

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

Коченов Артем Веніамінович

УДК 577.3: 51-76

**Збудливість гладеньком'язової клітини: вплив
співвідношення іонотропних і метаботропних
механізмів (модельні дослідження)**

03.00.02 – біофізика

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Міжнародному центрі молекулярної фізіології НАН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Корогод Сергій Михайлович,
Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України,
завідувач Дніпропетровським відділенням

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор
Жолос Олександр Вікторович,
ННЦ «Інститут біології» Київського національного
університету ім. Тараса Шевченка, в.о. завідувача кафедри
біофізики

кандидат біологічних наук
Філіпов Ігор Борисович,
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
провідний науковий співробітник відділу нервово-м'язової
фізіології

Захист відбудеться «15» листопада 2016 р. о 16 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: вул. Богомольця, 4, Київ 01024.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: вул. Богомольця, 4, Київ 01024 та на сайті <http://biph.kiev.ua/uk>.

Автореферат розісланий 12 жовтня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук



Любанова О.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. У клітинній біофізиці однією з фундаментальних проблем, котра також має істотне значення для суміжних областей знання, зокрема клінічної фізіології і медицини, є проблема збудливості, тобто здатності клітини відповідати на зовнішні подразники переходом із стану спокою у стан збудження.

Тканини гладеньких м'язів (ГМ) відрізняються від тканин скелетних та серцевого м'язів. Вони формують зв'язки між тканинами та оболонки навколо них майже у всіх органах. Їх основна функція, здебільшого, полягає в переміщенні рідини або суспензії у порожнистих органах до місця призначення. Гладеньком'язові клітини (ГМК) можуть приймати і генерувати сигнали, які потім ініціюють скорочення або релаксацію. Гладенькі м'язи вивчалися фактично з початку виникнення фізіології як науки; вони є незмінними об'єктами у дослідженнях вегетативної нервової системи, дії гормонів та ліків. Порушення у роботі ГМ вражає більшу кількість людей, ніж всі види функціональних порушень посмугованих м'язів разом узяті [Као а. Carsten, 2005]. Так, порушення функцій нижніх сечовивідних шляхів є дуже розповсюдженими патологіями [Soder a. Petkov, 2011; Milsom et al., 2001; Sellers a. Chess-Williams, 2012; Coyne et al., 2014 та ін.], у тому числі і серед дітей [Зоркин и соавт., 2009]. Окрім суттєвого зниження якості життя пацієнтів [Stewart et al., 2003], такі захворювання пов'язані зі значними негативними економічними наслідками [Coyne et al., 2014]. Часто такі патології супроводжуються вродженими порушеннями експресії молекулярних рецепторів. Прикладом може слугувати така важка вроджена вада, як екстрофія сечового міхура – тотальна епіспадія (ЕСМТЕ). Суттєвою особливістю останньої є комплексне порушення розвитку органів малого тазу, тазової мускулатури та їх іннервації, а також частковий або повний дефіцит холінергічних рецепторів М2- і М3-типів, виявлений нами в детрузорі сечового міхура (ДСМ) таких новонароджених [Makedonsky, 2004; Македонський, 2007]. Подібна молекулярна патологія веде до негативних наслідків для парасимпатичної іннервації ГМК ДСМ і, відповідно, до драматичних порушень функцій сечовивідних шляхів. Ці обставини, а також необхідність підтримки функціонування вказаних систем у післяопераційний і реабілітаційний періоди, вказують на необхідність поглиблених досліджень фізіологічних і біофізичних механізмів функціонування ГМК в нормі і при патології. Хоча висунуто багато гіпотез щодо ролі іонних каналів (зокрема Ca^{2+} -залежних хлорних) в мембранах ГМК та інших клітинних механізмах у патофізіології нижніх сечових шляхів, точні причини виникнення розладів у роботі сечовивідної системи досі вивчені вкрай недостатньо [Sellers a. Chess-Williams, 2012; Andersson, 2011; Brading a. Brain, 2011; Hegde, 2006 та ін.]. Дослідження ГМК ДСМ ускладнює і та обставина, що натурні досліди на людських та відповідних препаратах зустрічаються з вкрай серйозними обмеженнями як методичного, так і етичного (у разі клінічної практики) плану. Тваринні моделі згаданих патологій є більш доступними, але видоспецифічними. Наприклад, розподіли м-холінорецепторів у ГМК сечового міхура людини і тварин істотно розрізняються [Giglio a. Tobin, 2009; Fryer et al., 2012]. Зрозуміло, що за даних обставин доцільним для вивчення відповідної проблематики є використання математичного моделювання як досить ефективного комплементарного методу.

Методи моделювання і обчислювального експерименту стали невід'ємною частиною сучасного арсеналу інструментів дослідження в різних областях знання. Вони набувають все ширшого застосування в біологічних науках, зокрема в біофізиці і фізіології. Про це свідчить факт започаткування близько 10 років тому глобального проекту «Фізіом» IUPS World Physiome Project під егідою Міжнародного союзу фізіологічних наук (IUPS) (<http://www.physiome.org.nz>), котрому присвячена низка фундаментальних оглядів [Hunter et al., 2002; Hunter a. Borg, 2003; Popel a. Hunter, 2009; Smith et al., 2009 та ін.].

На сьогодні моделювання нервових клітин є досить розвиненою областю. В той же час моделі м'язових клітин (за винятком кардіоміоцитів), зокрема ГМК ДСМ, розроблялися досить рідко. Якщо кількість моделей нервових клітин і публікацій результатів відповідних модельних досліджень рахується тисячами, то, згідно з даними пошуку у базі Pubmed, до 2015 року опубліковано лише шість моделей ГМК кровоносних судин, три – ГМК повітряносних шляхів, дві – ГМК шлунково-кишкового тракту і лише одна модель ГМК сечового міхура [Laforet et al., 2011]. Слід визнати, що остання згадана модель є надзвичайно спрощеною. Вона включає в себе іонні канали лише одного типу (кальцієві) і зовсім не містить метаботропних рецепторів. Отже, така модель не є придатною для досліджень електричної збудливості. Нещодавно опубліковано роботу Dave et al. [2015] з детальнішою моделлю ГМК сечового міхура, яка зосереджена на динаміці внутрішньоклітинного Ca^{2+} в умовах зсуву і фіксації мембранного потенціалу (МП). У цю модель включено основні типи іонних каналів, задіяних у формуванні МП клітини, але не враховано дію метаботропних та іонотропних рецепторів.

Отже, проблема, яким чином змінюється збудливість ГМК ДСМ під впливом пуринаргічної та холінергічної парасимпатичної регуляції, є надзвичайно актуальною в аспектах як фундаментальної науки (вісцеральної фізіології), так і можливості практичної реалізації отриманих результатів у клінічній практиці. Очевидно, значну частину питань, що ускладнюють дану проблему, доцільно вирішувати за допомогою математичного моделювання.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано відповідно до загального плану науково-дослідних робіт Міжнародного центру молекулярної фізіології НАН України в рамках держбюджетної теми «Біофізичні механізми метастабільності фізіологічних станів клітин, що зазнають іонотропних та метаботропних впливів» (номер державної реєстрації 0114U000909).

Мета дослідження – з використанням модельного підходу з'ясувати біофізичні механізми, що обумовлюють зміни збудливості гладеньком'язової клітини детрузора сечового міхура, залежні від співвідношень іонотропних пуринових і метаботропних мускаринових компонентів парасимпатичних впливів на клітини.

Для досягнення мети було сформульовано наступні **задачі дослідження**:

1. Розробити модель Ca^{2+} -залежного хлорного струму, здатну адекватно відображати характеристики такого струму в прототипі – ГМК.
2. Адаптувати існуючі моделі іонних каналів, насосів та механізмів кальцієвої динаміки для побудови моделі ГМК ДСМ, що відповідає натурним

експериментальним даним.

3. З використанням отриманих результатів розробити біологічно обґрунтовану комп'ютерну модель ГМК ДСМ.

4. За допомогою розробленої моделі ГМК ДСМ описати біофізичні механізми парасимпатичного збудження модельної клітини та характеристики її збудливості.

5. З'ясувати вплив співвідношення метаболічного та іонотропного компонентів парасимпатичної дії на збудливість ГМК ДСМ.

6. За допомогою розробленої моделі ГМК ДСМ описати біофізичні процеси при застосуванні протоколів реабілітаційної електростимуляції ДСМ та визначити перспективи вдосконалення цих протоколів.

Об'єкт досліджень: біологічно обґрунтована математична модель ГМК детрузора сечового міхура.

Предмет досліджень: особливості збудливості ГМК сечовивідних шляхів у залежності від співвідношень іонотропних і метаболічних механізмів парасимпатичної дії на клітини.

Методи дослідження: комп'ютерне математичне моделювання у програмному середовищі «NEURON».

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше розроблено модель Ca^{2+} -залежного хлорного струму в ГМК ДСМ, а також комплексну модель такої клітини, до якої включено набір притаманних клітинам-прототипам іонних каналів, насосів і механізмів внутрішньоклітинної сигналізації. Вперше досліджено електричні та концентраційні процеси у ГМК ДСМ, викликані дією електричних і парасимпатичних стимулів, у тому числі організованих у відповідності з типовими протоколами, характерними для процедур реабілітаційної електричної стимуляції. Конкретизовано роль, яку в цих процесах відіграють відносини між часовими параметрами електростимуляції, з одного боку, і кінетичними характеристиками іонних каналів, насосів і процесів буферизації/дифузії внутрішньоклітинного кальцію – з іншого. Отримані результати істотно доповнюють сучасні уявлення щодо механізмів розвинення збудження у ГМК ДСМ в різних умовах.

Теоретичне та практичне значення роботи. Отримані результати мають як теоретичне, так і практичне значення, оскільки вони розкривають деталі біофізичних механізмів, пов'язаних з порушеннями збудливості ГМК ДСМ і демонструють важливу роль співвідношення іонотропних та метаболічних механізмів у нормі та в умовах патології. Таким чином, отримані результати розширюють та поглиблюють наукові уявлення про механізми формування збудження у ГМК ДСМ. Ці результати також представляють інтерес для практичної медицини та можуть бути використані для вдосконалення протоколів реабілітаційної електростимуляції. З урахуванням отриманих даних запропоновано нові принципи модифікації існуючих протоколів реабілітаційної електростимуляції. Результати досліджень показали можливість підбору оптимальних параметрів електричних стимулів з урахуванням змін провідності пуринорецепторів (що може бути реалізовано з використанням фармакологічних впливів – премедикації пуриноміметиками).

Особистий внесок здобувача. Здобувачем самостійно підібрано та вивчено наукову літературу з досліджуваної проблеми, розроблено протоколи

експериментів, виконано всі обчислювальні експерименти, здійснено узагальнення результатів, сформульовано висновки.

Визначення мети та задач дослідження, планування експериментів та обговорення їх результатів було проведено за участю наукового керівника роботи д.б.н., проф. С.М. Корогода.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи було представлено на наукових з'їздах та конференціях з міжнародною участю: 6-та Міжнародна наукова конференція «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі та патології» (Київ 2012р.); Науково-практична конференція з міжнародною участю «Актуальні питання неонатології, педіатрії та дитячої хірургії» (Дніпропетровськ 2013р.); 7-ма Міжнародна наукова конференція «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі та патології» (Київ 2014р.); Науково-практична конференція «3-й Всеукраїнський форум нейрореабілітації та медико-соціальної експертизи» (Дніпропетровськ 2015р.); VI з'їзд Українського біофізичного товариства (Луцьк-Світязь 2015р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 13 друкованих робіт: 7 статей у міжнародних та вітчизняних фахових наукових журналах, затверджених ВАК України, та 6 тез доповідей на наукових конференціях.

Обсяг та структура дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, опису результатів дослідження, обговорення результатів, висновків та переліку використаної літератури з 204 найменувань. Роботу викладено на 170 сторінках і проілюстровано 24 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **Вступі** обґрунтовано необхідність і актуальність дослідження ролі співвідношення іонотропних і метаботропних механізмів у збудливості клітин взагалі і ГМК зокрема. Сформульовано мету і завдання дослідження, наведено відомості щодо наукової новизни, теоретичного та практичного значення роботи, апробації отриманих результатів.

Огляд літературних даних складається з чотирьох розділів, в яких наведено сучасні дані, отримані вітчизняними та закордонними авторами щодо предмету дослідження, зокрема біофізичні характеристики ГМК сечового міхура та його детрузора, особливості регулювання їх функцій з боку нервової системи. Детально розглянуто типи іонних каналів та рецепторів (у тому числі іонотропних P2X та метаботропних м-холінорецепторів), їх роль у збудливості в нормі та при патології.

Матеріали та методи досліджень. У зазначеному розділі описано розроблені у програмному середовищі NEURON математичні моделі механізмів, застосованих у роботі (в тому числі авторські), зокрема модель ГМК детрузора (схему наведено на рис. 1), моделі іонних каналів (зокрема, авторську модель Ca^{2+} -залежного хлорного струму), обмінників та насосів, розташованих як на мембрані клітини, так і на мембрані саркоплазматичного ретикулула (СР). Описано моделі різних протоколів стимуляції, включаючи ті, які застосовуються у клінічній практиці.

Побудована модель ГМК ДСМ має вигляд циліндру ($d=5$ мкм, довжина $L=100$ мкм), питома ємність мембрани клітини $C_m=1.426$ мкФ/см²; значення розраховані згідно з даними експерименту [Hristov et al., 2011]. Відповідно до схеми

моделі (рис. 1), мембрана ГМК має канали вхідного Na^+ -струму (I_{Na}), Ca^{2+} -струму двох типів (I_{CaT} та I_{CaL}), Ca^{2+} -залежного хлорного струму ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) та канали вихідного K^+ -струму затриманого випрямлення (I_{K}), сімейства Kir2.1 ($I_{\text{Kir2.1}}$), Ca^{2+} -залежні K^+ -канали великої та малої провідності (I_{BK} та I_{SK}) та канали неспецифічного струму пасивного витоку (I_{leak}), а також Ca^{2+} -насос плазматичної мембрани (J_{PMCA}) та СР (J_{SERCA}). Параметри модельної клітини відповідають наявним натурним даним. Всі обчислювальні експерименти проведено в ізометричному режимі.

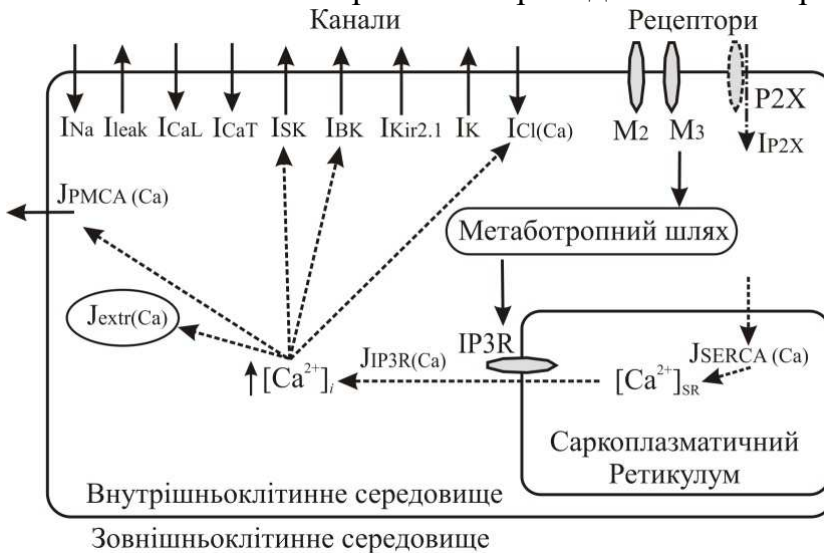


Рис. 1. Схема моделі ГМК ДСМ.

Електричні струми через представлені іонні канали були віднесені до одиниці площини мембрани I_i ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) та здебільшого описувались рівняннями типу Ходжкіна–Хакслі: $I_i = g_i \cdot m^x \cdot h \cdot (E - E_i)$, де g_i – максимальна питома провідність, m та h – кінетичні змінні активації та інактивації відповідно, x – порядок кінетичної змінної, E – мембранний потенціал (мВ), E_i – потенціал реверсії (рівноваги) струму (мВ). Кінетичні змінні ($p = m, h$) описувались диференційними рівняннями типу $dp/dt = (p - p_\infty(E)) / \tau_p(E)$, де $\tau_p = 1 / (\alpha_p(E) + \beta_p(E))$ – стала часу активації або інактивації, а $p_\infty(E) = \alpha_p(E) \cdot \tau_p$ – стаціонарні значення змінної. Останні описуються алгебраїчними рівняннями, які включають потенціалзалежні (або кальційзалежні) сталі швидкостей прямого та зворотного процесів – $\alpha_p(E)$ та $\beta_p(E)$, відповідно. Потенціали рівноваги струмів були наступними: $E_{\text{Ca}} = 132$ мВ (максимальне значення рівноважного потенціалу у стані спокою; при збудженні клітини його значення динамічно змінювалось відповідно до змін внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), $E_{\text{Na}} = 50$ мВ, $E_{\text{K}} = -77$ мВ, $E_{\text{Cl}} = -32$ мВ, $E_{\text{P2X}} = -7$ мВ і $E_{\text{leak}} = -70$ мВ.

Зміни мембранного потенціалу E (мВ) визначались парціальними струмами (I_i) через іонні канали, а також струмом стимуляції (I_{st}) згідно з рівнянням:

$$dE/dt = (I_{\text{CaT}} + I_{\text{CaL}} + I_{\text{Na}} + I_{\text{K}} + I_{\text{BK}} + I_{\text{SK}} + I_{\text{Kir2.1}} + I_{\text{Cl}(\text{Ca})} + I_{\text{P2X}} + I_{\text{leak}} - I_{\text{st}}) / C_m,$$

де C_m – питома ємність мембрани, $I_{\text{st}} = I \cdot A(t)$ – струм зовнішнього стимула,

I – амплітуда струму, $A(t)$ – функція часу, яка визначає форму стимула.

Розраховували наступні потоки обміну Ca^{2+} : потік через іонні канали (J_{Channels}), вихід у зовнішньоклітинне середовище через насоси плазматичної мембрани (J_{PMCA}), вхід у СР за допомогою насосів сарко(ендо)плазматичної мембрани (J_{SERCA}), зв'язування внутрішньоклітинними буферами та дифузія в глибинні шари цитозолу (J_{extr}), а також потік через IP3-рецептори (J_{IP3R}), який відповідає процесу вивільнення Ca^{2+} із СР.

Зміни $[Ca^{2+}]_i$ у примембранному шарі (товщина $\delta=0.1$ мкм) цитозоля визначались згідно з рівнянням: $d[Ca^{2+}]_i/dt = J_{Channels} + J_{SERCA} + J_{PMCA} + J_{extr} + J_{IP3R}$.

Ці потоки визначались наступними рівняннями:

$J_{Channels} = -(I_{CaT} + I_{CaL}) / (2 \cdot F \cdot \delta)$, де F – стала Фарадея, δ – товщина примембранного шару (0.1 мкм). $J_{SERCA} = (0.0083333 \cdot ([Ca^{2+}]_i / 0.00026)^{0.75}) - 0.0083333 \cdot ([Ca^{2+}]_{SR} / 1.8)^{0.75}) / (1 + ([Ca^{2+}]_i / 0.00026)^{0.75} + ([Ca^{2+}]_{SR} / 1.8)^{0.75})$, де $[Ca^{2+}]_{SR}$ – концентрація Ca^{2+} у СР; $J_{PMCA} = 0.0125 \cdot [Ca^{2+}]_i / ([Ca^{2+}]_i + 0.0015)$, $J_{extr} = ([Ca^{2+}]_i - [Ca^{2+}]_{i,0}) / \tau$, де $\tau = 1$ мс – стала часу повернення $[Ca^{2+}]_i$ до базального рівня $[Ca^{2+}]_{i,0}$. $J_{IP3R} = \alpha \cdot P_{IP3} \cdot ([Ca^{2+}]_{SR} - [Ca^{2+}]_i)$, де α – значення альфа-функції, P_{IP3} – проникність ($P_{IP3} = 14 \text{ c}^{-1}$); початкова концентрація Ca^{2+} у депо ($[Ca^{2+}]_{SR}$) становила 1 мМ.

В якості стимулів використовували поодинокі та множинні імпульси деполяризуючого струму або параметричні зміни у вигляді перехідних збільшень мембранних провідностей P2X-рецепторних каналів сарколеми (g_{P2X}) $g_{P2X}(t) = g_{P2Xmax} \cdot A(t)$, Ca^{2+} -залежного хлорного струму ($g_{Cl(Ca)}$) та проникності IP3-чутливих каналів депо (P_{IP3}) – СР, $P_{IP3}(t) = P_{IP3max} \cdot A(t)$. Ці зміни імітували іонотропну та метаботропну складові парасимпатичної дії відповідно. Параметри, які змінювались і визначали $P_{IP3}(t)$ та $g_{P2X}(t)$, були наступними: $\tau_s = \tau_{sIP3} = 0.8$ мс і $\tau_s = \tau_{sP2X} = 0.8$ мс, а також $t_0 = t_{0IP3}$ та $t_0 = t_{0P2X}$. Відому з експериментів відмінність латентних періодів (ЛП) пуринаргічного (раннього) і мускаринового (пізнього) компонентів відповіді ГМК ДСМ на стимуляцію парасимпатичних нервів [Hashitani et al., 2000; Neppner et al., 2009 Jaffe et al., 2011] відображено у моделі затримкою активації проникності $P_{IP3}(t)$ щодо провідності $g_{P2X}(t)$: $\Delta t = t_{0IP3} - t_{0P2X} = 70$ мс. Форма імпульсу $A(t)$ була або П-подібною (стандартного для теоретичних досліджень регуляторних процесів різної природи, $A(t) = 1$ при $t_0 \leq t \leq t_{st}$, $A(t) = 0$ при $t < t_0$ або $t > t_{st}$), або дзвоноподібною (див. нижче). Перший підхід, запозичений з теорії систем регулювання об'єктів небіологічної природи, де реакції на дію подібного найпростішого «стандартного стимулу» відомі як імпульсні перехідні характеристики, вивчаються з метою виявлення характерних властивостей системи; останні важко виявити за відгуками на вхідні сигнали складної (довільної) форми. В інших випадках форма була асиметричною дзвоноподібною. Вона відповідала альфа-функції, яка широко застосовується для опису синаптичних процесів [Carnevale a. Hines, 2006]: $A(t) = 0$, якщо $t < t_{act}$, або ж $A(t) = ((t - t_0) / \tau_s) \cdot \exp(-(t - t_0) / \tau_s)$, якщо $t \geq t_{act}$, де t_0 – момент початку імпульсу, τ_s – час досягнення його максимуму, рівного одиниці. Також застосовували аналоги протоколів, які використовуються в клінічній практиці (див. опис у керівництві користувача «Biofeedback/Stimulation Protocol Definitions List» для апарату «Urostym», «Laborie Medical Technologies Inc., Канада» або [Haslam a. Lausock, 2008]). Ці протоколи поділяються на два основні типи – пачка або «конверт» імпульсів, де кожен із стимулів може бути або П-подібним, або мати дзвоноподібну форму у випадку моделювання парасимпатичної активності. Основними характеристиками і пачки, і «конверту» стимулів є тривалість пачки (у «конверті» це еквівалентно тривалості фази плато – від 0 до 65 с), тривалість фази наростання у «конверті» (від 0 до 10 с), тривалість фази спаду у «конверті» (від 0 до 10 с), t_i – тривалість імпульсу (від 0.2 до 0.5 мс), міжстимульний інтервал (від 5 до 200 мс).

Динаміку відновлення ПД у дослідженнях електрозбудливості модельної ГМК кількісно описували подвійною експоненціальною наближаючою функцією виду: $f(t) = K_0 + K_1 \cdot \exp(K_2 \cdot t) + K_3 \cdot \exp(K_4 \cdot t)$ (1), параметри $K_0 - K_4$ визначали за критерієм мінімуму середньоквадратичного відхилення $\sigma = \sum_{i=1}^N (f_i - f_i')^2$ ([Корогод и соавт., 2012]).

При дослідженні розробленої моделі Ca^{2+} -залежного хлорного струму розраховували стаціонарні та динамічні ВАХ при певному значенні $[\text{Ca}^{2+}]_i$, стаціонарні та динамічні моль-амперні характеристики (МАХ), тобто залежності стаціонарних або миттєвих значень $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ від $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при певному рівні МП. Динамічні ВАХ та МАХ визначали за допомогою метода ступінчастої фіксації потенціалу E або $[\text{Ca}^{2+}]_i$ на різних рівнях, вимірюючи миттєві значення струму в різні моменти часу після початку сходинки. Моменти вимірювання слідували з рівними інтервалами щодо часу досягнення стаціонарного стану.

Результати досліджень.

1. *Характеристика Ca^{2+} -залежного хлорного струму – важливого чинника збудливості ГМК.* Деполяризуючі Ca^{2+} -залежні хлорні канали присутні у багатьох типах ГМК [Cotton et al., 1997; Hartzell et al., 2009 та інші], зокрема і у клітинах сечового міхура [Nakayama, 1993; Brading a. Brain, 2011 та ін.]. Вони активуються сигнальним шляхом, який іде від мускаринових рецепторів підтипу М3 через IP3-залежне вивільнення Ca^{2+} із депо [Sakamoto et al., 2007 та інші], і беруть участь у формуванні спонтанних перехідних вхідних струмів (*STICs – spontaneous transient inward currents*) [Bao et al., 2008; Wiwchar et al., 2009; Angermann et al., 2012 та ін.]. Показано, що $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ грає важливу роль у сполученні процесів збудження–скорочення [Pedemonte a. Galietta, 2014].

Розроблена модель $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ дозволяє симулювати інтегральний струм, досліджений з використанням протоколів ступінчастої фіксації потенціалу або $[\text{Ca}^{2+}]_i$, та адекватно відображає основні характеристики і властивості прототипу [Koumi et al., 1994; Hartzell et al., 2009; Duran et al., 2012 та ін.] (рис. 2). Порівняння нормованих графіків показує добре наближення до прототипів на А та Б, тоді як на В модельний струм близький до струму-прототипу, але трохи випереджає останній за часом досягнення стаціонарного рівня.

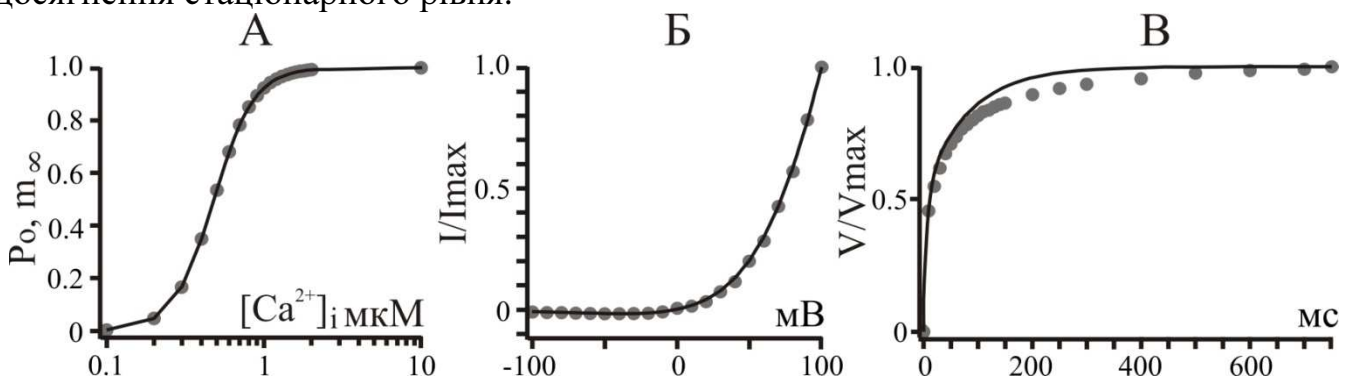


Рис. 2. Співставлення результатів моделювання Ca^{2+} -залежного хлорного струму з даними експериментальних досліджень [Hartzell et al., 2009; Koumi et al., 1994]. А) Концентраційні залежності стаціонарних значень кінетичної змінної Ca^{2+} -залежної активації модельного струму m_∞ (суцільна лінія) та вірогідностей відкритого стану каналу $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ у гепатоцитах (кружечки), зареєстрованих у

дослідженнях активності поодиноких каналів. Б і В) Нормовані статичні ВАХ і часовий перебіг модельного струму (суцільна лінія) і зареєстрований Хартцеллом та співавт. $I_{Cl(Ca)}$ через канали аноктамінової родини (кружечки).

2. *Характеристики електричної збудливості модельної ГМК.* Обчислювальні експерименти проводились на комплексній моделі ГМК, яка включала в себе моделі іонних каналів, насосів та інших механізмів, притаманних прототипу [Andersson a. Arner, 2004; Brading a. Brain, 2011 та ін.]. В якості основних характеристик розглядали криву «сила–тривалість» (рис. 3 А, Б) і динаміку рефрактерності після генерації ПД. Цю динаміку описували на основі набору ефектів додатків однакових поштовхів струму порогової інтенсивності (125 мкА/мкФ) тривалістю 0.2 мс, рознесених у часі (рис. 3 В, Г).

Графіки «сила–тривалість» показані для трьох значень g_{P2X} (0, 52.8 і 105.6 мкСм/см²), які відповідали відсутності і наявності активації різної інтенсивності. При нульовій g_{P2X} реобазний струм дорівнював 14.73 мкА/мкФ, хронаксія – 0.9178 мс. Додавання g_{P2X} , яка дорівнювала 52.8 або 105.6 мкСм/см², викликало зменшення реобазного струму до 13.58 або 12.45 мкА/мкФ, тобто на 7.8% або 15.5% відповідно. Хронаксія, що характеризує кінетичні властивості збудливості, збільшувалася до 0.94 або 0.96 мс відповідно. Крива «сила–тривалість» в цілому мала класичний вигляд, а її зміщення в бік менших значень порогової інтенсивності струму при збільшенні g_{P2X} (що імітувало дію пуриноміметиків) свідчило про те, що електрична збудливість ГМК може піддаватися пуринергічній модуляції.

Аналіз динаміки рефрактерності показав, що дія першого стимулу викликала типовий ПД, а зміни збудливості після його генерації мали ряд особливостей. Періоди абсолютної і відносної рефрактерності були досить тривалими (~20–22 і ~620 мс відповідно). Період відносної рефрактерності міг бути розділений на дві фази – ранню (25–220 мс) і пізню (220–620 мс), що відповідали 50%-вому і повному відновленню ПД відповідно. В межах кожної фази процес відновлення ПД мав «швидку» та «повільну» складові. Сталі часу «швидкої» та «повільної» складових процесу відновлення ПД розрізнялись майже на порядок (для ранньої фази $\tau_f=19.2$ та $\tau_s=271.98$ мс, а для пізньої фази – $\tau_f=29.8$ та $\tau_s=127.41$ мс). Абсолютна рефрактерність, очевидно, визначається в нашому випадку інактивацією кальцієвих каналів протягом перших 20–22 мс після ініціації ПД. Канали Т-типу повністю інактивуються в інтервалі 5–8 мс, а після їх відновлення (близько 18 мс) домінуючою стає інактивація каналів L-типу. Додатковими факторами є зменшення рушійного потенціалу для натрієвого струму, а також інверсія рушійного потенціалу для $I_{Cl(Ca)}$ (потенціал стає гіперполяризаційним на 15-й мс). Подальше відновлення кальцієвих каналів (потенціалзалежна складова) після інактивації на тлі натрієвого струму, що активується, і знову інвертованого (деполяризуючого) $I_{Cl(Ca)}$ визначає вступ клітини в ранню фазу відносної рефрактерності. В інтервалі 100–350 мс процес відновлення амплітуди ПД сповільнюється, що відповідає більшим сталим часу кальцієвої і потенціалзалежної інактивації, які дорівнюють 100 і 312 мс відповідно. Імовірною причиною зниження величини ПД у межах дуже великих інтервалів (~600 мс) є неповне відновлення базального рівня $[Ca^{2+}]_i$ і E_{Ca} , що

зменшує рушійний потенціал для кальцієвих струмів. Отже, величинами, що визначають найбільш «повільні» компоненти процесу відновлення регенеративного збудження, є кінетичні параметри механізмів екструзії Ca^{2+} .

В умовах стимуляції деполяризуючим струмом за відсутності парасимпатичних впливів було виявлено здатність ГМК генерувати ПД з необхідним для скорочення підвищенням $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Такий протокол стимуляції імітував ефект електростимуляції клітин-прототипів з частковим або повним дефіцитом парасимпатичної іннервації, що відзначається при деяких видах патологій, зокрема КЕСМЕ.

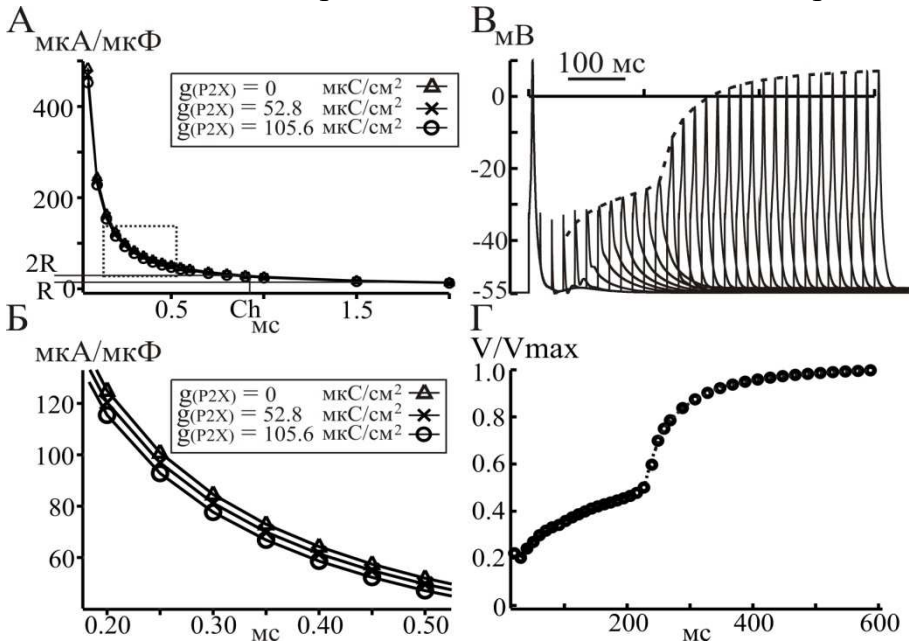


Рис. 3. Співвідношення «сила–тривалість» та динаміка рефрактерності після генерації ПД. А) Графіки «сила–тривалість» показано для нульового, нормального та підвищеного рівня активації P2X-рецепторів ($g(\text{P2X})$). Останні представлено постійними провідностями, рівними 0, 52.8 і 105.6 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ відповідно. Обмежений прямокутником фрагмент

використовуваного в протоколах клінічної електростимуляції діапазону тривалості стимулів показано на Б в збільшеному масштабі. В) Відновлення амплітуди відповіді на повторний тест-стимул, прикладений з різними затримками після першого (кондиціонуючого) стимулу. Пунктирна лінія – огинаюча максимумів регенеративних зміщень МП. На Г показано ту ж динаміку, що і на В, але амплітуди відповідей $V = E - E_r$ відраховано від рівня потенціалу спокою ($E_r = -54.67$ мВ) і нормовано щодо максимального значення V_{max} (азначено кружечками).

3. Біофізичні механізми електричного і парасимпатичного збудження ГМК ДСМ. Дослідження механізмів збудження цих клітин внаслідок парасимпатичної активації метаботропних м-холінорецепторів та коактивації іонотропних P2X-пуринорецепторів (рис. 4) виявило здатність такої клітини генерувати ПД зі значним перехідним підвищенням $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у відповідь на дзвоноподібне підвищення сумарної провідності холінергічного та пуринергічного компонентів до порогового рівня 3.82 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$. Використання такого метода дослідження обумовлено відсутністю детальних експериментальних даних щодо конкретних значень затримки між активацією P2X-пуринорецепторів та результатом активації м-холінорецепторів. Тому у першу чергу ми визначили напрямок змін досліджуваних процесів при варіації параметрів моделі, тобто її параметричну чутливість (що є стандартним підходом у моделюванні).

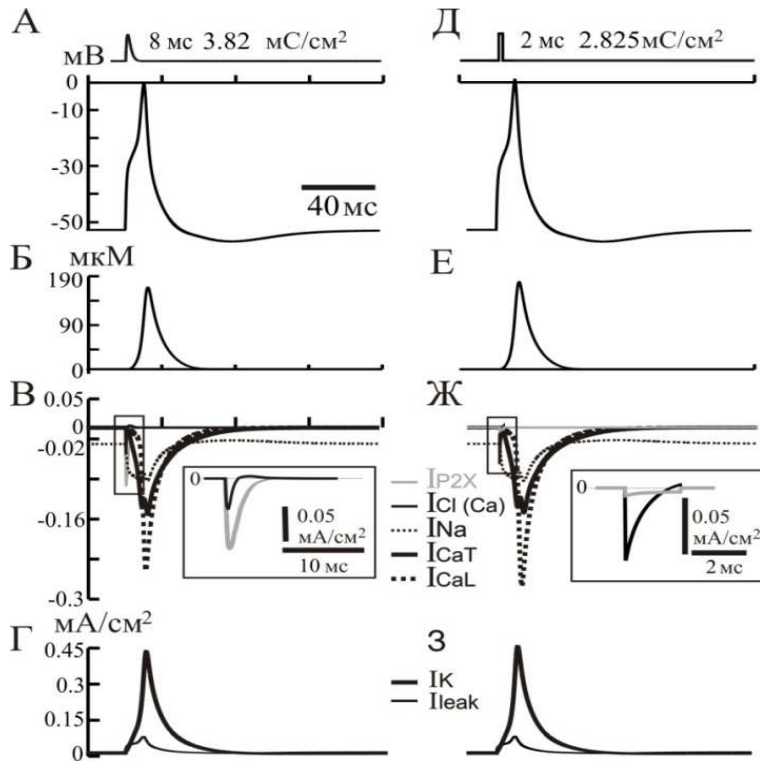


Рис. 4. Реакції модельної ГМК ДСМ на імпульсне збільшення провідності каналів Ca^{2+} -залежного хлорного струму та неспецифічного струму через пуринергічні рецепторні канали. А і Д) Зміни g_{P2X} та $g_{Cl(Ca)}$ (зверху) і МП (знизу). Б, Е) Зміни $[\text{Ca}^{2+}]_i$. В, Ж) Вхідні струми; на вставці – виділений фрагмент у збільшеному масштабі (видно різні співвідношення I_{P2X} і $I_{Cl(Ca)}$, а також зміну напрямку $I_{Cl(Ca)}$). Г, З) Вихідні струми.

Виявлено, що на піку ПД компоненти Ca^{2+} струмів L- і T-типів дорівнювали 60.77% і 39.23% відповідно (рис. 4 В), що близько до аналогічних значень у клітинах прототипів [Fry et al., 2006]. Вхідний напрямок $I_{Cl(Ca)}$ змінювався на вихідний, коли пов'язане з ПД деполаризаційне зміщення МП переверщувало рівень E_{Cl} , а пікове значення $I_{Cl(Ca)}$ було майже вдвічі меншим, ніж таке у I_{P2X} , що обумовлено більш деполаризаційним E_{P2X} . Дослідження реакції на збільшення тих же провідностей, але у вигляді короткого П-подібного зсуву (рис. 4, Д-З), показали чутливість трансмембранних струмів до параметрів парасимпатичної активації, зокрема, до швидкості збільшення провідності. При затримці активації $g_{Cl(Ca)}$ відносно g_{P2X} навіть на 1 мс або блокуванні останньої провідності клітина генерувала не ПД, а лише локальну відповідь майже вдвічі меншої амплітуди. Генерацію ПД можна було відновити, збільшуючи максимальну g_{P2X} і сповільнюючи її зростання так, щоб її максимум досягався приблизно одночасно з максимумом «затриманої» холінергічної складової. При повній блокаді g_{P2X} ГМК могла генерувати ПД при невеликому деполаризаційному зміщенні E_{Cl} (від -32 до -30.7 мВ). Заслуговує уваги також зниження порогу генерації ПД, викликаного додатком поштовху струму на тлі збільшеної g_{P2X} та незмінної $g_{Cl(Ca)}$.

На наступному етапі брали до уваги наявні дані щодо відмінності між ЛП пуринергічного (раннього) і мускаринового (пізнього) компонентів відповіді [Hashitani et al., 2000; Heppner et al., 2009; Bolton, 1979]. Представлені нижче результати було отримано на модифікованій моделі ГМК ДСМ з додаванням SK-струмів і модифікації BK-струмів шляхом відображення додаткової регулюючої субодиниці $\beta 4$ [Jaffe et al., 2011]. Існування в ДСМ саме таких BK-каналів було показано в роботах Petkov, 2011 та Petkov, 2014.

Поодинокий парасимпатичний стимул, який індукує послідовну (з інтервалом $\Delta \tau = 70$ мс) активацію g_{P2X} і $P_{IP3R}(t)$ (далі – Р- і М-стимули), викликав у модельній

ГМК відповідь з двома розділеними у часі компонентами. Перший, пуриновий компонент (далі Р-відповідь), обумовлений I_{P2X} , являв собою низькоамплітудну (6.12 мВ щодо потенціалу спокою $E_r = -55$ мВ) деполяризацію, тоді як другий, мускариновий (далі М-відповідь), був високоамплітудною деполяризацією, яка переходила у повноцінний ПД. Цей ПД запускався $I_{Cl(Ca)}$ та підтримувався в основному за рахунок I_{CaT} та I_{CaL} (рис. 5 В). $[Ca^{2+}]_i$ несуттєво підвищувалась щодо базального рівня з 123.7 нМ до 138 нМ під час початкової деполяризації за рахунок активованих нею Ca^{2+} -струмів. Під час генерування ПД цей показник спочатку швидко підвищувався до 1.441 мкМ за рахунок J_{IP3R} , що узгоджується з даними експериментів [Malysz et al., 2013; Green et al. 1991]. Після короткого (~ 3 мс) спаду $[Ca^{2+}]_i$ відновляла зростання до пікового значення 295 мкМ (Б) за рахунок I_{CaT} та I_{CaL} . Співвідношення I_{CaT} і I_{CaL} на максимумі ПД становило 74% і 26% відповідно, що також близько до експериментальних значень [Fry et al., 2006]. Уваги заслуговує знакозмінність $I_{Cl(Ca)}$. Після ініціації ПД цей струм поступово зменшувався і через 8.34 мс змінював первісний деполяризуючий напрямок на гіперполяризуючий, коли МП ставав більш деполяризаційним, ніж E_{Cl} . Далі, через 17.59 мс після початку вивільнення Ca^{2+} із депо і 6.12 мс після максимуму ПД, даний струм знову інвертувався і сприяв розвитку слідової деполяризації.

Така поведінка модельної клітини виявилася досить стійкою по відношенню до варіації параметрів. Для генерації ПД критичним був час зростання P_{IP3} : при $\tau_{IP3} > 2.7$ мс деполяризація не досягала порогових значень. Варіація інших параметрів змінювала ПД, але не запобігала його генерації. Так, наприклад, збільшення максимальної P_{IP3} до 28 s^{-1} і зменшення постійних часу активації Ca^{2+} -залежних K^+ -каналів типів ВК і СК призводило до зменшення амплітуди. ПД збільшувався при збільшенні τ_{IP3} з 0.8 до 1.6 мс і зменшувався при подальшому збільшенні даної сталої часу. Ефекти варіації інтервалу $\Delta\tau$ між моментами активації Р2Х- та ІР3-каналів заслуговують особливої уваги, зокрема тому, що при множинній стимуляції (яка характерна для реабілітаційних протоколів) в залежності від частоти моменти фактичної активації каналів обох типів можуть слідувати з іншими затримками, ніж базова затримка $\Delta\tau$. Так, поодинокий стимул при $\Delta\tau > 20$ мс викликав невеликий деполяризаційний «сплеск» у відповідь на Р-стимул і повноцінний ПД – у відповідь на М-стимул. При $\tau_{sp2X} = 3.2$ мс і затримках у межах $20 \text{ мс} > \Delta\tau > 16 \text{ мс}$ виникав ПД тим меншої амплітуди, чим меншою була $\Delta\tau$. Генерація ПД припинялась при $15 \text{ мс} \geq \Delta\tau > 6 \text{ мс}$ і відновлювалась при $\Delta\tau < 6 \text{ мс}$. Викликана I_{P2X} початкова деполяризація призводила до незначної активації Ca^{2+} -каналів і, відповідно, до невеликого підвищення $[Ca^{2+}]_i$ (див. вставку на рис. 5 Б). Зі зменшенням $\Delta\tau$ збільшувалося перевищення базального рівня $[Ca^{2+}]_i$ перед початком активації ІР3-каналів. Останній процес призводив до підвищення $[Ca^{2+}]_i$, активації $I_{Cl(Ca)}$ та істотної деполяризації мембрани (до рівнів активації Ca^{2+} -каналів Т- і L-типів). У результаті $[Ca^{2+}]_i$ продовжувала зростати, викликаючи тим самим Ca^{2+} -залежну інактивацію L-каналів. Коли Ca^{2+} -залежна інактивація починала переважати деполяризаційну потенціал залежну активацію, Ca^{2+} -струм швидко зменшувався, що робило неможливим розвиток повноцінного ПД (наприклад, при

15 мс $\geq \Delta \tau > 6$ мс і $\tau_{SP2X} = 3.2$ мс). При $\Delta \tau < 6$ мс викликана I_{P2X} деполяризація, будучи достатньо високою до початку активації IP3-каналів, посилювала ефекти останньої.

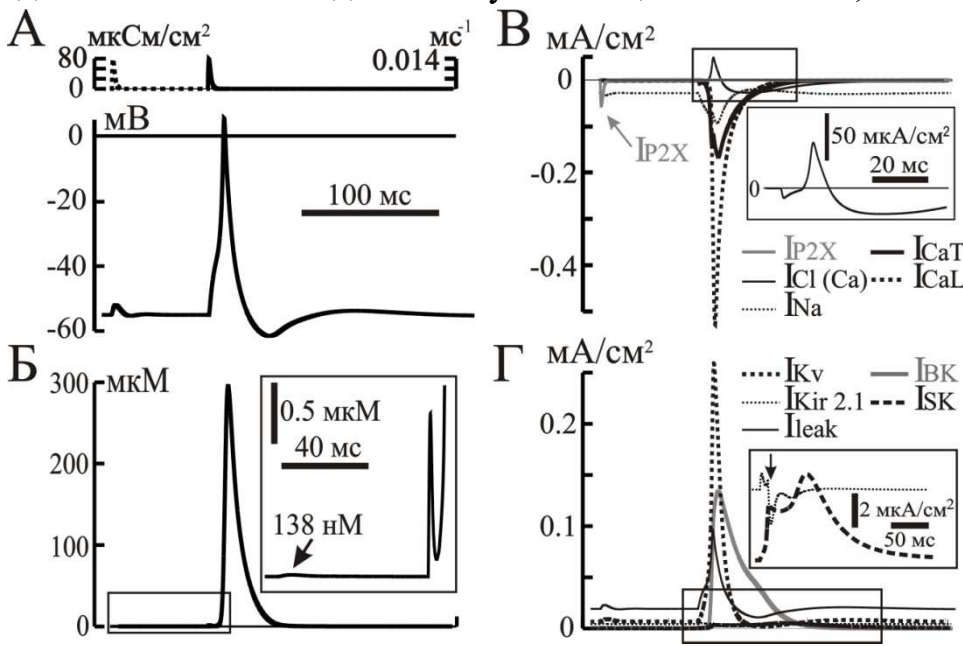


Рис. 5. Реакція модельної ГМК на парасимпатичний стимул у вигляді імпульсного збільшення g_{P2X} і P_{IP3} . А) Зміни g_{P2X} і P_{IP3} (зверху) помічені штриховою та суцільною лініями, відповідно, та МП (внизу). Б) Зміни $[\text{Ca}^{2+}]_i$. В і Г) Щільності парціальних струмів, вхідних та вихідних, відповідно.

4. Вплив співвідношення метаботропного та іонотропного компонентів парасимпатичної дії на збудливість ГМК ДСМ. Поодиноким парасимпатичним стимулом з Р- і М-компонентами, розділеними інтервалом $\Delta \tau$, викликав у ГМК сполучені електричний та концентраційний відгуки (рис. 6). Результуючу відповідь, викликану стимулом з параметрами $g_{P2X} = 76.6 \mu\text{S}/\text{cm}^2$, $P_{IP3} = 14 \text{ s}^{-1}$ і $\Delta t_0 = 70$ мс (рис. 6 А), було прийнято в якості базової для подальших порівняльних досліджень. Вона відображала описані в літературі суттєві особливості прототипу – значно більший ЛП М-відповіді та величину пов'язаного з нею кальцієвого транзйенту (основного фактора, що визначає скорочення ГМК), порівняно з аналогічними параметрами Р-відповіді. При незмінних величинах g_{P2X} і P_{IP3} М-відповідь залежала від фази Р-відповіді, на яку вона припадала, а, значить, від затримки Δt_0 – легко регульованого параметра моделі. В цьому випадку М-відповідь розвивалась вже після закінчення Р-відповіді (рис. 6 А, сіра крива) і тому не зазнавала впливу останньої. Р- і М-компоненти електричного відгуку були деполяризаційними піками тривалістю 10.65 і 29.0 мс відповідно; причому М-пік являв собою фактично ПД з амплітудою 60.6 мВ. Р- і М-піки супроводжувалися слідовими гіперполяризацією (тривалість 8.32 і 50.4 мс) і деполяризацією (18.68 і 93.02 мс). Концентраційні Р- і М-відповіді (рис. 6 А2, сіра крива) загальною тривалістю приблизно 67 і 1500 мс, відповідно, також мали вигляд піків із швидким наростанням і відносно повільним спадом $[\text{Ca}^{2+}]_i$ до базального рівня. Якщо затримку $\Delta \tau$ зменшували до 15, 5 або 2 мс, то М-стимул припадав, відповідно, на фазу слідової гіперполяризації, фазу спаду деполяризаційного піку Р-відповіді і вершину останнього (рис. 6). При цьому мала місце нелінійна сумація електричних М- і Р-відповідей, тобто виконувалось співвідношення $(M \& P)/(M + P) < 1$ (рис. 6 Г). Якщо згадані вище провідність і затримка залишалися незмінними, то зменшення P_{IP3} на 5, 15, 25 або 35% (до 13.26, 11.792, 10.318 і 8.844 s^{-1} , що моделює частковий дефіцит м-холінорецепторів)

призводило до різкого зменшення піків електричної і концентраційної М-відповідей (рис. 6 Д і Е). Залежність піку електричної М-відповіді від величини P_{IP3} (рис. 6 Д, сіра лінія) добре відтворювалася подвійною експоненціальною функцією (рівняння 1) з середньоквадратичним відхиленням $\sigma=0.00019$.

Далі ми з'ясовували можливість відновлення величини кальцієвого транзєнта, послабленого внаслідок зниження ефективності М-стимулу за рахунок посилення іонотропної дії – збільшення g_{P2X} . Таке збільшення імітувало ефект використання пуриноміметиків або компенсаційного збільшення кількості пуринорецепторів при фіксованій затримці Δt_0 (70 мс). У випадку 5%-вого ослаблення М-стимулу дворазове збільшення g_{P2X} (до 153.2 мкС/см²) не призводило до помітного відновлення кальцієвого транзєнту (пікове значення $[Ca^{2+}]_i$ не перевищувало 31.765 мкМ), оскільки $\Delta\tau$ Р-відповідь повністю закінчувалась перед початком М-відповіді (рис. 6 А, крива 2). При 15%-вому послабленні P_{IP3} чотириразове збільшення g_{P2X} (до 306.4 мкС/см²) викликало тривалу (>150 мс) деполяризацію (рис. 6 А, крива 3), яка супроводжувалась підвищенням пікової концентрації $[Ca^{2+}]_i$ з 0.124 до 0.698 мкМ. Ця деполяризація, хоча і активувала канали вхідного кальцієвого струму, все ж не досягала рівня, притаманного ПД. До початку М-відповіді кальцієві канали L-типу були інактивовані на ~51% (в основному, за рахунок Ca^{2+} -залежної інактивації), а потенціалзалежна інактивація кальцієвих каналів Т-типу становила всього ~5.5%. В таких умовах збільшення $[Ca^{2+}]_i$ (з максимумом 2.75 мкМ), яке активувало деполяризуючий $I_{Cl(Ca)}$, відбувалося, в основному, за рахунок вивільнення Ca^{2+} з депо СР. Шестиразово збільшений Р-стимул ($g_{P2X}=459.6$ мкС/см²) вже сам по собі викликав ПД амплітудою 70 мВ. При цьому електрична і концентраційна складові послабленої М-відповіді (що припадала на закінчення слідової гіперполяризації Р-відповіді) суттєво не змінювалися (рис. 6 А, крива 4).

Базовий парасимпатичний стимул зі зменшеним до $\Delta\tau=15$ мс інтервалом викликав М-відповідь, яка припадала на фазу слідової гіперполяризації Р-відповіді. У цьому випадку пікові зміщення МП та $[Ca^{2+}]_i$ були практично такими ж, як при вихідному значенні $\Delta t_0=70$ мс (рис. 6 Б, крива 1). Збільшений до $g_{P2X}=153.2$ мкС/см² Р-стимул і зменшений до $P_{IP3}=13.26$ с⁻¹ М-стимул, розділені згаданою вище затримкою $\Delta t_0=15$ мс, обумовлювали результуючу відповідь (рис. 6 Б, крива 2) з набагато вищими піковими значеннями як деполяризації мембрани (40.81 мВ), так і концентрації $[Ca^{2+}]_i$ (146 мкМ). Це відповідає частковій, але істотній компенсації ефекту ослаблення М-стимулу. При $P_{IP3}=11.792$ с⁻¹ і $g_{P2X}=306.4$ мкС/см² результуюча електрична відповідь ГМК мала трохи більшу, ніж при $\Delta t_0=70$ мс, амплітуду (на ~2.05 мВ). Водночас пікове значення концентраційної відповіді зменшилося до 2.48 мкМ (рис. 6 Б, крива 3). До початку М-відповіді інактивація кальцієвих каналів L- і Т-типів склала, відповідно, 16.7 і 3.5%, причому у каналах L-типу домінувала Ca^{2+} -залежна складова. В цих умовах ГМК не генерувала ПД, оскільки деполяризаційні струми (I_{CaT} , I_{CaL} , $I_{Cl(Ca)}$ та I_{P2X}) були менше гіперполяризаційних струмів, що йдуть, в основному, через потенціалзалежні калієві канали. Генерація ПД ставала можливою при істотному збільшенні Р-стимулу ($g_{P2X}=459.6$ мкС/см²), навіть якщо інтенсивність М-стимулу була ще меншою ($P_{IP3}=10.318$ с⁻¹) (рис. 6 Б, крива 4). Цей ПД амплітудою 70.64 мВ супроводжувався кальцієвим транзєнтом,

який досягав 330 мкМ. Такий ПД фактично був регенеративною відповіддю на Р-стимул, а М-стимул був настільки ослаблений, що не справляв помітного впливу на МП та $[Ca^{2+}]_i$.

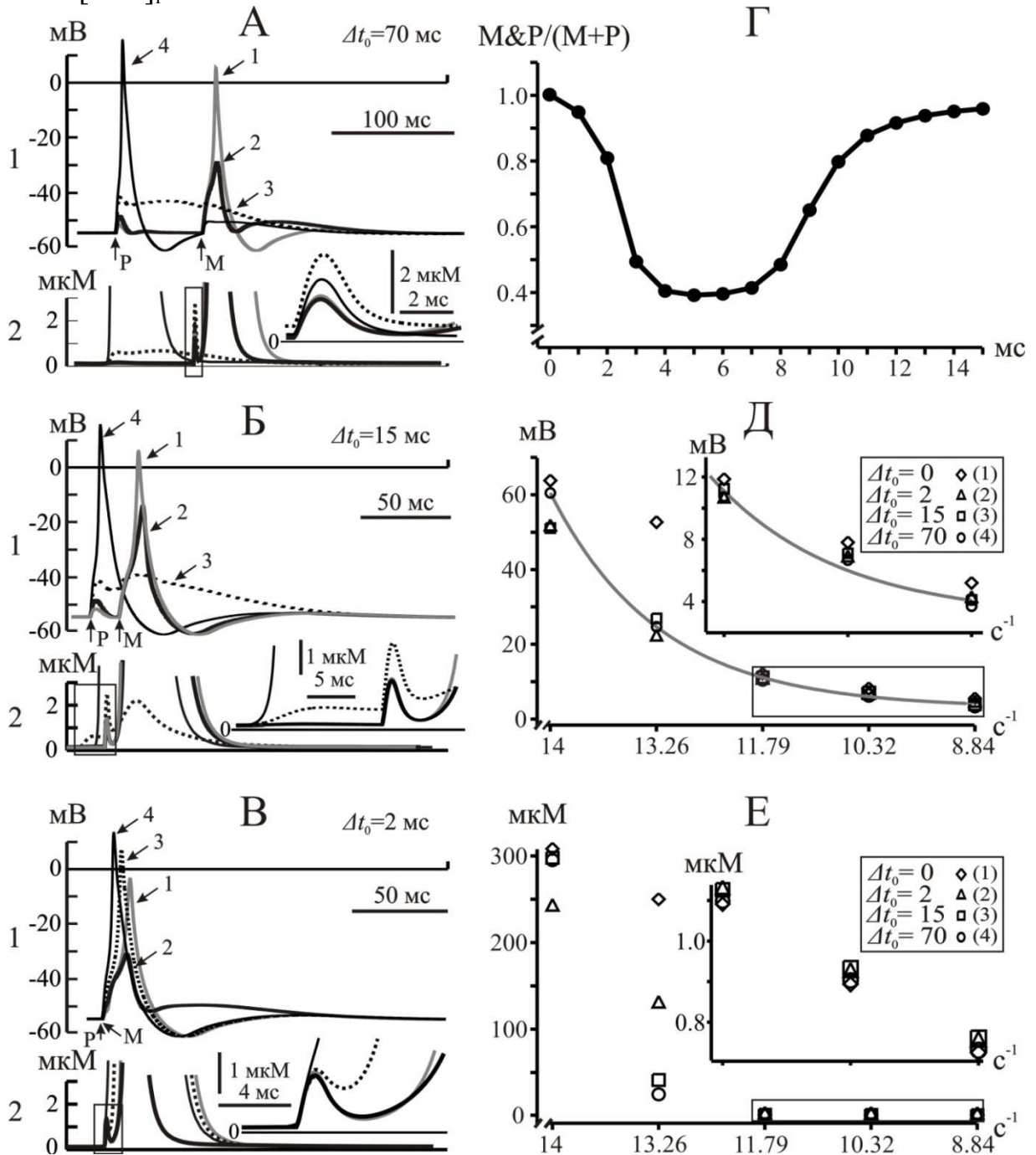


Рис. 6 Електричні та концентраційні відповіді ГМК на прикладення поодиноких парасимпатичних стимулів при різних значеннях інтенсивності Р- і М-компонентів і часовій затримці між ними. А—В, 1 та 2, відповідно) Зміни МП та $[Ca^{2+}]_i$, викликані стимулом, Р- та М-компоненти якого (вказано стрілками) були розділені затримкою $\Delta t_0 = 70$ мс (А), 15 мс (Б) або 2 мс (В), для комбінацій інтенсивностей 1–4 (криві 1–4, відповідно). Г) Амплітуди результуючої відповіді ГМК (М&Р), нормованої щодо суми амплітуд ізольованих М- і Р-компонентів (М+Р) у залежності від інтервалу між цими компонентами. Д і Е) Залежності відповідно М&Р і $[Ca^{2+}]_i$ від P_{IP3} при фіксованій $g_{P2X} = 76.6$ мкС/см² і різних затримках Δt_0 (вказані відповідними маркерами на вставках).

P- і M-стимули, що наносили при тих же, що й раніше, комбінаціях інтенсивності (рис. 6 А, Б, криві 1–4), але з мінімальним інтервалом ($\Delta t_0=2$ мс, рис. 6 В), характеризувалися прогресивним зменшенням електричної і концентраційної відповідей порівняно з реакціями, що спостерігалися при $\Delta t_0=15$ і 70 мс і комбінаціях інтенсивностей 1, 2 і 4 ($g_{P2X}=76.6$ мкС/см² і $P_{IP3}=14$ с⁻¹, $g_{P2X}=153.2$ мкС/см² і $P_{IP3}=13.26$ с⁻¹, $g_{P2X}=459.6$ мкС/см² і $P_{IP3}=10.318$ с⁻¹). У разі ж комбінації 3 ($P_{IP3}=11.792$ с⁻¹ і $g_{P2X}=306.4$ мкС/см²) спостерігалися протилежні зміни – значне збільшення як електричної (до 62.38 мВ), так і концентраційної (до 306 мкМ) відповідей (крива 3) порівняно з тим, що мало місце при більших затримках. Дана особливість обумовлена тим, що більш рання активація $I_{Cl(Ca)}$ (за рахунок вивільненням Ca^{2+} з депо) підсилює деполяризацію, генеровану натрієвим струмом. Це, в свою чергу, посилює активацію потенціалзалежних кальцієвих каналів і веде до генерації ПД.

5. *Особливості біофізичних процесів у ГМК при множинній електричній і парасимпатичній стимуляції.* Множинну стимуляцію (рис. 7) здійснювали імпульсами деполяризуючого струму з такими ж параметрами (140.625 мкА/мкФ, 0.2 мс), як і у поодинокого стимулу, який був пороговим для виклику повномасштабного поодинокого ПД. Порівнювали клітинні процеси, що розвивалися при такій стимуляції в чотирьох варіантах, які відповідали стандартним протоколам реабілітаційної стимуляції.

Доцільність дослідження впливу прямої дії електричного струму обумовлена тим, що аналогічні протоколи електростимуляції застосовуються для реабілітації пацієнтів з дефіцитом M2/M3 холінорецепторів [Македонський і Піддубна, 2011]. При цьому вважали, що, навіть коли стимули збуджують парасимпатичні нервові волокна, то при такій молекулярній патології метаботропний холінергічний шлях ГМК послаблений або взагалі не діє. Разом з цим, оскільки про дефіцит пуринаргічних рецепторів при даній патології не повідомляється, то не можна виключати вплив іонотропної дії АТФ, яка виділяється збудженими парасимпатичними закінченнями та активує P2X-рецепторні канали на мембрані ГМК.

Найбільш істотними рисами відповідей ГМК на характерну для реабілітаційних протоколів стимуляцію множинними імпульсами струму були наступні:

1. Через більший або менший проміжок часу після початку стимуляції виникали і стабілізувалися вимушені коливання МП та $[Ca^{2+}]_i$, частота яких була рівною частоті нанесення стимулів. Ці коливання були однаковими при стимуляції як пачками, так і «конвертами» рівної частоти, хоча в пачках сталість амплітуди стимулів мала місце з самого початку, а в «конвертах» досягалась лише поступово, за певний кінцевий час. Цей факт представляє особливий інтерес, оскільки при стимуляції і пачками, і «конвертами» інтенсивність стимулів є постійною протягом тривалих (10–20 с) інтервалів часу, а відрізки змін амплітуди (наростання і спаду при стимуляції «конвертами») коротше у разі і більше.

2. Спостерігалася характерна залежність параметрів усталених відповідей від частоти слідування імпульсів у пачці або «конверті»: чим більшою була частота (коротше ΔT), тим меншим був розмах коливань і більшим деполяризаційне

зміщення середнього рівня МП щодо потенціалу спокою – -54.7 мВ (біля 6.26 мВ та 10.23 мВ при частотах 20 с⁻¹ та 200 с⁻¹ відповідно).

3. Тривалості перехідних процесів були різними. Встановлення стаціонарного характеру електричних коливань відбувалося на порядок швидше, ніж у концентраційних коливань. Перехід в усталений режим обох процесів ставав швидшим зі зменшенням частоти стимуляції. Ці перехідні процеси можна розглядати як комбінацію вимушеного коливального процесу і затухаючого власного процесу, що є типовим для (біо)фізичних систем різної природи.

4. Відбувалося адаптаційне підвищення порогу збудження ГМК на початковому етапі стимуляції «конвертом» (упродовж зростання амплітуди стимулів до постійного рівня), що, проте, не впливало на параметри усталених коливань при тривалому стимулюванні. Так, інтенсивність стимулу, порогова для генерації повномасштабного ПД, в тому разі коли вона встановлювалася миттєво (при стимуляції пачкою – рис. 7 А), ставала підпороговою, якщо вона досягалася за кінцевий час у фазу наростання при стимуляції «конвертом». Для того, щоб останній стимул цієї фази (він же – перший стимул фази сталості амплітуди) зміг викликати ПД амплітудою 61.33 мВ, необхідно було збільшити його інтенсивність до 625 мкА/мкФ. Іншими словами, за час 0.5 с лінійного наростання інтенсивності стимулів, нанесених із частотою 200 с⁻¹ ($\Delta T=5$ мс), відбувалося адаптаційне підвищення порогу генерації ПД у 4.45 раз. При стимуляції з частотою 20 с⁻¹ ($\Delta T=50$ мс) ПД з амплітудою 62.14 мВ викликався при збільшенні інтенсивності до 200.89 мкА/мкФ, що відповідало підвищенню порога в 1.43 раз.

Аналіз вищезгаданих процесів також показав, що поріг генерації ПД при прямій дії електричного імпульсу в умовах підвищеної g_{P2X} знижується. Це привертає увагу до можливості функціонально рівноцінної реабілітаційної стимуляції при зниженій (а значить, і менш дискомфортній) інтенсивності електричних імпульсів на тлі премедикації пуринометиками.

Імітуючи парасимпатичне збудження клітин ДСМ при черезтканинній стимуляції пачками імпульсів, ми моделювали нанесення серії імпульсних впливів з тими ж параметрами, при котрих поодиноким стимулом викликав повномасштабний ПД (див. рис. 5). В цілому реакція модельної ГМК за основними властивостями і характеристиками була аналогічною такій при стимуляції поодинокими імпульсами деполяризуючого струму. Це видно на прикладах відповідей на стимули, які, слідуючи з $\Delta T=5, 50$ або 450 мс, тобто з частотами $f=200, 20$ або 2.22 с⁻¹ (рис. 8 та 9, А, Б або В і Г відповідно), активували Р2Х-канали і, після затримки $\Delta\tau=70$ мс – ІР3-канали. Проте існують важливі особливості, пов'язані із затримкою між активаціями пуринергічного і холінергічного компонентів. У перших двох випадках базова затримка $\Delta\tau$ перевищувала ΔT і була кратною $\Delta\tau/\Delta T=70$ мс/ 5 мс= 14 ($\varepsilon=0$) або некратною $\Delta\tau/\Delta T=70$ мс/ 50 мс= 1.4 ($\varepsilon=0.4$). Це обумовлювало зменшення фактичної затримки $\delta=\theta_i-\tau_{i+k}=\varepsilon\cdot\Delta T$ до 0 (тобто відбувалась одночасна активація Р2Х- і ІР3-каналів) або 20 мс відповідно. При $\Delta T=5$ мс, що відповідає інтервалу абсолютної рефрактерності (див. рис. 3), МП осцилював у підпороговому діапазоні з розмахом 0.9 мВ і середнім рівнем $E=-46.0$ мВ (рис. 8 А). Розмах коливань ставав більшим, а середній рівень – нижчим при збільшенні ΔT . Так, при $\Delta T=50$ мс (що відповідає

ранній фазі відносної рефрактерності) розмах ΔE дорівнював 6.4 мВ (від -50.8 до -44.4 мВ), а середній рівень \bar{E} дорівнював -47.7 мВ. Примітним було те, що, починаючи з $\Delta T = 420$ мс, у моменти активації IP3-каналів замість рівновеликих осциляцій спостерігались високо- та низькоамплітудні коливання, котрі чергувались. Режим рівновеликих коливань повертався при $\Delta T > 590$ мс.

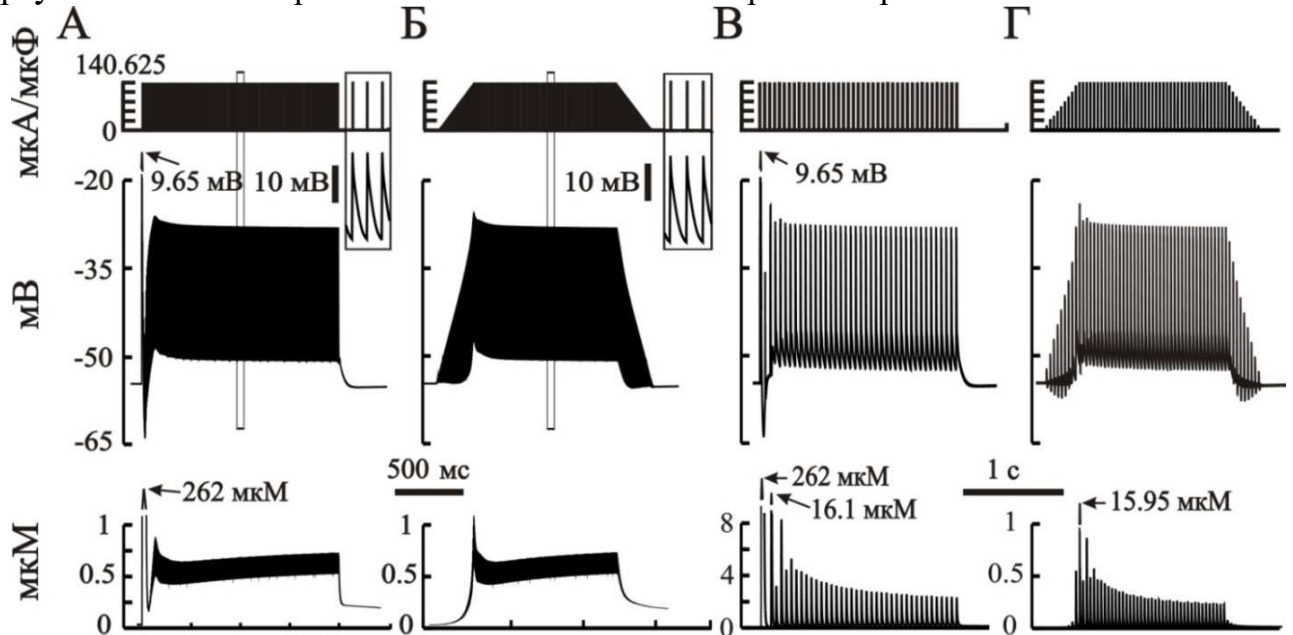


Рис. 7. Типові реакції модельної ГМК на стимуляцію пачкою (А, В) та «конвертом» (Б, Г) імпульсів деполяризуючого струму різної амплітуди та частоти. Тривалість імпульсів 0.2 мс, частота 200 с^{-1} (А, В) або 20 с^{-1} (Б, Г), амплітуда 140.625 мкА/мкФ (А, В) та від 0 до 140.625 мкА/мкФ (Б, Г). На кожному фрагменті А–Г верхні записи – стимули, середні – МП, нижні – кальцієві транзйєнти.

Уявлення про біофізичні механізми, породжені періодичними парасимпатичними стимулами вимушених коливань МП та $[\text{Ca}^{2+}]_i$, можна отримати, спостерігаючи за сполученими з цими коливаннями парціальними струмами. Найбільш важливими характеристиками останніх були наступні:

1. Більші, у порівнянні з високочастотною стимуляцією, пікові значення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ обумовлені тим, що при $\Delta T=50$ мс у депо встановлюється більша стаціонарна концентрація $\text{Ca}^{2+} \sim 1.6$ мМ замість ~ 530 мкМ при $\Delta T=5$ мс; відповідно, збільшується вихід кальцію у відповідь на кожний стимул.

2. Чергування відповідей більшої і меншої амплітуди при $\Delta T=450$ мс пов'язано з тим, що високоамплітудна відповідь на низькочастотну стимуляцію супроводжується значним підвищенням магнітуди I_{CaT} і I_{CaL} , що забезпечує істотне підвищення пікової концентрації $[\text{Ca}^{2+}]_i$ до 92.6 мкМ. Ці зміни, що супроводжують низькоамплітудну відповідь, були менш виражені. Таким чином, подібна низькоамплітудна стимуляція призводила до настільки значного підвищення величини деполяризації, кальцієвих струмів і концентраційного транзйєнту $[\text{Ca}^{2+}]_i$, що слідом за високоамплітудною відповіддю розвивалася глибока та тривала Ca^{2+} -залежна інактивація Ca^{2+} -каналів. Ця інактивація обумовлювала зменшення кальцієвого компонента вхідного струму і, відповідно, деполяризаційного відгуку на

наступний стимул. У свою чергу, низькоамплітудна відповідь породжувала менший транз'єнт, що сприяло відновленню Ca^{2+} -каналів, а, отже, і здатності генерувати високоамплітудну відповідь на наступний стимул.

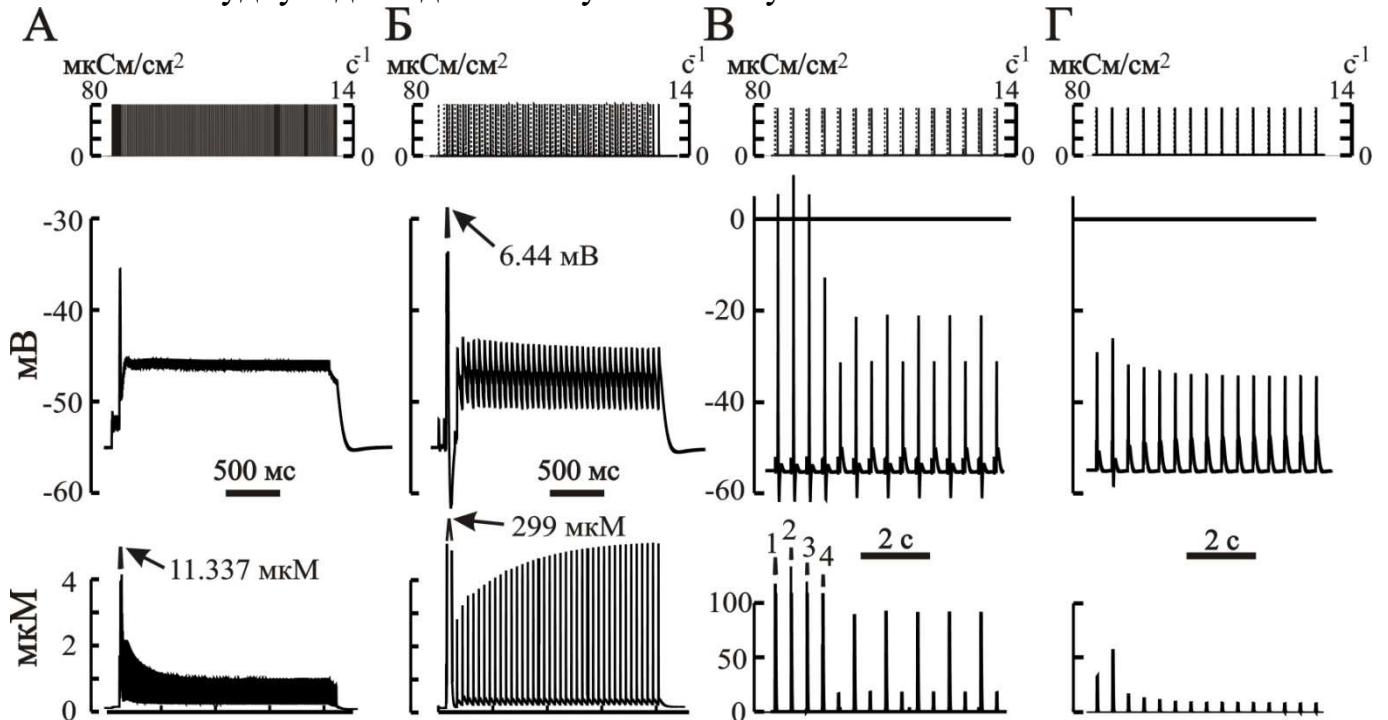


Рис. 8. Типові реакції модельної ГМК на серії парасимпатичних стимулів. Затримка активації g_{P2X} відносно P_{IP3} $\Delta\tau=70$ мс (А, Б, В) або $\Delta\tau=15$ мс (Г). А–Г) Верхні записи – зміни провідності і проникності, середні – МП, нижні – $[\text{Ca}^{2+}]_i$. На В піковим значенням 1–4 відповідають $[\text{Ca}^{2+}]_i = 295, 303, 283$ і 152 мкМ, відповідно.

Наведені вище дані дозволяють виділити найважливіші параметри, які визначають характер реакцій ГМК на періодичну парасимпатичну стимуляцію, що застосовується у реабілітаційних цілях. Такими є: (а) кінетичні параметри активації $P2X$ -каналів і $IP3$ -чутливих каналів, а також затримки активації між першими та другими; (б) Ca^{2+} -залежна інактивація Ca^{2+} -каналів; (в) екструзія вільного цитозольного Ca^{2+} . Новим аспектом, що був розкритий з використанням даної моделі ГМК ДСМ, є можливість розрахунку за допомогою простих математичних виразів такої частоти f ($\Delta T=1/f$) періодичної стимуляції, котра б забезпечувала націлену на бажаний функціональний ефект фактичну затримку δ між пуриновими і мускариновими компонентами парасимпатичної дії. Ці розрахунки можуть бути частиною алгоритму для біофізично обумовленого вибору параметрів реабілітаційної електростимуляції.

Обговорення.

В результаті проведених досліджень було визначено, що струм через Ca^{2+} -залежні хлорні канали може істотно впливати на збудливість ГМК ДСМ. За допомогою біофізичної моделі ГМК ДСМ, яка включала в себе авторську модель $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$, виявлено, що даний струм, окрім ініціації ПД при парасимпатичній стимуляції, також може моделювати частоту ПД. Отримані результати привертають

увагу до нових теоретичних аспектів парасимпатичної іннервації ГМК ДСМ – таких, як співвідношення швидкостей «одноступеневої» реакції активації іонотропних P2X-каналів і «багатоступеневих» реакцій на шляху від активації метаботропних M2/M3-холінорецепторів до вивільнення Ca^{2+} із CP та зміни станів іонних каналів вхідного струму. Дослідження збудливості модельної ГМК показали можливість пуринергічної модуляції електричної збудливості ГМК, виявили двофазний характер рефрактерності після її надпорогової активації. Кожна з її фаз складалась із «швидкої» та «повільної» складових, наявність яких обумовлена кінетичними властивостями активації/інактивації іонних каналів і механізмів регуляції рівня $[Ca^{2+}]_i$. Дослідження процесів, що виникають у ГМК ДСМ при реабілітаційній електростимуляції за різних умов (включаючи наявність та відсутність холінергічного компоненту), показали можливість теоретично обумовленого вибору параметрів реабілітаційної електростимуляції. Отримані досить прості математичні вирази, за допомогою яких можливо підібрати оптимальну для конкретного випадку частоту стимуляції. Отримані результати дозволяють припустити, що активація пуринергічних рецепторів може грати істотну компенсаторну роль в умовах дефіциту м-холінорецепторів. Про це говорить той факт, що ослаблений таким дефіцитом М-компонент відповіді може бути посилений шляхом помірною (в 2–4 рази) підвищення інтенсивності Р-компоненту стимулу. Подібний ефект є більш вираженим при малих часових затримках між Р- і М- компонентами відповіді. Така ситуація неможлива в умовах одиночної парасимпатичної стимуляції, але може бути досягнута при парній стимуляції.

Значне (п'яти-шестиразове) підвищення інтенсивності Р-компонента дозволяло отримати в ГМК ДСМ регенеративну відповідь, що супроводжується необхідним для розвитку скорочення значним підвищенням $[Ca^{2+}]_i$ навіть в умовах тотального дефіциту м-холінорецепторів. Було також виявлено, що величина результуючої відповіді ГМК ДСМ на дію парної парасимпатичної стимуляції характерним чином залежить від співвідношення інтенсивностей Р- і М-компонентів останньої. Зі збільшенням інтенсивності Р-компонента і зменшенням М-компонента стимулу електрична та концентраційна складові Р1-відповіді збільшуються, що робить більш глибокою потенціал- і Ca^{2+} -залежну інактивацію кальцієвих каналів до моменту початку Р2- і М1-компонентів результуючої відповіді.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі відповідно до поставленої мети досліджено роль співвідношення іонотропних та метаботропних механізмів у збудливості гладеньком'язової клітини (ГМК). Виявлено, що порушення співвідношення між згаданими механізмами, яке спостерігається при деяких патологіях, значною мірою впливає на функціональний стан клітини. Після виконання роботи отримано наступні принципові результати:

1. Вперше розроблено спеціалізовану модель Ca^{2+} -залежного хлорного струму, яка подібна до такого у прототипі за основними ознаками.
2. Вперше розроблено модель ГМК ДСМ, яка включає в себе набір каналів, характерних для прототипу, а також вищезгаданий модельований Ca^{2+} -залежний хлорний струм. Ця модель адекватно відтворює доступні експериментальні дані

(величину МП спокою, амплітуду ПД, форму і компоненти ПД та слідових процесів – гіпер- і деполяризації, рівень $[Ca^{2+}]_i$ у спокої, рівень $[Ca^{2+}]_i$ під час його вивільнення із депо при моделюванні парасимпатичної активації та співвідношення Ca^{2+} -струмів на максимумі ПД), отримані на клітинах прототипу [Bramich a. Brading, 1996; Andersson a. Arner, 2004; Heppner et al., 2009; Haslam a. Laycock, 2008; Patel a. Docampo, 2010; Brading a. Brain, 2011 та інші]. Така ситуація означає придатність моделі для дослідження раніше не вивчених процесів у клітинах даного типу.

3. Вперше показано, що струми через Ca^{2+} -залежні хлорні канали, які є кінцевим ефектом активації метаботропного шляху, в значній мірі визначають характеристики парасимпатичного збудження ГМК ДСМ.
4. Дослідження електричної збудливості ГМК ДСМ (зокрема кривої сила–тривалість) показало, що поріг збудження у відповідь на імпульс деполяризуючого струму при збільшеній провідності пуринергічних рецепторних каналів знижується, що імітує дію пуриноміметиків. Це дозволяє говорити про можливість забезпечення функціонально рівноцінної реабілітаційної стимуляції при зниженій (а, отже, і менш дискомфортній) інтенсивності електростимулів на тлі премедикації пуриноміметиками.
5. Динаміка рефрактерності після збудження ГМК свідчить про складний (двофазний) процес відновлення амплітуди ПД. Це обумовлено кінетиками іонних каналів і механізмами внутрішньоклітинної динаміки $[Ca^{2+}]_i$. Перша фаза пов'язана з інактивацією кальцієвих каналів, зменшенням їх рушійного потенціалу та активністю Ca^{2+} -залежних хлорних каналів. Друга ж фаза пов'язана з Ca^{2+} -залежною інактивацією Ca^{2+} -каналів L-типу та кінетичними параметрами механізмів екструзії Ca^{2+} . Сумарний калієвий струм досягає максимуму майже одночасно з максимумом $[Ca^{2+}]_i$, що вказує на визначальну роль ВК-компонента в генерації цього інтегрального струму.
6. Зміни співвідношення між іонотропними та метаботропними механізмами (наприклад, при дефіциті м-холінорецепторів) значною мірою впливають на збудливість ГМК ДСМ і можуть робити неможливим розвиток повноцінних ПД і, як наслідок, скорочень ГМК. Вперше показано, що ослаблений в результаті дефіциту м-холінорецепторів кальцієвий транз'єнт у ГМК можна збільшити або в разі значного посилення ефективності Р-стимулу (чого можна досягти за допомогою дії пуриноміметиків), або при істотному зменшенні затримки між моментами активації вказаних механізмів (що стає можливим при використанні парної стимуляції).
7. Величина результуючої відповіді ГМК ДСМ на дію парасимпатичних стимулів характерним чином залежить від співвідношення інтенсивностей іонотропного і метаботропного компонентів таких стимулів.

Список опублікованих робіт за темою дисертації

Статті:

1. Korogod S.M. Mathematical Model of the Calcium-Dependent Chloride Current in a Smooth Muscle Cell. / Korogod S.M., **Kochenov A.V.** // Neurophysiology. – 2013. – Vol. 45. – № 5–6. – P. 369–378. *(Дисертантом особисто виконано розробку моделі кальційзалежного хлорного струму у програмному середовищі NEURON, аналіз та обробку результатів. Дисертант брав участь в узагальненні та обговоренні результатів і написанні статті.)*
2. Korogod S.M. Biophysical Mechanism of Parasympathetic Excitation of Urinary Bladder Smooth Muscle Cells: A Simulation Study. / Korogod S.M., **Kochenov A.V.**, Makedonsky I.A. // Neurophysiology. – 2014. – Vol. 46. – № 4, P. 293–299. *(Дисертантом особисто виконано розробку механізмів досліджуваної у програмному середовищі NEURON моделі, проведення експериментів та обробку результатів. Дисертант брав участь в аналізі, узагальненні та обговоренні результатів і написанні статті.)*
3. **Kochenov A.V.** Excitability Characteristics of a Urinary Bladder Detrusor Smooth Muscle Cell as a Basis for Choosing Parameters of Rehabilitation Electrostimulation: A Simulation Study. / Kochenov A.V., Poddubnaya Y.P., Makedonsky I.A., Korogod S.M. // Neurophysiology. – 2015. – Vol. 47. – № 2. – P. 94–101. *(Дисертантом виконано експерименти та обробку результатів. Дисертант брав участь в аналізі, узагальненні та обговоренні результатів і написанні статті.)*
4. **Kochenov A.V.** Biophysical Processes in a Urinary Bladder Detrusor Smooth Muscle Cell during Rehabilitation Electrostimulation: a Simulation Study. / Kochenov A.V., E.P. Poddubnaya, I.A. Makedonsky, S.M. Korogod // Neurophysiology. – 2015. – Vol. 47 – № 3. – P. 174–184. *(Дисертантом виконано експерименти та обробку результатів. Дисертант брав участь в аналізі, узагальненні та обговоренні результатів і написанні статті.)*
5. Македонский И.А. На пути к трансляционной медицине: использование биофизических моделей для совершенствования реабилитационной электростимуляции в детской урологии. / Македонский И.А., **Коченов А.В.**, Поддубная Е.П., Моренец В.А., Кулагина И.Б., Новородовская Т.С., Македонская О.И., Корогод С.М. // Урология/Urology. – 2015. – 19 – № 3. – С. 259–262. *(Дисертант брав участь в обговоренні та написанні статті.)*
6. **Kochenov A.V.** Impact of the Ratio of Metabotropic and Ionotropic Components of Parasympathetic Action on the Excitability of a Urinary Bladder Smooth Muscle Cell: a Simulation Study. / Kochenov A.V., Korogod S.M. // Neurophysiology. – 2016. – Vol. 48 – № 1. – P. 2–10. *(Дисертантом виконано експерименти та обробку результатів. Дисертант брав участь в аналізі, узагальненні та обговоренні результатів і написанні статті.)*
7. **Kochenov A.V.** Biophysical Processes in a Urinary Bladder Detrusor Smooth Muscle Cell during Rehabilitation Stimulation of Parasympathetic Efferents: a Simulation Study / Kochenov A.V., Poddubnaya E.P., Makedonsky I.A., Korogod S.M. // Neurophysiology. – 2016. – Vol. 48 – № 3. – P. 156–165. *(Дисертантом виконано експерименти та обробку результатів. Дисертант брав участь в аналізі, узагальненні та обговоренні результатів і написанні статті.)*

Тези доповідей:

1. **Kochenov A.V.** A computer model for studies of excitability of detrusor smooth muscle cells / Kochenov A.V., Korogod S.M. // Psychophysiological and visceral functions in norm and pathology: 6 international scientific conference, Kiev, October 09 – 11, 2012.: Abstract book. – P. 35.
2. Корогод С.М., Коченов А.В. Математическая модель для изучения возбудимости гладкомышечных клеток детрузора / Корогод С.М., **Коченов А.В.**// Актуальні питання неонатології, педіатрії та дитячої хірургії: науково–практична конференція з міжнародною участю, Дніпропетровськ, Листопад 21–22, 2013. Науковий журнал ДЗ «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України» Медичні перспективи – 2013 – том 18 – № 3 ч. 2. – С. 254–255.
3. **Коченов А.В.** Реакции гладкомышечной клетки детрузора на парасимпатическую активацию и электростимуляцию. Модельные исследования / Коченов А.В., Поддубная Е.П., Македонский И.А., Корогод С.М. // Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології: 7 міжнародна наукова конференція, Київ, Жовтень 07–09, 2014.: Тези доп. – С. 84.
4. **Коченов А.В.** Роль Ca^{2+} зависимых хлорных каналов в возбудимости гладкомышечной клетки детрузора. Модельные исследования / Коченов А.В., Корогод С.М. // Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології: 7 міжнародна наукова конференція, Київ, Жовтень 07–09, 2014.: Тези доп. – С. 85.
5. Македонский И.А. Возможности электростимуляции и систем с биологической обратной связью в реабилитации детей с врожденными аноректальными аномалиями / Македонский И.А., Поддубная Е.П., Корогод С.М., **Коченов А.В.** // 3-й всеукраїнський форум нейрореабілітації та медико-соціальної експертизи: науково-практична конференція, Дніпропетровськ, Квітень 02–03, 2015.: Матеріали конф. С. 53–54.
6. **Коченов А.В.** Біофізичні процеси у гладком'язовій клітині детрузора сечового міхура при реабілітаційній електростимуляції. Модельне дослідження / Коченов А.В. // VI з'їзд Українського біофізичного товариства, Травень 27–29, 2015.: Тези доп. – С. 100.

АНОТАЦІЇ

Коченов А.В. Збудливість гладеньком'язової клітини: вплив співвідношення іонотропних і метаботропних механізмів (модельні дослідження) – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2016.

Дисертацію присвячено виявленню ролі співвідношення іонотропних та метаботропних механізмів, які лежать в основі збудливості гладеньком'язових клітин детрузора сечового міхура (ГМК ДСМ).

Встановлено: 1) величина результуючої відповіді ГМК ДСМ на дію парасимпатичних стимулів характерним чином залежить від співвідношення інтенсивностей іонотропного і метаботропного компонентів таких стимулів;

2) струми через Ca^{2+} -залежні хлорні канали, які є кінцевою ланкою метаботропного шляху, в значній мірі визначають парасимпатичне збудження ГМК ДСМ.

Показано: 1) можливість компенсації послабленої відповіді клітини на парасимпатичний стимул в умовах дефіциту м-холінорецепторів за рахунок стимуляції іонотропних P2X-рецепторних каналів; 2) зниження порогу збудження при збільшенні провідності P2X-рецепторних каналів, що імітує дію пуриноміметиків; 3) складний, двофазний процес відновлення амплітуди ПД пов'язаний з інактивацією кальцієвих каналів, зменшенням їх рушійного потенціалу, параметрами механізмів екструзії Ca^{2+} .

Запропоновано шляхи оптимізації існуючих протоколів електростимуляції, які застосовуються при реабілітації пацієнтів з патологіями нижніх сечовивідних шляхів.

Ключові слова: математична модель, гладеньком'язова клітина, детрузор, парасимпатична іннервація, пуринорецептори, мускаринові холінорецептори, електростимуляція, кальцій-залежний хлорний струм.

Коченов А.В. Возбудимость гладкомышечной клетки: влияние соотношения ионотропных и метаботропных механизмов (модельные исследования) – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.02 – биофизика. Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2016.

Диссертация посвящена выявлению роли соотношения ионотропных и метаботропных механизмов, лежащих в основе возбудимости гладкомышечных клеток детрузора мочевого пузыря (ГМК ДМП).

Установлено: 1) величина результирующего ответа ГМК ДМП на действие парасимпатических стимулов характерным образом зависит от соотношения интенсивностей ионотропного и метаботропного компонентов таких стимулов; 2) токи через Ca^{2+} -зависимые хлорные каналы, являющиеся конечным звеном метаботропного пути, в значительной степени определяют парасимпатическое возбуждение ГМК ДМП.

Показано: 1) возможность компенсации ослабленного ответа клетки на парасимпатический стимул в условиях дефицита м-холинорецепторов за счет стимуляции ионотропных P2X-рецепторных каналов; 2) снижение порога возбуждения при увеличении проводимости P2X-рецепторных каналов, что имитирует действие пуриноиметиков; 3) сложный, двухфазный процесс восстановления амплитуды ПД связан с инактивацией кальциевых каналов, уменьшением их движущего потенциала, а также параметрами механизмов экструзии Ca^{2+} .

Предложены пути оптимизации существующих протоколов электростимуляции, применяющихся при реабилитации пациентов с заболеваниями нижних мочевыводящих путей.

Ключевые слова: математическая модель, гладкомышечная клетка, детрузор, парасимпатическая иннервация, пуринорецепторы, мускариновые холинорецепторы, электростимуляция, кальций-зависимый хлорный ток.

Kochenov A.V. The excitability of the smooth muscle cells: influence of the ratio of ionotropic and metabotropic mechanisms (a simulation study) – Manuscript.

Thesis for Ph.D. degree in biological sciences, specialty 03.00.02 – biophysics. Bogomolets Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv, 2016.

This study is devoted to revealing the role played by the ratio of ionotropic and metabotropic mechanisms underlying the excitability of a smooth muscle cell of the urinary bladder detrusor (SMC UBD).

For the first time, a model of the SMC UBD has been developed. It included a set of channels typical of a prototype. The SMC UBD model also includes an author's model of the Ca^{2+} -dependent chloride current. The model adequately reproduces available experimental data (value of the resting membrane potential, amplitude of the action potential, shape and components of the action potential, including afterdepolarization and afterhyperpolarization, level of intracellular Ca^{2+} concentration at rest, level of intracellular Ca^{2+} concentration during its release from the intracellular store at modeling parasympathetic activity and the ratio of Ca^{2+} -currents at the peak of action potential) obtained from cell's of the prototype, which means suitability of the model for the study of previously unstudied processes in this type of cells.

It is shown that the value of the SMC UDB response to the action of parasympathetic stimulus is characteristically dependent upon the intensity ratio of ionotropic and metabotropic components of such stimulus. Currents through Ca^{2+} -dependent chloride channels, which are the final element of the metabotropic signaling pathway, largely determine parasympathetic excitation of SMC UBD. Analysis of the excitability of the cell show that the complex, two-phase process of restoring the action potential amplitude is associated with the inactivation of calcium channels, decrease of their driving potential and kinetic parameters of the mechanisms of Ca^{2+} extrusion. We also found a reduction of the excitation threshold with increasing conductivity of the P2X receptor channels that mimics the action of purinomimetics. According to the impact of the ratio of metabotropic and ionotropic components of parasympathetic action on the excitability of an urinary bladder SMC, we observe the possibility of compensating for the weakened response of a cell to a parasympathetic stimulus caused by deficiency of the metabotropic muscarinic M2/M3-cholinoreceptors, by stimulation of the ionotropic P2X receptor channels. These results allow us to propose ways of optimization existing stimulation protocols, which are used in rehabilitation of the patients with diseases of lower urinary tract.

Keywords: mathematical model, smooth muscle cell, detrusor, parasympathetic innervation, purinoreceptors, muscarinic cholinoreceptors, electrostimulation, calcium-dependent chloride current.