER}$  – концентрация  $Ca^{2+}$  в депо (начальное значение 1 мМ). Кроме того, были несколько модифицированы параметры в уравнениях ионных токов. По сравнению с таковыми в исходной модели [2, 3] были изменены значения потенциала полуактивации ( $V_h$ ) кальциевых каналов L-типа (с 4.0 на –4.7422 мВ) и T-типа (с –19.944 на –25.698 мВ), постоянной времени активации кальцийзависимых калиевых каналов типа SK (с 11 на 48 мс), а так-

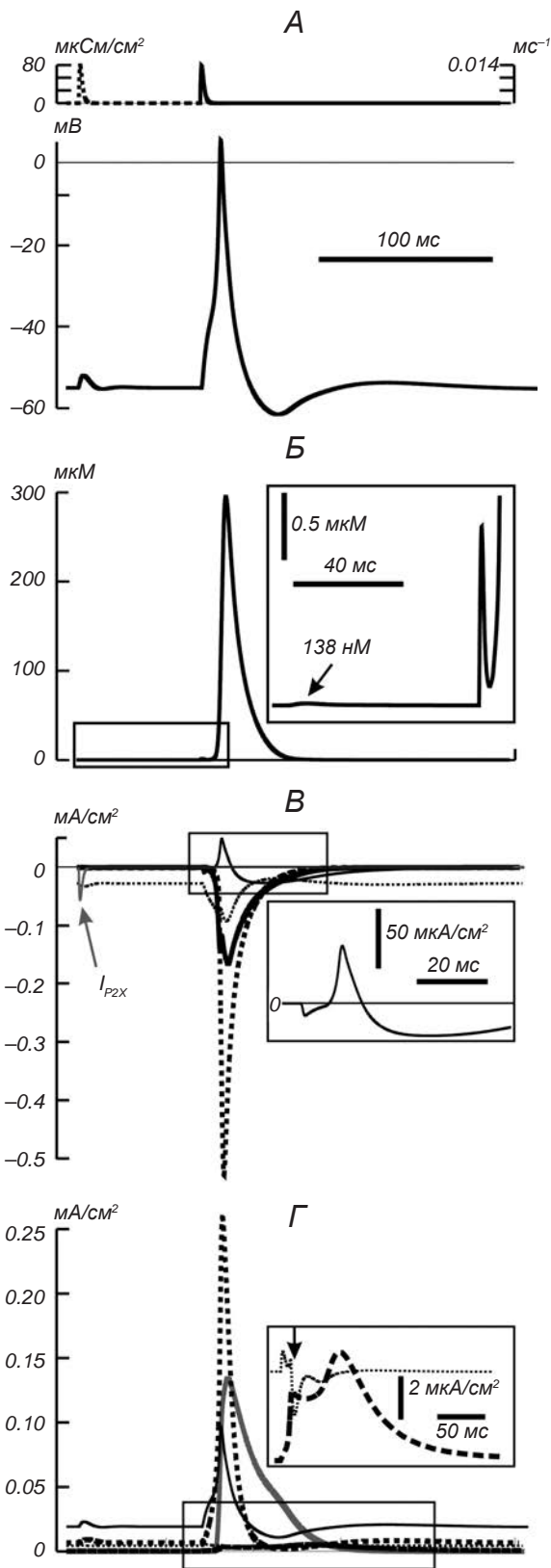
же величина невариативной составляющей постоянной времени активации кальцийзависимых калиевых каналов типа ВК (с 5 на 11 мс) – параметр  $b$  в уравнении  $\tau_m = (p(\text{Ca})-1) \cdot (f(V) - 0.2)/0.8 + b$  [15].

Метаботропный и ионотропный эффекты действия одиночного парасимпатического стимула моделировали импульсным увеличением, соответственно, проницаемости IP3-чувствительных каналов депо саркоплазматического ретикула (СР) –  $P_{\text{IP3R}}(t) = P_{\text{IP3Rmax}} \cdot \alpha(t)$  – и проводимости P2X-рецепторных каналов сарколеммы  $G_{\text{P2X}}(t) = G_{\text{P2Xmax}} \cdot \alpha(t)$ , где  $\alpha(t)$  – так называемая альфа-функция. Эта широко применяемая в моделировании синаптических процессов функция определяет асимметричную колоколообразную форму импульса и описывается такими уравнениями:  $\alpha(t) = 0$ , если  $t < t_0$ , или  $\alpha(t) = ((t - t_0)/t_s) \cdot \exp(- (t - t_0)/t_s)$ , если  $t \geq t_0$ , где  $t_0$  и  $t_s$  – моменты начала и пика  $\alpha(t_s) = 1$  импульса соответственно [14]. Варьируемыми параметрами, определяющими  $P_{\text{IP3R}}(t)$  и  $G_{\text{P2X}}(t)$ , были соответственно  $t_s = t_{\text{sIP3R}}$  и  $t_s = t_{\text{sP2X}}$ , а также  $t_0 = t_{\text{0IP3R}}$  и  $t_0 = t_{\text{0P2X}}$ . Известное из экспериментов различие латентных периодов (ЛП) пуринаргического (раннего) и мускаринового (позднего) компонентов ответа ГМК ДМП на стимуляцию парасимпатических нервов [15–17] в модели было отражено задержкой активации проницаемости  $P_{\text{IP3R}}(t)$  относительно активации проводимости  $G_{\text{P2X}}(t)$  —  $\Delta t = t_{\text{0IP3R}} - t_{\text{0P2X}} = 70$  мс (будем называть ее базовой задержкой в отличие от фактической – см. ниже). Исследовали также эффекты указанных выше парасимпатических воздействий, организованных в пачки с разными частотами следования  $f$  и, соответственно, разными межстимульными интервалами (МСИ)  $\Delta T = 1/f$ . Такая организация характерна для протоколов пачечной электростимуляции, применяемой в клинике в комплексе реабилитационных процедур [3].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*Реакция ГМК на действие парасимпатического стимула.* Одиночный парасимпатический стимул, обуславливающий последовательную (с интервалом  $\Delta t = 70$  мс) активацию проводимости P2X-каналов сарколеммы  $G_{\text{P2X}}(t)$  и проницаемости IP3-каналов СР  $P_{\text{IP3R}}(t)$  (каждая величина достигала максимума за  $t_{\text{sP2X}} = t_{\text{sIP3R}} = 0.8$  мс), вызывал в модельной ГМК ответ с двумя разделенными во времени компонентами (рис. 1). Первый из них – пу-

риновый, обусловленный током через P2X-каналы ( $I_{\text{P2X}}$ ), – был представлен начальной низкоамплитудной (6.12 мВ относительно потенциала покоя  $E_r = -55$  мВ) деполяризацией, а второй – мускариновый – задержанной (поздней) высокоамплитудной деполяризацией, переходившей в полноценный ПД с пиковым значением 60.2 мВ и следовыми гипер- и деполяризацией (амплитуды 6.53 и 1.22 мВ соответственно) (А). ПД запускался кальцийзависимым хлорным током ( $I_{\text{Cl(Ca)}}$ ) и поддерживался в основном токами через потенциалзависимые кальциевые каналы  $I_{\text{CaT}}$  и  $I_{\text{CaL}}$  (В). Значение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  незначительно повышалось от базального уровня 123.7 до 138 нМ во время начальной деполяризации за счёт активированных кальциевых токов. Во время генерации ПД оно вначале быстро повышалось до 1.441 мкМ за счёт потока из депо  $J_{\text{IP3R}}$  (что согласуется с данными экспериментов [18, 19]). После короткого (~ 3 мс) спада это значение возобновляло рост до пика 295 мкМ (Б), который был обусловлен трансмембранным кальциевым током (В). В составе последнего L- и T-компоненты на пике ПД составляли 74 и 26 % соответственно, что близко к экспериментальным данным [20]. Примечательной была знакпеременность  $I_{\text{Cl(Ca)}}$ . После инициации ПД  $I_{\text{Cl(Ca)}}$  постепенно уменьшался и через 8.34 мс менял своё первоначальное деполяризующее направление на гиперполяризующее. При этом мембранный потенциал (МП) становился более деполяризационным, чем потенциал равновесия для хлорного тока ( $E_{\text{Cl}} = -32$  мВ). Через 17.59 мс после начала высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из депо и через 6.12 мс после пика ПД данный ток вновь инвертировался, что способствовало развитию следовой деполяризации. Среди выходящих токов (Г) преобладал ток через потенциалзависимые калиевые каналы ( $I_{\text{Kv}}$ ). Вторым по величине был ток через кальцийзависимые калиевые каналы типа ВК ( $I_{\text{BK}}$ ), а третьим – ток утечки ( $I_{\text{Leak}}$ ). Гораздо меньшими были калиевые токи через каналы типов Kir 2.1 ( $I_{\text{Kir2.1}}$ ) и SK ( $I_{\text{SK}}$ ) (см. вставку на рис. 1, Г). Следовые процессы после ПД, также присущие клеткам-прототипам, были обусловлены доминированием соответствующих токов. Роль  $I_{\text{Kv}}$  и  $I_{\text{Kir2.1}}$  заключалась в формировании потенциала покоя и ограничении амплитуды ПД, тогда как  $I_{\text{BK}}$ , активировавшийся несколько позже, ограничивал амплитуду и продолжительность ПД и определял амплитуду следовой гиперполяризации. Калиевый ток через SK-каналы, которые активировались наиболее поздно (максимум на



~50.82 мс после пика ПД), определял продолжительность следовой гиперполяризации (см. вставку на рис. 1, Г).

Таким образом, модельная ГМК ДМП отвечала на приложение парасимпатического стимула генерацией полноценного ПД, который имел параметры, близкие к таковым у прототипа, и сопровождался необходимым для сокращения существенным преходящим повышением  $[Ca^{2+}]_i$ .

Такое поведение модельной клетки было достаточно устойчивым (робастным) по отношению к вариации параметров. Для генерации ПД критичным параметром было время нарастания проницаемости IP3-каналов депо (при  $t_{sIP3R} > 2.7$  мс деполяризация не достигала порога генерации ПД). Вариация других параметров изменяла характеристики ПД, но не предотвращала его генерации. Так, например, увеличение максимальной проницаемости  $P_{IP3R}$  до  $0.028$  мс<sup>-1</sup> и уменьшение постоянных времени активации кальцийзависимых калиевых каналов типов BK и SK приводило к уменьшению амплитуды ПД. В случае увеличения  $t_{sIP3R}$  от 0.8 до 1.6 мс амплитуда ПД увеличивалась, а с дальнейшим увеличением этого параметра – уменьшалась.

Эффекты вариации интервала  $\Delta t$  между моментами активации P2X- и IP3-каналов представляют особый интерес, в частности потому, что при множественной стимуляции (см. ниже), характерной для реабилитационных протоколов, моменты фак-

**Р и с. 1.** Реакция модельной гладкомышечной клетки на приложение парасимпатического стимула, имеющего вид импульсного увеличения проводимости P2X-рецепторных каналов сарколеммы и кальциевой проницаемости IP3-рецепторных каналов депо.

А–Г – изменения во времени трансмембранного потенциала (мВ), внутриклеточной концентрации кальция  $[Ca^{2+}]_i$  (мкМ), а также плотности парциальных токов (мА/см<sup>2</sup>) – входящих  $I_{Na}$ ,  $I_{Cl(Ca)}$ ,  $I_{CaT}$ ,  $I_{CaL}$ ,  $I_{P2X}$  и выходящих  $I_{Leak}$ ,  $I_{BK}$ ,  $I_{SK}$ ,  $I_{Kir 2.1}$ ,  $I_{Kv}$ . Время достижения пика  $G_{P2X}$  и  $P_{IP3}$ ,  $t_{sP2X} = t_{sIP3R} = 0.8$  мс, задержка активации  $G_{P2X}$  относительно  $P_{IP3}$ ,  $\Delta t = 70$  мс. На вставке в увеличенном масштабе представлены  $I_{Kir 2.1}$  и  $I_{SK}$ , стрелкой отмечен момент пика ПД. На В  $I_{Cl(Ca)}$  является знакопеременным. Калировка времени 100 мс общая для всех записей, кроме показанных на вставках.

**Р и с. 1.** Реакція модельної гладеньком'язової клітини на прикладання парасимпатичного стимулу, який має вигляд імпульсного збільшення провідності P2X-рецепторних каналів сарколеми і кальцієвої проникності IP3-рецепторних каналів депо.

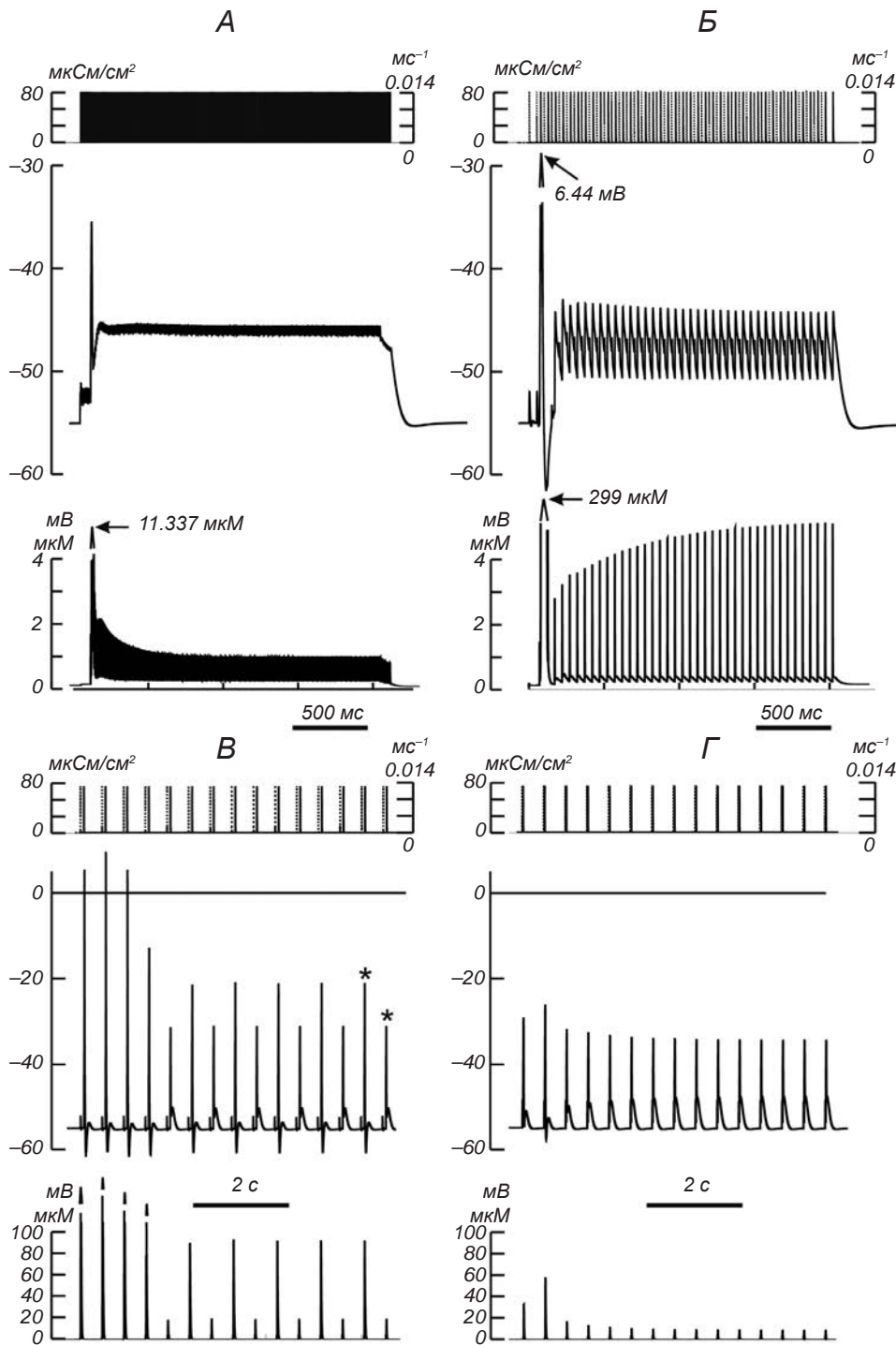


тической активации тех и других каналов зависят от МСИ и могут реализовываться с интервалами, иными, чем базовая задержка  $\Delta t$ . Мы получили простые формулы, характеризующие этот аспект. Каждый последовательный  $i$ -й стимул, приложенный в момент  $t_i$ , активирует P2X-и IP3-каналы соответственно в моменты  $\tau_i$  и  $\theta_i$ , отстоящие на величину базовой задержки  $\Delta t = \theta_i - \tau_i$ . Очевидно, что эффекты последовательных  $i$ -го и  $(i+1)$ -го стимулов следуют друг за другом с одинаковыми интервалами  $\Delta T = t_{i+1} - t_i = \tau_{i+1} - \tau_i = \theta_{i+1} - \theta_i$ . Если МСИ продолжительнее, чем базовая задержка  $\Delta T > \Delta t$ , то моменты активации каналов в порядке P2X  $\rightarrow$  IP3  $\rightarrow$  P2X  $\rightarrow$  чередуются с интервалами  $\delta = \theta_i - \tau_i = \Delta t$  и  $\delta' = \tau_{i+1} - \theta_i = \Delta T - \delta$ . Если же  $\Delta T \leq \Delta t$  и задержка кратна МСИ, т. е.  $\Delta t = k \cdot \Delta T$  ( $k = 1, 2, \dots$  – целое число, коэффициент кратности), то начиная с  $k$ -го стимула активация IP3-каналов  $i$ -м стимулом происходит в момент  $\theta_i = \tau_i + \Delta t = \tau_i + k \cdot \Delta T$ , который совпадает с моментом активации P2X-каналов  $(i+k)$ -ым стимулом  $\tau_{i+k} = \tau_i + k \cdot \Delta T$ . Это соответствует нулевой фактической задержке  $\delta = \theta_i - \tau_{i+k} = 0$ . Если же  $\Delta T \leq \Delta t$  и  $\Delta t$  не кратна  $\Delta T$ , т. е.  $\Delta t = (k + \varepsilon) \cdot \Delta T$  ( $k = 1, 2, \dots$  – целое,  $0 < \varepsilon < 1$ ), то, начиная с  $k$ -го стимула, момент активации IP3-каналов  $i$ -ым стимулом есть  $\theta_i = \tau_i + \Delta t = (k + \varepsilon) \cdot \Delta T = \tau_{i+k} + \varepsilon \cdot \Delta T$ . Это означает более короткую, чем базовая, фактическую задержку  $\delta = \theta_i - \tau_{i+k} = \varepsilon \cdot \Delta T < \Delta t$  по отношению к ближайшему моменту активации P2X-каналов  $(i+k)$ -ым стимулом.

Как показали расчеты, действие одиночного стимула при  $\Delta t > 20$  мс вызывало небольшой деполяризационный всплеск в ответ на активацию P2X-каналов и полноценный ПД в ответ на активацию IP3-чувствительных каналов депо. В условиях  $t_{sp2X} = 3.2$  мс и задержках в интервале  $20 \text{ мс} > \Delta t > 16$  мс возникал ПД тем меньшей амплитуды, чем меньше  $\Delta t$ . Генерация ПД прекращалась при  $15 \text{ мс} \geq \Delta t > 6$  мс и возобновлялась при  $\Delta t < 6$  мс. Вызванная током через P2X-каналы начальная деполяризация приводила к незначительной активации кальциевых каналов и, соответственно, к небольшому повышению  $[Ca^{2+}]_i$  (см. вставку на рис. 1, Б). С уменьшением  $\Delta t$  превышение базального уровня  $[Ca^{2+}]_i$  к началу активации IP3-каналов увеличивалось. Последний процесс приводил к повышению  $[Ca^{2+}]_i$  и активации кальцийзависимых хлорных каналов, ток которых деполяризовал мембрану до уровней активации кальциевых каналов Т и L типов. В результате  $[Ca^{2+}]_i$  продолжала расти, вызывая кальцийзависимую инактивацию L-каналов. Когда каль-

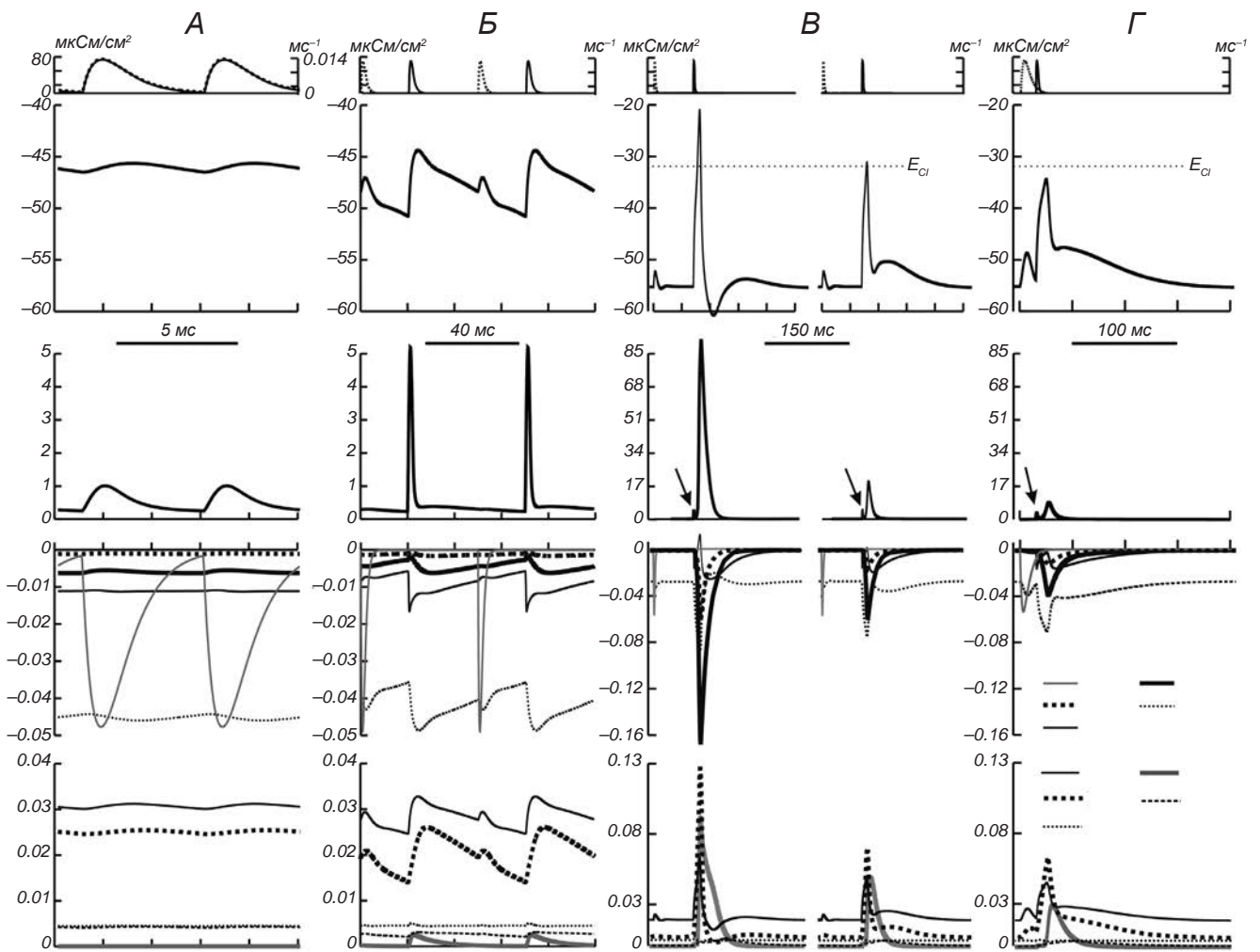
цийзависимая инактивация начинала преобладать над деполяризационной потенциалзависимой активацией, кальциевый ток быстро убывал. Это делало невозможным развитие полноценного ПД (например, при  $15 \text{ мс} \geq \Delta t > 6$  мс и  $t_{sp2X} = 3.2$  мс). В случае  $\Delta t < 6$  мс вызванная P2X-током деполяризация, будучи достаточно высокой к началу активации IP3-каналов, усиливала эффекты последней.

*Реакция ГМК на периодическую парасимпатическую стимуляцию.* Имитируя парасимпатическое возбуждение клеток ДМП в условиях чрезтканевой пачечной стимуляции, на P2X и IP3-каналы ГМК подавали серии импульсных воздействий с теми же параметрами ( $t_{sp2X} = t_{sp3R} = 0.8$  мс,  $\Delta t = 70$  мс), при которых приложение одиночного стимула вызывало полномасштабный ПД (рис. 1). Такая стимуляция, подобно тому, что ранее наблюдалось в случае прямого действия на клетку серий толчков деполяризующего тока [3], после некоторого переходного процесса приводила к установлению стационарных вынужденных колебаний МП и концентрации  $[Ca^{2+}]_i$ . Диапазон принимаемых этим параметром значений (размах) и их средний уровень зависели от МСИ (рис. 2). Основные черты такой зависимости видны на примерах ответов на приложение стимулов, которые, следуя с МСИ  $\Delta T = 5, 50$  или  $450$  мс, т. е. с частотами  $f = 200, 20$  или  $2.22 \text{ с}^{-1}$  (рис. 2 и 3, А, Б или В соответственно), активировали P2X- и (с задержкой  $\Delta t = 70$  мс) IP3-каналы. Заметим, что в первых двух случаях базовая задержка  $\Delta t$  превосходила МСИ  $\Delta T$  и была кратной  $\Delta t/\Delta T = 70/5 = 14$  ( $\varepsilon = 0$ ) или не кратной  $\Delta t/\Delta T = 70/50 = 1.4$  ( $\varepsilon = 0.4$ ). Это обуславливало уменьшение фактической задержки  $\delta = \theta_i - \tau_{i+k} = \varepsilon \cdot \Delta T$  до нуля (одновременная активация P2X- и IP3-каналов) или  $20$  мс соответственно. При МСИ  $\Delta T = 5$  мс, что соответствовало длительности периода абсолютной рефрактерности [2], МП колебался в допороговом диапазоне от  $-46.5$  до  $-45.6$  мВ (размах  $DE = 0.9$  мВ) со средним уровнем  $\bar{E} = -46.0$  мВ (рис. 2, А). Размах колебаний становился больше, а средний уровень – ниже с увеличением МСИ. Так, при  $\Delta T = 50$  мс (что соответствует ранней фазе относительной рефрактерности [2]) размах  $DE$  равнялся  $6.4$  мВ (от  $-50.8$  до  $-44.4$  мВ), а средний уровень –  $\bar{E} = -47.7$  мВ. Примечательно, что начиная с МСИ  $\Delta T = 420$  мс (поздняя фаза восстановления регенеративного ответа после одиночной стимуляции [2]) в моменты активации IP3-каналов наблюдались чередующиеся высоко- и низкоампли-



**Р и с. 2.** Типичные реакции модельной гладкомышечной клетки на приложение серии парасимпатических стимулов. Время достижения пика  $G_{P2X}$  и  $P_{IP3}$   $t_{sP2X} = t_{sIP3R} = 0.8$  мс (А–В) или  $t_{sP2X} = 3.5$  мс и  $t_{sIP3R} = 0.8$  мс (Г); задержка активации  $G_{P2X}$  относительно  $P_{IP3}$   $\Delta t = 70$  мс; частота следования стимулов 200 (А), 20 (Б) и 2.22 (В, Г) с<sup>-1</sup>; задержка активации  $G_{P2X}$  относительно  $P_{IP3}$   $\Delta t = 70$  мс (А, Б, В) или  $\Delta t = 15$  мс (Г). А–Г – изменение проводимости (мСм/см<sup>2</sup>), мембранного потенциала (мВ) и концентрации  $[Ca^{2+}]_i$  (мкМ). На В пикам 1–4 соответствуют  $[Ca^{2+}]_i = 295, 303, 283$  и  $152$  мкМ. Калибровки времени: 0.5 (А, Б) и 2.0 (В, Г) с.

**Р и с. 2.** Типові реакції модельної гладеньком'язової клітини на прикладання серії парасимпатичних стимулів.



**Р и с. 3.** Сопряженные электрические и концентрационные процессы в модельной гладкомышечной клетке при генерации стационарных вынужденных колебаний, вызванных действием серий парасимпатических стимулов разной частоты. Записи ответов при межстимульных интервалах  $\Delta T = 15$  (А), 75 (Б) и 450 (В) мс, соответственно, времени достижения пика  $G_{P2X}$  и  $P_{IP3}$   $t_{sp2X} = t_{sip3R} = 0.8$  мс и задержке активации  $G_{P2X}$  относительно  $P_{IP3}$   $\Delta t = 70$  мс или при  $t_{sp2X} = 3.5$  мс,  $t_{sip3R} = 0.8$  мс и  $\Delta t = 15$  мс (Г). Проводимость P2X-каналов  $G_{P2X}$  (мкСм/см<sup>2</sup>, 1 сверху) и проницаемость IP3-каналов  $P_{IP3}$  (мс<sup>-1</sup>, 1 сверху) показаны пунктирной и сплошной линиями соответственно. В рядах представлены изменения во времени трансмембранного потенциала, мВ (1), внутриклеточной концентрации кальция, мкМ (2), а также плотности парциальных токов – входящих  $I_{Na^+}$ ,  $I_{Cl(Ca)^-}$ ,  $I_{CaT^+}$ ,  $I_{CaL^+}$ ,  $I_{P2X}$  (мА/см<sup>2</sup>, 3) и выходящих  $I_{Leak^+}$ ,  $I_{BK^+}$ ,  $I_{SK^+}$ ,  $I_{Kir2.1^+}$ ,  $I_{Kv}$  (мА/см<sup>2</sup>, 4). Калибровки времени: 5 (А), 40 (Б), 150 (В), 100 (Г) мс. На В – чередующиеся низкоамплитудный (справа) и высокоамплитудный (слева) ответы, соответствующие помеченным звездочкой на рис. 2, В. На В и Г (2) стрелками указаны повышения  $[Ca^{2+}]_i$  за счёт высвобождения ионов из депо.

**Р и с. 3.** Сполучені електричні та концентраційні процеси в модельній ГМК при генерації стаціонарних вимушених коливань, викликаних серіями парасимпатичних стимулів різної частоти.

тудные колебания, а не равновеликие осцилляции. Режим равновеликих колебаний восстанавливался при  $\Delta T > 590$  мс. Размах (диапазон) и средний уровень чередующихся колебаний, наблюдавшихся в случае  $\Delta T = 450$  мс, были соответственно  $\Delta E = 39.6$  мВ (–60.7...–21.1 мВ),  $\bar{E} = -54.52$  мВ у высокоамплитудных и  $\Delta E = 24.5$  мВ (–55.6...–31.1 мВ),

$\bar{E} = -53.98$  мВ – у низкоамплитудных осцилляциях (Б и В соответственно). Равновеликие стационарные колебания при МСИ, равных 450 мс, можно было наблюдать в условиях уменьшенной базовой задержки  $\Delta t = 15$  мс и увеличенного времени активации P2X-каналов  $t_{sp2X} = 3.2$  мс. Их параметры были следующими:  $\Delta E = 21.0$  мВ (–55.4...

-34.4 мВ),  $\bar{E} = -53.5$  мВ ( $I$ ).

Зарегистрированные одновременно с изменениями МП при частотах  $\Delta T = 5, 50$  или 450 мс колебания  $[\overline{\text{Ca}^{2+}}]_i$  характеризовались следующими размахом (диапазоном) и средним уровнем соответственно:  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 0.76$  мкМ (от 0.25 до 1.01 мкМ) и  $[\overline{\text{Ca}^{2+}}]_i = 0.52$  мкМ;  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 4.97$  мкМ (от 0.23 до 5.2 мкМ) и  $[\overline{\text{Ca}^{2+}}]_i = 0.49$  мкМ или  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 92.43$  мкМ (0.17...92.6 мкМ) и  $[\overline{\text{Ca}^{2+}}]_i = 2.97$  мкМ в случае ответов большей амплитуды и  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 4.53$  мкМ (0.17...4.7 мкМ) и  $[\overline{\text{Ca}^{2+}}]_i = 0.4$  мкМ в случае ответов меньшей амплитуды (рис. 2, А-В, внизу соответственно). Эти же параметры в условиях  $\Delta T = 450$  мс, но  $\Delta t = 15$  мс и  $t_{\text{sp2X}} = 3.5$  мс имели значения  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 8.65$  мкМ (0.16...8.80 мкМ) и  $[\overline{\text{Ca}^{2+}}]_i = 0.36$  мкМ ( $I$ , внизу). Стабилизация режима стационарных колебаний  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  происходила заметно дольше, чем у колебаний МП.

Представления о биофизических механизмах вынужденных колебаний МП и  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , обусловленных действием периодических парасимпатических стимулов, можно получить, наблюдая сопряженные с ними парциальные токи. Ответы, реализуемые в течение одного такого периода при разных МСИ, показаны на рис. 3.

В случае МСИ  $\Delta T = 5$  мс деполяризационный ответ амплитудой  $\sim 0.85$  мВ (относительно исходного уровня  $-46.5$  мВ) с нарастанием более коротким, чем спад (рис. 3, А, 1), сопровождался доминированием  $I_{\text{P2X}}$ -тока. Токи  $I_{\text{CaT}}$  и  $I_{\text{CaL}}$  были минимальными вследствие инактивации (А, 3) и соответственно вносили весьма малый вклад в сравнительно незначительное повышение концентрации  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (до  $\sim 1.01$  мкМ относительно исходных  $\sim 0.252$  мкМ) накануне приложения очередного стимула (А, 2). Среди выходящих токов (А, 4) преобладал  $I_{\text{Leak}}$ ;  $I_{\text{Kv}}$ ,  $I_{\text{Kir2.1}}$  и  $I_{\text{SK}}$  вносили меньший вклад, а  $I_{\text{BK}}$  был пренебрежимо мал. При МСИ  $\Delta T = 50$  мс пуриновый и мускариновый компоненты деполяризационного ответа разделялись (В, 1). Основной, мускариновый, компонент имел амплитуду 6.4 мВ (относительно исходного значения  $-50.8$  мВ) и двухфазный пологий спад. На фоне последнего возникал низкоамплитудный пуриновый компонент, обусловленный током через P2X-каналы (В, 3). Максимум мускаринового компонента предшествовал быстрому транзиенту  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  амплитудой 5.19 мкМ (В, 2), обусловленный потоком  $\text{Ca}^{2+}$  из депо и подержанный Т-током (В, 3). Большие, чем наблюдаемые при высокочастотной стимуляции, пико-

вые значения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  обусловлены тем, что в случае  $\Delta T = 50$  мс в депо устанавливалась большая концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\sim 1.6$  mM вместо  $\sim 530$  мкМ) и соответственно, увеличивался выход этих ионов ответ на приложение стимула. При  $\Delta T = 450$  мс пики МП и  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  увеличивались, пуриновые компоненты были равновеликими, а задержанные на 70 мс мускариновые компоненты оказывались поочередно от стимула к стимулу высоко- и низкоамплитудными (34.2 и 24.1 мВ соответственно относительно исходной величины  $-52.2$  мВ; рис. 3, В). Высокоамплитудный ответ сопровождался выраженными следовыми гипер- и деполяризацией, а низкоамплитудный – только следовой деполяризацией (В). Первый из таких ответов на пике превышал равновесный потенциал для  $I_{\text{Cl(Ca)}}$  (В, 1, 3), в результате чего данный ток был знакопеременным. В первые 7.3 мс с момента активации IP3-каналов этот ток деполяризовал мембрану, а после инверсии в течение следующих 6.2 мс – гиперполяризовал. Высокоамплитудный ответ сопровождался значительно большими, чем при высокочастотной стимуляции, токами  $I_{\text{CaT}}$  и  $I_{\text{CaL}}$  (В, 3), которые обеспечивали значительное увеличение пиковой концентрации  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  до 92.6 мкМ. Эти изменения, связанные с низкоамплитудными ответами, были намного менее выраженными (В, 2, справа и слева соответственно). Примечательной особенностью выходящих токов было доминирование значительно увеличенного  $I_{\text{Kv}}$ ; за ним по величине следовал  $I_{\text{BK}}$  (в случае высокоамплитудных колебаний) или  $I_{\text{Leak}}$  (в случае низкоамплитудных осцилляций). Таким образом, наблюдавшийся при  $\Delta T = 450$  мс режим чередования разновеликих ответов на приложение одинаковых стимулов можно объяснить следующим образом. Столь низкочастотная стимуляция приводит к настолько значительному повышению деполяризации, кальциевых токов и транзиента концентрации  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , что вслед за высокоамплитудным ответом развивается глубокая и длительная кальцийзависимая инактивация кальциевых каналов, обуславливающая уменьшение кальциевого компонента входящего тока и, соответственно, деполяризационного отклика на приложение следующего стимула. В свою очередь, низкоамплитудный ответ порождает транзиент меньшей величины, что способствует деинактивации кальциевых каналов и восстановлению способности генерировать высокоамплитудный ответ к моменту прихода следующего стимула.

При увеличении  $t_{\text{sp2X}}$  до 3.5 мс, уменьшении  $\Delta t$



до 15 мс и сохранении длительности МСИ (450 мс) колебание имело вид равновеликого ответа с ранним пуриновым и поздним мускариновым деполяризационными компонентами амплитудой 6.4 и 20.0 мВ, соответственно (относительно исходного уровня  $-52.2$  мВ; рис. 3, Г). Во время пуринового компонента кальциевые токи были незначительными, и  $[Ca^{2+}]_i$  не изменялась. Среди выходящих токов (Г, 4) преобладал  $I_{Kv}$ , следующими по значимости были ток утечки  $I_{Leak}$ ,  $I_{BK}$  и гораздо меньшие  $I_{Kir2.1}$  и  $I_{SK}$ . Мускариновый компонент характеризовался развитием значительного кальцийзависимого хлорного тока, что порождало деполяризацию, активировавшую натриевый ток. Менее значительными были кальциевые токи, что обуславливало намного меньший транзист  $[Ca^{2+}]_i$  (пик 8.8 мкМ) (рис. 2, Г, 2).

*Возможности и ограничения используемой модели ГМК.* Используемая в данной работе модель, более совершенная, чем предыдущие [1–3], все еще весьма упрощенно описывает механизмы как пуринергического, так м-холинергического действия парасимпатической стимуляции на клетку. Первый из упомянутых компонентов представлен активацией пассивной (P2X-рецепторной) проводимости мембраны, что обеспечивает неспецифический входящий ток, тогда как в реальных ГМК-прототипах механизм сложнее (что связано с вовлечением рецепторов разных подтипов – P2X1 и P2X3) [9, 10]. Второй компонент связан с активацией проницаемости IP3-чувствительных кальциевых каналов депо, т. е. конечным эффектом цепи метаболических реакций, инициируемой связыванием ацетилхолина с M3/M2-рецепторами. Промежуточные реакции (требующие большего времени, чем связывание АТФ с P2X-рецепторами) упрощенно учитываются в задержке открывания каналов депо относительно открывания P2X-каналов. Факт более позднего развития мускаринового компонента парасимпатического действия по сравнению с таковым пуринового компонента известен по результатам натуральных экспериментов на ГМК ДМП [17]. Однако и точные временные соотношения компонентов, и их видоспецифические особенности требуют уточнения [21]. Упрощенная таким образом модельная ГМК показала способность отвечать на приложение парасимпатического стимула генерацией ПД (рис. 1) с параметрами, характерными для

прототипа [6, 17]. Это позволяет считать модель достаточно адекватной в рамках задач настоящей работы, в частности в аспекте отображения эффектов периодической парасимпатической стимуляции (рис. 2; 3).

Приведенное выше сопоставление одновременно зарегистрированных электрических и концентрационных процессов, обусловленных такой стимуляцией, выявило наиболее важные (а значит, требующие детального экспериментального исследования) параметры, определяющие характер реакций клетки на периодическую парасимпатическую стимуляцию, которая применяется в реабилитационных целях. Таковыми являются кинетические параметры активации P2X- и IP3-чувствительных каналов (а также задержки активации вторых относительно первых), параметры кальцийзависимой инактивации кальциевых каналов и характеристики экстружии свободного цитозольного  $Ca^{2+}$ .

Новым аспектом, раскрытым с помощью данной модели ГМК ДМП, является возможность рассчитать, используя простые выражения, такую частоту  $f$  периодической стимуляции (МСИ  $\Delta T = 1/f$ ), которая обеспечивает нацеленную на желаемый функциональный эффект *фактическую* задержку  $\delta$  между развитием пуринового и мускаринового компонентов парасимпатического действия. Из экспериментов известна лишь *базовая* задержка  $\Delta t$  между названными компонентами, которая является собственной (intrinsic), т. е. не управляемой напрямую характеристикой ГМК. Подобные расчеты могут быть частью эффективного алгоритма для биофизически обусловленного выбора параметров реабилитационной электростимуляции.

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 аспекте не требуется.

Авторы настоящей работы – А. В. Коченов, Е. П. Поддубная, И. А. Македонский 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, а также взаимоотношений соавторов статьи.

А. В. Коченов<sup>1,3</sup>, О. П. Піддубна<sup>2,3</sup>, І. О. Македонський<sup>2</sup>,  
С. М. Корогод<sup>1</sup>

БІОФІЗИЧНІ ПРОЦЕСИ В ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВІЙ  
КЛІТИНІ ДЕТРУЗОРА СЕЧОВОГО МІХУРА ПРИ  
РЕАБІЛІТАЦІЙНІЙ СТИМУЛЯЦІЇ ПАРАСИМПАТИЧНИХ  
ЕФЕРЕНТІВ: МОДЕЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

<sup>1</sup> Дніпропетровське відділення Міжнародного центру  
молекулярної фізіології НАН України, Дніпро (Україна).

<sup>2</sup> Дніпропетровський обласний спеціалізований клінічний  
медичний центр матері та дитини ім. проф. М.Ф. Руднева  
(Україна).

<sup>3</sup> Державний заклад «Дніпропетровська медична академія  
МОЗ України» (Україна).

Резюме

На комп'ютерній моделі гладеньком'язової клітини (ГМК) детрузора сечового міхура (ДСМ) ми досліджували сполучені зміни мембранного потенціалу (МП), парціальних трансмембранних струмів і внутрішньоклітинної концентрації кальцію ( $[Ca^{2+}]_i$ ), викликані парасимпатичною стимуляцією, з метою визначити біофізичні основи для вибору параметрів медичної реабілітаційної електростимуляції ДСМ. Іоно- і метаботропні ефекти такої стимуляції, що мали різні латентні періоди (ЛП), імітували відповідно збільшенням провідності пуринорецепторних каналів сарколеми і затриманим на 70 мс збільшенням проникності кальцієвих каналів саркоплазматичного ретикулула (депо), чутливих до інозитолтрифосфату (ІР3) – кінцевого продукту ланцюга реакцій, що запускаються активацією мускаринових холінорецепторів. ГМК відповідала на поодинокі стимуляції генерацією потенціалу дії (ПД), близького до такого у прототипу. Прикладання тривалої серії однакових стимулів викликало після перехідного процесу стаціонарні вимушені коливання МП і  $[Ca^{2+}]_i$ , розмах яких зменшувався, а середній рівень збільшувався при скороченні міжстимульних інтервалів (МСІ). Встановлено, що для кінцевого результату стимуляції визначальними (а отже такими, що потребують першочергового експериментального уточнення) є такі параметри парасимпатичної дії, як тривалості пуринового та мускаринового компонентів і затримка між ними. Показано, що при стимуляції з МСІ, більш короткими, ніж згадана затримка, прикладання чергового стимулу активує Р2Х-канали раніше закінчення затримки активації ІР3-каналів, викликані впливом попереднього стимулу. Це фактично еквівалентно скороченню інтервалу між послідовними активаціями Р2Х- та ІР3-каналів. Отримані прості вирази, які дозволяють за відомою різницею ЛП пуринового і мускаринового ефектів парасимпатичної стимуляції обчислювати МСІ, здатні забезпечувати більш ефективну реабілітаційну стимуляцію парасимпатичних нервів ДМП.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. 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).
2. 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).
3. А. В. Коченов, Е. П. Поддубная, И. А. Македонский, С. М. Корогод, "Биофизические процессы в гладкомышечной клетке детрузора мочевого пузыря при реабилитационной электростимуляции: модельное исследование", *Neurophysiology / Нейрофизиология*, **47**, № 3, 215-226 (2015).
4. I. A. Makedonsky, "Immunohistochemical investigation of the M2 and M3 muscarinic receptors in patients with bladder exstrophy," *Eur. Urol.*, **4**, No. 2, 182 (2004).
5. G. Burnstock, "Purinergic signaling in the gastrointestinal tract and related organs in health and disease," *Purinerg. Signal.*, **10**, No. 1, 3-50 (2014).
6. K. E. Andersson and A. Arner, "Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology," *Physiol. Rev.*, **84**, No. 3, 935-986 (2004).
7. F. J. Ehler, "Contractile role of M2 and M3 muscarinic receptors in gastrointestinal, airway and urinary bladder smooth muscle," *Life Sci.*, **74**, Nos. 2/3, 355-366 (2003).
8. C. J. Fowler, D. Griffiths, and W. C. de Groat, "The neural control of micturition," *Nat. Rev. Neurosci.*, **9**, No. 6, 453-466 (2008).
9. 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).
10. P. D. Anthony, W. Ford, and D. A. Cockayne, "ATP and P2X purinoceptors in urinary tract disorders," in: *Urinary Tract (Handbook Exp. Pharmacol.*, Vol. 202), K.-E. Andersson and M. C. Michel (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (2011), pp. 375-393.
11. M. Li, S. D. Silberberg, and K. J. Swartz, "Subtype-specific control of P2X receptor channel signaling by ATP and  $Mg^{2+}$ ," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, No. 36, E3455-E3463 (2013).
12. G. Burnstock, "Purinergic signalling in the urinary tract in health and disease," *Purinerg. Signal.*, **10**, No. 1, 103-155 (2014).
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. N. T. Carnevale and M. L. Hines, *The NEURON Book*, Cambridge Univ. Press, Cambridge (2006).
15. 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).
16. H. Hashitani, N. J. Bramich, and G. D. Hirst, "Mechanisms

- of excitatory neuromuscular transmission in the guinea-pig urinary bladder," *J. Physiol.*, **524**, No. 2, 565-579 (2000).
17. T. J. Heppner, M. E. Werner, B. Nausch, et al., "Nerve-evoked purinergic signalling suppresses action potentials, Ca<sup>2+</sup> flashes and contractility evoked by muscarinic receptor activation in mouse urinary bladder smooth muscle," *J. Physiol.*, **587**, No. 21, 5275-5288 (2009).
  18. J. Malysz, E. S. Rovner, and G. V. Petkov, "Single-channel biophysical and pharmacological characterizations of native human large-conductance calcium-activated potassium channels in freshly isolated detrusor smooth muscle cells," *Pflügers Arch.*, **465**, No. 7, 965-975 (2013).
  19. K. A. Green, R. W. Foster, and R. C. Small, "A patch-clamp study of K(+) channel activity in bovine isolated tracheal smooth muscle cells," *Br. J. Pharmacol.*, **102**, No. 4, 871-878 (1991).
  20. C. H. Fry, G. Sui, and C. Wu, "T-type Ca<sup>2+</sup> channels in non-vascular smooth muscles," *Cell Calcium*, **40**, No. 2, 231-239 (2006).
  21. T. B. Bolton, "Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle," *Physiol. Rev.*, **59**, No. 3, 606-718 (1979).