

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
МІЖНАРОДНИЙ ЦЕНТР МОЛЕКУЛЯРНОЇ ФІЗІОЛОГІЇ**

на правах рукопису

УДК 577.3: 51-76

КОЧЕНОВ АРТЕМ ВЕНІАМІНОВИЧ

**ЗБУДЛИВІСТЬ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВОЇ КЛІТИНИ: ВПЛИВ
СПІВВІДНОШЕННЯ ІОНОТРОПНИХ І МЕТАБОТРОПНИХ
МЕХАНІЗМІВ (МОДЕЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ)**

03.00.02 - біофізика

Дисертація
на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник
доктор біологічних наук, професор
Корогод Сергій Михайлович

Київ – 2016

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	15
1.1 Нервова регуляція ДСМ та її порушення	15
1.1.1 Характеристика порушень сечовипускання.....	22
1.2 Регуляція активності ГМК ДСМ	26
1.3 Біофізичні механізми регуляції ГМК ДСМ.....	32
1.4 Математичне моделювання як інструмент дослідження	43
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	45
2.1 Модель ГМК ДСМ	45
2.2 Програмне середовище «НЕЙРОН».....	47
2.3 Моделювання електричних процесів	48
2.4 Моделювання динаміки концентрації кальцію	54
2.5 Протоколи обчислювальних експериментів.....	56
2.5.1 Дослідження вольтамперних і моль-амперних характеристик.....	56
2.5.2 Дослідження характеристик збудливості мембрани ГМК ДСМ	57
2.5.3 Дослідження реакцій модельної ГМК ДСМ на електричні та парасимпатичні стимули	59
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	61
3.1 Характеристика Ca^{2+} -залежного хлорного струму – важливого чинника збудливості ГМК.....	61
3.1.1 Вольтамперні характеристики.....	61
3.1.2 Моль-амперні характеристики – залежність струму від внутрішньоклітинної концентрації кальцію	64
3.1.3 Особливості динаміки потенціал- і кальційзалежної активації струму.....	66
3.1.4 Обговорення	72
3.2 Біофізичні механізми електричного і парасимпатичного збудження ГМК ДСМ.....	75
3.2.1 Характеристики електричної збудливості модельної ГМК ДСМ	77

3.2.2 Особливості відповідей модельної ГМК на електричну стимуляцію, пов'язані з впливом калієвих струмів.....	84
3.2.3 Реакції ГМК ДСМ у відповідь на парасимпатичну стимуляцію	86
3.2.4 Особливості відповідей модельної ГМК ДСМ на парасимпатичну стимуляцію, пов'язані з впливом калієвих струмів	90
3.3 Вплив співвідношення метаботропного та іонотропного компонентів парасимпатичної дії на збудливість ГМК ДСМ.....	94
3.3.1 Відповіді ГМК на дію поодинокого парасимпатичного стимулу при різних співвідношеннях метаботропного та іонотропного компонентів.....	94
3.3.2 Відповіді ГМК ДСМ на парну парасимпатичну стимуляцію	101
3.4 Особливості біофізичних процесів у ГМК ДСМ при множинній електричній і парасимпатичній стимуляції	105
3.4.1 Відповіді модельної ГМК на множинну електричну стимуляцію	105
3.4.2 Парціальні струми при генерації усталених відповідей на множинну електричну стимуляцію.....	109
3.4.3 Реакція ГМК на періодичні парасимпатичні стимули	114
3.4.5 Парціальні струми при генерації усталених відповідей на множинну парасимпатичну стимуляцію	117
3.4.6 Основні клітинні ефекти та біофізичні основи для аналізу і вибору протоколів реабілітаційної електростимуляції.....	121
3.4.6 Реакції ГМК ДСМ на комбіновану електричну і парасимпатичну багатоімпульсну стимуляцію.....	125
РОЗДІЛ 4 ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	128
4.1 Особливості моделі Ca^{2+} -залежного хлорного струму.....	128
4.2 Характеристика розробленої моделі ГМК ДСМ.....	130
4.3 Роль метаботропних і іонотропних механізмів у збудливості ГМК ДСМ.....	135
ВИСНОВКИ.....	138
ДОДАТОК «А»	140
ДОДАТОК «Б»	142
ДОДАТОК «В»	145
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	149

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

$[Ca^{2+}]_i$ – внутрішньоклітинна концентрація вільних іонів кальцію;

АТФ – аденозинтрифосфат;

ГМК – гладеньком’язова клітина;

ДСМ – детрузор сечового міхура;

МП – мембранний потенціал;

ПД – потенціал дії;

СР – саркоплазматичний ретикулум;

ВАХ – вольт-амперна характеристика;

ЛП – латентний період;

МСІ – міжстимульний інтервал;

цАМФ – циклічний аденозинмонофосфат.

Вступ

Однією з фундаментальних проблем клітинної біофізики є проблема збудливості, яка характеризує здатність клітини відповідати на подразник переходом із стану спокою у стан збудження. Електричним проявом останнього є деполяризація клітинної мембрани, спричинена вхідними струмами через іонні канали, керовані потенціалом і/або лігандами. Природними лігандами, що спричиняють такий ефект, є нейромедіатори збудження, які, окрім відкриття іонних каналів вхідного струму завдяки з'єднанню з чутливими до даного ліганду канальними рецепторами (іонотропний механізм), також діють на інші мембранні рецептори, через котрі запускають ланцюги внутрішньоклітинних обмінних процесів (метаботропний механізм). Отже, збудливість і збудження клітини того чи іншого типу залежать від властивостей і співвідношень рецепторів та іонних каналів, присутніх в її мембрані, а також від внутрішньоклітинних метаболічних процесів, котрі на певному етапі після запуску лігандом можуть змінити властивості каналів. При вивченні клітин певного типу актуальним є питання, при яких відхиленнях від нормальних співвідношень між відповідними ендогенними механізмами і процесами, що забезпечують збудження, виникає аномальне підвищення або зниження збудливості.

Актуальним є також пов'язане із попереднім питання про можливі шляхи компенсації виниклих функціональних аномалій, зокрема за рахунок компенсаторної дії екзогенних факторів, як фармакологічних (застосування антагоністів або агоністів медіатору, блокаторів тих чи інших іонних каналів), так і електричних (поляризація струмами різної полярності). Зазначені запитання адресуються як нейронам, так і іншим збудливим клітинам, наприклад, клітинам гладеньких м'язів (ГМК) сечовивідних шляхів, зокрема детрузору сечового міхура (ДСМ). Адже відомо, що аномалії їх збудливості спостерігаються у випадках порушення експресії метаботропних мускаринових ацетилхолінових рецепторів (M2 і M3 типу),

присутніх у мембрані разом із різноманітними іонними каналами, обмінниками і насосами.

Вибір саме ГМК сечовивідних шляхів, зокрема детрузора, для дослідження виникнення аномально підвищеної збудливості визначається декількома обставинами.

По-перше, проявом аномально підвищеної збудливості ГМК є підвищена спонтанна скорочуваність (*spontaneous contractility*), яка спостерігалася «*in vitro*» у зразках тканини сечового міхура пацієнтів із синдром аномально підвищеної активності сечового міхура (*overactive bladder syndrome*) та тварин із обструкцією відтоку сечового міхура [1–3].

По-друге, синдром аномально підвищеної активності сечового міхура є одним із дуже поширених нейроурологічних розладів, що реєструється у мільйонів пацієнтів в усьому світі [4].

По-третє, при різних видах патології сечовивідних шляхів, зокрема таких, як гіперактивний, нейрогенний або ідіопатичний сечовий міхур, обструкція відтоку сечового міхура, щільність і функція мускаринових рецепторів може змінюватись (див., наприклад, [5–7]). Хоча існують і інші дані, згідно з якими при ідіопатичній і нейрогенній гіперактивності ДСМ співвідношення між внеском холінергічних рецепторів у розвиток скорочення не змінюється [8].

Пошук відповідей на вищевказані запитання та розкриття біофізичних механізмів, які лежать в їх основі, за допомогою біологічно обґрунтованих комп'ютерних моделей, став предметом даної роботи.

Дисертація складається з трьох розділів.

В І розділі «Огляд літератури» наведено сучасні літературні дані вітчизняних та закордонних авторів про предмет дослідження, зокрема біофізичні характеристики ГМК сечового міхура та детрузора, особливості регулювання з боку нервової системи. Розглянуто основні іонні канали, насоси та рецептори, присутні як на мембрані ГМК ДСМ, так і на мембрані саркоплазматичного ретикулума. Описано їх роль у нормі та при патології.

В розділі II «Матеріали та методи досліджень» описано програмне середовище, у якому проводилась робота та створювались відповідні моделі. Описано математичні моделі іонних каналів, обмінників та насосів, розташованих як на мембрані клітини, так і на мембранах внутрішньоклітинних органел, застосованих у роботі, зокрема, комплексну модель клітини гладенького м'яза детрузора. Також описано моделі різних протоколів стимуляції, включаючи ті, що застосовуються у клінічній практиці.

В розділі III «Результати досліджень» наведено отримані результати на основі яких зроблено висновки.

В розділі IV «Обговорення результатів досліджень» наведено критичний аналіз отриманих результатів, розробленої моделі ГМК ДСМ в цілому, та окремих її механізмів (іонних каналів і т.д.).

Завершується робота висновками та переліком цитованої літератури із 204 найменувань.

Роботу викладено на 170 сторінках (139 сторінок загального обсягу дисертації) і проілюстровано 24 рисунками.

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 [9]. Так, порушення функцій нижніх сечовивідних шляхів є дуже розповсюдженими патологіями [10–13 та ін.], у тому числі і серед дітей [14]. Окрім суттєвого зниження якості життя пацієнтів [15], такі захворювання пов'язані зі значними негативними економічними наслідками [12]. 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 [16, 17]. 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 механізмів у патофізіології нижніх сечових шляхів, точні причини виникнення розладів у роботі сечовивідної системи досі вивчені вкрай недостатньо [13, 18–20 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 [13, 21]. 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 у різних областях знання. Вони набувають все ширшого застосування у біологічних науках, зокрема у 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 [22–25 та ін.].

На сьогодні є досить розвиненою областю моделювання нервових клітин. 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 [26]. 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. [27] 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 пуринергічної 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, що 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 (ГМК) детрузора сечового міхура (ДСМ), залежні від співвідношень іонотропних пуринових і метаботропних мускаринових компонентів парасимпатичних впливів на клітини.

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 метаботропного 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 дослідження – Біологічно обґрунтована математична модель ГМК детрузора сечового міхура.

Предмет дослідження – особливості збудливості ГМК сечовивідних шляхів у залежності від співвідношень іонотропних і метаботропних механізмів парасимпатичної дії на клітини.

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

Новизна отриманих 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 отриманих результатів

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 метаботропних 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, сформульовані 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Тканини гладеньких м'язів відрізняються від скелетної та серцевої як за функціями, так і за структурою. Вони формують зв'язки та оболонки навколо інших тканин у майже всіх органах та відіграють важливу роль у різних системах організму [28].

1.1 Нервова регуляція ДСМ та її порушення

Вісцеральний гладенький м'яз має подвійну вегетативну іннервацію – парасимпатичну та симпатичну. Подразнення одного з вегетативних нервів зазвичай підвищує активність м'язу, стимуляція іншого – зменшує. У деяких органах, наприклад, у кишечнику, стимуляція адренергічних нервів зменшує, а холінергічних – підвищує м'язову активність. У судинах норадреналін підсилює, а ацетилхолін зменшує м'язовий тонус. Будова нервових закінчень у гладких м'язах відрізняється від будови нервово-м'язового синапсу у скелетних м'язах. У гладких м'язах немає кінцевих пластин та окремих нервових закінчень. По всій довжині розгалужень адренергічних та холінергічних нейронів знаходяться потовщення, які називаються *варікозами*. Вони містять гранули з медіатором, який виділяється з кожної варікози нервових волокон. Таким чином, на протязі всього нервового волокна можуть збуджуватись або гальмуватись багато клітин гладеньких м'язів. Клітини, які не мають безпосереднього контакту з варікозами, активуються потенціалами дії (ПД), які розповсюджуються через нексуси на сусідні клітини. Швидкість розповсюдження збудження у клітинах гладких м'язів невелика і дорівнює декільком сантиметрам у секунду.

Збуджуючий вплив адренергічних або холінергічних нервів проявляється у вигляді окремих хвиль деполяризації. При повторному стимулюванні ці

хвилі підсумовуються і при досягненні порогового значення викликають ПД. Гальмуючий вплив адренергічних або холінергічних нервів проявляється у вигляді окремих хвиль гіперполяризації, які називаються гальмівними постсинаптичними потенціалами (ГПСП). При ритмічному стимулюванні ГПСП також підсумовуються. [29]

Регуляція функцій сечовипускання здійснюється як рефлекторними (мимовільними), так і довільними механізмами. Утримання і видалення сечі сечовим міхуром забезпечується координованими скороченнями і розслабленнями гладких м'язів, які утворюють детрузор і внутрішній сфінктер. Детрузор забезпечує розтягнення сечового міхура при накопиченні у ньому сечі, а також скорочення при його спорожненні. Функцію утримання сечі забезпечує сфінктер.

Спинальний парасимпатичний центр знаходиться у бічних рогах спинного мозку на рівні сегментів S2–S4. Від нього парасимпатичні волокна йдуть у складі тазових нервів та іннервують гладкі м'язи сечового міхура, здебільшого детрузор. Парасимпатична іннервація забезпечує скорочення детрузора та розслаблення сфінктера, тобто вона відповідає за спорожнення сечового міхура. Симпатичну іннервацію забезпечують волокна, що йдуть від мотонейронів бічних рогів спинного мозку (сегменти T11–T12 та L1–L2) і проходять у складі підчеревних нервів (*n. hypogastrici*) до внутрішнього сфінктера сечового міхура. Симпатична стимуляція призводить до скорочення сфінктера та розслаблення детрузора, що гальмує спорожнення сечового міхура. Вважають, що ураження симпатичних волокон не призводить до порушень сечовипускання. Припускають, що еферентні волокна сечового міхура представлені лише парасимпатичними волокнами.

Функціонування сечового міхура забезпечується спинальним рефлексом: скорочення сфінктера супроводжується розслабленням детрузора – сечовий міхур наповнюється сечею. Після наповнення сечового міхуру скорочується детрузор та розслаблюється сфінктер – сеча виводиться. За таким типом

сечовипускання здійснюється у дітей у перші роки життя, коли акт сечовипускання не контролюється свідомо, а здійснюється за механізмом безумовного рефлексу.

У здорової людини сечовипускання здійснюється за типом умовного рефлексу – свідоме затримування сечовипускання при виникненні позиву та спорожнення міхура за бажанням. Довільна регуляція здійснюється за участю коркових сенсорних моторних зон. До супроспинальних контролюючих механізмів відноситься і мостовий центр (Барінгтона), який входить до складу ретикулярної формації. Аферентна частина цього умовного рефлексу починається з рецепторів, які знаходяться у внутрішньому сфінктері. Далі сигнал через спинномозкові вузли, задні корінці, задні канатики, довгастий мозок, міст, середній мозок направляються до сенсорної кори (*girus fornicatus*), звідки по асоціативних волокнах імпульси надходять у кірковий руховий центр сечовивільнення, який локалізується в парацентральної часточці (*lobulus paracentralis*). Еферентна частина рефлексу у складі кірково-спинномозкового шляху пролягає у бічних та передніх канатиках спинного мозку та закінчується у спинальних центрах сечовипускання (сегменти S2–S4), які мають двобічний кірковий зв'язок. Далі волокна через передні корінці, статеве сплетення та статевий нерв (*n. pudendus*) досягають зовнішнього сфінктера сечового міхура. При скороченні зовнішнього сфінктера детрузор розслаблюється та настає гальмування позиву до сечовипускання. При сечовипусканні напружується не тільки детрузор, але й м'язи діафрагми і черевного преса; у свою чергу, внутрішній та зовнішній сфінктери розслаблюються [30].

Таким чином, безумовний спинальний рефлекс спорожнення та закриття сечового міхура підпорядковується кірковим впливам, які забезпечують свідоме сечовипускання. В цілому сечовипускання є складним нервово-рефлекторним актом. У реалізації процесів накопичення сечі та випорожнення сечового міхура приймає участь велика кількість еферентних

та аферентних нервових шляхів, рефлексів, центральних та периферійних нейротрансмітерів. Серед нейротрансмітерів слід відмітити наступні:

- глутамат, який має збуджуючу дію на провідні шляхи, що мають відношення до акту сечовивільнення;
- серотонін – викликає підсилення симпатичного рефлексу та пригнічення парасимпатичного рефлексу сечовивільнення, що сприяє накопиченню сечі;
- допамін – при взаємодії з рецепторами D1 пригнічує активність сечового міхура, а при взаємодії з D2 стимулює сечовивільнення;
- ацетилхолін є переважно периферійним нейротрансмітером, який напряму відповідає за скорочення детрузора (Рис. 1.2).

Найбільш значущим у цьому плані є вплив ацетилхоліну на мускаринові M3 рецептори. Вважається, що скорочення детрузора може бути також опосередковано дією ацетилхоліну на M2 рецептори та подальшим зменшенням кількості внутрішньоклітинного циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ). Зміщення фокусу впливу ацетилхоліна з M3 на M2 рецептори може мати місце при старінні, інфравезикальній обструкції і неврологічних захворюваннях.

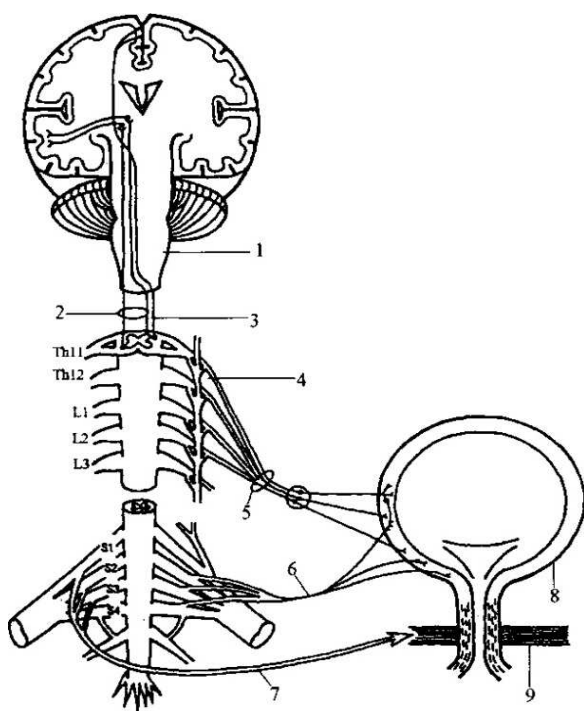


Рисунок 1.1 *Схема іннервації сечового міхура [30]. 1 – стовбур головного мозку; 2 – аферентні шляхи; 3 – еферентні (пірамідні) шляхи; 4 – симпатичний стовбур; 5 – підчеревні нерви (симпатична іннервація); 6 – тазові нерви (парасимпатична іннервація); 7 – соромливі нерви (соматична іннервація); 8 – м'яз, який виштовхує сечу; 9 – сфінктер сечового міхура.*

Все більше уваги в останній час приділяється ролі сенсорних аферентних нервів у фізіології сечовипускання та патофізіології гіперактивності детрузора.

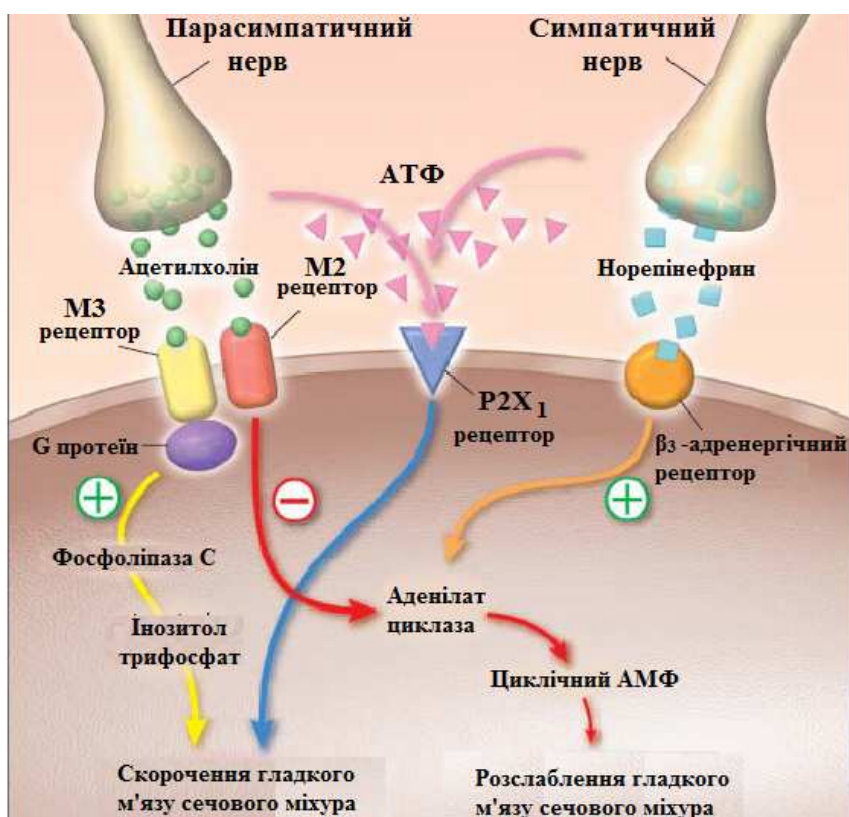


Рисунок 1.2 Автономна еферентна іннервація клітин детрузора [31].

У процесі наповнення сечового міхура аферентна імпульсація від нього та від уретри надходить по тазових нервах до спинного мозку, що викликає підвищення тону симпатичної нервової системи для пригнічення парасимпатичного рефлексу сечовивільнення. Накопичення сечі також реалізується за рахунок релаксації детрузора при стимуляції β_3 -адренорецепторів. Мієлінізовані А-дельта сенсорні волокна відповідають за пасивну дистензію та активне скорочення детрузора. Немієлінізовані сенсорні волокна С-типу мають більш високий механічний поріг подразнення та реагують на дію різних нейротрансмітерів. При цьому волокна С-типу практично неактивні в умовах нормального сечовивільнення, але при гіперактивності детрузора, ідеопатичній або нейрогенної етіології грають ключову роль.

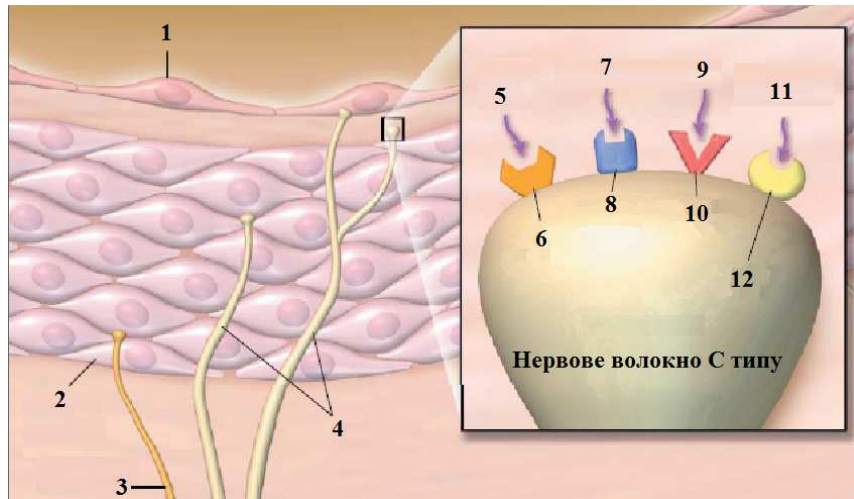


Рисунок 1.3 Сенсорна іннервація детрузора [31]. 1 – уроепітеліальні клітини; 2 – ГМК детрузора; 3 – сенсорне волокно типу А-дельта; 4 – сенсорне волокно С-типу; 5 – фактор росту нервів (NGF), 6 – *trk-A* рецептор; 7 – капсаїцин (ендогенний анандамід); 8 – ванілоїдні рецептори; 9 – АТФ; 10 – P2X рецептори; 11 – нейрокінін та субстанція Р; 12 – нейрокінінові рецептори.

На аферентних нервах є кілька типів рецепторів: ванілоїдні, що активуються капсаїцином та, вірогідно, ендogenousним анандамідом; пуринергічні (P2X), що активуються АТФ; нейрокінінові, що активуються субстанцією Р та нейрокініном А; рецептори для фактору росту нервів (*trk-A* рецептори для NGF). Стимуляція будь-якого з цих рецепторів може призводити до гіперактивості детрузора. Вважається, що реорганізація рефлексу сечовивільнення в умовах інфравезикальної обструкції може зумовлювати гіпертрофію як аферентних (більшою мірою), так і еферентних нейронів, що супроводжується підвищеною експресією NGF як у самому сечовому міхурі, так і у сакральних нервових центрах [31].

Багато клітин гладеньких м'язів не інеровано руховими мотонейронами, а ті нейрони, які іннервують гладенькі м'язи, знаходяться під неусвідомленим контролем. Зазвичай, ГМК поділяють на мультиунітарні та вісцеральні. Мультиунітарні клітини гладеньких м'язів інеровані

моторними одиницями так само як у скелетних м'язах, але кожна ГМК може бути пов'язана більш ніж з одним мотонейроном, і, навпаки, у багатьох клітин може бути відсутній зв'язок з мотонейроном. Мультиунітарні ГМК подібні до скелетних і серцевих м'язів у своїй активності, яка полягає у генерації ПД, що розповсюджується по сраколемі; однак, перші скорочуються більш повільно. Вони зустрічаються у райдужній оболонці ока, уздовж чоловічих статевих шляхів, у стінках великих артерій і, як правило, не зустрічаються у шлунково-кишковому тракті [28].

Вісцеральні ГМК зустрічаються у шарах, які покривають внутрішні органи. Вони розташовуються у складі пучків і тісно прилягають одна до одної. В межах кожного шару суміжні м'язові клітини пов'язані між собою нексусами (щільними з'єднаннями), що призводить до формування функціонального синцитію, забезпечує електричний зв'язок між клітинами та слугує для передачі збудження [29] і скорочення від клітини до клітини усюди по тканині. Нексуси дозволяють ПД та повільним хвилям деполяризації розповсюджуватись з однієї м'язової клітини на іншу, тому вісцеральні гладенькі м'язи скорочуються одночасно з приходом нервового імпульсу [29]. Кожного разу, коли м'язова клітина скорочується, електричний імпульс, який призвів до скорочення, може переходити на суміжні клітини. Тому, скорочення розповсюджується у вигляді хвилі, яка незабаром залучає кожен ГМК у шарі. Початковий стимул може бути активацією мотонейрону, який має контакт з однією із м'язових клітин в області. ГМК також можуть скорочуватись або розслаблюватись у відповідь на різноманітні фізичні фактори, такі як надзвичайне розтягнення або подразнення. Багато вісцеральних шарів ГМК демонструють ритмічну циклічну активність і при відсутності нервового збудження. Наприклад, ці цикли характерні для ГМК у стінці травного тракту, де клітини лідера (*pacesetter cells*) спонтанно викликають скорочення усіх м'язових шарів [28].

1.1.1 Характеристика порушень сечовивипускання

Порушення функцій нижніх сечовивідних шляхів (нейрогенний сечовий міхур, гіпер- та гіпоактивний сечовий міхур та ін.), є дуже розповсюдженим [10–12, 15, 32–36]. Наприклад, розповсюдженість гіперактивного сечового міхура з проявом різних симптомів у США та Європі складає від 12% до 17% і зростає з віком з однаковим рівнем серед чоловіків та жінок [11]. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (World Health Organization [37]), близько 200 мільйонів людей в усьому світі мають нетримання сечі. Розповсюдженість порушення функцій сечового міхура має значні економічні наслідки [12], а також призводить до суттєвого зниження якості життя хворих [15]. Окремо слід відзначити розповсюдженість цієї патології серед дітей (приблизно 10% дитячого населення) і її роль у розвитку вторинних змін сечовивідної системи (хронічний цистит, пієлонефрит, артеріальна гіпертензія та інші патології, що можуть призвести до ранньої інвалідізації), які супроводжують цю патологію у більш, ніж 30% випадках [14].

Проблема, пов'язана з порушенням функцій сечового міхура, є багатофакторною та недостатньо дослідженою [38–39], і, хоча, висувається багато гіпотез відносно ролі іонних каналів та інших механізмів у патофізіології нижніх сечовивідних шляхів, точна причина виникнення розладів у роботі сечового міхура досі невідома [18, 19, 32, 38, 40–42 та інші]. Багато біофізичних і фізіологічних аспектів збудження і скорочення ГМК залишаються мало вивченими через методичні обмеження (відповідним препаратом по своїй природі властива рухливість, що ускладнює стійку реєстрацію електричних і концентраційних процесів). Крім того, дослідження, спрямовані на вирішення даного питання, ставилися на тваринах різних видів [43], різного віку [44], з відсутністю або наявністю патологій [45, 46]. Діагностика та ефективне лікування зазначених вище розладів ускладнена

значною мірою через неповноту уявлень про механізми іннервації ГМК сечовивідних шляхів в нормі і патології [19, 47–48]. Існуючі на даний момент основні методи лікування ГСМ за допомогою фармацевтичних препаратів є малоефективними [49] (максимальний ефект досягається через декілька місяців [47], також сечовий міхур поступово адаптується до присутності препаратів [18 стор. 376]) та мають великий спектр побічних ефектів [10, 14, 19, 32, 42, 50–52], які обумовлені розповсюдженістю мускаринових рецепторів у тілі людини. Терапевтичний ефект залежить від селективності препарату [47] і навіть нові, більш селективні препарати, здатні лише зменшити дію побічних ефектів, але не призводять до значного підвищення ефективності лікування [19, 53]. Це пов'язано з тим, що їх дія на сечовий міхур може бути дуже складною, навіть якщо розглядати лише локальний вплив через мускаринові рецептори [32]. Також деякі автори [53] вказують, що у лікуванні розладів сечового міхура антихолінергічними препаратами присутній значний внесок ефекту «плацебо» (близько 30–50%) у клінічному поліпшенні стану пацієнтів. Серед різноманітності фізіотерапевтичних методів лікування порушень сечового міхура виділяють: електростимуляцію, електрофорез, гальванізацію, голкорексфлексотерапію тощо. Така різноманітність методів лікування обумовлена багатьма факторами, які разом сприяють виникненню патологічного стану але піддаються різним засобам лікування по одинці. Однак, багато методів не мають стійкого позитивного ефекту і потребують повторного курсу лікування, як, наприклад, введення бутулічного токсину.

Як вже зазначалось вище, патології функцій сечового міхура можуть супроводжуватись вродженими порушеннями експресії холінергічних рецепторів M2- і M3-типів. Іншими причинами порушень співвідношення між пуриновим і мускариновим компонентами можуть бути недостатня продукція ацетилхоліну або, навпаки, надмірна продукція АТФ (що спостерігається при запаленнях СМ [54]). Можливою причиною

представляється також збільшення експресії пуринорецепторів, проте дані про подібну молекулярну патологію ДСМ відсутні. Якщо при хірургічній корекції згаданих вад виявлялося збереження парасимпатичної іннервації тазових органів [54, 55], то стає можливим курс медичної реабілітації з використанням електростимуляції м'язів тазового дна і ЕМГ-контролю [56].

Успішність такого реабілітаційного підходу показала необхідність подальшого вдосконалення відповідної програми, зокрема, визначення фізіологічно і біофізично обґрунтованих мішеней та параметрів електростимуляції, спрямованої на компенсацію дефіциту парасимпатичної іннервації м'язів сечового міхура та запобігання дегенеративних змін. Але вибір параметрів електростимуляції, яка застосовується в цих випадках, ускладнений тим, що інформація про характеристики біофізичних та фізіологічних процесів у відповідних клітинах-мішенях вельми обмежена.

Додаткові труднощі пов'язані з тим, що вади розвитку органів супроводжуються патологічними змінами на клітинному рівні. Обґрунтований вибір параметрів електричних стимулів ускладнений невідомістю характеристик, викликаних ними в клітинах-мішенях біофізичних і фізіологічних процесів. Очевидно, при електростимуляції, в залежності від взаємного розташування електрода і ГМК-мішеней, збудження останніх може досягатися різними шляхами. А саме, або дією на мембранні рецептори ацетилхоліну та АТФ-медіаторів, які вивільняються з закінчень парасимпатичних нервових волокон в результаті надходження викликаних стимулами ПД, або прямою деполяризуючою дією стимулюючого струму на мембрану ГМК, або комбінацією першого і другого. Крім того, електростимуляція може зачіпати постгангліонарні симпатичні нервові волокна, що виділяють норадреналін – медіатор гальмування ГМК ДСМ. До того ж, існуючі методичні (а у випадку клінічної практики – етичні) обмеження роблять практично неможливим пряме експериментальне дослідження симетричних електричних і концентраційних

процесів у ГМК ДСМ. Однак, це можливо зробити за допомогою комп'ютерної моделі. Тому важливим є комплексний підхід та розуміння первинних причин виникнення патологічного стану. Ці обставини, а також необхідність підтримки функціонування вказаних систем у післяопераційний і реабілітаційний періоди, мотивують необхідність поглиблених досліджень фізіологічних і біофізичних механізмів функціонування ГМК в нормі та при патології. Отже, розкриття біофізичних механізмів, що забезпечують нервову регуляцію ГМК ДСМ, є актуальною фундаментальною задачею клітинної фізіології та біофізики; вирішення даної задачі має суттєві теоретичні та практичні значення.

1.2 Регуляція активності ГМК ДСМ

Досліджувати співвідношення між електричними та механічними проявами скорочення у вісцеральному гладкому м'язі важче, ніж в інших збудливих клітинах, через безперервну активність та нестабільний мембранний потенціал (МП), але в умовах відносного спокою можна зареєструвати поодинокі ПД. Коливання МП незалежно від нервових впливів викликають нерегулярні скорочення, які підтримують м'яз у стані постійного часткового скорочення – *тонусу*. Тонус гладких м'язів добре виражений у порожнистих органах, таких як сечовий міхур, жовчний міхур, а також у гладких м'язах артерій та артеріол. У періоди відносного спокою величина МП дорівнює приблизно -50 мВ. МП у клітинах сечового міхура та детрузора морської свинки може бути у діапазоні від -58 до -38 мВ (у середньому -42.9 ± 3.1 мВ [57], -48 мВ [58]) або від -41 до -47 мВ (у середньому -45 ± 1 мВ [59]); від -50 до -39 мВ (у середньому -43.1 ± 2.9 мВ [60]) – у ГМК детрузора свині; -41 мВ, -38.1 ± 4.3 мВ [50], -40 мВ [61], -45 мВ [40] та від -40 до -30 мВ [41] – у ГМК детрузора людини. У клітинах вісцеральних гладких м'язів спостерігаються повільні хвилеподібні флуктуації МП завбільшки декілька мілівольт. Також спостерігаються флуктуації ПД. У ГМК величина ПД варіюється у широкому діапазоні, а його тривалість – у середньому 50–250 мс. Зустрічаються ПД різної форми. Іонна природа ПД гладенького м'яза визначається особливостями каналів мембрани ГМК та механізмами їх регуляції. Пусковим механізмом для скорочення гладеньких м'язів є поява вільних іонів кальцію у цитоплазмі. При стимуляції потік іонів кальцію входить у клітину із зовнішньоклітинної рідини та саркоплазматичного ретикулуму (СР), що веде до збільшення концентрації іонів кальцію всюди по клітині, де вони взаємодіють з кальмодуліном (CaM), що в подальшому призводить до розвитку скорочення [27, 28].

ГМК детрузора формують стінку сечового міхура та проявляють спонтанні і нервово-опосередковані ПД, які викликають Ca^{2+} -залежні фазові скорочення. У морських свинок вхід Ca^{2+} через потенціалзалежні Ca^{2+} -канали L-типу відповідає за виникнення ПД (див. рис. 1.4), який активує фазові скорочення ГМК детрузора, тоді як фаза реполяризації керується більшою частиною через Ca^{2+} -залежні K-канали типу ВК. Багато досліджень вказують, що канали типу ВК є головними K^+ -каналами, які регулюють збудливість та скорочуваність ГМК детрузора у багатьох типах тварин [62, 63].

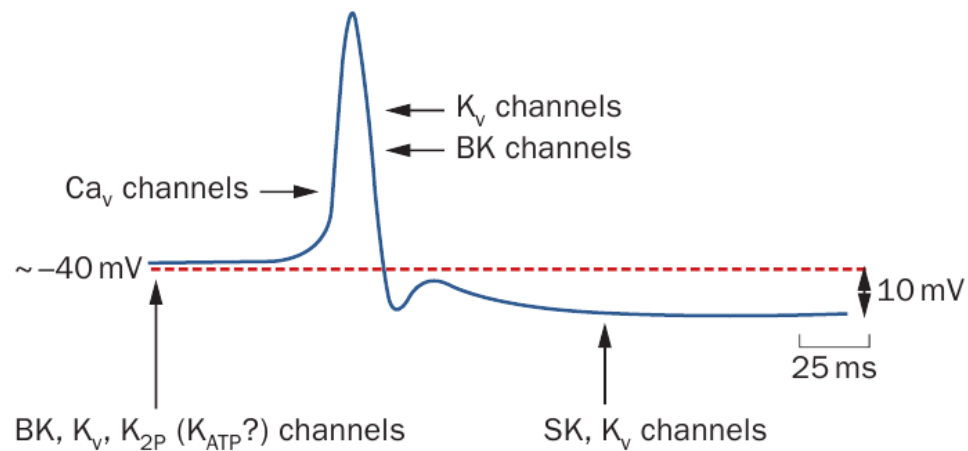


Рисунок 1.4 Схематичне зображення ПД у ГМК ДСМ та роль різноманітних K^+ -каналів у визначенні мембранного потенціалу спокою та ПД. [63] ВК – потенціал- та Ca^{2+} -залежні K^+ -канали великої провідності; Ca_v – потенціал-залежні Ca^{2+} -канали; K_{2P} – K^+ -канали, що мають дві пори у своїй структурі; K_{ATP} – АТР-чутливі K^+ -канали вхідного випрямлення; K_v – потенціалзалежні K^+ канали; SK – Ca^{2+} -залежні K^+ -канали малої провідності. ВК, K_v , K_{2P} , та, вірогідно, K_{ATP} канали, визначають потенціал спокою. ВК та K_v канали роблять внесок у початкову фазу реполяризації ПД. SK та K_v канали роблять внесок у тривалу фазу слідової гіперполяризації після ПД.

Вважається, що головним фактором скорочуваності ГМК сечового міхура є МП, за допомогою якого відбувається регулювання надходження Ca^{2+} через потенціал-залежні Ca^{2+} -канали, а K^+ -канали грають визначну роль у

контролюванні МП у якості головного гіперполяризуючого впливу [41]. За допомогою внутрішньоклітинних мікроелектродів було виявлено деполяризацію клітини у відповідь на стимуляцію мускаринових рецепторів у сечовому міхурі та інших гладеньких м'язах [58]. Хоча є дослідження, у яких вказується на незалежність виникнення скорочення від зміни МП [40] (наприклад, ГМК детрузора морської свинки проявляє спонтанну електричну та механічну активність [64]), що за даними інших авторів [65] характерно для нормально м'язу детрузора людини. Також повідомляється, що стимулювання мускриновими агоністами гладеньких м'язів сечового міхура не призводить до значних змін МП, виключаючи можливість взаємозв'язку збудження–скорочення, принаймні, для гладеньких м'язів сечового міхура миші [58]. Вхід Ca^{2+} може грати роль у генеруванні спонтанних скорочень, які спостерігаються у м'язі детрузора при патології сечового міхура, а також впливати на скорочувальну дію пуринаргічних нейротрансмітерів [65].

Згідно з існуючими уявленнями, пуриновий (Р-) шлях – це відкриття P2X-рецепторних каналів деполяризуючого струму, генерація збудливого потенціалу нервово-м'язового з'єднання (*excitatory junction potential*) і активація кальцієвого струму L-типу, який переносить Ca^{2+} із зовнішнього середовища [66, 67]. Мускариновий шлях (М-шлях) – це ланцюг біохімічних реакцій, кінцевим продуктом яких є інозитол-3-фосфат (IP3). Дія останнього веде до відкриття IP3-чутливих каналів CP, в результаті чого Ca^{2+} вивільняється з депо і виходить у цитозоль. Підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ забезпечує ініціацію скорочення ГМК і, паралельно, активацію Ca^{2+} -залежних каналів хлорного струму, що підсилює деполяризацію клітинної мембрани [21]. Отже, одним з головних компонентів нейрогенних стимулів, які роблять внесок у скорочуваність ГМК детрузора, є холінергічний сигнальний шлях, оскільки кінцевим результатом його активації є вивільнення Ca^{2+} із депо і деполяризаційне зміщення МП. Також вважається, що цей сигнальний шлях є основним механізмом скорочення сечового міхура. Ацетилхолін, який

вивільняється з нервового закінчення, активує мускаринові рецептори у ГМК детрузора і викликає фазові скорочення при нормальній функції сечовипускання [10, 40, 50]. Це можна перевірити, якщо взяти тканини сечового міхура у здорової людини і стимулювати нерв. В результаті ми отримаємо скорочення, чутливі до атропіну, за допомогою якого їх можна блокувати. Однак, вище зазначена схема актуальна для нормального стану, і не виключено, що за наявності дисфункції сечового міхура можуть вмикатись інші механізми [49]. Крім цього, слід зазначити, що точна послідовність подій холінергічного сигнального шляху досі залишається невизначеною [40].

Мускаринові рецептори фізіологічно представляють собою найбільш важливий механізм для скорочення сечового міхура. Відомо, що МЗ холінорецептори, які присутні в ГМК детрузора людини, пов'язані з системою вторинних посередників, і при стимуляції цього підтипу рецепторів активується G-протеїн, який мобілізує IP3 [40]. Роль останнього полягає у вивільненні Ca^{2+} з СР за допомогою активації відповідних рецепторів на його мембрані. Важливість вивільнення Ca^{2+} з СР було доведено дослідями з використанням блокаторів функцій СР. Ці дослідження показали, що нервово- та агоніст-індуковане скорочення залежать від функціонального стану СР [43]. Далі, вивільнений Ca^{2+} , зв'язуючись з кальмодуліном, активує білки, що скорочуються. Окрім цього, підвищена концентрація Ca^{2+} може сприяти подальшому вивільненню Ca^{2+} (*Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release*) через ріанодинові рецептори (*RyRs*) [40, 43]. Також виявлено, що при стимуляції більшість збудливих клітин демонструють двофазне підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Первинне підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ обумовлене IP3-керованим вивільненням з СР. Подальше тривале підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ залучає надходження зовнішньоклітинного Ca^{2+} через багато різноманітних шляхів, включаючи: депозалежні Ca^{2+} -канали (SOCC), потенціалзалежні Ca^{2+} -канали, пурінергічні рецептори, канали сімейства TRP (*transient receptor membrane*

potential channels) та $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник [69]. Розслаблення відбувається, коли $[\text{Ca}^{2+}]_i$ зменшується, Ca^{2+} переходить у СР, або видаляється з клітини за допомогою $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмінника та насосів плазматичної мембрани. Механізми, що відповідають за заповнення депо Ca^{2+} , залучають приток цих іонів за допомогою мембранних Ca^{2+} -каналів.

У гладенькому м'язі детрузора кішки, ацетилхолін-індуковане скорочення керується М3-рецептор залежною активацією $G_{q/11}$, PLC- $\beta 1$ та IP3-залежним вивільненням Ca^{2+} . Також визначено, що бетанехол-індуковане скорочення у детрузорі кроля було практично повністю припинено інгібуванням Rho-кінази у поєднанні з інгібуванням неселективних катіонних каналів. Отже, можна визначити, що активація мускаринових рецепторів включає активацію неселективних катіонних каналів та Rho-кінази. У дослідженнях ролі Rho-кінази у регулюванні скорочення і тонусу детрузора щура було визначено, що інгібування Rho-кінази блокує скорочення, викликане карбахолом, та не впливає на скорочення у відповідь на KCl. Показано, що у сечовому міхурі наявні високі рівні ізоформ Rho-кінази (I та II), а також, що у людському детрузорі інгібітор фосфоліпази C (U73122, який може блокувати генерацію IP3 у сечовому міхурі щура) не впливає у значній мірі на карбахол-стимульоване скорочення сечового міхура. У зв'язку з цим було зроблено висновок, що карбахол-індуковане скорочення сечового міхура людини керується М3-підтипом рецепторів і у значній мірі залежить від входу Ca^{2+} через ніфедипін-чутливі канали і активації сигнального шляху Rho-кінази. Таким чином, може виявитись, що основним шляхом активації мускаринових рецепторів у детрузорі людини через підтип М3 є вхід кальцію через L-тип Ca^{2+} -каналів та підвищення чутливості до Ca^{2+} -механізмів скорочення шляхом інгібування фосфатази легкого ланцюгу міозину за допомогою активації Rho-кінази [18]. Мускаринові рецептори підтипів М2 та М4, які є інгібуючими, можуть впливати на активність

аденіліл-циклази та інгібувати калієві канали (K_{ATP} та BK), неселективні катіонні канали та канали сімейства TRP [18].

Беручи до уваги вище зазначену інформацію, а також дані інших досліджень [65], можна зазначити, що у нормальному м'язі ДСМ людини збудження і скорочення ГМК ДСМ пов'язані з активацією метаботропних мускаринових рецепторів ацетилхоліном (АХ), що виділяється із закінчень парасимпатичних ефферентів [13, 20, 43, 70] – аксонів постгангліонарних нейронів, розташованих в тазовому сплетінні та стінці міхура. Невеликий внесок (3–5 % в нормі та дещо більший при деяких видах патології [70, 71]) забезпечує також АТФ, що виділяється з закінчень постгангліонарних парасимпатичних нервів і діє на пуренергічні іонотропні рецептори [69, 71]. Але в описаній вище картині бракує багатьох принципових деталей. Не повністю зрозуміла залежність функціонування каналів вхідного струму (зокрема, кальцієвого, що забезпечує генерацію деполяризаційних ПД) від активації метаботропних мускаринових рецепторів. Залишаються предметом дискусії ролі, які можуть грати в генерації ПД і ініціації скорочення ГМК різні рецептори (холін- і пуринергічні) і шляхи підвищення $[Ca^{2+}]_i$ [43, 72]. Багато змін в основі представленого механізму пов'язують з дисфункціями сечового міхура. Саме тому елементи цього механізму є ціллю для різних підходів у регулюванні відхилень активності сечового міхура, хоча точно не відомо, чи є ці зміни причиною або наслідком [73].

1.3 Біофізичні механізми регуляції ГМК ДСМ

Гладенькі м'язи мають велику чутливість до різних фізіологічно активних речовин: адреналіну, норадреналіну, ацетилхоліну, гістаміну та інших речовин. Це обумовлено наявністю специфічних рецепторів на їх мембрані. Якщо, наприклад, до гладенького м'язу додати адреналін або норадреналін, то підвищується МП, зменшується частота ПД, і м'яз розслаблюється. Інакше кажучи, спостерігаються той самий ефект, як і при стимуляції симпатичних нервів. Ацетилхолін впливає на МП та скорочення гладеньких м'язів, наприклад, кишечника, протилежно дії норадреналіну. Додавання ацетилхоліну у препарат гладеньких м'язів кишечника зменшує МП і підвищує частоту спонтанних ПД, у результаті чого підвищується тонус та зростає частота ритмічних скорочень. Інакше кажучи, спостерігається ефект, аналогічний ефекту при збудженні парасимпатичних нервів. Ацетилхолін деполяризує мембрану та підвищує її проникність для іонів Na^+ та Ca^{2+} [29]. ГМК також можуть скоротитися або розслабитися у відповідь на гормони, локальні зміни концентрації кисню або двоокису вуглецю [28].

Окрім реакції на різні хімічні речовини та нейротрансмітери, у регуляції збудливості ГМК ДСМ беруть участь іонні канали, рецептори та інші структури. Так, потенціалзалежні Ca^{2+} -канали грають важливу роль у ініціації скорочення у багатьох м'язах та є основним типом каналів, які ініціюють скорочення ГМК детрузора [28, 74–75]. На їх роботу може впливати активація P2X рецепторних каналів [76], кальмодулін (CaM), який зв'язуючись з Ca^{2+} відповідає за Ca^{2+} -залежну інактивацію каналу [77].

Два класи Ca^{2+} -каналів присутні у детрузорі (L-тип [59, 65, 78–80 та інш.] та T-тип [65, 80–81 та інш.]) та, загалом, у клітинах сечового міхура [80–82], і, можливо, вхід Ca^{2+} через ці канали є найбільшим. Автори робіт [59, 65, 78–82] вказують, що на скорочення у значній мірі впливають Ca^{2+} -канали

L-типу, у той час, як канали Т-типу у більше проявляють себе поблизу потенціалу спокою клітини, викликаючи генерацію спонтанних скорочень [43]. Функцію Ca^{2+} -каналів L-типу детально досліджено і, вважається, що у детрузорі цей тип каналів регулює заповнення Ca^{2+} внутрішньоклітинних депо під час стану спокою [31, 50] (див. схему на рис. 1.5). Це досягається регулюванням мембранного потенціалу Ca^{2+} -залежними K^+ -каналами. Які при низькій $[\text{Ca}^{2+}]_i$, одразу після скорочення, коли ще є деякий витік Ca^{2+} , зменшують свою провідність, мембрана деполяризується і Ca^{2+} -канали L-типу відкриваються, щоб відновити баланс Ca^{2+} у клітині [65].

Наявність Ca^{2+} -каналів Т-типу у детрузорі представляє інтерес, тому що вони відкриваються при більш негативному МП і дозволяють деякий приток Ca^{2+} навіть при потенціалі спокою. [73] У детрузорі внесок Ca^{2+} -каналів Т-типу у загальний Ca^{2+} -струм становить приблизно 20–30% [81]. Основною властивістю Ca^{2+} -каналів Т-типу є створення так званого «віконного» струму при МП спокою (як, наприклад, у клітинах міометрію людини, де вони є домінуючим підтипом), що може робити внесок до Ca^{2+} -залежних клітинних процесів або призвести до повільної деполяризації [83]. Остання дозволяє робити внесок у генерацію низькопорогових Ca^{2+} -спайків та коливань $[\text{Ca}^{2+}]_i$ з малою амплітудою. Такі локальні зміни у $[\text{Ca}^{2+}]_i$ можуть впливати на близько розташовані протеїни (прикладом є функціональний зв'язок з Ca^{2+} -залежними K^+ -каналами [84]). Крім цього, стабільний потік Ca^{2+} може сприяти повільному наповненню СР, і рівень його наповнення буде визначати спонтанні вивільнення і подальшу активацію Ca^{2+} -чутливого хлорного струму, який, як було показано, впливає на частоту скорочень [83]. Струми, обумовлені активністю Ca^{2+} -каналів Т-типу (так звані LVA-струми), пропадають у культивованих клітинах сечового міхура; одночасно з відсутністю цього струму змінювався поріг генерації ПД: з -25 мВ до -15 мВ, що може вказувати на їх роль у збудливості [85]. Крім цього, поріг ПД стає більш негативним при гіперполяризації МП, яка підвищує доступність

Ca^{2+} -каналів Т-типу, а, отже, при більш негативному потенціалі цей тип каналів буде робити більший внесок у загальний вхідний струм [81]. Вхідний Ca^{2+} -струм, який активується при негативних значеннях МП, також присутній у ГМК шлунково-кишкового тракту та у внутрішньотканинних (*interstitial*) клітинах, робить внесок у пейсмейкерну активність, можливо, через комплексну взаємодію між внутрішньоклітинними механізмами. А математичні моделі підтверджують важливу роль Ca^{2+} -каналів Т-типу у генерації ритмічної активності [81]. Селективна блокада низькими (мікромольними) концентраціями Ni^{2+} призводить до зменшення спонтанних скорочень у детрузорі. Однак вони не проявляють значного ефекту на подібні спонтанні зміни МП, де більш важлива роль активації Ca^{2+} -каналів L-типу. В цілому їхня фактична функція залишається нез'ясованою. Тому важливим є визначення ролі їх активності у регулюванні $[\text{Ca}^{2+}]_i$, а, отже, функції скорочення не тільки тому, що вони можуть керувати рівнем Ca^{2+} , але також і тому, що пропорція між каналами Т-типу порівняно з L-типом зростає у детрузорі надактивного сечового міхура.

У досліджах на Ca^{2+} -каналах Т-типу та м-холінорецепторах, експресованих у клітини типу НЕК, показано, що активація м-холінорецепторів може впливати на роботу різних підтипів Ca^{2+} -каналів Т-типу за допомогою G-протеїну, зокрема зв'язаного з рецепторами $G_{\alpha q/11}$. Активація рецепторів підтипу M3 та M5 призводить до інгібування Ca^{2+} -каналу Т-типу Cav3.3, в той час, коли активація M2 та M4, які зв'язані з $G_{\alpha i}$, ніяк не впливає на Cav3.3 [86]. В цілому, активація м-холінорецепторів може призвести до великої кількості ефектів у нативних Ca^{2+} -каналах Т-типу, включаючи стимуляцію та інгібування [86].

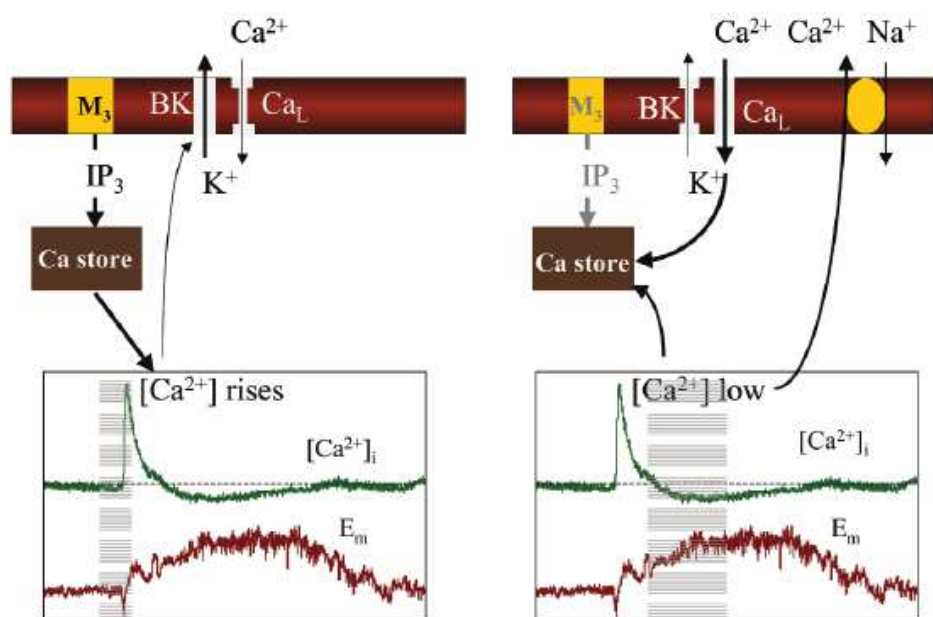


Рисунок 1.5 Контроль внутрішньоклітинного Ca^{2+} у детрузорі за допомогою зворотного зв'язку [73]. Схема зліва: концентрація внутрішньоклітинного кальцію $[Ca^{2+}]_i$ збільшується після виходу з депо в наслідок активації мускаринового рецептора. Підвищення $[Ca^{2+}]_i$ відкриває Ca^{2+} -залежні K^+ -канали (BK-типу) і гіперполяризує клітину. Це, у свою чергу, зменшує вірогідність відкриття мембранних Ca^{2+} -каналів. Схема справа: зменшення $[Ca^{2+}]_i$ після його переходу у депо і видалення з клітини за допомогою Na^+/Ca^{2+} -обміну веде до закриття BK каналів, викликаючи деполяризацію мембрани. Мембранні Ca^{2+} -канали відкриті, щоб дозволити вхід Ca^{2+} і, таким чином, відновити внутрішньоклітинний баланс Ca^{2+} . Експериментальні графіки, за якими побудовано схему, показані знизу.

Далі зупинимось на кожному з наявних у ГМК детрузора іонних каналів і насосів окремо та узагальнимо їх функції та властивості.

Ca^{2+} -канали L-типу. Можуть грати ключову роль у скороченні гладких м'язів [86], знаходиться у відкритому стані протягом тривалого часу. Вони мають велику провідність одиночного каналу та активуються у відповідь на відносно велику деполяризацію [19]. Для них характерна залежність як від потенціалу, так і від концентрації Ca^{2+} [64, 88–92]. Також вважається, що канали, які знаходяться поряд, можуть взаємодіяти поміж собою [64, 93–95].

На їх роботу впливає GTP-зв'язуючий протеїн-залежний механізм [96] та CaM, який може слугувати сенсором Ca^{2+} і для позитивної, і для негативної модуляції роботи каналу [88]. ПД у ГМК сечового міхура є результатом відкриття цього типу каналів, у той час, коли вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо не впливає на його ініціацію [57, 60].

Ca^{2+} -канали T-типу. Поодинокий канал має малу провідність, активується невеликою деполяризацією [19], демонструє: швидку активацію, повільну деактивацію та виражену потенціалзалежну інактивацію [81, 84–85, 94, 97–101]; їх провідність залежить від концентрації дівалентних катіонів [84]. Порогом активації у фізіологічних умовах є потенціал у діапазоні від -75 мВ до -60 мВ, а подальша деполяризація підвищує активність каналу [97]. Для клітин сечового міхура характерна наявність Ca^{2+} -каналів T-типу з порогом активації у -56 мВ, піком струму при -10 мВ та інактивацією при -60 мВ [85]. Відновлення після інактивації може бути описано однією або двома експоненціальними функціями зі сталими часу у діапазоні від 50 до 400 мс [97]. На роботу каналів впливає субодиниця $\beta\gamma$ G-протеїну, яка безпосередньо зв'язується з каналом та регулює його активність [85, 89]. Також можуть впливати РКА та РКС, кальмодулін-залежна протеїнкіназа II (CaMKII), G-протеїн та арахідонова кислота [85, 97, 102]. Повідомляється, що гладкі м'язи сечовивідного шляху в цілому проявляють спонтанну електричну та механічну активність різного ступеню, і одна з існуючих гіпотез говорить про внесок Ca^{2+} -каналів T-типу до генерації такої активності [81]. Так як струм через канали цього типу зареєстровано у багатьох ГМК, включаючи шлунково-кишковий тракт, сечовий міхур, уретру, міометрій, повітроносні шляхи та ін., то розглядається використання модуляторів цього типу каналів для зменшення м'язової гіперактивності у шлунково-кишковому тракті та сечовивідних шляхах [81].

Na^{+} -канали. Потенціалзалежні Na^{+} -канали грають головну роль у регулюванні клітинної збудливості, особливо при генерації ПД у нейронах,

клітинах скелетних та серцевих м'язів [103]. У більшості ГМК Na^+ -канали, хоча і наявні, але не є головним механізмом, необхідним для функціонування ГМК у нормі [19, 59]. Na^+ -струм був зареєстрований у вісцеральних гладких м'язах міометрію, товстої кишки, стравоходу, шлунку та уретри, а також у ГМК деяких судин [103] і сечового міхура [59]. Було відзначено, що в мембрані ГМК можуть бути істинні (genuine) натрієві канали як чутливі, так і не чутливі до ТТХ [21].

K^+ -канали затриманого випрямлення. Потенціал-залежні K^+ -канали присутні у ГМК детрузора [19, 60, 73]. Однак, важливість цього типу каналів у функціонуванні детрузора «in vivo» залишається у стадії вивчення [43, 75]. За припущенням, їх пов'язують з регулюванням реполяризації ПД гладких м'язів сечового міхура, регулюванням МП спокою [41] та частоти ПД [57, 104]. Для них характерна залежність часу активації, деактивації та інактивації від МП [105]. Аналогічна тенденція спостерігається і для потенціал-залежних K^+ -каналів у ГМК сечового міхура миші [41]. Також вказується, що процеси активації та інактивації у потенціал-залежних K^+ -каналах може регулювати PIP2 [106].

K^+ -канали типу Kir2.1. Цей тип каналів є важливим у регулюванні збудливості ГМК [107–109]. Для нього характерне вхідне випрямлення та залежність від МП.

Ca^{2+} -залежні K^+ -канали типу BK. Важливими для функціонування ГМК детрузора є Ca^{2+} -залежні K^+ -канали великої провідності (BK) [19, 104, 110–114]. Їх активація у ГМК сечового міхура призводить до значної гіперполяризації, що сприяє розслабленню ГМК детрузора [57, 74, 111, 115]. Канали активуються у відповідь на змінення МП та/або підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ за рахунок вивільнення Ca^{2+} з депо або входу через Ca^{2+} -канали [10, 43, 75, 104, 116]. Вони також беруть участь у формуванні спонтанних перехідних вихідних струмів (*STOCs-spontaneous transient outward currents*) [62, 113, 117–123] майже у всіх типах ГМК. Функціональний зв'язок між сполохами

$[Ca^{2+}]_i$ та STOCs критичний для регулювання скорочення ГМК, адже STOCs регулюють МП, який впливає на потенціал-залежні канали [117, 120]. Також ВК-канали грають важливу роль у визначенні частоти ПД та підтримці тону гладких м'язів [19]. Порушення у структурі каналів може призвести до розвинення гіпертензії, нетримання сечі і діабетичної ретинопатії у мишей [117]. Вони можуть модулюватись напряду через рецептори, пов'язані з G-протеїном (це єдиний тип каналу із усього сімейства, який може бути активований лише зміною МП [111]). Такими рецепторами у детрузорі є м-холінорецептори. У ГМК детрузора цей тип каналів грає центральну роль у регулюванні збудливості, спонтанних фазових і тонічних скороченнях, контролює МП спокою, сприяє зниженню $[Ca^{2+}]_i$ при активації [10, 50, 51, 61, 62, 122, 124].

Ca²⁺-залежні K⁺-канали типу SK. Важливими для функціонування ГМК детрузора є також Ca²⁺-залежні K⁺-канали малої провідності (SK) [18, 110–114]. На відміну від каналів типу ВК, канали SK є більш чутливими до змін $[Ca^{2+}]_i$ [110] і можуть бути активовані дуже низьким рівнем Ca²⁺. Для них константа напівактивації ($K_{1/2}$) знаходиться у діапазоні 300–700 нМ, що дозволяє цим каналам добре реагувати на зміни $[Ca^{2+}]_i$ за дуже короткий час (5–15 мс) [111]. Зазвичай вони є не чутливими до змін МП [110]. Вважається, що канали SK, а також потенціал-залежні K⁺-канали впливають на МП спокою і регулюють частоту ПД [57, 104]. Було показано, що цей тип каналів приймає участь у регуляції збудливості ГМК детрузора, що вхід Ca²⁺ через потенціалзалежні Ca²⁺-канали призводить до активації як ВК-, так і SK-каналів, але вивільнення Ca²⁺ (Ca²⁺-сполохи) через ріанодинові рецептори активує тільки ВК. Нечутливість каналів SK до Ca²⁺-сполохів пов'язана з їх малою щільністю [43, 75, 104]. На роботу K⁺-каналів типу SK може впливати CaM який, зв'язуючись з іонами Ca²⁺, може призвести до активації каналу [77, 104].

Канали пасивного витоку. K^+ -специфічні канали пасивного витоку можуть грати важливу роль у збудженні, в якості основного типу каналів витоку. Струм пасивного витоку впливає на МП спокою (як, наприклад, K^+ -канали вхідного випрямлення), змінює висоту та тривалість ПД [125]. Цей тип каналів може стабілізувати МП та сприяти реполяризації після ПД, а регулювання фонових струмів забезпечує механізм контролю клітинної збудливості [126]. У людини канали витоку представлені сімейством K^+ -каналів, яке налічує 15 елементів, ключовою особливістю яких є формування димерів у мембрані. α -субодиниці такого каналу складаються з чотирьох трансмембранних сегментів, кожен з яких у своєму складі має по два сегменти, які формують пору каналу. Тобто такі канали структурно відповідають двом α -субодиницям з властивістю направлено всередину випрямлення (*inward-rectifier*), за що вони і отримали назву K^+ -каналів з двома порами (*K_{2P}-two-pore domain K⁺-channels*). Останні поділяються на різні ізоформи та зустрічаються всюди в організмі [127], зокрема і в ГМК [128]. Так, представники цієї родини каналів, а саме потенціалнезалежні K^+ -канали з властивістю відкритого випрямлення «*open rectification*» (*KCNKO*) демонструють лінійну ВАХ з домінуванням вихідних струмів при фізіологічних умовах [125, 127]. Слід зазначити, що деякі типи каналів витоку можуть бути інгібовані в результаті активації МЗ-холінорецепторів [129].

Ca²⁺-залежні хлорні канали. Деполяризуючі Ca^{2+} -залежні хлорні канали присутні у багатьох типах ГМК [130–133], зокрема, і в клітинах сечового міхура [20, 31, 82]. Вважається, що ці струми грають важливу роль у клітинних процесах. Так, завдяки менш негативному рівноважному потенціалу у порівнянні з потенціалом спокою (за різними даними – від -32 мВ [20] до приблизно +2.2 мВ [150]) цей вхідний струм може суттєво зміщувати МП клітини у сторону деполяризації, тим самим сприяючи розвиненню електричного збудження [9, 20, 134,], м'язовому скороченню

[130] та інших, функціонально важливих, процесів в залежності від типу клітини. Вони активуються сигнальним шляхом, який веде від мускаринових рецепторів підтипу М3 через IP3-залежне вивільнення Ca^{2+} із депо [9, 135], і беруть участь у формуванні спонтанних перехідних вхідних струмів (*STICs-spontaneous transient inward currents*) [117–119, 136–139]. Хоча K^+ -канали типу ВК активуються та гіперполяризують мембрану клітини у відповідь на ту ж саму подію, вважається, що Ca^{2+} -залежні хлорні канали більш чутливі до змін $[\text{Ca}^{2+}]_i$, і вони можуть активуватись, знаходячись навіть на значних відстанях від місця підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Струм через Ca^{2+} -залежні хлорні канали та Ca^{2+} -канали може бути залучений до генерації спонтанної електричної активності в ізольованих клітинах уретри та до виникнення скорочення [118]. Добре відомо, що ці канали наявні у сарколемі ГМК і залучені до генерації м'язових скорочень [76]. Було показано, що вони грають важливу роль у сполученні механізмів збудження–скорочення [140] та міогенній спонтанній ритмічності (*myogenic spontaneous rhythmicity*) у різних гладеньких м'язах [18, 35, 81]. Крім цього, вони можуть відповідати як за початковий перехідний процес, так і за послідуєчі коливання вхідного струму [81]. Разом з цим, багато аспектів біофізики та молекулярної фізіології, що відносяться до цих функціонально важливих струмів, залишаються невирішеними. Не зовсім відомо, які мембранні протеїни можуть грати роль каналів для даного струму, ще менше досліджено конкретну роль каналів для вказаного струму у формуванні цілого ряду клітинних електричних та біохімічних процесів.

Математичні моделі даного струму нещодавно було створено лише для ендотеліальних клітин [141], ГМК легеневої артерії [142], міометрію [143] та клітин шлунково-кишкового тракту [144]. Для ГМК ДСМ, який представляє для нас особливу цікавість, такі моделі відсутні. Це і послугувало мотивацією для розробки відповідної моделі Ca^{2+} -залежного хлорного струму.

P2X-рецепторні канали неспецифічного струму. У сечовому міхурі пуринаргічні рецептори грають важливу роль як у нормі, так і при патології [145, 146]. Активація P2X-рецепторних каналів забезпечується виділенням з закінчень парасимпатичних постгангліонарних нервів АТФ [69, 71]. Також відомо, що пуринорецептори наявні у багатьох типах тканин та органів людини і тварин, зокрема, в гладеньких м'язах [147–149] і сечовому міхурі [146]. Згідно з деякими дослідженнями, P2X1-рецептори керують змінами $[Ca^{2+}]_i$ у ГМК протягом швидких синаптичних передач за допомогою АТФ [149]. Їх внесок становить лише близько 3–5 % у нормі, та значно зростає при виникненні деяких видів патологій [70, 71] (наприклад, при інтерстиціальному циститі, обструкції та нейропатії сечового міхура) і може досягати 40% [150, 151], та з віком людини [18, 150, 152]. P2X1 рецептори присутні у ГМК сечового міхура, при активації беруть участь у ініціації ПД [18, 153]. P2X1-рецептори керують скороченням гладеньких м'язів і зазвичай присутні разом з сімейством рецепторів, пов'язаних з G-протеїном (*GPCRs*). На їх активність впливає сигнальний шлях від активації PLC, що в цілому призводить до незалежної від $[Ca^{2+}]_i$ потенціації рецепторів [153]. Також інтерес представляє те, що вони в значній мірі проникні для Ca^{2+} і, завдяки цьому, роблять значний внесок у Ca^{2+} сигналізацію у збудливих та незбудливих тканинах [149].

Ca^{2+} -насос плазматичної мембрани (PMCA). Ca^{2+} -насоси плазматичної мембрани, зокрема PMCA, забезпечують регуляцію $[Ca^{2+}]_i$, тим самим захищаючи клітину від надвисоких концентрацій $[Ca^{2+}]_i$ у період розвинення скорочення, коли Ca^{2+} активно входить через іонні канали та вивільняється з депо.

Ca^{2+} -насос сарко(ендо)плазматичної мембрани (SERCA). Основна функція Ca^{2+} АТФази СР (SERCA) полягає у регулюванні $[Ca^{2+}]_i$ за рахунок енергії, що виділяється при гідролізі АТФ. А у м'язах різних типів SERCA

регулює процеси скорочення–розслаблення за рахунок акумулювання Ca^{2+} із цитоплазми всередину СР.

Серед рецепторів, які присутні у ГМК ДСМ, слід окремо виділити мускаринові м-холінорецептори. Існує 5 підтипів мускаринових рецепторів та 2 різні типи сигнальних шляхів. Стимулюючий шлях відноситься до підтипів М1, М3 та М5, активація яких стимулює фосфоліпазу С (*PLC*) та призводить до вивільнення кальцію і подальшої активації протеїнів, що скорочуються. Цікавим є те, що всі ці підтипи використовують один сигнальний шлях, але це не означає, що він є єдиним. Можливо, є й інші фактори, які приймають участь у процесі активації. До інгібуючого шляху відносяться підтипи М4 та М2, але це не означає, що вони сприяють блокуванню саме скорочення. Ці 2 підтипи блокують адренергічну циклазу (*adrenergic cyclase*) та циклічний аденозін монофосфат (*cAMP*), які, в свою чергу, є інгібіторами скорочення [49]. Рецептори підтипів М1, М2 та М4 є на нервових закінченнях, де, наприклад, протягом фази наповнення рецептори підтипів М2 та М4 блокують вивільнення ацетилхоліну [49]. Є наступна інформація про розподіл цих рецепторів у ГМК:

- Співвідношення між М2 та М3 рецепторами були встановлені як 3:1 у людини (підтверджується у [42, 154]) та 9:1 – у щурів [53].
- За іншими даними [155], співвідношення рецепторів підтипів М2 та М3 у сечовому міхурі людини та більшості ссавців становить приблизно 4:1.
- У людському сечовому міхурі імунопреципітаційні дослідження показали наявність ~70% М2 та ~30% М3 рецепторів. Однак, у дослідях з використанням методу закріплення міченого ліганда було виявлено 70% М2, 20% М3 та 10% М1 рецепторів [32] (аналогічні результати отримані у [53]). Можна відзначити, що у сечовому міхурі свині співвідношення М2 та М3 рецепторів аналогічне такому у людини, тоді як у щурів М3 рецептори складають лише 10% від всієї популяції [32].

1.4 Математичне моделювання як інструмент дослідження

Комп'ютерне моделювання є одним з ефективних методів вивчення складних систем різної природи. Як уже було зазначено вище, методи комп'ютерного моделювання стали невід'ємною частиною сучасних досліджень як прикладної, так і фундаментальної науки. Використання комп'ютерних моделей в обчислювальних експериментах дозволяє у значній мірі подолати методичні обмеження при дослідженні біологічних об'єктів. Стають можливими варіювання в широких межах багатьох параметрів досліджуваної системи та декомпозиція вихідних даних на окремі складники (наприклад, одночасна реєстрація електричних і концентраційних процесів та ролі окремих іонних каналів у їх розвитку). Останнє є дуже складним, або навіть неможливим у натурному експерименті. Однак, у порівнянні з моделюванням нервових клітин, моделювання ГМК (за винятком кардіоміоцитів) є дуже нерозвиненим. Як уже було зазначено, за даними пошуку у базі Pubmed, на момент початку даної роботи знайдено тисячі робіт, присвячених моделям нейронів, і лише декілька моделей ГМК сечового міхура [26, 27]. Остання з представлених моделей [27] є більш детальною. Вона головним чином зосереджена на динаміці внутрішньоклітинного Ca^{2+} в умовах зсуву і фіксації мембранного потенціалу з -60 мВ до 0 мВ [27], враховує основні типи іонних каналів, задіяних у генерації МП клітини, але не враховує дію метаботропних та іонотропних рецепторів.

Через обмеженість названих моделей вони не дають відповіді на питання щодо біофізичних механізмів парасимпатичної регуляції активності клітин через іонотропні та метаботропні шляхи. Отже, актуальною задачею є як розробка більш адекватних моделей даного типу клітин, так і використання цих моделей для розкриття основних функцій ГМК ДСМ в нормі і патології.

Огляд літератури показав, що наразі відомі основні типи іонних каналів, розташованих на мембрані ГМК ДСМ та мембрані СР, основні шляхи іннервації і мембранні рецептори, через які здійснюється регулювання функцій ГМК ДСМ, та багато елементів іонотропного та метаботропного шляху регуляції електричних і внутрішньоклітинних сигнальних процесів ГМК. Відомі порушення експресії та розподілу мембранних рецепторів (зокрема мускаринових) при певних вадах вроджених патологій сечового міхура. Разом з цим, в силу відмічених вище методичних обмежень, залишаються невизначеними багато ключових аспектів біофізичних механізмів, які забезпечують функціонування ГМК ДСМ. Так, залишається недостатньо дослідженим співвідношення мускаринового і пуринового компонентів парасимпатичної дії на ГМК ДСМ. Відсутня цілісна картина біофізичних механізмів сполучених електричних і внутрішньоклітинних сигнальних процесів у ГМК ДСМ у нормі і при патології. Невідомо, як проходять ці процеси при терапевтичних впливах на ДСМ, зокрема, при реабілітаційній електростимуляції органів малого тазу, що широко використовується у медичній практиці. Звідси випливає актуальність наступних задач: 1) побудувати модель Ca^{2+} -залежних хлорних каналів та дослідити їх властивості; 2) побудувати комп'ютерну модель ГМК ДСМ, що включає в себе основні типи властивих реальному біологічному об'єкту іонних каналів, насосів, кальцієвих депо та відображає процеси, пов'язані з активацією холінергічних та пуринергічних рецепторів; 3) визначити реакції модельної ГМК на електричну та парасимпатичну стимуляцію (з'ясувати можливу роль метаботропної активації каналів Ca^{2+} -залежного хлорного струму в ініціації ПД та підвищенні $[\text{Ca}^{2+}]_i$), зокрема, з використанням протоколів стимуляції, подібних до тих, які використовуються у клінічній практиці; 4) дослідити вплив різних співвідношень мускаринового та пуринового компонентів парасимпатичної дії на ГМК ДСМ.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Модель ГМК ДСМ

ГМК ДСМ представлено однокомпартментною моделлю у вигляді ізометричного циліндра діаметром $d=5$ мкм і довжиною $L=100$ мкм, що відповідало типовим розмірам біологічного прототипу [29, 43, 73, 156]. Питома ємність мембрани $C_m=1.426$ мкФ/см² була розрахована за даними з експерименту [62]. Компоненти моделі показані на схемі (Рис. 2.1). Сарколема мала характерний для прототипу набір іонних каналів і рецепторів. Це були канали вхідного Na^+ -струму (I_{Na}), Ca^{2+} -струму двох типів (I_{CaT} та I_{CaL}), Ca^{2+} -залежного хлорного струму ($I_{\text{Cl(Ca)}}$) 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}). Зміни $[\text{Ca}^{2+}]_i$ визначались надходженням Ca^{2+} у цитозоль ззовні через Ca^{2+} канали L- і T-типу, та із СР через IP3-чутливі канали, а також видаленням Ca^{2+} з цитозоллю потоками, створюваними насосами сарколеми (PMCA) та СР. Обмін Ca^{2+} між цитозолем і буферами, а також дифузію із примембранного шару, області впливу на Ca^{2+} -залежні канали, у глибинні шари цитозоллю представляли узагальненим потоком екструзії ($J_{\text{Extr(Ca)}}$).

Всі описані нижче обчислювальні експерименти проводились в ізометричному режимі, який широко використовується в експериментальних дослідженнях м'язових клітин [26], тобто діаметр і довжина клітини залишались незмінними при збудженні.

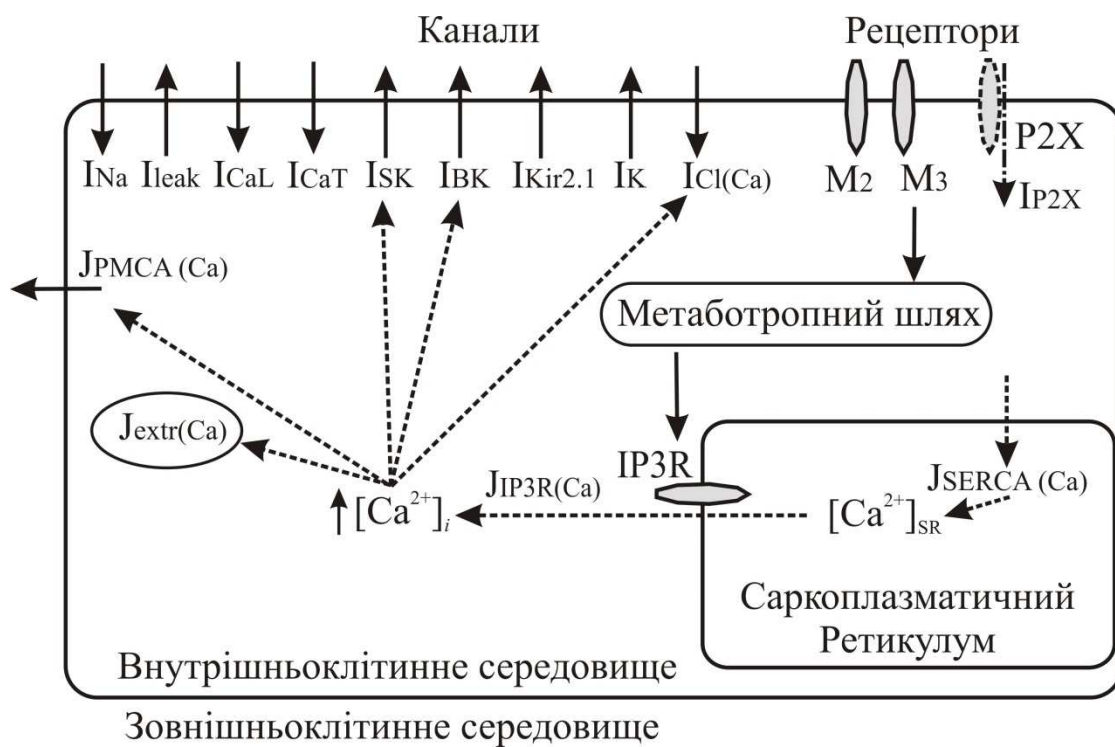


Рисунок 2.1 *Схема моделі ГМК ДСМ. Стрілками на схемі показано напрямки струмів, потоків Ca^{2+} та вплив змін $[Ca^{2+}]_i$ на окремі типи іонних каналів.*

2.2 Програмне середовище «НЕЙРОН»

Програмне середовище «НЕЙРОН» є гнучким та потужним інструментом, яке було розроблено для моделювання поодиноких нейронів та нейронних мереж [157]. Воно добре підходить для моделювання та вирішення проблем, тісно пов'язаних з експериментальними даними, у тому числі таких, що стосуються клітин зі складними анатомічними та біофізичними властивостями. Найбільш продуктивним використанням даного програмного середовища є тестування гіпотез, які виходять з експериментальних досліджень, та здійснення обчислювальних експериментів, спрямованих на перевірку робочих гіпотез, що можуть призвести до розробки нових біологічних експериментів [158]. Даний інструмент також дозволяє створювати та досліджувати моделі будь яких інших, ніж нейронних, збудливих клітини. Для моделювання клітини потрібно мати інформацію про її біофізичні та геометричні параметри, зокрема, про типи і розподіл іонних каналів, рецепторів, та інших механізмів, притаманних даному типу клітин. Саме це програмне середовище було застосовано нами у розробці і дослідженнях моделей іонних каналів, насосів, рецепторів і клітинних сигнальних механізмів, описаних нижче.

2.3 Моделювання електричних процесів

Зміни мембранного потенціалу E (мВ) визначались парціальними струмами I_i , віднесеними до одиниці площини поверхні мембрани (мкА/см²) через іонні канали та насоси, а також струмом стимуляції ($I_{st}=I \cdot A(t)$) згідно рівнянню:

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

де C_m – питома ємність мембрани, I – амплітуда струму, $A(t)$ – функція часу, яка визначає форму імпульсу (більш детально див. нижче).

Кінетики описаних нижче каналів відповідають даним експериментів «*in vitro*» при кімнатній температурі. Потенціали рівноваги струмів були наступними: $E_{Ca}=132$ мВ (максимальне значення рівноважного потенціалу у стані спокою, при збудженні клітини його значення динамічно змінювалось відповідно до змін $[Ca^{2+}]_i$), $E_{Na}=50$ мВ, $E_K=-77$ мВ, $E_{Cl}=-32$ мВ, $E_{P2X}=-7$ мВ та $E_{leak}=-70$ мВ.

Струм через Ca^{2+} -канали L -типу:

$$I_{CaL} = g_{CaL} \cdot m \cdot h_E \cdot h_{Ca} \cdot (E - E_{Ca}),$$

де $g_{CaL}=35.9$ мСм/см² – максимальна провідність, m – змінна потенціалзалежної активації, τ_m – змінна часу активації, h_E – змінна повільної потенціалзалежної інактивації, h_{Ca} – змінна швидкої кальційзалежної інактивації;

$$dm/dt = (m - m_\infty) / \tau_m; m_\infty = 1 / (1 + \exp((4 - E)/6));$$

$$\tau_m = 14.617 - 13.692 / (1 + \exp((-49.042 - E)/14.057)); dh_E/dt = (h - h_{E,\infty}) / \tau_{hE},$$

$$h_{E,\infty} = 1 / (1 + \exp((-24.4362 - E)/7)); dh_{Ca}/dt = (h - h_{Ca,\infty}) / \tau_{hCa},$$

$$h_{Ca,\infty} = 1 / (1 + ([Ca^{2+}]_i / 0.00026)^{3.9}),$$

де $\tau_{hE}=312$ мс – стала часу повільної потенціалзалежної інактивації, $\tau_{hCa}=21.4$ мс – стала часу швидкої кальційзалежної інактивації.

Рівняння для кінетичних змінних були побудовані на основі рівняння Больцмана та рівняння Хілла.

Рівняння Больцмана має наступний загальний вид:

$$1/[1+\exp(-(E-V_h)/s)],$$

де E – значення мембранного потенціалу, V_h – потенціал напівактивації, s – крутизна.

Рівняння Хілла:

$$1/\{1+([Ca^{2+}]_i/K_D)^H\},$$

де K_D – стала дисоціації, H – коефіцієнт (афінності) Хілла.

Параметри моделі каналу та кінетичні функції було обрано та побудовано, спираючись на дані з експериментів [94, 159–163]. На основі ВАХ, наведених авторами роботи [94], було побудовано рівняння для m та визначено параметри V_h та s . На основі даних, наведених в роботах [95, 160], було побудовано рівняння для h_E та визначено параметри V_h та s . Також, спираючись на данні експерименту [160], було обрано $\tau_{hE}=156$ мс. За допомогою даних з експерименту [161] було побудовано рівняння для τ_m та визначено його параметри. Рівняння для h_{Ca} побудовано, спираючись на данні з експерименту [164].

Струм через Ca^{2+} -канали T-типу:

$$I_{CaT}=g_{CaT} \cdot m \cdot h \cdot (E-E_{Ca}),$$

де $g_{CaT}=6.74$ мСм/см² – максимальна провідність, m – змінна потенціалзалежної активації, h – змінна потенціалзалежної інактивації, τ_m – змінна часу активації, τ_h – змінна часу інактивації;

$$dm/dt=(m-m_\infty)/\tau_m, \quad m_\infty=1/(1+\exp((-19.944-E)/4)), \quad \tau_m=40-39.9/(1+\exp((-77-E)/20)),$$

$$dh/dt=(h-h_\infty)/\tau_h, \quad h_\infty=1/(1+\exp((-29.9303-E)/5)),$$

$$\tau_h=44.241-30.896/(1+\exp((-48.922-E)/3.0929)).$$

Рівняння для кінетичних змінних було побудовано на основі рівняння Больцмана. Параметри моделі каналу та кінетичні функції було обрано та

побудовано, спираючись на дані з експериментів [94, 165]. На основі ВАХ з [94] було побудовано рівняння для m , та визначено параметри V_h та s . За допомогою даних з експерименту [165] було побудовано рівняння для h , τ_m та τ_h , а також визначено їх параметри.

Струм через Na^+ -канали:

$$I_{Na} = g_{Na} \cdot m \cdot (E - E_{Na}),$$

де $g_{Na} = 1.6667$ мСм/см² – максимальна провідність, m – змінна потенціалзалежної активації;

$$dm/dt = (m - m_\infty) / \tau_m, \quad \tau_m = 1 / (\alpha_m + \beta_m), \quad m_\infty = \alpha_m \tau_m, \quad \tau_{m(Na)} = 1 - \exp(-0.025 \cdot (\alpha + \beta)).$$

$$\alpha = 1.74 \cdot (-(E - 11)) / (\exp(-(E - 11) / 12.94) - 1), \quad \beta = 0.06 \cdot (E - 5.9) / (\exp((E - 5.9) / 4.47) - 1),$$

Струм через K^+ -канали затриманого випрямлення:

$$I_K = g_K \cdot m^4 \cdot (E - E_K),$$

де $g_K = 6$ мСм/см² – максимальна провідність, m – змінна потенціалзалежної активації;

$$dm/dt = (m - m_\infty) / \tau_m, \quad \tau_m = 1 / (\alpha_m + \beta_m), \quad m_\infty = \alpha_m \tau_m,$$

$$\alpha = 0.01 \cdot (-(E + 55)) / (\exp(-(E + 55) / 10) - 1), \quad \beta = 0.125 \cdot \exp(-(E + 65) / 80),$$

$$\tau_{m(K)} = 1 - \exp(-0.025 \cdot (\alpha + \beta)).$$

Струм через Ca^{2+} -залежні K^+ -канали типу ВК:

$$I_{K(BK)} = g_{K(BK)} \cdot m \cdot (V - E_K),$$

де $g_{K(BK)} = 4.5$ мСм/см² – максимальна провідність, m – кінетична змінна активації, τ_m – змінна часу активації;

$$dm/dt = (m - m_\infty) / \tau_m, \quad m_\infty = 1 / (1 + \exp(V_h - V) / (25 / 1.6))),$$

$$V_h = -56.449 + 104.52 \cdot \exp(-0.22964 \cdot [Ca^{2+}]_i \cdot 10^3) + 295.68 \cdot \exp(-2.1571 \cdot [Ca^{2+}]_i \cdot 10^3),$$

$$\tau_m = (p(Ca) - 1) \cdot (f(V) - 0.2) / 0.8 + 11, \quad p(Ca) = 13.7 + 234 \cdot \exp(-0.72 \cdot [Ca^{2+}]_i \cdot 1000),$$

$$f(V) = 1 / ((10 - (\exp(-V / 63.6) + \exp(-(150 - V) / 63.6))) - 5.2) \text{ якщо } (f(v) \leq 0.2) \text{ то } f(V) = 0.2.$$

Вказані вище рівняння були отримані з роботи [166].

Струм через Ca^{2+} -залежні K^+ -канали типу SK:

$$I_{K(SK)} = g_{K(SK)} \cdot m^2 \cdot (V - E_K),$$

де $g_{K(SK)} = 0.6$ мСм/см² – максимальна провідність, m – кінетична змінна кальційзалежної активації, $\tau_m = 11$ мс – стала часу активації;

$$dm/dt = (m - m_\infty) / \tau_m, m_\infty = 1 / (1 + (0.0005 [Ca^{2+}]_i)^{1.3}).$$

Модель було побудовано, спираючись на данні з досліджень [104, 110–111]. На основі експериментів [104, 111] було визначено значення концентрації напівактивації та τ_m , а за допомогою даних дослідження [110] було визначено коефіцієнт Хілла.

Струм через K^+ -канали типу Kir2.1:

$$I_{Kir2.1} = g_{Kir2.1} \cdot m \cdot h^2 \cdot (E - E_K),$$

де $g_{Kir2.1} = 1.6$ мСм/см² – максимальна провідність, m – кінетична змінна потенціалзалежної активації, h – кінетична змінна потенціалзалежної інактивації.

$$dm/dt = (m - m_\infty) / \tau_m, \tau_m = 1 / (\alpha_m + \beta_m), m_\infty = 1 / (1 + \exp((E - (-96.48)) / 23.26)),$$

$$\tau_m = 3.7 + (-3.37 / (1 + \exp((E - (-32.9)) / 27.93))), dh/dt = (h - h_\infty) / \tau_h,$$

$$h_\infty = 1 / (1 + \exp((E - (-168.28)) / -44.13)),$$

$$\tau_h = 0.85 + (306.3 / (1 + \exp((E - (-118.29)) / -27.23))).$$

Вказані вище рівняння було отримано з роботи [167].

Неспецифічний струм пасивного витоку:

$$I_{leak} = g_{leak} \cdot (E - E_{leak}),$$

де $g_{leak} = 1.6667$ мСм/см² – максимальна провідність.

Струм через Ca^{2+} -залежні хлорні канали:

$$I_{Cl(Ca)} = g_{Cl(Ca)} \cdot (E - E_{Cl}),$$

де $g_{Cl(Ca)}$ – віднесена до одиниці площини поверхні мембрани провідність, яка включала у себе дві складові, котрі характеризувались однаковою

залежністю активації від $[Ca^{2+}]_i$, але різними швидкостями потенціалзалежної активації – швидкою і повільною. При дослідженні поведінки модельної ГМК в умовах електростимуляції (див. пункт 3.2.1) максимальні значення $g_{Cl(Ca),f}=g_{Cl(Ca),s}=16.7$ мСм/см², в інших дослідах $g_{Cl(Ca),f}=g_{Cl(Ca),s}=3.629$ мСм/см² (див. пункт 3.2.3). Такі властивості відображались рівнянням:

$$g_{Cl(Ca)} = g_{Cl(Ca),f} \cdot m \cdot p_f + g_{Cl(Ca),s} \cdot m \cdot p_s,$$

де $g_{Cl(Ca),f}$ та $g_{Cl(Ca),s}$ – максимальні питомі провідності каналів, що активуються швидко та повільно, m – загальна для обох складових кінетична змінна кальційзалежної активації, p_f та p_s – кінетичні змінні швидкої та повільної активації відповідно. Рівняння кінетичних змінних були наступні:

$$dm/dt = (m_{\infty} - m) / \tau_m, \quad m_{\infty} = 1 / \{ 1 + ([Ca^{2+}]_i / K_D)^H \},$$

де $\tau_m = 33.3$ мс, $K_D = 0.48$ мкМ та $H = 3.4$;

$$dp/dt = (p_{\infty} - p) / \tau_p, \quad p_{\infty} = 1 / [1 + \exp(-(E - E_{1/2})/s)] \quad (p = p_f, p_s),$$

де $E_{1/2} = 103.5$ мВ, $s = 37.266$ мВ, $\tau_p = \tau_f = 7.826$ мс для $p = p_f$, $\tau_p = \tau_s = 82.028$ мс для $p = p_s$.

Рівняння для m_{∞} ідентично рівнянню Хілла, що було використано Коумі та співавт. [168] для опису кальційзалежної активації струму через хлорні канали у мембрані ізольованих гепатоцитів морської свинки. Згідно [168], такий підхід забезпечував краще (за критерієм найменших квадратів) наближення до даних з натурних експериментів, у яких оцінювалась відносна вірогідність відкритого стану каналу. Йдеться про результати реєстрації методом *inside-out patch clamp* струмів через одиночні канали при різних концентраціях Ca^{2+} на цитозольній стороні мембрани та фіксованому МП +50 мВ. Величина τ_m не залежала від концентрації Ca^{2+} , як і у випадку Ca^{2+} -залежних калієвих каналів типу ВК. Рівняння для p_{∞} аналогічне рівнянню Больцмана, параметри якого $E_{1/2}$ та s було підібрано нами так, що стаціонарна ВАХ модельного струму найкраще наближувалася до подібної характеристики, побудованої Хартцеллом та співавт. [71] за даними реєстрації струму через Ca^{2+} -залежні хлорні канали аноктамінової родини.

Неспецифічний струм через P2X рецепторні канали:

$$I_{P2X} = g_{P2X} \cdot (E - E_{P2X});$$

де $g_{P2X}(t) = g_{P2Xmax} \cdot A(t)$ – провідність, віднесена до одиниці площини поверхні мембрани;

$A(t)$ – функція часу t , що визначала форму імпульсу – П-подібну або асиметричну дзвоноподібну (так звана альфа-функція, див. 2.5).

У деяких дослідах $g_{P2X} = 0.191 \text{ мСм/см}^2$, що складало 5% від загальної максимальної провідності каналів, які активуються при стимуляції парасимпатичних нервів $g_{P2X} / (g_{Cl(Ca),f} + g_{Cl(Ca),s} + g_{P2X}) = 0.05$ (див. пункт 3.2.3).

2.4 Моделювання динаміки концентрації кальцію

Вхід Ca^{2+} через Ca^{2+} -канали L-і T-типу і його подальший вплив на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ описували рівнянням, аналогічним представленому у роботі [169]:

$$J_{\text{Channels}} = -(I_{\text{CaT}} + I_{\text{CaL}}) / (2 \cdot F \cdot \delta),$$

де F – стала Фарадея, δ – товщина примембранного шару (0.1 мкм).

Ca^{2+} -насос плазматичної мембрани (PMCA):

$$J_{\text{PMCA}} = 0.0125 \cdot [\text{Ca}^{2+}]_i / ([\text{Ca}^{2+}]_i + 0.0015).$$

Для побудови рівняння цього насосу були використані наведені у роботі [170] максимальне значення потоку та афінність.

Ca^{2+} -насос сарко(ендо)плазматичної мембрани (SERCA):

$$J_{\text{SERCA}} = (0.0083333 \cdot ([\text{Ca}^{2+}]_i / 0.00026)^{0.75} - 0.0083333 \cdot ([\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}} / 1.8)^{0.75}) / (1 + ([\text{Ca}^{2+}]_i / 0.00026)^{0.75} + ([\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}} / 1.8)^{0.75}),$$

де $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ – концентрація Ca^{2+} у СР.

Представлене рівняння враховує роботу SERCA у прямому (закачування Ca^{2+} у СР) та зворотному (вивільнення з СР Ca^{2+}) напрямках. Загальний вид рівняння та коефіцієнт Хілла – як у роботі [171], значення максимального потоку та афінність – як у роботі [170].

Зв'язування Ca^{2+} внутрішньоклітинними буферами та дифузія у глибокі шари цитозолу було спрощено представлено загальним рівнянням поступового зменшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ до базального рівня $[\text{Ca}^{2+}]_{i,0}$, аналогічно представленому у роботі [169]:

$$J_{\text{Buf}} = ([\text{Ca}^{2+}]_i - [\text{Ca}^{2+}]_{i,0}) / \tau,$$

де $\tau = 1$ мс – стала часу повернення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ до $[\text{Ca}^{2+}]_{i,0}$.

Вивільнення Ca^{2+} із депо. У ряді обчислювальних експериментів потік Ca^{2+} із депо моделювали за допомогою наступного рівняння:

$$J_{\text{IP3R}} = A \cdot P_{\text{IP3R}} \cdot ([\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}} - [\text{Ca}^{2+}]_i),$$

де A – значення альфа-функції ($A(t)=0$, якщо $t < t_{\text{act}}$ або $A(t) = ((t-t_0)/\tau_s) \cdot \exp(-(t-t_0)/\tau_s)$, якщо $t \geq t_{\text{act}}$, де t_0 – момент початку імпульсу, τ_s – час досягнення максимуму, рівного одиниці); P_{IP3} – проникність ($P_{\text{IP3}}=14 \text{ c}^{-1}$), початкова $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ становила 1 мМ.

Така розмірність питомої величини P_{IP3} (c^{-1}) визначається тим, що фактичне рівняння щільності трансмембранного потоку наступне:

$$\Phi_{\text{IP3}} = -P_{\text{IP3}}^* \cdot \Delta c,$$

де Φ_{IP3} – щільність потоку Ca^{2+} через IP3-чутливі канали СР [ммоль/($\text{cm}^2 \cdot \text{c}$)], $\Delta c = ([\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}} - [\text{Ca}^{2+}]_i)$ – різниця концентрацій у депо та цитозолі [ммоль/ cm^3], P_{IP3}^* – проникність мембрани [см/с].

$$d[\text{Ca}^{2+}]_i/dt = J_{\text{IP3}} = (\Phi_{\text{IP3}} \cdot S)/V = P_{\text{IP3}}^* \cdot \Delta c \cdot S/V,$$

де S – площа СР [cm^2], V – об'єм цитозолу [cm^3], $\Delta c = ([\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}} - [\text{Ca}^{2+}]_i)$ – різниця концентрацій у [ммоль]. В результаті $P_{\text{IP3}} = P_{\text{IP3}}^* \cdot S/V$, де S/V – геометричний коефіцієнт у [1/см], а P_{IP3} матиме розмірність [c^{-1}] (або мс^{-1}), що еквівалентно константі швидкості обміну Ca^{2+} між депо та цитозолем.

2.5 Протоколи обчислювальних експериментів

2.5.1 Дослідження вольтамперних і моль-амперних характеристик

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

Обчислювальні експерименти виконували на однокомпартментному мембранному циліндрі, розміри котрого: довжина $L=100$ мкм, діаметр $d=5$ мкм. Модель включала у себе провідність питомого струму I_{Cl} та аналог електроду для фіксації МП. Електричні процеси у вказаному компартменті в цілому описувались рівнянням:

$$C_m \cdot dE/dt = I_{\text{Cl}} + I_{\text{stim}} / \pi \cdot d \cdot l,$$

де $C_m=3$ мкФ/см² (або 1.426 мкФ/см² – див. розділ 2.1) – питома ємність мембрани, а I_{stim} – струм від зовнішнього генератора. Максимальні питомі провідності каналів, що активуються швидко ($g_{\text{Cl},f}$) та повільно ($g_{\text{Cl},s}$), дорівнювали 0.74352 См/см² та 0.85648 См/см² відповідно.

2.5.2 Дослідження характеристик збудливості мембрани ГМК ДСМ

Збудливість характеризували рефрактерністю та співвідношенням сила–тривалість прикладених стимулів. При рефрактерності досліджували динаміку відновлення ПД при прикладені парних стимулів однакової інтенсивності. Динаміку відновлення ПД кількісно описували подвійними експоненціальними наближуючими функціями виду:

$$f(t) = K_0 + K_1 \cdot \exp(K_2 \cdot t) + K_3 \cdot \exp(K_4 \cdot t), \quad (2.1)$$

параметри яких K_0 – K_4 визначали за критерієм мінімуму середньоквадратичного відхилення $\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (f_i - f_i')^2}$.

В якості стимулів використовували одиночні та множинні імпульси деполяризуючого струму, або параметричні зміни у вигляді перехідних збільшень сумарної провідності Ca^{2+} -залежного хлорного струму ($g_{\text{Cl}(\text{Ca})}$), P2X-рецепторних каналів сарколеми (g_{P2X}) $g_{\text{P2X}}(t) = g_{\text{P2Xmax}} \cdot A(t)$ та проникності IP3-чутливих каналів депо (P_{IP3}), $P_{\text{IP3}}(t) = P_{\text{IP3max}} \cdot A(t)$, імітуючи іонотропну та метаботропну складові парасимпатичної дії відповідно. Параметрами, які змінювались і визначали $P_{\text{IP3}}(t)$ та $g_{\text{P2X}}(t)$, були відповідно $\tau_s = \tau_{\text{sIP3}}$ і $\tau_s = \tau_{\text{sP2X}}$, а також $t_0 = t_{0\text{IP3}}$ та $t_0 = t_{0\text{P2X}}$. Відома із експериментів відмінність латентності пуринаргічного (раннього) і мускаринового (пізнього) компонентів відповіді ГМК ДСМ на стимуляцію парасимпатичних нервів [172–174] у моделі відображено затримкою активації проникності $P_{\text{IP3R}}(t)$ відносно провідності $g_{\text{P2X}}(t)$: $\Delta \tau = t_{0\text{IP3R}} - t_{0\text{P2X}} = 70$ мс (будемо називати її базовою затримкою на відміну від фактичної – див. доданок А). Форма імпульсу $A(t)$ була або П-подібною (стандартного для теоретичних досліджень регуляторних процесів різної природи, $A(t) = 1$ при $t_0 \leq t \leq t_{\text{st}}$, $A(t) = 0$ при $t < t_0$ або $t > t_{\text{st}}$), або дзвоноподібною (див. нижче). Перший підхід запозичений з теорії систем регулювання об'єктів небіологічної природи, де реакції на дію подібного «стандартного стимулу», відомі як імпульсні перехідні характеристики, вивчаються з метою виявлення характерних властивостей системи, що важко

виявити по відгуку на входні сигнали складної (довільної) форми. В інших випадках форма була асиметричною дзвоноподібною. Вона відповідала альфа-функції, яка широко застосовується для опису синаптичних процесів [175]:

$$A(t)=0, \text{ якщо } t < t_{\text{act}},$$
$$\text{або } A(t)=((t-t_0)/\tau_s) \cdot \exp(-(t-t_0)/\tau_s), \text{ якщо } t \geq t_{\text{act}},$$

де t_0 – момент початку імпульсу, τ_s – час досягнення максимуму, рівного одиниці.

Було сформовано базову модель ГМК ДСМ (далі «базова модель», див. параграфи 2.1, 2.3 і 2.4), яка у подальшому лише вдосконалювалась та змінювалась в залежності від потреб експерименту.

2.5.3 Дослідження реакцій модельної ГМК ДСМ на електричні та парасимпатичні стимули

Ці дослідження проводили на моделі ГМК ДСМ, описаній раніше (див. параграфи 2.1, 2.3 і 2.4), а також на її модифікаціях. Застосовували поодинокі, парні та множинні стимули. У випадку множинних стимулів частота слідування стимулів, як правило, встановлювалась такою, яка застосовується при реабілітаційній стимуляції у клінічній практиці (див. доданок А). Імпульси були організовані у, так звані, пачки або «конверти», у складі якого кожен із стимулів може бути або П-подібним, або мати дзвоноподібну форму (у випадку моделювання парасимпатичної активності). Основними характеристиками і пачки, і «конверту» імпульсів є: T_i – тривалість пачки імпульсів (у «конверті» це еквівалентно тривалості фази плато, від 0 до 65 с), тривалість фази зростання у «конверті» (від 0 до 10 с), тривалість фази спаду у «конверті» (від 0 до 10 с), t_i – тривалість імпульсу (від 200 до 500 мкс), MCI – міжстимульний інтервал (від 5 до 200 мс). Вказані вище характеристики відповідають тим, що застосовуються у клінічній практиці (див. опис у керівництві користувача «Biofeedback/Stimulation Protocol Definitions List» для апарату «Urostym» від «Laborie Medical Technologies, Inc., Канада» або [176]).

Подальші зміни стосувались виключення струму через калієві канали типу SK і спрощеного представлення струму через канали типу BK (активація каналів залежала тільки від змін $[Ca^{2+}]_i$) та додавання струмів через канали типу SK і модифікації каналів типу BK (див. розділ 3.2). Модифікація K^+ -каналів типу BK полягала у відображенні наявності додаткової регулюючої субодиниці $\beta 4$ (існування в ДСМ саме таких BK каналів показано в роботах [63, 177 та ін.]).

Модель, використана у дослідженнях, представлених у пунктах 3.3 та 3.4.3, відрізнялась модифікацією параметрів у рівняннях іонних струмів. Були змінені значення потенціалу напівактивації (V_h) кальцієвих каналів L-типу (з 4 на -4.7422 мВ) і Т-типу (з -19.944 на -25.698 мВ), сталі часу активації Ca^{2+} -залежних калієвих каналів типу SK (з 11 на 48 мс), а також неваріативну складову сталої часу активації Ca^{2+} -залежних калієвих каналів типу BK (з 5 мс на 11 мс) – параметр b у рівнянні:

$$\tau_m = (p(Ca) - 1) \cdot (f(V) - 0.2) / 0.8 + b \text{ [172]}.$$

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Характеристика Ca^{2+} -залежного хлорного струму – важливого чинника збудливості ГМК

Як слідує з огляду літератури, Ca^{2+} -залежний хлорний струм суттєво впливає на активність ГМК [35, 77, 81, 118, 140]. Проте, біофізичні механізми цього впливу нез'ясовані. До того ж, були відсутні моделі струму, які дозволяли б з'ясувати механізми його дії на збудливість ГМК у обчислювальних експериментах. Отже, таку модель нами було вперше створено на основі відповідних експериментальних даних та описано вище у пункті 2.3. За її допомогою нами було з'ясовано важливі характеристики Ca^{2+} -залежного хлорного струму у співставленні з даними біологічних експериментів.

3.1.1 Вольтамперні характеристики

У першій серії обчислювальних експериментів розраховували стаціонарні (статичні) ВАХ даного струму при декількох фіксованих значеннях $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ці нелінійні характеристики (рис. 3.1) мали дві основні особливості: По-перше, при всіх значеннях $[\text{Ca}^{2+}]_i$ вихідний (позитивний) струм, викликаний деполяризаційним зміщенням МП відносно потенціалу рівноваги $E_{\text{Cl}}=0$ мВ, істотно перевищував за абсолютною величиною вхідний (негативний) струм, зумовлений протилежним зміщенням МП. Така особливість характерна для струмів «направленого назовні» випрямлення (outward rectification – термін, який часто перекладається як «вихідне випрямлення»). По-друге, при будь-яких відхиленнях МП від E_{Cl} підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ призводило до збільшення як вихідного, так і вхідного струмів (криві 1–5 на рис. 3.1). При

цьому прирости абсолютних значень струму при однакових приростах концентрації $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 0.25$ мкМ у діапазоні низьких $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (0.25...0.5 мкМ) були значно більшими порівняно з такими, які спостерігались при тих самих $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ у діапазоні більших $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (0.5...0.75 мкМ, порівн. криві 1–2 та 2–3 на рис. 3.1). Ця особливість вказує на суттєву нелінійність концентраційної залежності активації даного струму.

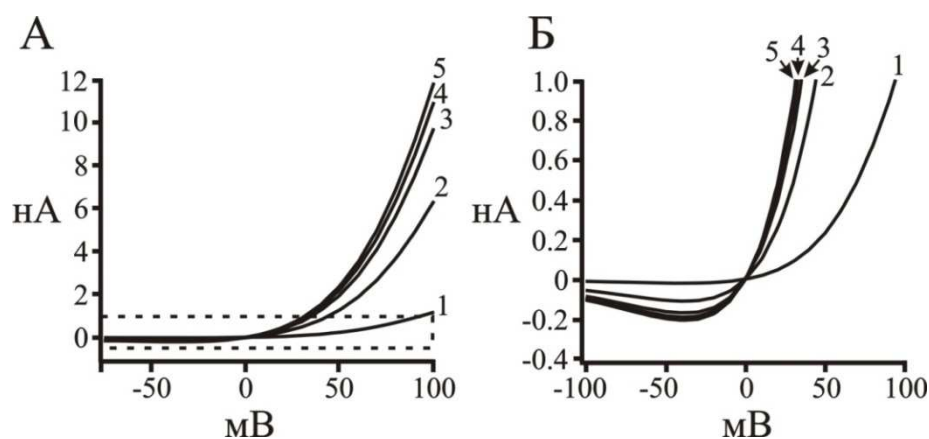


Рисунок 3.1 Статичні ВАХ Ca^{2+} -залежного хлорного струму при різних значеннях $[\text{Ca}^{2+}]_i$. А) Криві 1–5 відповідають значенням $[\text{Ca}^{2+}]_i$, рівним 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 та 5.0 мкМ відповідно. Б) представлений у розгорнутому масштабі фрагмент А, позначений штриховими лініями.

У наступній серії обчислювальних експериментів досліджували динамічні ВАХ з використанням ступінчастої фіксації МП для описаного струму в пункті 2.3. На рис. 3.2 наведено типовий приклад даних, отриманих при двох фіксованих рівнях $[\text{Ca}^{2+}]_i$, а саме 0.5 (А–Б) та 5.0 (Б–Г) мкМ. Значення 0.5 мкМ було обране також з міркувань можливості порівняння з даними експериментальних досліджень [147] (подробиці див. у Обговоренні). Динамічні ВАХ представляли як сімейство миттєвих значень струму (Б, Г), виміряних з рівними 20-мілісекундними інтервалами на протязі 750 мс (тривалість сходінки потенціалу), використовуючи записи часового перебігу струму, наведеного на А та В. Струм досягав свого стаціонарного значення приблизно через 340 мс після початку сходінки при зміщенні МП до +100 мВ та через 250 мс – при зміщенні до -100 мВ (тобто, тим швидше, чим

нижче був рівень МП). Відповідно, миттєві динамічні ВАХ (Б, Г – показано суцільними лініями) з часом збігались до стаціонарної ВАХ (Б, Г – показано кружечками).

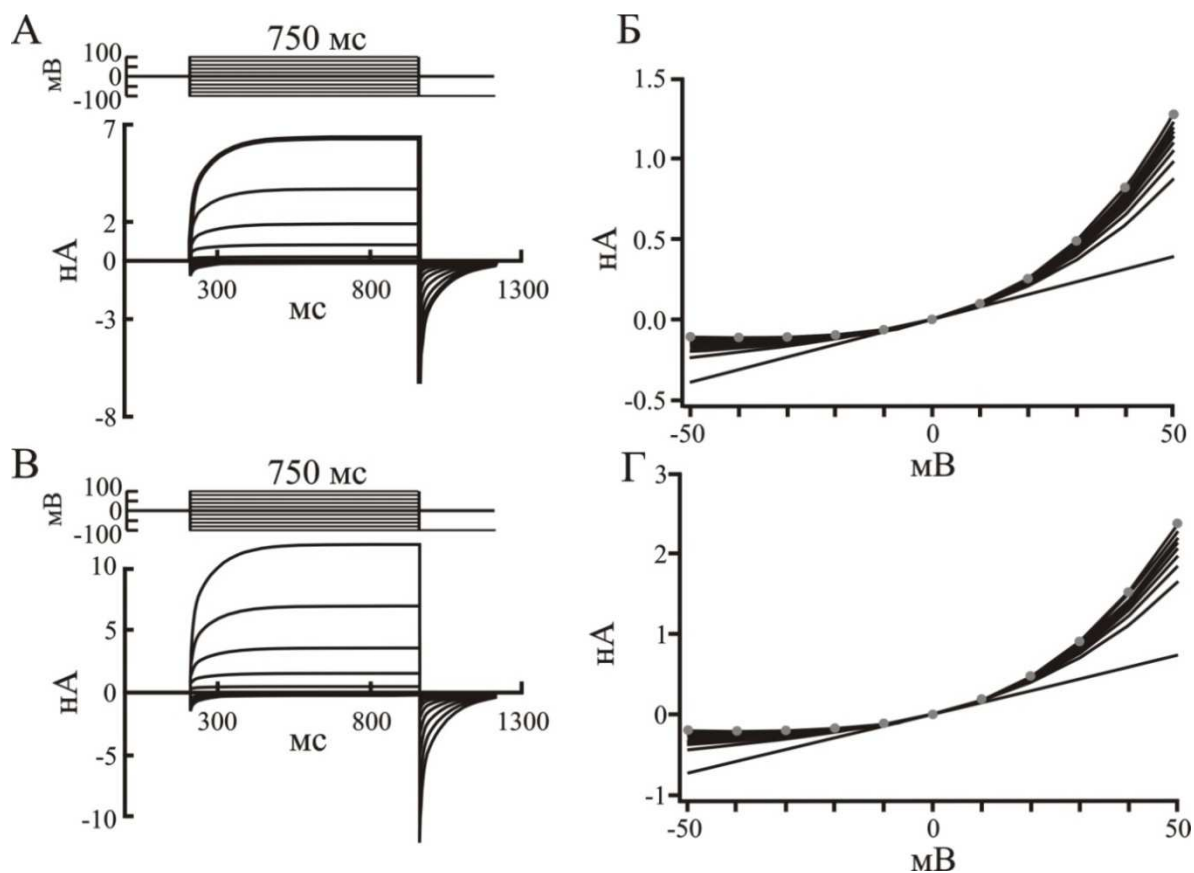


Рисунок 3.2 Динамічні ВАХ Ca^{2+} -залежного хлорного струму.

А, В) Сімейства струмів, які генеруються при значеннях $[\text{Ca}^{2+}]_i$, фіксованих на рівні, відповідно, 0.5 (А) або 5.0 (Б) мкМ у відповідь на ступінчасті (тривалість сходинки 750 мс) зміни МП у діапазоні -100...+100 мВ з наступною 250-мілісекундною фіксацією на рівні -100 мВ (крок приросту 20 мВ на А та 10 мВ на В). Б, Г) Динамічні (вказано суцільними лініями) та статичні (вказано кружечками) ВАХ. Кожна крива сімейства Б та Г отримана із записів А та В, відповідно, шляхом вимірювання миттєвих значень струму у певний момент часу після початку сходинки. Моменти вимірювання слідували з кроком 20 мс у діапазоні 0–750 мс (тривалість сходинки). Статична ВАХ виміряна на 750-й мс, коли встановились стаціонарні значення струму.

3.1.2 Моль-амперні характеристики – залежність струму від внутрішньоклітинної концентрації кальцію

Згадану у п.3.1.1 (рис. 3.1) концентраційну залежність струму, так звані «моль-амперні» характеристики (МАХ), детально досліджували у наступній серії обчислювальних експериментів, типовий результат яких представлений на рис. 3.3. МАХ струму визначались так, як показано у пункті 2.5.1, методом ступінчастої фіксації $[Ca^{2+}]_i$ на різних рівнях у діапазоні від 0 до 2 мкМ (рис. 3.3 А), вимірюючи струм при фіксованому МП = +50 мВ.

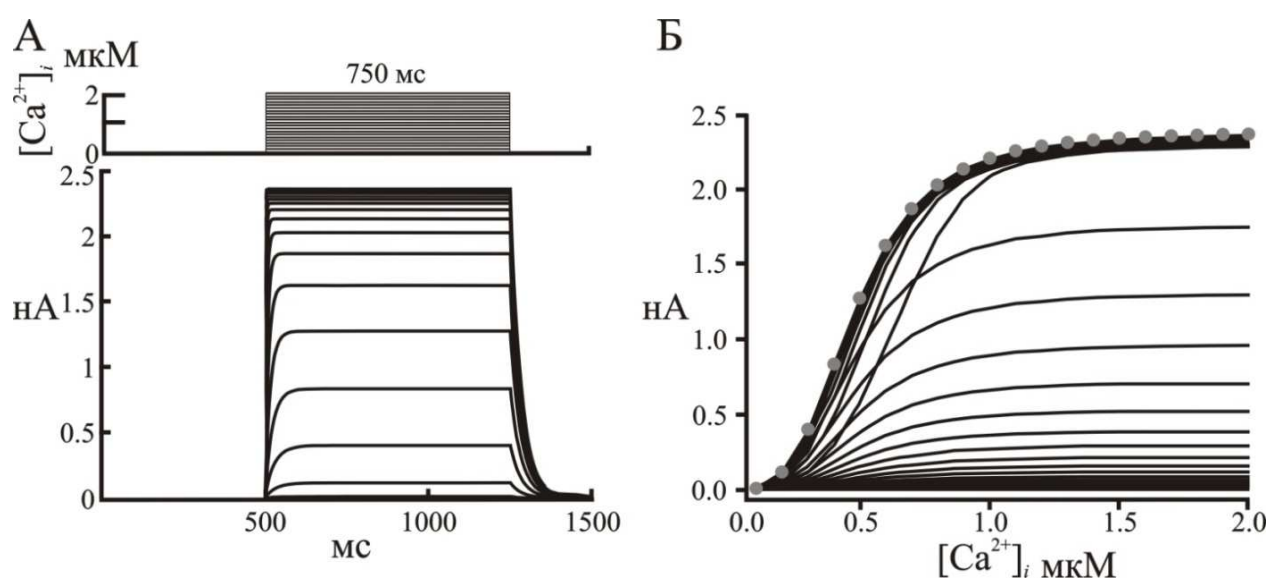


Рисунок 3.3 Моль-амперні характеристики Ca^{2+} -залежного хлорного струму. А) Сімейство струмів (знизу), що генеруються при фіксованому МП +50 мВ у відповідь на ступінчасті зміни $[Ca^{2+}]_i$ (зверху) від нульового до фіксованого рівня у діапазоні 0.1–2.0 мкМ (крок приросту 0.1 мкМ, тривалість сходінки 750 мс). Б) Статична (показано кружечками) та динамічні (показано суцільними лініями) МАХ, представлені сімейством виміряних у різні моменти часу залежностей його миттєвих значень від $[Ca^{2+}]_i$. Моменти вимірювання слідували з кроком 10 мс у діапазоні від 0 до 750 мс (тривалість тест-стрибка $[Ca^{2+}]_i$). Статична МАХ виміряна у момент встановлення стаціонарного значення струму (на 750-й мс).

Такий вибір МП давав можливість порівняння з результатами натурних експериментів [153]. Динамічні МАХ представляли сімейством концентраційних залежностей миттєвих значень струму (*B*), виміряних з рівними 10-мілісекундними інтервалами протягом 750-мс концентраційної сходинки (*A*). Струм досягав стаціонарної величини на інтервалах 50–260 мс після початку концентраційного стрибку (тим швидше, чим вище був стрибок). Стаціонарні значення струму зростали S-подібно зі збільшенням $[Ca^{2+}]_i$, досягаючи насичення при $[Ca^{2+}]_i > 1.0\text{--}1.5$ мкМ. Відповідно, миттєві динамічні МАХ (*B*, показано суцільними лініями) з часом збігались до стаціонарної МАХ (показано кружечками на тому ж рисунку). Подібна залежність спостерігалась і при інших, ніж +50 мВ, фіксованих рівнях МП.

3.1.3 Особливості динаміки потенціал- і кальційзалежної активації струму

Динамічні властивості модельованого струму, що характеризуються сімействами миттєвих ВАХ (рис. 3.2) та МАХ (рис. 3.3), визначаються процесами його кальцій- та потенціал-залежністю активації. Обчислювальні експерименти дозволили здійснити декомпозицію цих процесів (що практично неможливо у натурному експерименті) та охарактеризувати природу компонентів за допомогою розрахунку змін у часі відповідних кінетичних змінних в тих же умовах, у яких визначались загальні динамічні ВАХ і МАХ вказаного струму. Крім того, було отримано дані для порівняння з результатами деяких натурних експериментів (див. нижче).

Результати, представлені на рис. 3.4, показують наступні відмінності динаміки кальцій- (*A*) та потенціалзалежної (*B*) активації, що виявляються у реакціях на ступінчасті зміни рівня $[Ca^{2+}]_i$ та МП відповідно.

По-перше, це суттєві відмінності швидкості зміни та часу досягнення стаціонарного рівня кінетичних значень активації. Найбільша швидкість та, відповідно, найменший час були властиві кінетичній змінній швидкої потенціалзалежної активації p_f (*B*, вказано суцільними лініями), дещо менша швидкість зростання та, відповідно, більший час стабілізації – кінетичній змінній кальцій-залежної активації m (*A*). Нарешті, суттєво меншою була швидкість та більшим був час наростання до стаціонарного рівня у кінетичної змінної повільної потенціалзалежної активації p_s (*B*, вказано штриховими лініями). Слід зазначити, що при фіксації потенціалу на будь-якому рівні обидві кінетичні змінні (p_f та p_s) досягали того ж самого стаціонарного значення, що відповідало даному рівню, хоч і за різний час.

По-друге, характер приростів кінетичних змінних в умовах рівних приростів величин, які керують цими змінними ($[Ca^{2+}]_i$ та E), мали як спільні

риса, так і ряд відмінностей. Загальною рисою, властивою обою кінетичним змінним потенціалзалежної активації, було те, що рівні прирости фіксованої напруги в усьому діапазоні значень ($-100 \dots +100$ мВ) викликали прогресивно більші прирости P_f і P_s (Б). Суттєво іншим був характер приросту кінетичної змінної кальційзалежної активації m (А). Ці прирости спочатку збільшувались, а потім зменшувались до нуля при рівномірному зростанні концентрації з кроком 0.1 мкМ у діапазоні $0-2.0$ мкМ, так що стаціонарне значення вказаної змінної активації досягало одиниці (свого роду «рівня насичення») у випадку збільшення $[Ca^{2+}]_i$ до 1.7 мкМ.

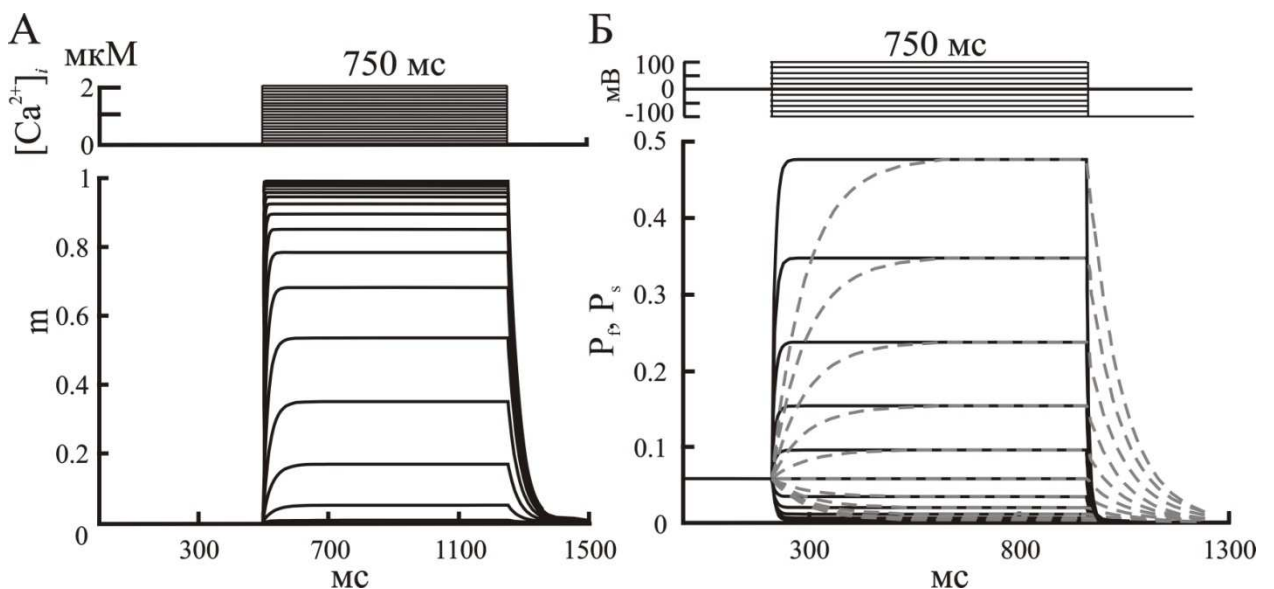


Рисунок 3.4 Динамічні властивості кінетичних функцій активації кальцій-залежного хлорного струму. А) Зміни у часі кінетичної змінної концентраційно-залежної активації m при таких самих, як на рис. 3.3, А, ступінчастих змінах $[Ca^{2+}]_i$ в умовах фіксації МП на рівні $E=+50$ мВ. Б) Зміни у часі кінетичних змінних потенціалзалежної активації, швидкої p_f (вказано суцільною лінією) та повільної p_s (вказано пунктирною лінією) при таких самих, як на рис. 3.2, А та Б, ступінчастих змінах МП в умовах фіксації $[Ca^{2+}]_i$ на рівні 0.5 мкМ.

Співставлення отриманих результатів обчислювальних експериментів (рис. 3.1–3.4) з даними експериментальних досліджень струмів-прототипів показало наступне. Як правило, ці експериментальні дані стосуються струмів через поодинокі канали, які характеризуються потенціал- або концентраційно-залежними ймовірностями відкритих (P_o) або закритих (P_c) станів каналів, а також інтегральних (популяційних) струмів. Останні представлені або їх нативними записами, що ілюструють реакцію на прикладену напругу, дію фармакологічних речовин та ін., або стаціонарними та динамічними ВАХ, побудованими на основі вказаних записів [91].

Наша модель дозволяє розраховувати інтегральний струм з використанням протоколів ступінчастої фіксації потенціалу або $[Ca^{2+}]_i$. Саме це визначило вибір даних для порівняння, представлених трьома прикладами на рис. 3.5. Адекватність порівняння забезпечувалась, зокрема, відповідністю умов (протоколів) обчислювального експерименту умовам, при яких були отримані натурні данні. За фізичним змістом, ймовірності відкритого (активованого) стану каналу відповідають стаціонарні значення кінетичної змінної (концентраційно-залежної m_∞ або потенціалзалежної p_∞) активації інтегрального струму.

У першому випадку (*A*) порівнювались залежності від $[Ca^{2+}]_i$ таких величин, як стаціонарна кінетична змінна кальційкерованої активації модельного струму m_∞ (вказано суцільними лініями) та описана у роботі Коумі та співавт. [168] ймовірність відкритого стану P_o , які оцінювали за результатами вимірювання подібного струму каналів у мембрані гепатоцитів (вказано кружечками) при однакових значеннях фіксованого МП +50 мВ. Представлена тут залежність m_∞ була отримана із записів, показаних на рис. 3.4, *A*, для моменту часу 750 мс після початку сходінки (аналогічно процедурі отримання стаціонарної МАХ). Відповідна залежність ймовірності P_o визначалась рівнянням (2) з роботи Коумі та співавт. [168], де вона була виведена за результатами вимірювання струмів через поодинокі канали

([168], рис. 8). Близькість залежностей, що порівнюються, очевидна. Проте такої близькості не спостерігається при порівнянні залежностей від МП таких величин, як стаціонарні кінетичні змінні потенціалкерованої активації модельного струму $p_{\infty}=p_f=p_s$ (Рис. 3.4, Б) та ймовірності відкритого стану P_o каналів того ж типу (за експериментальними даними Коумі та співавт. [168], рис. 3.4), що були встановлені в однакових умовах фіксованої концентрації кальцію 0.5 мкМ (не ілюструється, обговорення див. нижче).

Рис. 3.5, Б ілюструє порівняння статичних ВАХ модельного струму (показано суцільною лінією) та зареєстрованого в експериментах Хартцелла та співавт. [131] Ca^{2+} -залежного хлорного струму через канали аноктамінової родини (вказано кружечками). При цьому протоколи і умови обчислювального і натурного експериментів були однакові. Застосовували ступінчасту фіксацію потенціалу (тривалість сходінки 750 мс, амплітуда від -100 до +100 мВ, префіксація на рівні 0 мВ) при $[\text{Ca}^{2+}]_i=0.26$ мкМ, а також нормування струмів. Останнє було необхідно у зв'язку з режимом «ціла клітина» при фіксації потенціалу (*whole-cell voltage clamp*) та невизначеністю розмірів досліджуваних клітин у згаданих експериментах Хартцелла та співавт. [131]. Нормування здійснювали шляхом поділу кожного значення струму I (вісі ординат на нашому рис. 3.4, Б або рис. 6, С у [131]) на максимальне значення I_{\max} , котре мало місце у кінці 750-мілісекундного інтервалу фіксації потенціалу на рівні +100 мВ (А, вказано товстою лінією, або [131], верхній запис струму на рис. 3.3, А). Приклад, наведений на рис. 3.5, Б, також підтверджує близьку відповідність статичної ВАХ модельного струму і аналогічної характеристики струму-прототипу через канали аноктамінового типу.

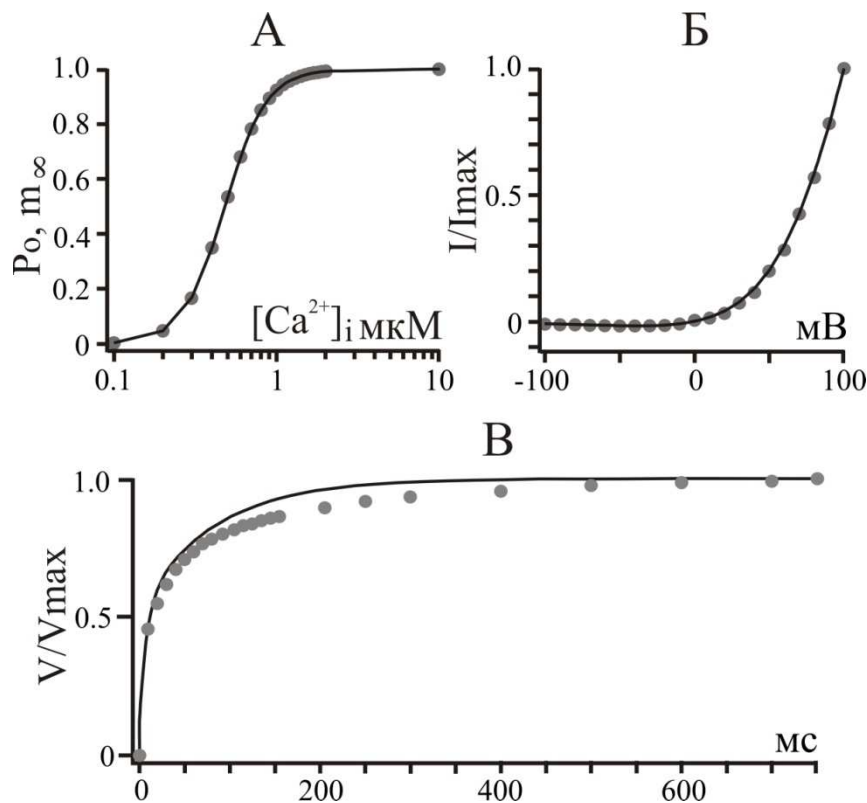


Рисунок 3.5 Співставлення результатів моделювання з даними експериментальних досліджень [131, 168] Ca^{2+} -залежного хлорного струму. А) Концентраційні залежності, отримані із записів рис. 3.4 А (на 750-й мс після початку сходінки), стаціонарних значень кінетичної змінної кальційкерованої активації модельного струму m_{∞} (вказано суцільною лінією) та ймовірностей відкритого стану каналів Ca^{2+} -залежного хлорного струму у гепатоцитах (вказано кружечками) за даними досліджень активності поодиноких каналів, отриманих Коумі та співавт. [168] (шкала концентрацій по вісі абсцис – логарифмічна). Б) Нормовані статичні ВАХ модельного струму (показано суцільною лінією) і зареєстрованого Хартцеллом та співавт. [131] Ca^{2+} -залежного хлорного струму через канали аноктамінової родини (вказано кружечками), отримані з використанням однакових протоколів ступінчастої фіксації потенціалу. В) Нормовані записи часового перебігу модельного струму (вказано суцільною лінією) та струму-прототипу, зареєстрованого в експериментах Хартцелла та співавт. [131] (вказано кружечками). Подробиці, що відносяться до умов експериментів та процедур нормалізації, наведено у тексті.

Схожість та відмінність динаміки тих самих струмів ілюструються на рис. 3.5, *B*, де представлено перебіг у часі модельного струму (вказано суцільною лінією) та струму прототипу, зареєстрованого в експериментах Хартцелла та співавт. [131] (вказано кружечками), що генерувався в однакових умовах (префіксація потенціалу на рівні 0 мВ, ступінчаста фіксація потенціалу протягом 750 мс на рівні 100 мВ, значення $[Ca^{2+}]_i=0.26$ мкМ); дані нормовані так, як описано вище. При цьому, в якості початкових (ненормованих) даних використовували верхній запис струму з вказаної роботи ([131], рис. 1, *A*), а також запис модельного струму – такий, як на рис. 3.3, *A* (вказано жирною лінією), але для $[Ca^{2+}]_i=0.26$ мкМ. Як показує порівняння нормованих графіків, представлених на рис. 3.5, *B* (вказано суцільною лінією та кружечками), модельний струм за своїм перебігом у часі близький до струму-прототипу, але досягає стаціонарного рівня трохи раніше. Такі співвідношення кількісно характеризуються досить малою величиною середньоквадратичного відхилення модельних даних (0.00175) від експериментальних на протязі усього 750-мілісекундного інтервалу порівняння та дещо більшою величиною цього показника (0.0021) у межах перших 350 мс після початку сходінки (усереднено по рівновіддалених точках вказаних інтервалів при $N=100$).

3.1.4 Обговорення

Розроблена модель дозволяє відтворювати Ca^{2+} -залежний хлорний струм з характеристиками, які відповідають виявленим у струмі такого типу у натурних експериментах на гепатоцитах і у струмі через канали, сформовані протеїнами аноктамінової родини (Anoctamin/TMEM16) [131]. Зокрема, струм, що моделюється, має динамічні і статичні ВАХ, дуже близькі до таких характеристик у прототипів. Модельний струм демонструє виражену властивість «направленого назовні» випрямлення (*outward rectification*), що властиве струму-прототипу у різних реальних клітинах [131, 142]. Дана властивість продемонстрована також у ВАХ, приведених Коумі та співавт. [168]. Примітними особливостями модельного струму є посилення вище вказаного ефекту випрямлення при збільшенні $[\text{Ca}^{2+}]_i$, а також більшого відношення приросту струму/концентрація у діапазоні відносно низьких значень $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (до 1 мкМ) у порівнянні з такими у діапазоні вищих концентрацій. Це означає більш високу чутливість струму до відносно невеликих відхилень $[\text{Ca}^{2+}]_i$ від базального рівня. Подібні ефекти в умовах збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ спостерігаються у ряді експериментальних досліджень Ca^{2+} -залежних хлорних каналів (зокрема, див. рис. 8, *B* [178], рис. 1, *F* [179] та рис. 1, *B* [180]).

Ключовим припущенням, за яким було засновано побудову нашої моделі, є можлива наявність у Ca^{2+} -залежного хлорного струму двох незалежних компонентів, які мають різні кінетики потенціалзалежної активації – швидку і повільну, але однакову кінетику кальційкерованої активації. Це припущення базується на висновку, зробленому Хартцеллом та співавт. [131] за результатами експериментальних досліджень, з яких слідувала наявність у каналах аноктамінової родини, що проводять Ca^{2+} -залежний хлорний струм, множинних відкритих станів, які розрізняються за кінетикою відкриття та селективністю.

Загальна для обох складових струму кінетична функція, що описує залежність активації від $[Ca^{2+}]_i$, обрана нами аналогічною за видом та параметрами функції ймовірності відкритого стану каналів, побудованої Коумі та співавт. [168] за результатами експериментів на поодиноких каналах з використанням методу «*inside-out patch clamp*» в умовах підтримки примембранної концентрації Ca^{2+} на рівні 0.5 мкМ. Такий наш вибір кінетичної функції і забезпечував явну близькість її стаціонарних значень, визначених в умовах ступінчастої фіксації потенціалу при такій самій $[Ca^{2+}]_i$ (0.5 мкМ) (Рис. 3.5, А). Разом з тим, відповідність кінетик потенціалзалежної активації у нашій моделі струму такій у прототипі з тієї ж роботи, виконаної на гепатоцитах [168], була не такою близькою (не ілюстровано). Що ж до близькості до відповідних даних, отриманих для струму через канали аноктамінової родини [131], то вона виявилась достатньо суттєвою (хоча й з трохи більшою розбіжністю у межах відносно малих інтервалів часу після початку ступінчастої фіксації потенціалу) (В).

Відмічені розбіжності можна пояснити, у першому випадку, специфікою властивостей каналів Ca^{2+} -залежного хлорного струму, наявних у різних клітинах і досліджених у роботах Хартцелла і співавт. [131] та Коумі і співавт. [168] (ці роботи послужили першоджерелами для різних компонентів нашої моделі), а в другому випадку (зіставлення із струмом через аноктамінові канали) – тим, що на відміну від нашої моделі, потенціалзалежна активація цих каналів характеризується потенціал- або кальційзалежністю сталої часу. На користь такого пояснення говорить і той факт, що згадана розбіжність між модельним і експериментально зареєстрованим струмами у межах перших 350 мс після початку ступінчастої фіксації потенціалу (В) значно зменшувалась в умовах повторення тих розрахунків при вдвічі більшій, ніж у натурному експерименті, $[Ca^{2+}]_i$ (0.5 замість 0.26 мкМ). Ці аспекти можна з'ясувати у подальших дослідженнях нашої моделі, яку може бути відповідним чином удосконалено.

Порівняння з даними небагатьох аналогічних модельних досліджень показало наступне. Описані в літературі моделі Ca^{2+} -залежних хлорних струмів ґрунтувалися на даних експериментів з клітинами різних типів [142, 143, 181, 182] та відображали різні гіпотези відносно воротних механізмів у відповідних каналах. Так, наприклад, Тонг та співавт. [181] вважали, що відкриття каналів є кальцій-залежним, а закриття – потенціал-чутливим. Арреола та співавт. [182] вважали, що активація каналів пов'язана з залежністю як від МП, так і від $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Тобто при відсутності змін $[\text{Ca}^{2+}]_i$ зрушення МП недостатні для активації каналу, чутливість каналу до $[\text{Ca}^{2+}]_i$ підвищується в умовах деполяризації, а часовий перебіг активації є двокомпонентним (один компонент миттєвий, а другий – більш тривалий). Найбільш близьким до нашого є опис хлорного струму, включеного у комплексну модель ендотеліальної клітини [141]. У вказаній роботі для опису кінетики даного струму використовувались аналогічні функції, що також забезпечували властивість направленої випрямленості (*outward rectification*) з трохи більшими значеннями сталих напівактивації у потенціалзалежної кінетичної функції. При цьому основні розбіжності полягали у динамічному представленні сталої часу (в нашій моделі ця величина – константа) та у чутливості до величин $[\text{Ca}^{2+}]_i$ та МП (у нашій моделі – це незалежні функції). Для порівняння двох моделей у плані якості відтворення властивостей струмів-прототипів необхідні подальші дослідження з використанням однакових умов і протоколів.

3.2 Біофізичні механізми електричного і парасимпатичного збудження ГМК ДСМ

Дослідження механізмів електричного і парасимпатичного збудження проводились на «базовій» моделі ГМК ДСМ (див. пункти 2.1, 2.3, 2.4) за виключенням струму через калієві канали типу SK і спрощеного представлення струму через BK канали (активація каналів залежала тільки від змін $[Ca^{2+}]_i$) та при додаванні SK і модифікації BK струмів (враховували також вплив МП, див. пункт 3.2.2). У першій серії обчислювальних експериментів виявили здатність модельної ГМК генерувати ПД з необхідним для скорочення підвищенням $[Ca^{2+}]_i$ в умовах стимуляції деполяризуючим струмом за відсутності парасимпатичних впливів. Такий протокол стимуляції використовували для імітації ефекту електростимуляції клітин-прототипів з частковим або повним дефіцитом парасимпатичної іннервації, що відзначається при деяких видах патології, зокрема КЕМПЕ.

У відповідь на пороговий П-подібний поштовх струму (0.33 нА, 2 мс; рис. 3.6, *A*, вгорі) клітина генерувала ПД амплітудою 55 мВ зі слідовими деполяризацією та гіперполяризацією (*A*, внизу). При цьому спостерігалось пікове зміщення МП до 0 мВ, що відповідало діапазону величин, наведених у ГМК детрузора морської свинки (-9 мВ [60]) і людини (20 мВ [43, 183]). Генерація ПД супроводжувалася значним (до 170 мкМ) тимчасовим підвищенням $[Ca^{2+}]_i$ (*B*), що обумовлено вхідними кальцієвими струмами (*B*). На піку деполяризації ПД компоненти L- і T-типів в загальному кальцієвому струмі становили 61.44% і 38.56% відповідно, що близько до експериментальних даних [81], згідно з якими внесок струму T-типу у детрузорі становить 20–30%. Серед вихідних струмів (*Г*) сумарний струм через калієві канали всіх типів у кілька разів перевищував струм витоку. Слідові процеси після ПД, також притаманні прототипам, були приурочені до інтервалів домінування відповідних струмів – Ca^{2+} -залежного хлорного,

спрямованого всередину під час слідової деполяризації (*B*, зазначено тонкою суцільною лінією), і багатокомпонентного калієвого, що має вихідний напрям в межах фази гіперполяризації (*P*, зазначено товстою лінією). Дзвоноподібний пороговий поштовх струму (*Д*, вгорі) викликав реакції (*Е–З*), схожі з описаними вище.

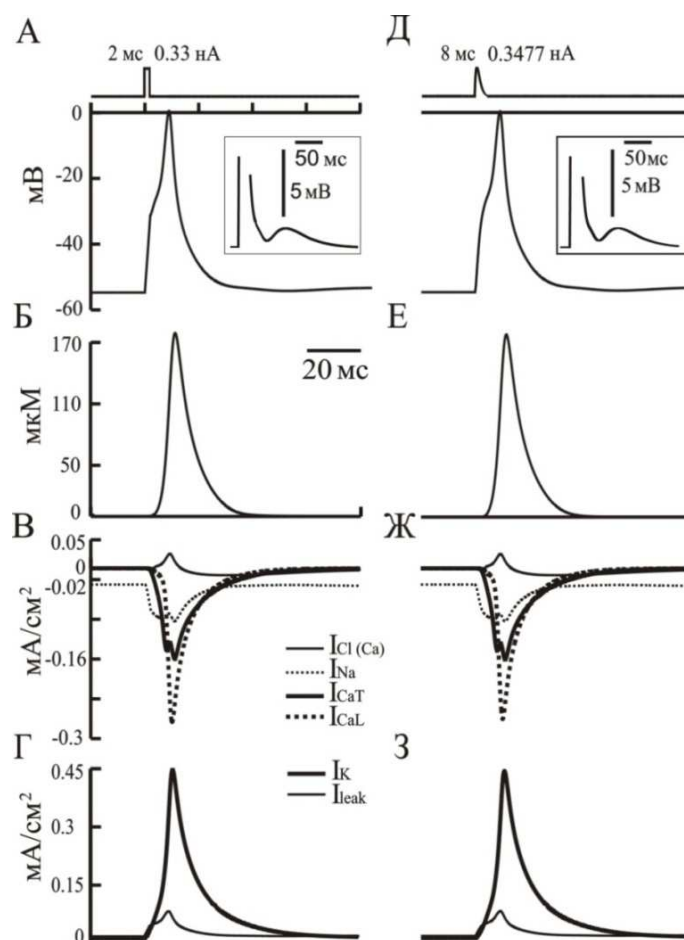


Рисунок 3.6 Реакції модельної ГМК ДСМ на стимуляцію поштовхом деполяризуючого струму П-подібної (А–Г) та дзвоноподібної (Д–Е) форми.

А) ПД (внизу), що генерується у відповідь на дію порогового струму П-подібного поштовху струму (0.33 нА, 2 мс) (зверху); на вставці – той самий відгук у збільшеному масштабі для наглядної демонстрації слідових процесів. Б–Г) Зміни $[Ca^{2+}]_i$, що супроводжують ПД, щільностей вхідних (хлорного, натрієвого і кальцієвих) і вихідних (калієвого і струму витоку) струмів відповідно. Д–З) Те ж, що і А–Г, але форма поштовху струму відповідала альфа-функції (порогова амплітуда $A=0.3477$ нА). Калібрування часу 20 мс загальне для А–З скрізь, крім вставок.

3.2.1 Характеристики електричної збудливості модельної ГМК ДСМ

Реєстрували реакції модельної ГМК при стимуляції поодинокими і парними поштовхами струму. Електрозбудження ГМК характеризували співвідношенням «сила–тривалість» поштовхів деполяризуючого струму, порогових для генерації повномасштабного ПД, а також залежністю амплітуди регенеративної відповіді, що виникала після повторної стимуляції, від інтервалу часу після генерації попереднього ПД. Графіки «сила–тривалість» (рис. 3.7) показані для трьох значень провідності P2X-рецепторних каналів (0, 52.8 і 105.6 мкСм/см²), які відповідали відсутності і наявності тонічної дії пуриноміметиків різної інтенсивності. При нульовій провідності P2X-каналів реобазний струм дорівнював 14.73 мкА/мкФ, хронаксія – 0.9178 мс. При додаванні P2X-провідності, яка дорівнювала 52.8 або 105.6 мкСм/см², спостерігалось зменшення реобазного струму до 13.58 або 12.4487 мкА/мкФ, тобто на 7.8% або 15.49% відповідно. Хронаксія, що характеризує кінетичні властивості збудливості, збільшувалася до 0.94 мс або 0.96 мс відповідно. Таким чином, активація іонотропних пуринорецепторів дещо знижувала поріг електричної збудливості ГМК.

Виявлену з використанням парних порогових поштовхів струму (125 мкА/мкФ, 0.2 мс) динаміку рефрактерності показано на рис. 3.8, А, Б. Дія першого стимулу викликала типовий ПД, амплітуда якого становила 67.7 мВ, а тривалість – ~10.5 мс на рівні половини амплітуди і ~50 мс – на рівні потенціалу спокою. Після цього спостерігалася тривала (~160 мс) низькоамплітудна (зміщення на 1.31 мВ на 87-й мс) слідова деполяризація. Зміни збудливості після генерації ПД мали ряд особливостей. Періоди як абсолютної, так і відносної рефрактерності були досить тривалими (близько 20–22 і 620 мс відповідно). Період відносної рефрактерності умовно поділявся на дві фази (рис. 3.8, А, Б) – ранню (25–220 мс) і пізню

(220–620 мс), що відповідало 50%-вому і повному відновленню ПД. В межах кожної фази процес відновлення ПД мав «швидку» та «повільну» складові. Про це свідчило те, що огинаюча амплітуди відповідей як у ранню, так і пізню фазу добре апроксимувалась подвійними експоненціальними функціями (Б) (див. рівняння 2.1 у пункті 2.5.2) з параметрами: $K_0=0.691\pm0.102$, $K_1=-0.302\pm0.07$ та $K_2=0.052\pm0.014$, $K_3=-0.478\pm0.077$, $K_4=0.0037\pm0.0014$ для ранньої фази і $K_0=1.011\pm0.006$, $K_1=-597.49\pm383$ та $K_2=0.0335\pm0.0033$, $K_3=-1.271\pm0.56$, $K_4=0.00785\pm0.00136$ для пізньої фази з дуже малими середньоквадратичними відхиленнями ($\sigma=9.47\text{e-}05$ та 0.000792 відповідно). Таким чином, сталі часу «швидкої» та «повільної» складових процесу відновлення ПД ($\tau_f=1/K_2$ та $\tau_s=1/K_4$) відрізнялись майже на порядок: для ранньої фази $\tau_f=19.2$ та $\tau_s=271.98$ мс, а для пізньої фази – $\tau_f=29.8$ мс та $\tau_s=127.41$ мс.

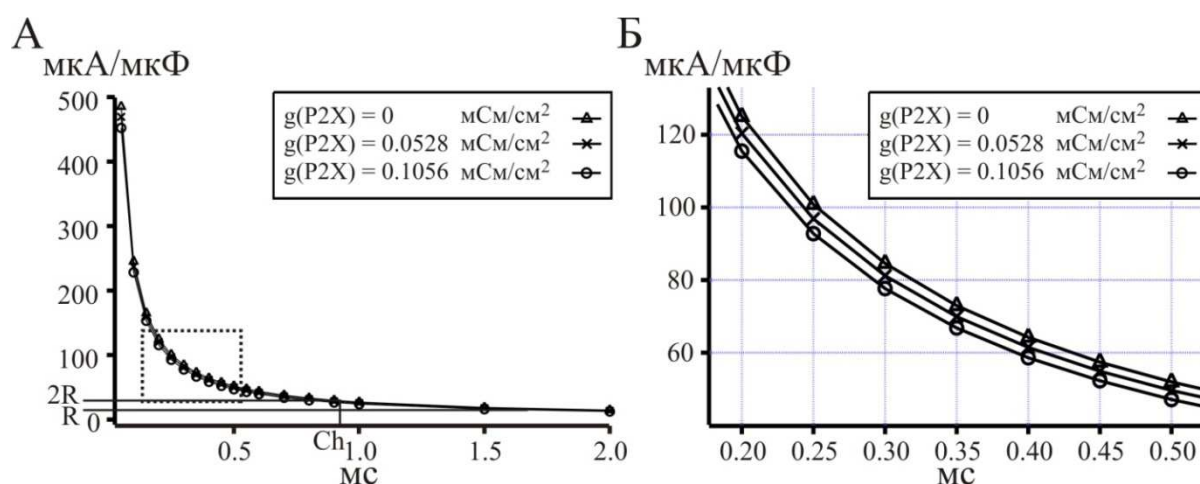


Рисунок 3.7. Співвідношення «сила–тривалість». А) Графіки «сила–тривалість» показані для нульового, нормального та підвищеного рівня активації P2X-рецепторів ($g(P2X)$). Останні представлені постійними провідностями, рівними 0, 52.8 і 105.6 мкСм/см² відповідно. Обмежений прямокутником фрагмент використовуваного в протоколах клінічної електростимуляції діапазону тривалості стимулів показано на Б в збільшеному масштабі. Виділені значення реобазис ($R=14.73$ мкА/мкФ) і хронаксії ($Ch=0.9178$ мс) розраховані при нульовій провідності P2X-каналів.

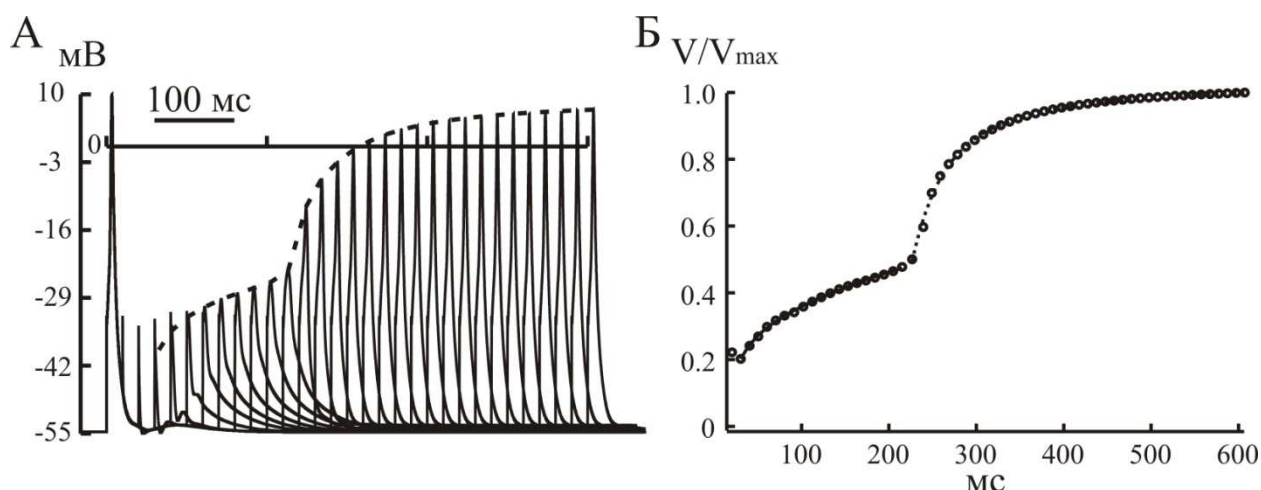


Рисунок 3.8 Динаміка рефрактерності після генерації ПД модельною ГМК ДСМ. А) Відновлення амплітуди відповіді на повторний тест-стимул, прикладений з різними затримками після першого, кондиціонуючого стимулу. Сила (125 мкА/мкФ) та тривалість (0.2 мс) обох стимулів однакові. Пунктирна лінія – огинаюча максимумів регенеративних зміщень МП. Б) Та ж динаміка, що і на А, але амплітуди відповідей $V=E-E_r$ відраховані від рівня потенціалу спокою ($E_r=-54.67$ мВ) і нормовані відповідно до максимального значення V_{max} (вказано кружечками). Суцільна і штрихова лінії – графіки наближаючих подвійних експоненціальних функцій (визначаються рівнянням 2.1 в межах інтервалів часу, що відповідають ранній та пізній фазі відновлення ПД).

Крива «сила–тривалість», в цілому, мала класичний вигляд (рис. 3.7). Спостерігалось зміщення цієї кривої в бік менших значень порогової інтенсивності струму при збільшенні провідності P2X-рецепторів (що імітувало дію пуриноміметиків). Це свідчило про те, що електрична збудливість ГМК може піддаватися пуринергічній модуляції. Особливістю тривалого періоду відносної рефрактерності був її двофазний характер з наявністю у складі кожної фази «швидких» і «повільних» складових процесу відновлення амплітуди ПД (рис. 3.8, А, Б). Порівняльний аналіз часових характеристик ранньої та пізньої фаз відновлення ПД з кінетичними властивостями активації/інактивації іонних каналів і механізмів регуляції

рівня $[Ca^{2+}]_i$ дозволяє висловити наступні міркування про природу та особливості розглянутої рефрактерності.

Феномен рефрактерності пов'язують з інактивацією каналів деполяризуючого струму, специфічно чутливих до МП і/або значень $[Ca^{2+}]_i$. Однак, деполяризаційна відповідь може зменшуватися також в результаті зменшення рушійного потенціалу для деполяризуючого струму та/або збільшення провідності «гіперполяризуючих» каналів і рушійного потенціалу для гіперполяризуючого струму. 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 деінактивації (до 18 мс) домінуючою стає інактивація L-каналів. Додатковими факторами є зменшення рушійного потенціалу для натрієвого струму, а також інверсія рушійного потенціалу для хлорного струму (потенціал стає гіперполяризаційним на 15-й мс). Подальша деінактивація кальцієвих каналів (потенціалзалежна складова) на тлі натрієвого струму, що активується, і знову інвертованого (деполяризуючого) хлорного струму 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 (~600 мс) інтервалів 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+} .

Розрахунки парціальних струмів і транзєнта $[Ca^{2+}]_i$, які супроводжували повномасштабний ПД, показали особливості їх часового перебігу і співвідношення величин (не ілюструється). ПД супроводжувався швидким і значним підвищенням $[Ca^{2+}]_i$, остання досягала піку через 2.45 мс після максимуму ПД, а далі ця концентрація експоненціально (стала часу τ близько 6.7 мс) знижувалася на 50-й мс до 285 нМ і повільно поверталася до базального рівня (34 нМ); на 300-й мс $[Ca^{2+}]_i$ становила 60 нМ. Таке тимчасове збільшення $[Ca^{2+}]_i$ викликало відповідне зменшення потенціалу рівноваги E_{Ca} від 132 мВ у стані спокою до 25.42 мВ на максимумі $[Ca^{2+}]_i$; відновлення E_{Ca} займало близько 600 мс. У межах фази наростання ПД серед визначаючих її деполяризуючих струмів найбільш виражено збільшувався спочатку натрієвий, а за ним – послідовно кальцієві струми Т- та L-типу. Ca^{2+} -залежний хлорний струм інвертувався у гіперполяризаційний; він наростав найбільш повільно (відповідно до найбільш повільної кінетики його потенціалзалежної активації, згладжуючи швидку кальційзалежну активацію). Слід зазначити, що в сумарному кальцієвому струмі відсоткове співвідношення L- і Т-компонентів (74.11% і 25.89%) було близько до експериментально зарєєстрованих значень [81]. Потенціалзалежна інактивація Т-струму швидко зростала, ставала повною в інтервалі 5–8 мс, після чого швидко зменшувалась, і цей процес практично закінчувався до 30-ї мс (частка деінактивованих каналів збільшувалася до 95% на 18-й і до 99% на 30-й мс). У L-струмі аналогічний процес був менш глибоким і швидким; максимум спостерігався на 20-й мс, а повернення до початкового рівня було більш тривалим (~600 мс). Кальційзалежна інактивація L-струму, практично відсутня в стані спокою порівняно з потенціалзалежною, була майже такою ж тривалою, але більш глибокою. Примітні особливості струмів спостерігалися в інтервалах часу, відповідних піку ПД, коли мембранний потенціал E максимально наближався до потенціалів рівноваги – сталому $E_{Na}=50$ мВ і динамічно змінюваного E_{Ca} (див. вище) – і ставав більш

деполяризаційним, ніж $E_{Cl} = -32$ мВ, тобто тоді, коли рушійні потенціали ($E - E_{Na}$) та ($E - E_{Ca}$) були найменшими, а ($E - E_{Cl}$) міняв знак на протилежний. Відповідно, натрієвий струм і кальцієвий струм Т-типу зменшувалися за абсолютною величиною, а Ca^{2+} -залежний хлорний струм змінював напрямок на протилежний, гіперполяризаційний. Кальцієвий струм L-типу наростав до максимуму через 0.66 мс після максимуму ПД і далі спадав. Ці особливості вказують на те, що під час пікової деполяризації ПД послаблюючі ефекти зменшення рушійних потенціалів нейтралізують посилюючі ефекти активації потенціалзалежних провідностей (натрієвої і кальцієвої Т-типу).

Примітними були і особливості більш складної динаміки Ca^{2+} -залежного хлорного струму у зіставленні не тільки з динамікою МП, що визначає відповідну парціальну провідність, але й з динамікою $[Ca^{2+}]_i$ (не ілюструється). Останній параметр досягав максимуму на 8.95 мс після закінчення стимулу, тобто у проміжку між максимумами кальцієвого струму L-типу (7.8 мс) і значно меншого струму Т-типу (9.5 мс). Починаючи з моменту 12.775 мс після стимулу, деполяризація опускалася нижче потенціалу інверсії $E_{Cl} = -32$ мВ; відповідно хлорний струм знову ставав деполяризаційним і на тлі підвищеної $[Ca^{2+}]_i$ посилювався до максимуму (27.875 мс), підтримуючи слідову деполяризацію. Остання виглядала як низькоамплітудна хвиля з максимумом на 87.575 мс. Часовий хід пасивного струму витоку, зважаючи на постійну провідність при незмінному потенціалі інверсії, точно дотримувався траєкторії МП, а сумарний калієвий струм досягав максимуму на 8.1 мс, тобто майже одночасно з максимумом $[Ca^{2+}]_i$ (8.95 мс), що вказує на визначальну роль ВК-компоненту в генерації цього сумарного струму.

Представлена модельна ГМК мала потенціал спокою -54.7 мВ, близький до такого у прототипі [57, 59, 61], і генерувала типовий ПД пороговий

П-подібний поштовх струму (рис. 3.6). Цей потенціал супроводжувався необхідним для м'язового скорочення тимчасовим підвищенням $[Ca^{2+}]_i$ в результаті входу зазначених іонів через кальцієві канали і вивільнення кальцію з депо. Слідові де- і гіперполяризаційні процеси, властиві прототипу, були приурочені до часових інтервалів домінування відповідних струмів.

Слід зазначити, що в цих експериментах розглядалися тільки ті процеси, які викликалися прямою дією деполяризуючого електричного струму прикладеного ззовні. При черезтканинній електростимуляції клітина може відчувати не тільки ці впливи, але й впливи нейромедіаторів, які виділяються з закінчень збуджених тими ж стимулами парасимпатичних і/або симпатичних нервових волокон (що є предметом окремих досліджень, детально розглянутих далі у пункті 3.2.3).

В цілому, отримані характеристики збудливості, а також електричних і концентраційних процесів, викликаних в модельній ГМК ДСМ стимулюючими струмами, можуть послугувати основою біофізично обумовленого вибору параметрів реабілітаційної електростимуляції.

3.2.2 Особливості відповідей модельної ГМК на електричну стимуляцію, пов'язані з впливом калієвих струмів

У відповідь на стимуляцію П-подібним імпульсом струму порогової інтенсивності (тривалість 0.2 мс, амплітуда 140.625 мкА/мкФ) клітина генерувала ПД амплітудою 64.35 мВ (щодо потенціалу спокою, який дорівнював -54.6 мВ) з наступною слідовою гіперполяризацією та деполяризацією, які відхилялись від потенціалу спокою на 9 мВ і 1.3 мВ, відповідно (рис. 3.9 А). Генерація ПД супроводжувалася значним (до 262 мкМ) тимчасовим підвищенням $[Ca^{2+}]_i$ (Б), що обумовлено вхідними кальцієвими струмами (В). На піку деполяризації ПД компоненти L- і T-типів в загальному кальцієвому струмі становили 71.41% і 28.59% відповідно. Це співвідношення близько до експериментально зареєстрованих значень, згідно з якими у ДСМ внесок струму T-типу в сумарний Ca^{2+} струм складає 20–30% [81]. Серед вихідних струмів (Р) переважав струм через потенціалзалежні K^+ -канали; другим за величиною був струм через Ca^{2+} -залежні K^+ -канали типу ВК, максимум якого практично збігався з піком $[Ca^{2+}]_i$. Третім за величиною був струм пасивного витоку, динаміка якого повторювала форму ПД. Значно меншими були струми через K^+ -канали типу Kir2.1 і Ca^{2+} -залежні K^+ -канали типу SK відповідно. Слідові процеси, які розвивалися після ПД, також притаманні прототипам, були приурочені до інтервалів домінування відповідних струмів – Ca^{2+} -залежного хлорного, спрямованого всередину під час розвитку слідової деполяризації (В, зазначено тонкою суцільною лінією), і багатоконпонентного калієвого, спрямованого назовні в межах фази гіперполяризації (Г).

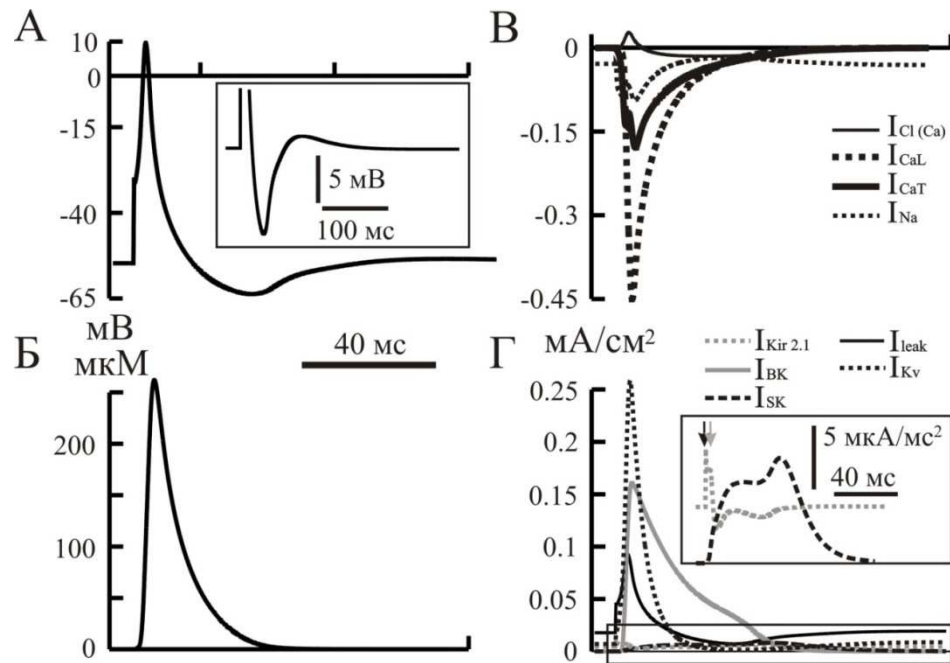


Рисунок 3.9 Реакція модельної ГМК на стимуляцію імпульсом струму. А – Г) Зміни у часі трансмембранного потенціалу; на вставці – той самий відгук у збільшеному масштабі для наглядної демонстрації слідових процесів; внутрішньоклітинна концентрація кальцію, а також щільності парціальних струмів – вхідних I_{Na} , $I_{Cl(Ca)}$, I_{CaT} , I_{CaL} і вихідних I_{Leak} , I_{BK} , I_{SK} , $I_{Kir\ 2.1}$, I_{Kv} ; на вставці – у збільшеному масштабі представлені $I_{Kir2.1}$ і I_{SK} , стрілками (зліва на право) відмічено початок стимулу і момент піку ПД. На В $I_{Cl(Ca)}$ – знакозмінний. Калібрування часу 40 мс загальне для всіх записів, окрім вставок.

Таким чином, додавання I_{SK} та модифікація I_{BK} призвело до більш вираженого прояву слідових процесів у відповідь на електростимуляцію деполяризуючими поштовхами струму.

3.2.3 Реакції ГМК ДСМ у відповідь на парасимпатичну стимуляцію

Аналогічно розглянутим вище відповідям ГМК ДСМ на електричну стимуляцію, дослідження реакцій на парасимпатичний стимул проводились на «базовій» моделі (див. пункти 2.1, 2.3, 2.4) за виключенням струму через калієві канали типу SK і спрощеного представлення струму через BK канали (активація каналів залежала тільки від змін $[Ca^{2+}]_i$) та при додаванні SK і модифікації BK струмів (див. пункт 3.2.4).

Перевіряли можливість збудження ГМК за рахунок активації іонотропних P2X-пуринорецепторів та коактивації струму через Ca^{2+} -залежні хлорні канали, які вважались основним результатом парасимпатичної стимуляції. Цей ефект спрощено представляли тимчасовим збільшенням провідності Ca^{2+} -залежних хлорних каналів, тобто кінцевим ефектом послідовності метаболічних реакцій, опускаючи на цьому етапі докладний опис кожної з ланок зазначеного ланцюга. Експериментальні дані про співвідношення холін- та пуринергічного компонентів (95% до 5%) реакції ГМК-прототипу на парасимпатичну стимуляцію [71] відображали в модельній ГМК співвідношенням відповідних компонентів парціальних провідностей $(g_{Cl(Ca),r} + g_{Cl(Ca),s}) / (g_{P2X})$ у сумарній максимальній провідності $(g_{Cl(Ca),r} + g_{Cl(Ca),s} + g_{P2X})$. Перехідне збільшення парціальних провідностей і розглядалося як результат парасимпатичної дії.

У відповідь на дзвоноподібне підвищення такої сумарної провідності до порогового рівня 3.82 мСм/см^2 (рис. 3.10, *A*, вгорі) модельна ГМК генерувала ПД приблизно такої самої амплітуди (54.4 мВ) та форми (*A*, внизу), як і при електричній стимуляції (пор. з рис. 3.6). Така амплітуда дещо вище, ніж зареєстрована в ГМК прототипу (40 мВ [60], рис. 1, *B c*). Слід зазначити, що цитовані дані [60] відносяться до ПД, який генерувався в процесі безперервної імпульсної активності ГМК, а не активності, викликаній дією поодиноким парасимпатичного стимулу. У наших модельних експериментах

амплітуда ПД також ставала нижче при застосуванні серії стимулів (див. розділ 3.4). Пов'язане з поодиноким ПД (рис. 3.10, *А*) перехідне підвищення $[Ca^{2+}]_i$ до пікового значення 167.3 мкМ (*Б*) забезпечувалося кальцієвим струмом, в якому нормовані значення вимірюваних на піку ПД компонентів L- і T-типів складали 60.77% і 39.23%, відповідно (*В*). Ці значення досить близькі до вже згаданого співвідношення у клітинах-прототипах [81]. Вхідний напрямок Ca^{2+} -залежного хлорного струму змінювався на вихідний, коли пов'язане з ПД деполяризаційне зміщення МП перевершувало рівень $E_{Cl} = -32$ мВ, а пікове значення зазначеного струму було майже вдвічі меншим, ніж у струмі через пуринергічні рецепторні канали. Пікова провідність останніх була у 19 разів менша, ніж у каналах Ca^{2+} -залежного хлорного струму (див. вставку на рис. 3.10, *В*). Дана обставина обумовлена істотно більш значним деполяризаційним потенціалом рівноваги I_{P2X} ($E_{P2X} = -7$ мВ). Як і при електричній стимуляції (рис. 3.6, *Г*, *З*), калієвий компонент вихідного струму у багато разів перевищував компонент пасивного витоку (рис. 3.10, *Г*).

Були досліджені також реакції модельної ГМК на збільшення тих же, що і в попередній серії, провідностей, але у вигляді короткого П-подібного зсуву (рис. 3.10, *Д-З*). Такий підхід був запозичений з теорії систем регулювання об'єктів небіологічної природи, де реакції на дію подібного «стандартного стимулу», відомі як імпульсні перехідні характеристики, вивчаються з метою виявлення характерних властивостей системи, що важко виявити за відгуком на вхідні сигнали складної (довільної) форми. Застосування подібного, що не має фізіологічної аналогії, впливу, виявило наступні особливості регулювання процесів збудження в ГМК, які заслуговують пильної уваги. Перш за все, було виявлено характерну чутливість трансмембранних струмів до параметрів парасимпатичної активації, зокрема до швидкості збільшення провідності. Незважаючи на зовнішню схожість електричних (пор. *А* і *Д*) та концентраційних (пор. *Б* і *Е*) відгуків, можна бачити, що викликані дією

П-подібного (тобто наростаючого миттєво) стимулу вхідні струми через кальцієві канали L-типу, Ca^{2+} -залежні хлорні канали і P2X-рецепторні канали (В) суттєво відрізняються від викликаного наростаючим за кінцевий час поштовху струму, що відповідає альфа-функції (Ж). Граничне скорочення часу наростання в умовах П-подібного впливу призводить до одночасної швидкої активації Ca^{2+} -залежного хлорного струму і неспецифічного струму через P2X-рецепторні канали, співвідношення амплітуд яких у даному випадку близьке до співвідношення відповідних пікових провідностей (95:5). Однак, при цьому швидше, ніж при дзвоноподібному стимулі, активується струм L-типу, помітне збільшення якого слідом за струмом Т-типу призводить до відповідного збільшення концентраційного відгуку (Е) і невеликого збільшення амплітуди ПД (Д).

Результати ряду допоміжних модельних експериментів дали додаткові відомості про те, наскільки значущою для збудливості ГМК є чутливість, виявлена за допомогою П-подібної стимуляції, деполяризаційних механізмів до часових характеристик парасимпатичного стимулу, його холінергічної та пуринаергічної складових. Характерні зміни відгуків (рис. 3.10, А–Г) спостерігалися в умовах модифікації параметрів альфаподібного парасимпатичного стимулу. Так, при затримці холінергічної складової активації щодо P2X-складової навіть на 1 мс, або при блокуванні останньої, клітина генерувала не ПД, а лише локальну відповідь майже вдвічі меншої амплітуди. В даному випадку генерацію ПД можна було відновити, збільшуючи максимальну P2X-провідність і сповільнюючи її наростання так, щоб її максимум досягався приблизно в один і той же час із максимумом «затриманої» холінергічної складової. Заслуговує уваги також зниження порогу генерації ПД, викликаного додатком поштовху струму на тлі збільшеної P2X-провідності та незмінною провідністю каналів Ca^{2+} -залежного хлорного струму; зменшення порогового струму було близьким до лінійного з крутизною $\sim 0.52 \text{ нА}/(\text{мСм}/\text{см}^2)$.

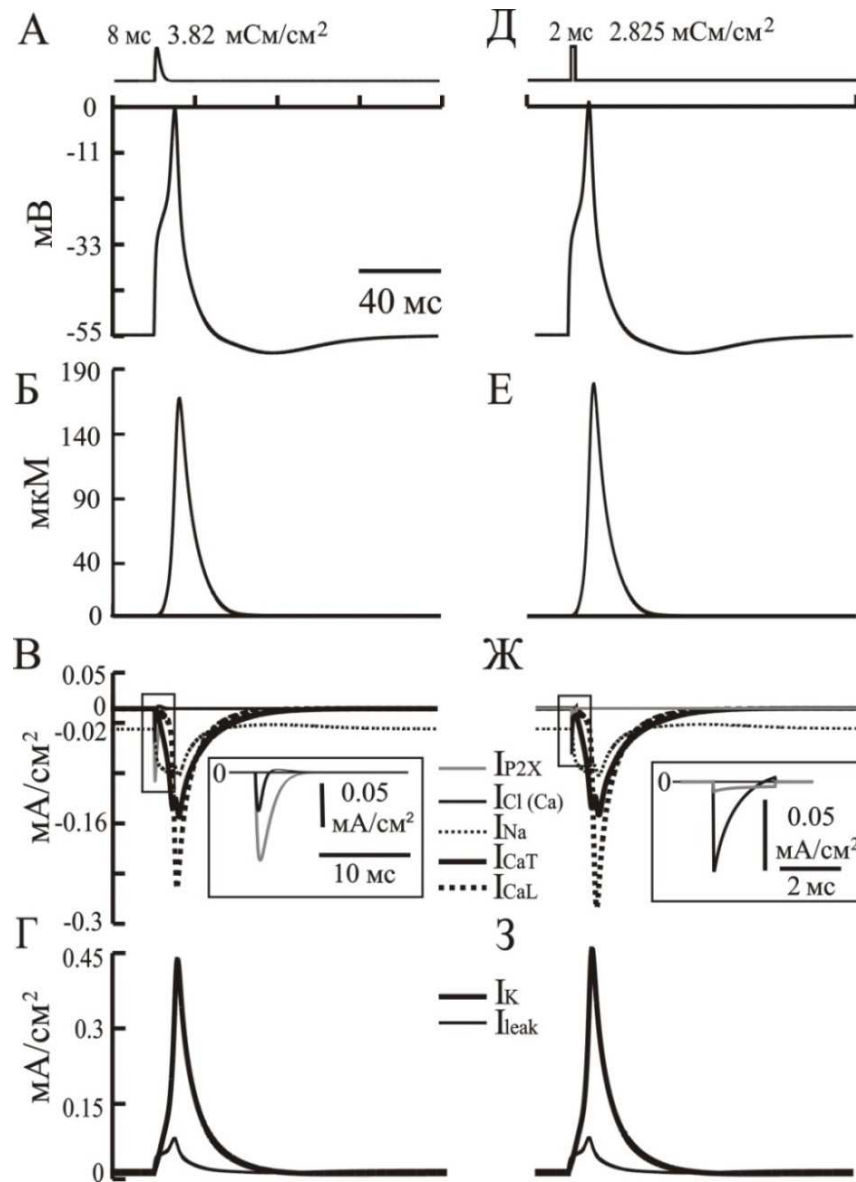


Рисунок 3.10 Реакції модельної ГМК ДСМ на імпульсне збільшення провідності каналів Ca^{2+} -залежного хлорного струму та неспецифічного струму через пуринергічні рецепторні канали. А, Д) Зверху – параметричні стимули, що відповідають альфа-функції та П-подібному імпульсу, знизу – викликані ними зміни МП. Б, Е – зміни $[\text{Ca}^{2+}]_i$. В, Ж) Вхідні струми; на вставці – виділений фрагмент у збільшеному масштабі (видно різні співвідношення I_{P2X} і $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$, а також зміну напрямку $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$). Г, З) Вихідні струми. Калібрування часу 40 мс загальне для А–З скрізь, крім вставок.

3.2.4 Особливості відповідей модельної ГМК ДСМ на парасимпатичну стимуляцію, пов'язані з впливом калієвих струмів

Можливість збудження ГМК ДСМ сумісною метаботропною і іонотропною дією на спрощеній моделі було показано вище (див. рис. 3.10). Далі було важливо і необхідно з'ясувати детальні біофізичні механізми збудження ГМК ДСМ при більш наближених до прототипу характеристик і співвідношення мускаринового і пуринового компонентів загальної парасимпатичної дії. Це було здійснено на модифікованій моделі ГМК ДСМ, у якій поодинокий парасимпатичний стимул представляв собою послідовну, з інтервалом $\Delta\tau=70$ мс, активацію провідності P2X-каналів сарколеми $g_{P2X}(t)$ (далі Р-стимул) і проникності IP3-каналів СР $P_{IP3}(t)$ (далі М-стимул) (кожна величина досягала максимуму за $\tau_{SP2X}=\tau_{SIP3}=0.8$ мс). Такий стимул викликав у модельній ГМК відповідь з двома відповідно розділеними у часі компонентами (рис. 3.11). Перший, пуриновий, обумовлений струмом через P2X-канали, був представлений початковою низько-амплітудною (6.12 мВ відносно потенціалу інверсії $E_r=-55$ мВ) деполяризацією, а другий, мускариновий – пізньою високо-амплітудною деполяризацією, яка переходила у повноцінний ПД з піковим значення 60.2 мВ, слідовими гіпер- і деполяризацією величиною, відповідно, 6.53 мВ і 1.22 мВ (рис. 3.11 А). ПД «запускався» Ca^{2+} -залежним хлорним струмом і підтримувався, в основному, струмами через потенціалзалежні Ca^{2+} канали Т- і L-типу (рис. 3.11 В). $[Ca^{2+}]_i$ несуттєво підвищувалась від базального рівня 123.7 нМ до 138 нМ під час початкової деполяризації за рахунок Ca^{2+} -струмів. А під час генерації ПД – спочатку швидко підвищувалась до 1.441 мкМ за рахунок потоку із депо J_{IP3R} (що узгоджується з даними експериментів [61, 184]) і після короткого (~3 мс) спаду відновлювала зростання до піку 295 мкМ (Б), що було обумовлено трансмембранним Ca^{2+} -струмом. У складі останнього L- і Т- компоненти на піку ПД складали 74% і 26% відповідно, що близько до

експериментальних даних [81]. Примітним був знакозмінний струм через Ca^{2+} -залежні хлорні канали. Після «запуску» ПД він поступово зменшувався і на 8.34 мс, змінював свій початковий деполяризуючий напрямок на гіперполяризуючий, коли МП ставав більш деполяризаційним, ніж $E_{\text{Cl}} = -32$ мВ. Далі, через 17.59 мс після початку вивільнення Ca^{2+} із депо і 6.12 мс після піку ПД, даний струм знову інвертувався і, таким чином, сприяв слідовій деполяризації. Серед вихідних струмів (Г) переважав струм через потенціалзалежні K^+ -канали. Другим за величиною був струм через Ca^{2+} -залежні K^+ -канали типу ВК, третім – струм пасивного витоку. Набагато меншими були K^+ -струми через канали типів Kir2.1 і SK (див. вставку на рис. 3.11 Г). Слідові процеси після ПД, також притаманні клітинам-прототипам, були обумовлені домінуванням відповідних струмів. Роль K^+ -струмів через потенціалзалежні K^+ -канали, а також K^+ -канали типу Kir2.1 полягала у формуванні потенціалу спокою та обмеженні амплітуди ПД, тоді як струм через Ca^{2+} -залежні K^+ -канали типу ВК, що активувався дещо пізніше, обмежував амплітуду і тривалість ПД та визначав амплітуду слідової гіперполяризації. K^+ -струм через SK-канали, які активуються останніми (максимум на ~ 50.82 мс після піку ПД), визначав тривалість слідової гіперполяризації (див. вставку на рис. 3.11 Г).

Таким чином, модельна ГМК ДСМ відповідала на парасимпатичний стимул генерацією повноцінного ПД, який мав параметри, близькі до таких у прототипі, і супроводжувався необхідним для скорочення суттєвим перехідним підвищенням $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Така поведінка модельної клітини була досить стійкою по відношенню до варіації параметрів. Для генерації ПД критичним був час наростання проникності IP3-каналів депо: при $\tau_{\text{IP3}} > 2.7$ мс деполяризація не досягала порогу ПД. Варіація інших параметрів змінювала ПД, але не запобігала його генерації. Так, наприклад, збільшення максимальної проникності P_{IP3R} до 0.028 мс^{-1} та зменшення постійних часу активації Ca^{2+} -залежних K^+ -каналів

типу ВК і СК призводило до зменшення амплітуди ПД. ПД збільшувався при збільшенні τ_{sIP3} з 0.8 мс до 1.6 мс і зменшувався при подальшому збільшенні τ_{sIP3} .

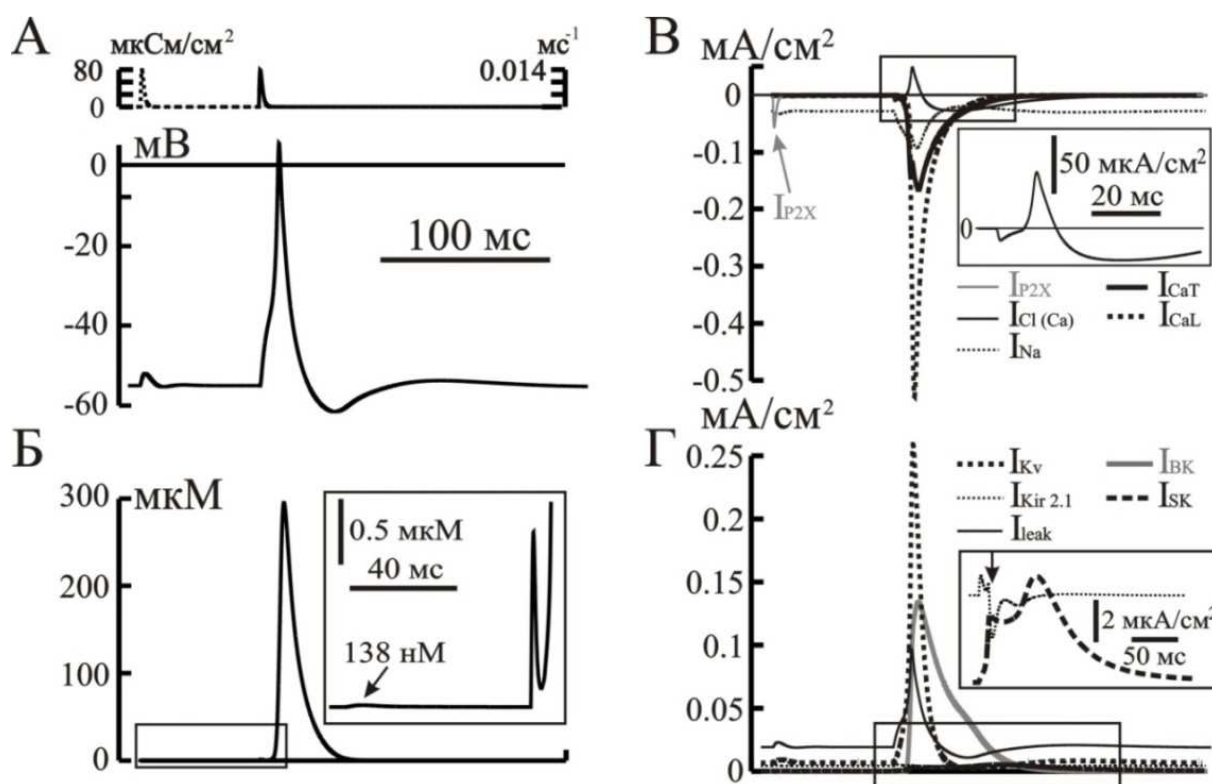


Рисунок 3.11 Реакція модельної ГМК на парасимпатичний стимул у вигляді імпульсного збільшення провідності P2X-рецепторних каналів сарколеми і кальцієвої проникності IP3-рецепторних каналів депо. Час досягнення піку g_{P2X} і P_{IP3} $\tau_{sP2X} = \tau_{sIP3R} = 0.8$ мс, затримка активації g_{P2X} відносно P_{IP3} $\Delta\tau = 70$ мс. А) зверху: провідність P2X-каналів g_{P2X} і проникність IP3-каналів P_{IP3} (штрихова і суцільна лінія відповідно), знизу – МП. Б – $[Ca^{2+}]_i$. В і Г) Щільність парціальних струмів – входних (I_{Na} , $I_{Cl(Ca)}$, I_{CaT} , I_{CaL} , I_{P2X}) і вихідних (I_{Leak} , I_{BK} , I_{SK} , $I_{Kir2.1}$, I_K) відповідно. Вставки на Б–Г – збільшені фрагменти записів, охоплених прямокутниками. На В струм $I_{Cl(Ca)}$ – знакозмінний. Калібрування часу 100 мс загальне для всіх, окрім вставок.

Як показали обчислення, поодинокий стимул при $\Delta\tau > 20$ мс викликав невеликий деполяризаційний сплеск у відповідь на активацію P2X-каналів і

повноцінний ПД – у відповідь на активацію IP3-чутливих каналів депо. При $\tau_{\text{SP2X}}=3.2$ мс і затримках в інтервалі $20 \text{ мс} > \Delta \tau > 16 \text{ мс}$ виникав ПД тим меншої амплітуди, чим менше $\Delta \tau$; генерація ПД припинялась при $15 \text{ мс} \geq \Delta \tau > 6 \text{ мс}$ і відновлювалась при $\Delta \tau < 6 \text{ мс}$. Викликана струмом P2X-каналів початкова деполяризація призводила до незначної активації Ca^{2+} -каналів і, відповідно, до невеликого підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (див. вставку рис. 3.14 Б). Зі зменшенням $\Delta \tau$ збільшувалось перевищення базального рівня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ до початку активації IP3-каналів. Остання призводила до підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$, активації Ca^{2+} -залежних хлорних каналів, струм яких призводив до деполяризації мембрани, до рівнів активації Ca^{2+} -каналів Т-та L-типів. У результаті $[\text{Ca}^{2+}]_i$ продовжувала зростати, викликаючи тим самим кальційзалежну інактивацію L-каналів. Коли кальційзалежна інактивація починала переважати над деполяризаційною потенціалзалежною активацією, Ca^{2+} -струм швидко зменшувався, що робило неможливим розвиток повноцінного ПД (наприклад, при $15 \text{ мс} \geq \Delta \tau > 6 \text{ мс}$ і $\tau_{\text{SP2X}}=3.2$ мс). При $\Delta \tau < 6 \text{ мс}$ викликана P2X-струмом деполяризація, будучи достатньо високою до початку активації IP3-каналів, підсилювала ефекти останньої.

Отже, додавання I_{SK} та модифікація I_{BK} призвели до більш вираженого прояву слідових процесів у відповідь на парасимпатичну стимуляцію.

3.3 Вплив співвідношення метаботропного та іонотропного компонентів парасимпатичної дії на збудливість ГМК ДСМ

3.3.1 Відповіді ГМК на дію поодинокого парасимпатичного стимулу при різних співвідношеннях метаботропного та іонотропного компонентів

Поодиноким парасимпатичним стимулом з розділеними інтервалами Δt_0 пуриновим і мускариновим компонентами, g_{P2X} і P_{IP3} (далі – Р- і М-стимули) викликав у ГМК сполучені електричний та концентраційний відгуки, кожен з яких мав відповідні компоненти (далі – Р- і М-відповіді) (рис. 3.12). Результируюча відповідь, викликана стимулом з параметрами $g_{P2X}=76.6$ мкСм/см², $P_{IP3}=14$ с⁻¹ і $\Delta t_0=70$ мс (рис. 3.12 А), була прийнята в якості відлікової для подальших порівняльних досліджень. При зазначеному виборі параметрів стимулу ця відповідь модельної ГМК відображала описані в літературі суттєві особливості прототипу – значно більшу латентність М-відповіді та величину пов'язаного з нею кальцієвого транзйенту (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 параметру моделі. В цьому випадку М-відповідь розвивалась після закінчення Р-відповіді (рис. 3.12 А, сіра крива) і тому не зазнавала впливу останнього. Р- і М-компоненти електричного відгуку представляли собою деполяризаційні піки тривалістю, відповідно, 10.65 і 29 мс (час досягнення максимумів приблизно 3 і 11.65 мс), причому М-пік був 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 мс і 93.02 мс). Викликані дією того ж стимулу концентраційні Р- і М-відповіді (рис. 3.12 А2, сіра крива) загальною тривалістю приблизно 67 і 1500 мс, відповідно, також мали вигляд піків із швидким наростанням і повільним спадом $[Ca^{2+}]_i$ до базального рівня, причому М-пік (295 мкМ) багаторазово

(на порядки) перевищував Р-пік (0.138 мкМ). Якщо затримку Δt_0 зменшували до 15, 5 і 2 мс, то М-стимул припадав, відповідно, на фазу слідової гіперполяризації (рис. 3.12 Б), фазу спаду і вершину деполяризаційного піку Р-відповіді. При цьому мала місце нелінійна сумація електричних М- і Р-відповідей: максимальне значення результуючої відповіді (М&Р) було менше алгебраїчної суми максимальних значень цих компонентів, що спостерігалось при їх повному розділенні у часі, тобто $(M \& P)/(M + P) < 1$ (рис. 3.12 Г). Якщо згадані вище провідність і затримка залишалися незмінними ($g_{P2X} = 76.6 \text{ мкС/см}^2$ і $\Delta t_0 = 70 \text{ мс}$), то зменшення проникності P_{IP3} на 5, 15, 25 і 35% (до 13.26, 11.792, 10.318 і 8.844 с^{-1}), що моделює частковий дефіцит м-холінорецепторів, призводило до різкого зниження піків електричної і концентраційної М-відповідей (рис. 3.12 Д і Е). Залежність піку електричної М-відповіді від величини P_{IP3} (рис. 3.12 Д, сіра лінія) добре наближувалась подвійною експоненціальною функцією:

$$f(P_{IP3}) = 2.5 + 102.36 \cdot \exp(-0.95418 \cdot P_{IP3}) - 44.412 \cdot \exp(-0.95418 \cdot P_{IP3})$$

з середньоквадратичним відхиленням $\sigma = 0.00019$.

Особливий інтерес для нас становило з'ясування можливостей відновлення величини кальцієвого транзйєнта, послабленого внаслідок зниження ефективності М-стимулу. У наступних обчислювальних експериментах розглядали таку можливість, обумовлену посиленням іонотропної дії – збільшенням Р-стимулу (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 ($P_{IP3} = 13.26 \text{ с}^{-1}$) дворазове збільшення g_{P2X} (до 153.2 мкС/см^2) не призводило до помітного відновлення кальцієвого транзйєнту (пікове значення $[Ca^{2+}]_i$ не перевищувало 31.765 мкМ), оскільки при згаданій затримці $\Delta t_0 = 70 \text{ мс}$ Р-відповідь повністю закінчувалась перед початком М-відповіді (рис. 3.12 А, крива 2). При 15%-вому послабленні P_{IP3} чотириразове збільшення g_{P2X} (до 306.4 мкС/см^2) викликало тривалу

(>150 мс) деполяризацію (рис. 3.12 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 ПД. До початку М-відповіді кальцієві канали L-типу були інактивовані на ~51% (переважно за рахунок кальційзалежної інактивації), а потенціалзалежна інактивація кальцієвих каналів Т-типу становила всього ~5.5%. Отже, збільшення $[Ca^{2+}]_i$ (з максимумом 2.75 мкМ), яке активувало деполяризуючий струм через Ca^{2+} -залежні хлорні канали, відбувалося, переважно, за рахунок вивільнення Ca^{2+} з депо СР. Шестикратно збільшений Р-стимул ($g_{P2X} = 459.6$ мкС/см²) вже сам по собі викликав ПД з амплітудою у 70 мВ. При цьому електрична і концентраційна складові послабленої М-відповіді, що приходилася на закінчення слідової гіперполяризації Р-відповіді, суттєво не змінювалися (рис. 3.12 А, крива 4).

Парасимпатичний стимул з компонентами $P_{IP3} = 14$ с⁻¹ і $g_{P2X} = 76.6$ мкС/см², розділеними зменшеною до $\Delta t_0 = 15$ мс затримкою, 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. 3.12 Б, крива 1). Різниці склали менше 1 мВ для електричного і близько 2.5 мкМ – для концентраційного компонентів відповіді. 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. 3.12 Б, крива 2) з набагато більш високими піковими значеннями як деполяризації мембрани (40.81 мВ), так і концентрації $[Ca^{2+}]_i$ (146 мкМ). Це відповідає частковій 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). У той же час пікове значення концентраційної відповіді зменшилося до 2.48 мкМ (рис. 3.12 Б, крива 3). До початку М-відповіді інактивація кальцієвих каналів L- і Т-типів складала, 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 (неспецифічний катіонний струм через P2X -канали, струми через потенціалзалежні кальцієві канали, Ca^{2+} -залежний хлорний струм) були менше гіперполяризаційних струмів, що течуть, переважно, через потенціалзалежні калієві канали. Генерація ПД, однак, ставала можливою при істотному збільшенні Р-стимулу ($g_{\text{P2X}}=459.6 \text{ мкС/см}^2$), навіть якщо інтенсивність М-стимулу була ще меншою ($P_{\text{IP3}}=10.318 \text{ с}^{-1}$) (рис. 3.12 Б, крива 4). Цей ПД, який фактично був регенеративною відповіддю на Р-стимул, з амплітудою 70.64 мВ супроводжувався кальцієвим транзієнтом, який досягав 330 мкМ; М-стимул був настільки ослаблений, що не справляв помітного впливу на МП та $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Р- і М-стимули, що наносили при тих же, що й раніше, комбінаціях інтенсивності (рис. 3.12 А, Б, криві 1-4), але з мінімальним інтервалом ($\Delta t_0=2 \text{ мс}$), викликали результуючі відповіді, які мали як спільні риси, так і певні особливості. Загальним феноменом було прогресивне зменшення електричної і концентраційної відповідей порівняно з реакціями, що спостерігалися при $\Delta t_0=15$ і 70 мс і комбінаціях інтенсивностей 1, 2 і 4 ($g_{\text{P2X}}=76.6 \text{ мкС/см}^2$ і $P_{\text{IP3}}=14 \text{ с}^{-1}$, $g_{\text{P2X}}=153.2 \text{ мкС/см}^2$ і $P_{\text{IP3}}=13.26 \text{ с}^{-1}$, $g_{\text{P2X}}=459.6 \text{ мкС/см}^2$ і $P_{\text{IP3}}=10.318 \text{ с}^{-1}$). У разі ж комбінації 3 ($P_{\text{IP3}}=11.792 \text{ с}^{-1}$ і $g_{\text{P2X}}=306.4 \text{ мкС/см}^2$) 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 струму через Ca^{2+} -залежні хлорні канали виникає за рахунок вивільненням Ca^{2+} з депо, це підсилює деполяризацію, генеровану натрієвим струмом. Що, в свою чергу, посилює активацію потенціалзалежних кальцієвих каналів і веде до генерації ПД.

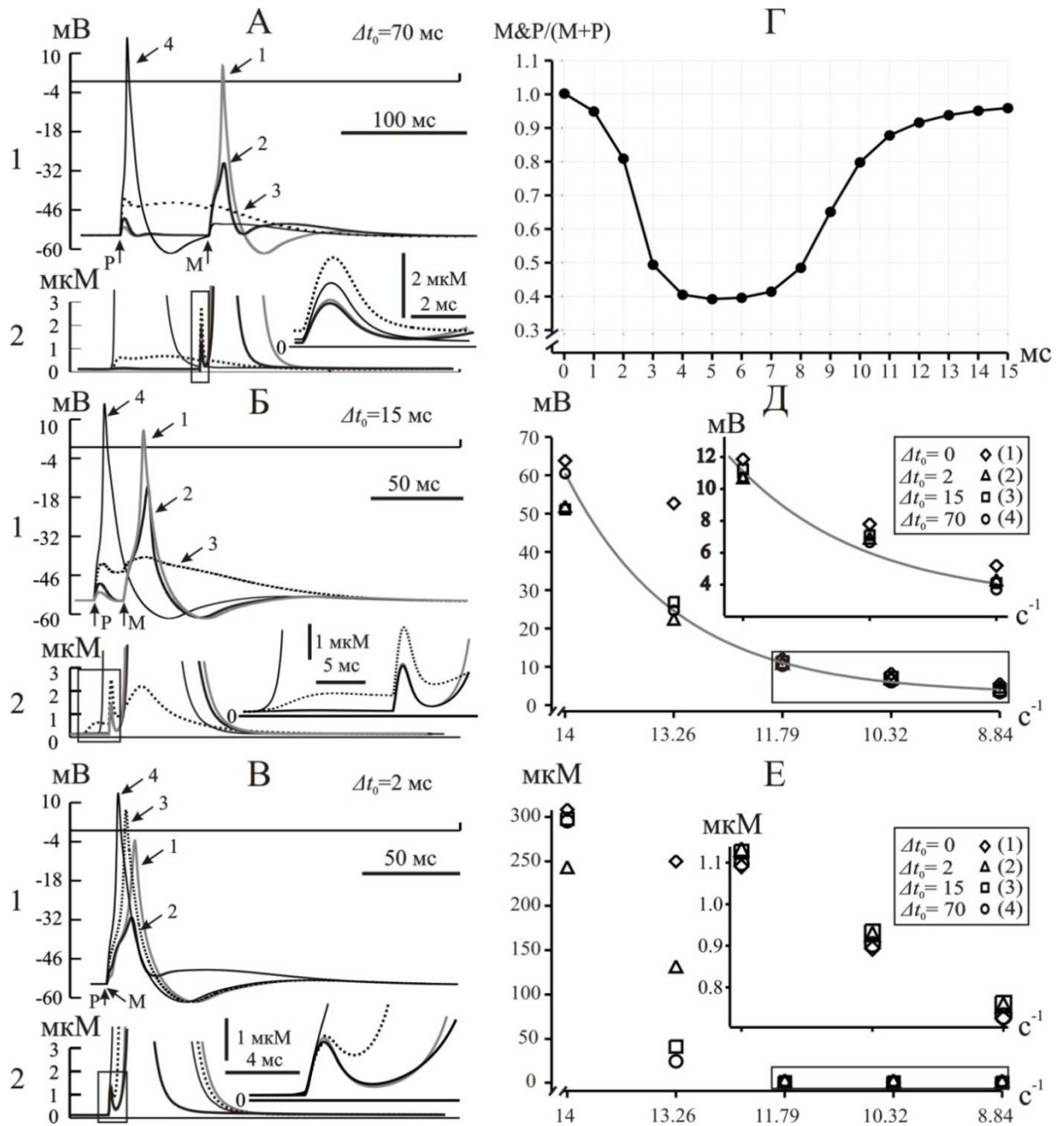


Рисунок 3.12 Електричні та концентраційні відповіді модельної ГМК на прикладення поодиноких парасимпатичних стимулів при різних значеннях інтенсивності *P*- і *M*-компонентів і часової затримки (Δt_0) між ними. А–В) 1 та 2, відповідно, – зміни МП та зміни $[Ca^{2+}]_i$, викликані стимулом, *P*- та *M*-компоненти яких (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 ($M\&P$), нормованої по відношенню до суми амплітуд ізольованих *M*- і *P*-компонентів ($M+P$) у залежності від інтервалу між цими

компонентами. Д і Е) Залежності, відповідно, М&Р і $[Ca^{2+}]_i$ від проникності ІРЗ-каналів (P_{IP3} , c^{-1}) при фіксованій провідності Р2Х каналів $g_{P2X}=76.6$ мкС/см² і різних затримках Δt_0 (мс, вказано відповідними маркерами на вставках). Суцільна лінія на Д – наближаюча функція, розрахована при $\Delta t_0=70$ мс. Охоплені прямокутниками фрагменти графіків на А2–В2, Д і Е представлені у збільшеному масштабі на вставках.

В цілому, при затримках Δt_0 у діапазоні від 0 до ~4 мс М-відповідь припадала на фазу наростання деполяризації, викликаной Р-стимулом. При цьому чим більше ця деполяризація (ближче до піку), тим менші результуючі відповіді (рис. 3.12 Г, рис. 3.13 А). Якщо затримка Δt_0 варіювалася в діапазоні від ~4 до 7 мс (що відповідало початку спаду деполяризації, викликаной Р-стимулом), то результуючі відповіді були найменшими (рис. 3.13 Б). В діапазоні Δt_0 від 8 до 15 мс, коли деполяризація становила менше 29% від максимуму, результуючі відповіді збільшувались (рис. 3.13 В). Примітно, що одночасне збільшення g_{P2X} і зменшення P_{IP3} призводило до виникнення ПД при менших значеннях Δt_0 . Наприклад, у разі $P_{IP3}=13.26$ c^{-1} і $g_{P2X}=153.2$ мкС/см² ПД амплітудою 54 мВ виникав при $\Delta t_0=1$ мс, а у разі $P_{IP3}=11.792$ c^{-1} і $G_{P2X}=306.4$ мкС/см² ПД амплітудою 51.29 мВ розвивався при $\Delta t_0=3$ мс.

Представлені вище результати показують, що кальцієвий транз'єнт, ослаблений в результаті дефіциту м-холінорецепторів, можна збільшити шляхом підсилення інтенсивності Р-стимулу. Таке підсилення має бути або значним (шестикратним) при великій затримці ($\Delta t_0=70$ мс), або помірним (двох-, чотирикратним) при істотно менших затримках ($\Delta t_0 \leq 15$ мс). Виявлений за допомогою варіації затримки Δt_0 між Р- і М-компонентами поодинокого парасимпатичного стимулу компенсаторний ефект зменшення цього параметра заслуговує особливої уваги. Очевидно, що існуючі методи

не дозволяють реалізувати необхідну для цього зміну латентного періоду (ЛП) Р- і М-відповідей на дію поодинокого парасимпатичного стимулу в умовах фізіологічного експерименту. Однак, обійти ці методичні обмеження виявилось можливим в умовах моделі за допомогою нанесення парних парасимпатичних стимулів, розділених керованим інтервалом часу.

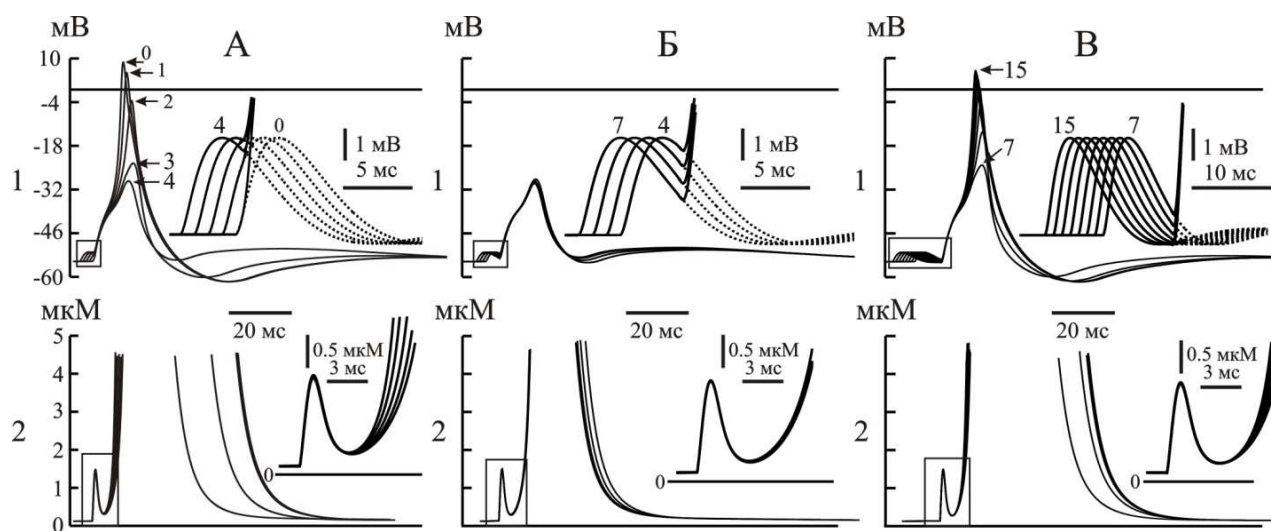


Рисунок 3.13 *Зміна МП та $[Ca^{2+}]_i$ в залежності від часової затримки Δt_0 (мс) між Р- і М- компонентами парасимпатичного стимулу. А–В) Записи змін МП (1) та транзйєнтів $[Ca^{2+}]_i$ (2) при різних величинах інтервалу між Р- і М-компонентами: 0–4 мс (А), 4–7 мс (Б) і 8–15 мс (В). Охоплені прямокутниками фрагменти записів представлені в збільшеному масштабі на вставках праворуч; над вставками на фрагментах А1, Б1 і В1 вказано значення Δt_0 (мс).*

3.3.2 Відповіді ГМК ДСМ на парну парасимпатичну стимуляцію

Парну стимуляцію здійснювали, завдаючи ідентичних парасимпатичних впливів, розділених міжстимульним інтервалом (МСІ) ΔT . У кожного з таких впливів мускариновий компонент (М1 або М2) був затриманий щодо пуринового (Р1 або Р2) на один і той же час $\Delta t_0 = 70$ мс. Зауважимо, що міжімпульсний інтервал ΔT можна підібрати так, що М-відповіді на перший стимул (М1) передуватимуть Р-відповідь на другий стимул (Р2) з інтервалом $\Delta \tau = \Delta t_0 - \Delta T$ як завгодно меншим, ніж інтервал між Р2- і М2-відповідями ($\Delta \tau < \Delta t_0$). Таким чином, парна стимуляція дозволяла в певному сенсі подолати «фізіологічні» обмеження поодинокій стимуляції, пов'язані з неможливістю зменшувати природний ЛП М-відповіді (наближати останню до Р-відповіді) у біологічному експерименті (рис. 3.12). Так, при $\Delta t_0 = 70$ мс і $\Delta T = 68$ і 55 мс забезпечувались інтервали між Р2- і М1-відповідями, рівні $\Delta \tau = 2$ і 15 мс відповідно (такі ж, як використовувалися в описаних вище обчислювальних експериментах з поодинокією стимуляцією, інтервали між Р- і М-відповідями Δt_0 , зменшені порівняно з фізіологічними). Для полегшення зіставлення результатів парної стимуляції (рис. 3.14) з отриманими при поодинокій стимуляції (рис. 3.12) ми використовували ті ж чотири комбінації інтенсивностей Р- і М-компонентів кожного з двох парасимпатичних стимулів (див. пункт 3.3.1). Відповіді на парну стимуляцію з комбінаціями інтенсивностей 1 ($P_{IP3} = 14 \text{ с}^{-1}$, $g_{P2X} = 76.6 \text{ мкС/см}^2$) і 2 ($P_{IP3} = 13.26 \text{ с}^{-1}$, $g_{P2X} = 153.2 \text{ мкС/см}^2$) були подібні до тих, які спостерігалися при поодинокій стимуляції, оскільки всі процеси, викликані Р1-стимулом, закінчувалися до початку як Р2-, так і М1-відповідей (рис. 3.14 А і Б). Однак, у відповідей на стимуляцію з комбінаціями інтенсивностей 3 і 4 спостерігалися примітні особливості.

Так, у разі стимуляції з інтенсивностями компонентів $P_{IP3} = 11.792 \text{ с}^{-1}$ і $g_{P2X} = 306.4 \text{ мкС/см}^2$ (комбінація 3) при $\Delta T = 55$ мс ($\Delta \tau = 15$ мс) відповіддю на

Р2-стимул був деполяризаційний «сплеск» з максимумом 4.43 мВ, який не супроводжувався помітною зміною $[Ca^{2+}]_i$. Наступна за цим М1-відповідь характеризувалася зміщенням $[Ca^{2+}]_i$ до максимуму 4.14 мкМ і відсутністю помітної зміни МП (рис. 3.14 А, крива 3). Така картина визначається розвитком кальційзалежної інактивації кальцієвих каналів. До початку Р2-відповіді така інактивація каналів L-типу склала близько 42.5%, а до початку М2-відповіді – 50.2%. Потенціалзалежна інактивація була менш суттєвою, складаючи для каналів L- і Т-типу, відповідно, близько 2% і 5.9% на момент початку Р2-відповіді, і 2.3% та 7.7% – перед початком М2-відповіді. У разі ж стимуляції з тими ж значеннями інтенсивності компонентів, але з великим МСІ ($\Delta T=68$ мс, що відповідає найбільш короткому інтервалу $\Delta \tau=2$ мс) пікове значення результуючої електричної відповіді ставало дещо більшим (4.6 мВ), а концентраційної – меншим (3.43 мкМ) (рис. 3.14 Б, крива 3). Кальційзалежна інактивація каналів L-типу, що визначає таку картину, збільшилася до 48.8% до початку Р2-відповіді, але зменшилася до 49.6% до початку М1-відповіді. Потенціалзалежна інактивація на момент початку Р2-відповіді збільшилася до 2.2% у L-каналах, але зменшилася до 5.6% у Т-каналах. У момент початку М1-відповіді така інактивація зменшилася у каналах L-і Т-типу до 2.2 і 5.9% відповідно. При стимуляції з значеннями інтенсивності компонентів, що відповідають комбінації 4 ($P_{IP3}=10.318$ с⁻¹, $g_{P2X}=459.6$ мкС/см²), Р1-відповідь на шестикратно збільшений стимул представляла собою повноцінний ПД, а Р2- і М1- стимули припадали на фазу слідової гіперполяризації останнього. Така гіперполяризація була більш глибокою при меншому МСІ ($\Delta T=55$ мс; інтервал між компонентами $\Delta \tau=15$ мс) і меншою при більшому ΔT (68 мс, що відповідає $\Delta \tau=2$ мс) (криві 4 на рис. 3.14, А, Б). Порівняно з тим, що спостерігалось у випадку комбінації 3, результуючі відповіді характеризувалися більш високими піковими значеннями зрушень МП (6.2 та 8.5 мВ; криві 4 на рис. 3.14, А2 і Б2 відповідно) і більш низькими піковими

концентраціями $[Ca^{2+}]_i$, 1.96 мкМ і 2.05 мкМ (криві 4 рис. 3.14, А3 і Б3 відповідно).

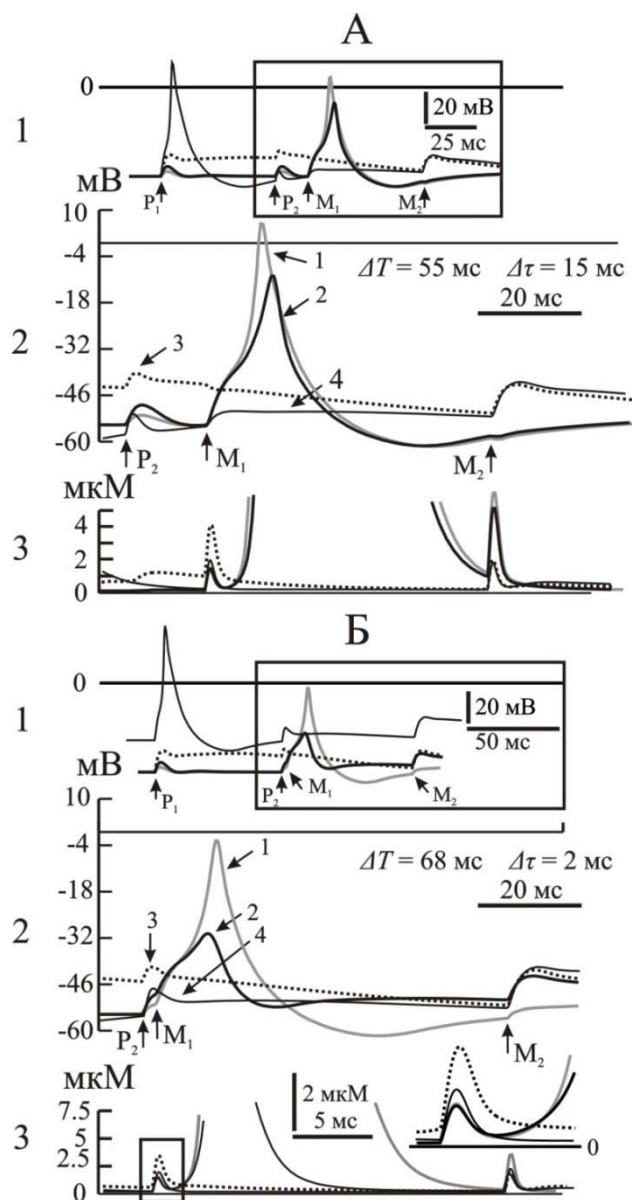


Рисунок 3.14 Електричні та концентраційні відповіді ГМК ДСМ на прикладення двох парасимпатичних стимулів при різних значеннях інтенсивності Р- і М-компонентів та МСІ (ΔT). А і Б) МП (1 і 2) та $[Ca^{2+}]_i$ (3), викликані стимулами, розділеними інтервалами $\Delta T=55$ і 68 мс відповідно. Криві 1–4 відповідають чотирьом комбінаціям інтенсивності Р- і М-компонентів стимулу. Охоплені прямокутниками фрагменти панелі 1 представлені в збільшеному масштабі на панелі 2, а фрагмент Б3 показаний також у збільшеному масштабі праворуч.

У підсумку представлені дані показують, що величина результуючої відповіді ГМК ДСМ на дію парасимпатичних стимулів характерним чином залежить від співвідношення інтенсивностей їх Р- і М-компонентів. Зі збільшенням інтенсивності Р-компонента і зменшенням М-компонента стимулу електрична та концентраційна складові Р1-відповіді збільшуються, що робить більш глибокою потенціал- і кальційзалежну інактивацію кальцієвих каналів до моменту початку Р2- і М1- компонентів результуючої відповіді.

3.4 Особливості біофізичних процесів у ГМК ДСМ при множинній електричній і парасимпатичній стимуляції

3.4.1 Відповіді модельної ГМК на множинну електричну стимуляцію

Множинну стимуляцію (рис. 3.15, 3.16) здійснювали імпульсами деполяризуючого струму з такими ж параметрами (140.625 мкА/мкФ, 0.2 мс), як і у поодинокого імпульсу, який був пороговим для виклику повномасштабного одиночного ПД у попередніх дослідях (див. пункт 3.2.2 рис. 3.9). Стимули були організовані у, так звані, пачки або «конверти». Порівнювали клітинні процеси, що розвивалися при такій стимуляції, у чотирьох варіантах, які відповідали стандартним протоколам реабілітаційної стимуляції (див. опис у керівництві користувача «Biofeedback/Stimulation Protocol Definitions List» до апарату «UroStym», виробництва «Laborie Medical Technologies, Inc.», Канада або [176]). Для стислості ці варіанти названі тут високо- або низькочастотною пачкою (ВП або НП), високо- або низькочастотним конвертом (ВК або НК). Амплітуда імпульсів у ВП (рис. 3.15 А) та НП (рис. 3.15 Б) була від початку постійною, а у ВК (рис. 3.15 В) і НК (рис. 3.15 Г) – трапецеїдально модульованою. В таких конвертах амплітуда імпульсів спочатку за 0.5 сек лінійно наростала від 0 до 140.625 мкА/мкФ (або більше – у деяких спеціально обумовлених випадках), далі утримувалася на цьому рівні протягом 2 с і лінійно спадала до нуля за 0.5 с. Імпульси слідували з частотою 200 с^{-1} у складі ВП і ВК або 20 с^{-1} – у складі НП і НК, що відповідало МСІ 5 мс або 50 мс. Для процесів, що спостерігалися при всіх вищезазначених варіантах стимуляції, загальним було те, що після деякого перехідного процесу відповіді на ідентичні послідовні стимули ставали однаковими, що можна розглядати як усталені (стаціонарні) вимушені коливання МП і $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (відповідно верхні і нижні записи на А–Г). Ці перехідні процеси можна розглядати як комбінацію

вимушеного коливального і власного затухаючого процесу, що є типовим для (біо)фізичних систем різної природи.

Усталені коливання характеризувалися наступними особливостями. Параметри цих коливань були практично однаковими при стимуляції як пачкою, так і конвертом однакової частоти (пор. ВП і ВК на рис. 3.15 *А* і *В*; НП і НК на рис. 3.15 *Б* і *Г*), але помітно відрізнялися при різній частоті стимулів у пачці або конверті (пор., наприклад, ВП і НП на рис. 3.15 *А* і *Б*, або ВК і НК на рис. 3.15 *В* і *Г*). На це вказують такі параметри коливань МП і $[Ca^{2+}]_i$, як розмах (діапазон) змін, а також середній рівень. МП коливався з розмахом 22.864 мВ (в діапазоні від -51.13 мВ до -28.27 мВ) і середнім значенням -44.47 мВ при стимуляції ВП, а при стимуляції ВК розмах був 22.86 мВ (діапазон від -51.13 до -28.27 мВ) з середнім значенням -44.47 мВ, тобто відмінності в масштабах і середньому рівні складали лише 0.0004% і 0.00045% відповідно. При низькочастотній стимуляції названі параметри мали наступні значення: розмах був дещо більше 24.43 мВ (діапазон від -52.57 мВ до -28.13 мВ), середній рівень був менш деполяризаційним – -48.44 мВ при стимуляції НП. Теж саме було характерно у разі стимуляції НК: розмах становив 24.43 мВ (від -52.57 мВ до -28.13 мВ), середній рівень – -48.44 мВ. Тобто, коливання, викликані низькочастотною стимуляцією у формі НП і НК, не відрізнялися за розмахом і середнім рівнем. Слід зазначити, що процес переходу коливань $[Ca^{2+}]_i$ у сталий режим був значно тривалішим порівняно з процесом встановлення стаціонарних електричних коливань. Усталені високочастотні вимушені коливання $[Ca^{2+}]_i$ відбувалися з розмахом в 0.2013 мкМ (від 0.5915 мкМ до 0.7929 мкМ) з середнім рівнем 0.7143 мкМ при стимуляції ВП, а при стимуляції ВК розмах був 0.2015 мкМ (від 0.5914 мкМ до 0.7929 мкМ) з середнім рівнем 0.7142 мкМ. Тобто, при практично однаковому розмаху середні рівні відрізнялися на 0.004%. Відповідні вимушені коливання низької частоти характеризувалися великим розмахом 1.801 мкМ (від 0.209 мкМ до 2.01 мкМ) і меншим середнім

значенням 0.515 мкМ (НП). Дуже близькими до вказаних були параметри коливань при стимуляції НК – відмінності середнього рівня і розмаху склали 0.00019 і 0.0002% відповідно. Ці результати представляють особливий інтерес, оскільки при стимуляції і пачками, і конвертами інтенсивність імпульсів постійна протягом тривалих інтервалів часу (10–20 с), а інтервали змін амплітуди (наростання і спаду при стимуляції конвертами) коротші (0.5–1.0 с) (див. опис протоколів стимуляції в керівництві користувача «Biofeedback/Stimulation Protocol Definitions List» до апарату «Urostym»).

Перехідні процеси, що ведуть до встановлення стаціонарних вимушених коливань МП і концентрації $[Ca^{2+}]_i$, були примітні наступним. Тривалість перехідного процесу при низькочастотній стимуляції була менше (близько 1.6 с), ніж при високочастотній (близько 5 с), а при однаковій частоті у концентраційних коливань – майже на порядок більше, ніж у електричних. Перехідний процес при стимуляції конвертом був примітний особливістю, яка вказувала на адаптаційне підвищення порогу генерації повноцінного ПД за час поступового наростання амплітуди імпульсів. Так, інтенсивність імпульсу 140.625 мкА/мкФ (незмінної тривалості 0.2 мс), яка була пороговою для генерації повномасштабного ПД, якщо встановлювалася миттєво (як при стимуляції пачкою – рис. 3.15 А), переставала бути такою при стимуляції конвертом, тобто коли досягалася за кінцевий час у фазу наростання. Для того, щоб останній імпульс цієї фази (він же перший імпульс фази сталості амплітуди) став пороговим, тобто викликав ПД амплітудою 61.33 мВ, необхідно було збільшити його інтенсивність до 625 мкА/мкФ (не ілюструється). Це означає, що за час 0.5 с лінійного наростання інтенсивності при стимуляції конвертом імпульсів з частотою слідування 200 с^{-1} (МСІ=5 мс) відбувалося адаптаційне підвищення порога генерації ПД у 4.45 рази. При стимуляції з частотою 20 с^{-1} (МСІ=50 мс) ПД з амплітудою 62.14 мВ викликався при збільшенні інтенсивності стимулу до 200.89 мкА/мкФ, що відповідало підвищенню порога у 1.43 рази.

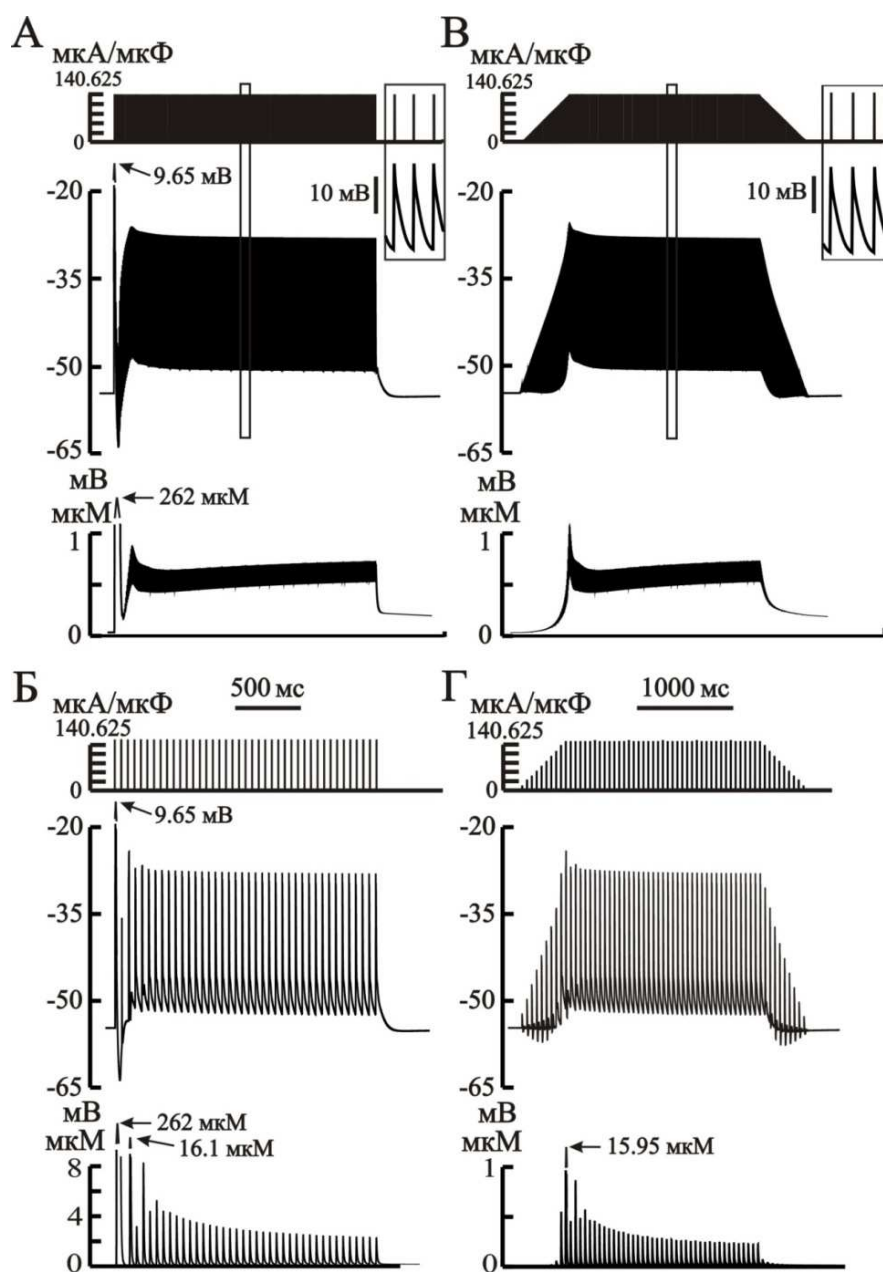


Рисунок 3.15 Типові реакції модельної ГМК на стимуляцію пачкою (А, Б) та конвертом (В, Г) імпульсів деполяризуючого струму. Тривалість імпульсів – 0.2 мс, частота слідування – 200 с^{-1} (А, В) або 20 с^{-1} (Б, Г), амплітуда – 140.625 мкА/мкФ (А, Б), від 0 до 140.625 мкА/мкФ (В, Г). Тривалість пачки – 2 с (А, Б). Тривалість фаз зростання, сталості і зниження амплітуди імпульсів у конверті (В і Г) – 0.5 с, 1.2 с і 0.5 с відповідно. На кожному записі А–Г зверху – імпульси струму, у середині – МП, знизу – $[\text{Ca}^{2+}]_i$. На А, В фрагменти записів зліва, охоплені прямокутниками, представлені на вставках справа у збільшеному масштабі. Калібрування часу 0.5 с загальне для всіх.

3.4.2 Парціальні струми при генерації усталених відповідей на множинну електричну стимуляцію

Щоб отримати уявлення про біофізичні механізми, які визначають генерацію модельною клітиною усталених вимушених коливань МП та $[Ca^{2+}]_i$, виділяли відповідь на один з множини імпульсів, які слідують з тією чи іншою частотою у складі пачок або конвертів, показаних на рис. 3.15, і визначали парціальні іонні струми, які супроводжували таку відповідь (рис. 3.16). Дані, показані на рис. 3.16, характеризують відповіді, зареєстровані через 20 с після початку стимуляції пачкою з високою (А) і низькою (Б) частотою слідування, тобто після завершення всіх перехідних процесів, коли вимушені коливання ставали стаціонарними. Стаціонарні вимушені коливання потенціалу, концентрації і струмів при стимуляції конвертами відповідної частоти практично не відрізнялися від тих, які представлені на рис. 3.15, тому вони не ілюструються, а подальший опис результатів відноситься до обох протоколів стимуляції.

При високочастотній стимуляції ВП або ВК (рис. 3.15 А чи рис. 3.15 В) імпульси йшли з інтервалами ($MSI=5$ мс), меншими, ніж тривалість абсолютної рефрактерності (див. рис. 3.8 Б), яку пов'язують з інактивацією каналів деполяризуючого струму. Викликана в цих умовах електрична відповідь представляла собою швидкий (час наростання 0.2 мс, що дорівнює тривалості стимулу) 22.87-міллівольтний (відносно вихідного рівня -51.13 мВ) сплеск деполяризації з подальшим спадом, спочатку (за першу мс) – більш крутим, потім – більш пологим, майже лінійним (рис. 3.16 А, І). Чим більший був такий деполяризаційний зсув, тим ближче МП був до потенціалу рівноваги кальцієвих і натрієвих струмів (менше їх рушійні потенціали) і, відповідно, тим далі він був від потенціалів рівноваги вихідних струмів, калієвого і струму пасивного витоку (чиї рушійні потенціали при цьому збільшувалися). Траєкторія МП (І) двічі, по висхідній і нисхідній,

перетинала рівень рівноваги (інверсії) Ca^{2+} -залежного хлорного струму ($E_{\text{Cl}} = -32$ мВ). Відповідно знакозмінними були рушійний потенціал і сам цей струм (III). Згаданий струм зменшувався за абсолютною величиною до нуля. Далі, змінивши знак на протилежний, збільшувався, досягав максимуму в момент закінчення стимулюючого імпульсу, після чого зазнавав зворотніх змін з меншою швидкістю. Таким чином, даний струм, будучи переважно деполяризаційним, на короткий час (з 0.2 по 0.4 мс після початку стимулу) ставав гіперполяризаційним. Серед вхідних струмів домінував натрієвий (IV), який майже вчетверо переверщував другий за величиною Ca^{2+} -струм Т-типу (III, I_{CaT}), а Ca^{2+} -струм L-типу був дуже малий. Для всіх вхідних струмів характерною була двофазна зміна щодо відповідного початкового рівня (на момент початку стимулюючого імпульсу). Перша фаза зменшення абсолютної величини струму починалася разом з імпульсом-стимулом і не перевершувала його за тривалістю: мінімуми натрієвого, кальцієвого Т- та L-типу струмів досягалися через 0.025, 0.125 та 0.15 мс відповідно (рис. 3.15, III і IV). Слідом за цим наставала фаза зростання абсолютних величин струмів, яка тривала і після завершення імпульсу: максимумами вищеназваних струмів досягалися, відповідно, через 0.55, 1.0 і 1.35 мс після надходження 0.2-мілісекундного імпульсу, що також відповідало різній кінетиці потенціалзалежної активації каналів: найбільш швидкої – у натрієвих, повільніше – у кальцієвих Т-типу і самої повільної – у кальцієвих L-типу. Далі, до надходження чергового імпульсу, струми спадали до вихідного рівня. Водночас, вихідний струм пасивного витоку через постійну мембранну провідність (V) практично повторював траєкторію МП (I), що закономірно в умовах сталості його рівноважного потенціалу. Приблизно на 20% менший струм через потенціалзалежні K^{+} -канали (V) змінювався аналогічно, відрізняючись деяким уповільненням спаду. Наступними за величиною були струми через K^{+} -канали типу SK і Kir2.1, пікова амплітуда яких припадала на

момент закінчення стимулу (V), при цьому струм через K^+ -канали типу ВК був дуже малий.

З точки зору важливої функціональної ролі не тільки в електрогенезі, але й у скоротливості ГМК, особливий інтерес представляв кальцієвий транз'єнт (рис. 3.16 А, II). Концентрація $[Ca^{2+}]_i$ після короткочасного падіння, що спостерігалось в фазі початкового зменшення вхідних кальцієвих струмів (на тлі триваючої екструзії кальцію насосами і т.п.), наростала, досягала максимуму 0.793 мкМ на 1.2 мс після початку стимулу і за час, що залишився до приходу чергового стимулюючого імпульсу, спадала до вихідного рівня 0.628 мкМ, який істотно перевищував базальний (34.28 нМ) перед початком стимуляції. Слід зазначити, що максимум $[Ca^{2+}]_i$ досягався дещо пізніше максимумів кальцієвих струмів (пор. I с II), тобто спад концентрації починався, коли названі струми вже зменшилися настільки, що імовірно пов'язаний з ними приплив кальцію в цитозоль ставав менше екструзійного відтоку.

При низькочастотній стимуляції як НП (рис. 3.15 Б), так і НК (рис. 3.15 Г) з $MSI=50$ мс, що відповідають ранній фазі періоду відносної рефрактерності (див. рис. 3.8 Б, В), відгуки, що встановилися (рис. 3.16 Б), суттєво відрізнялися від описаних вище (рис. 3.16 А). Загальною рисою було лише майже лінійне наростання деполяризації мембрани до -28.13 мВ (тобто на 24.43 мВ від більш низького вихідного рівня -52.57 мВ) в межах тривалості прикладеного стимулюючого імпульсу та її подальший спад (рис. 3.16 Б, I). Однак, цей спад був неглибоким і коротким, після чого мембранна деполяризація відновлювала зростання, досягала піку -30.28 мВ на 1.4 мс, а після закінчення стимулу знову спадала. При цьому на низхідній фазі деполяризації спостерігалось короткочасне плато, яке по суті було другим, слабо вираженим піком (-47.06 мВ на 8.9 мс після закінчення стимулу). Вихідний струм пасивного витоку (рис. 3.16 Б, V), як і при високочастотній стимуляції, повторював траєкторію МП.

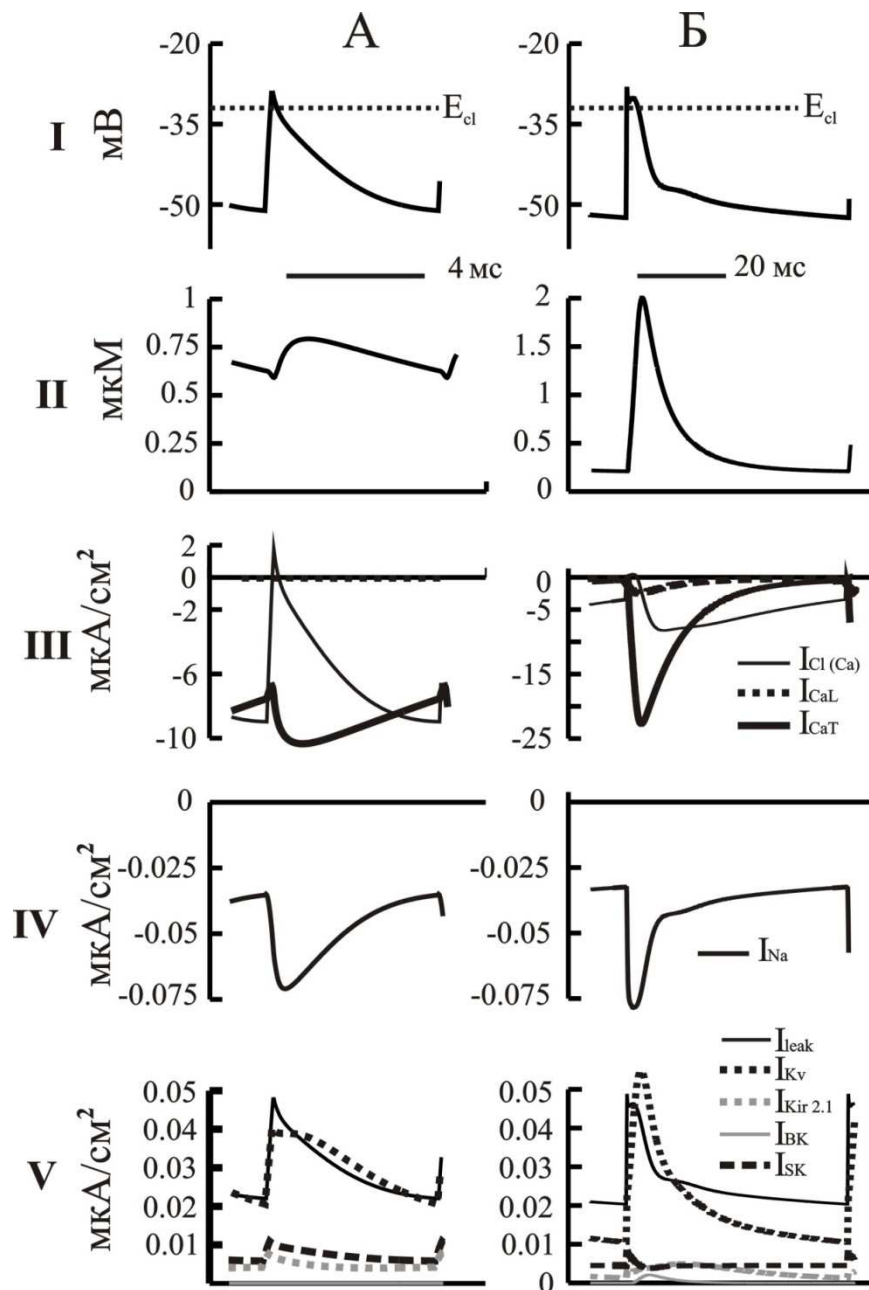


Рисунок 3.16 *Сполучені електричні та концентраційні процеси у модельній ГМК при генерації відповіді, викликаній імпульсом деполяризуючого струму, що подається у складі пачки/конверта (А, Б) з частотою слідування 200 с^{-1} (А) та 20 с^{-1} (Б) у режимі сталих вимушених коливань. У рядках представлені зміни у часі трансмембранного потенціалу, мВ (I), внутрішньоклітинної концентрації кальцію, мкМ (II), а також щільності парціальних струмів: входних – I_{Na} , $\text{мА}/\text{см}^2$ (III), $I_{Cl(Ca)}$, I_{CaT} , I_{CaL} , $\text{мА}/\text{см}^2$ (IV) і вихідних: – I_K , $I_{Kir\ 2.1}$, I_{BK} , I_{SK} , I_{Leak} , $\text{мА}/\text{см}^2$ (V). Струм $I_{Cl(Ca)}$ – знакозмінний. Калібрування часу 4 мс (А) і 20 мс (Б).*

Інший вихідний струм – через потенціал-залежні K^+ -канали (I_K , тамо ж) – демонстрував повільну активацію, збільшуючись до максимуму на 3.2 мс, що було практично одночасно з максимумом $[Ca^{2+}]_i$ (пор. II). Наступними за величиною були струми через K^+ -канали типу SK і Kir2.1: пікова амплітуда останнього припадала на момент закінчення стимулу (V), тоді як струм через Ca^{2+} -залежні K^+ -канали типу SK досягав максимуму через 12.6 мс після закінчення стимулу. Струм через K^+ -канали типу BK був істотно більшим, ніж при високочастотній стимуляції, і досягав піку через 5 мс після закінчення стимулу. Вхідні струми (у тому числі Ca^{2+} -залежний хлорний струм, який практично не змінював напрямок при низькочастотній стимуляції) після закінчення імпульсу-стимулу демонстрували виражену активацію з властивою кожному з них швидкістю (рис. 3.16 Б, III). Так, найбільш високоамплітудний натрієвий струм досягав піку (максимуму абсолютної величини) на 1.6 мс, кальцієві струми T- і L-типу (набагато більший, ніж при високочастотній стимуляції) – на 2.9 мс та 3.4 мс відповідно, а Ca^{2+} -залежний хлорний струм – на 8.5 мс після закінчення стимулу. Слід зазначити, що, відповідно до повільної активації каналів (максимум на 8.5 мс), Ca^{2+} -залежний хлорний струм був найбільшим на інтервалах часу, які відповідали плато (другого піку) мембранної деполяризації (рис. 3.16 Б, I), коли деполяризаційні кальцієві струми спадали до 52.6–57.29% (II), а натрієвий – до 55.03% (IV) від своїх пікових значень. Ця обставина вказує на важливу роль саме Ca^{2+} -залежного хлорного струму у формуванні сталих відповідей на низькочастотну стимуляцію.

3.4.3 Реакція ГМК на періодичні парасимпатичні стимули

Імітуючи парасимпатичне збудження клітин ДСМ при черзтканинній стимуляції пачками імпульсів, на Р2Х- та ІРЗ-канали ГМК подавали серії імпульсних впливів з тими ж параметрами ($\tau_{\text{SP2X}}=\tau_{\text{SPIR}}=0.8$ мс, $\Delta\tau=70$ мс), при котрих поодинокий стимул викликав повномасштабний ПД (див. рис. 3.11). Така стимуляція подібна до тієї, що раніше спостерігалась при прямій дії на клітину серії імпульсів деполяризуючого струму (пункт 3.4.2), призводила після деякого перехідного процесу до встановлення стаціонарних вимушених коливань МП і $[\text{Ca}^{2+}]_i$, діапазон значень (розмах) і середній рівень котрих залежали від МСІ (Рис. 3.18).

Основні риси такої залежності можна побачити на прикладах відповідей на стимули, котрі, слідуючи з $\Delta T=5, 50$ або 450 мс, тобто з частотами $f=200, 20$ або 2.22 c^{-1} (рис. 3.17 і 3.18, А, Б або В відповідно), активували Р2Х-канали і, з затримкою $\Delta\tau=70$ мс – ІРЗ-канали. Зазначимо, що у перших двох випадках базова затримка $\Delta\tau$ перевершувала ΔT і була кратною $\Delta\tau/\Delta T=70/5=14$ ($\varepsilon=0$) або не кратною $\Delta\tau/\Delta T=70/50=1.4$ ($\varepsilon=0.4$), що обумовлювало зменшення фактичної затримки $\delta=\theta_i-\tau_{i+k}=\varepsilon\cdot\Delta T$ до 0 (одночасна активація Р2Х- і ІРЗ-каналів) або 20 мс відповідно (пояснення див. у додатку А). При $\Delta T=5$ мс, який відповідає інтервалу абсолютної рефрактерності, МП коливався у допороговому діапазоні від -46.5 до -45.6 мВ (розмах $\Delta E=0.9$ мВ) із середнім рівнем $\bar{E}=-46.0$ мВ (рис. 3.18 А). Розмах коливань ставав більше, а середній рівень – нижче при збільшенні МСІ. Так, при $\Delta T=50$ мс (що відповідає ранній фазі відносної рефрактерності) розмах був $\Delta E=6.4$ мВ ($-50.8\dots-44.4$ мВ), а середній рівень $\bar{E}=-47.7$ мВ. Примітним було те, що, починаючи з $\Delta T=420$ мс (пізня фаза відновлення регенеративної відповіді після одиночної стимуляції), у моменти активації ІРЗ-каналів замість рівновеликих спостерігались високо- і низько-амплітудні поливання, які

чергувались. Режим рівновеликих коливань повертався при $\Delta T > 590$ мс. Розмах (діапазон) і середній рівень коливань, що чергувались і які спостерігались при $\Delta T = 450$ мс, були, відповідно, $\Delta E = 39.6$ мВ (від -60.7 до -21.1 мВ), $\bar{E} = -54.52$ мВ у високоамплітудних і $\Delta E = 24.5$ мВ (-55.6...-31.1 мВ), $\bar{E} = -53.98$ мВ – у низько амплітудних коливань (рис. 3.17 Б і В відповідно). Рівновеликі стаціонарні коливання при $MSI = 450$ мс можна було спостерігати при зменшеній базовій затримці $\Delta \tau = 15$ мс і збільшеному часу активації P2X-каналів $\tau_{SP2X} = 3.2$ мс; їх параметри: $\Delta E = 21.0$ мВ (-55.4...-34.4 мВ), $\bar{E} = -53.5$ мВ (рис. 3.17 Г). Зареєстровані одночасно з МП при $\Delta T = 5, 50$ або 450 мс коливання $[Ca^{2+}]_i$ характеризувались наступним розмахом (діапазоном від–до) і середнім рівнем, відповідно: $\Delta[Ca^{2+}]_i = 0.76$ мкМ (0.25...1.01 мкМ) і $\bar{[Ca^{2+}]}_i = 0.52$ мкМ; $\Delta[Ca^{2+}]_i = 4.97$ мкМ (0.23...5.2 мкМ) і $\bar{[Ca^{2+}]}_i = 0.49$ мкМ; або $\Delta[Ca^{2+}]_i = 92.43$ мкМ (0.17...92.6 мкМ) і $\bar{[Ca^{2+}]}_i = 2.97$ мкМ у випадку відповідей більшої амплітуди і $\Delta[Ca^{2+}]_i = 4.53$ мкМ (0.17...4.7 мкМ) і $\bar{[Ca^{2+}]}_i = 0.4$ мкМ у випадку відповідей меншої амплітуди (рис. 3.15 А–В знизу відповідно). Ці ж параметри при такому ж $\Delta T = 450$ мс, але при $\Delta \tau = 15$ мс, $\tau_{SP2X} = 3.5$ мс мали значення $\Delta[Ca^{2+}]_i = 8.65$ мкМ (0.16...8.80 мкМ) і $\bar{[Ca^{2+}]}_i = 0.36$ мкМ (рис. 3.15 Г знизу). Встановлення стаціонарних коливань $[Ca^{2+}]_i$ відбувалося помітно довше, чим у коливань МП.

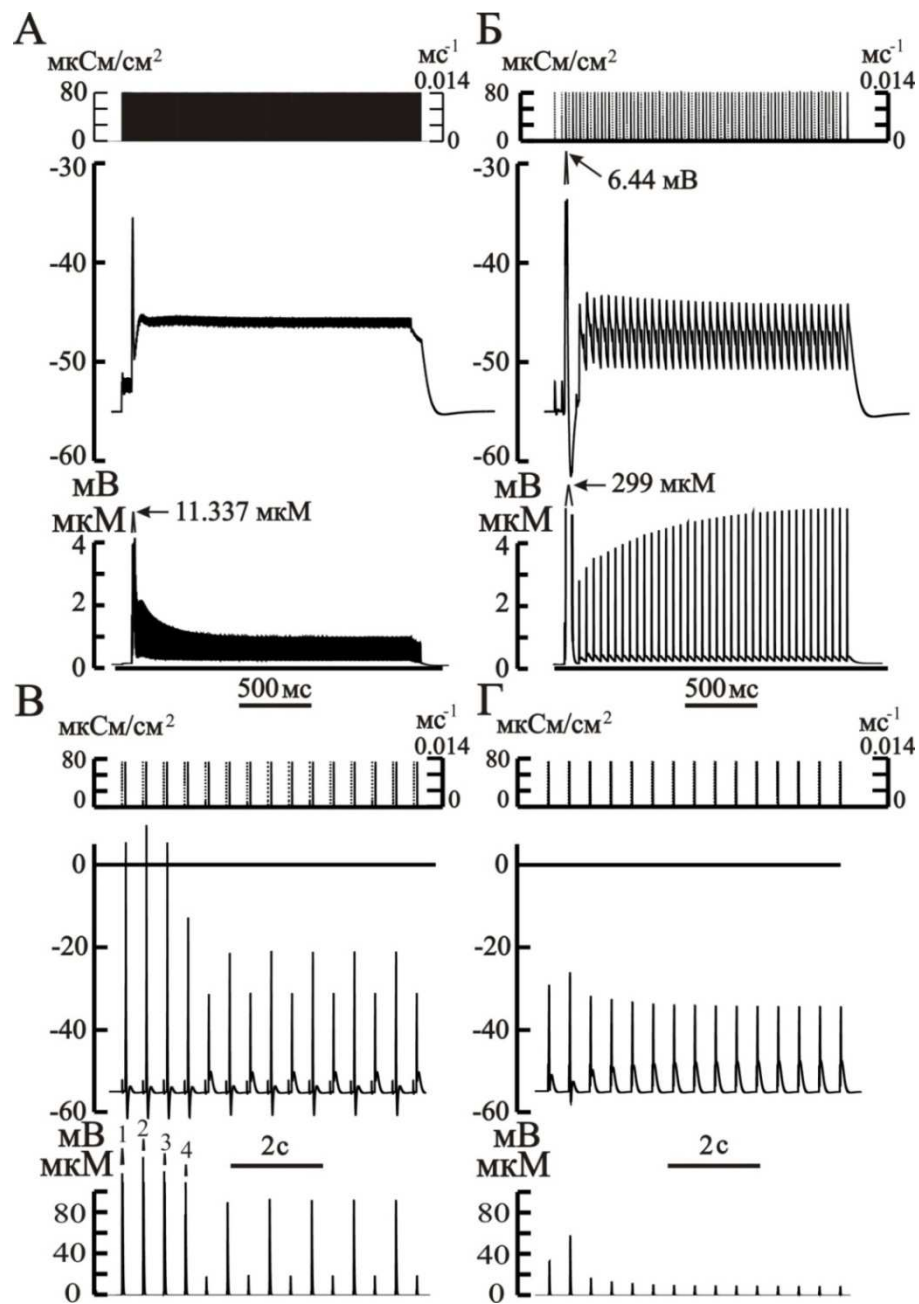


Рисунок 3.17 Типові реакції модельної ГМК на серії парасимпатичних стимулів. Час досягнення піку g_{P2X} і P_{IP3} $\tau_{sP2X} = \tau_{sIP3R} = 0.8$ мс (А–В) або $\tau_{sP2X} = 3.5$ мс і $\tau_{sIP3R} = 0.8$ мс (Г); затримка активації g_{P2X} відносно P_{IP3} $\Delta\tau = 70$ мс; частота слідування стимулів – 200 с^{-1} (А), 20 с^{-1} (Б), 2.22 с^{-1} (В, Г); затримка активації g_{P2X} відносно P_{IP3} $\Delta\tau = 70$ мс (А, Б, В) або $\Delta\tau = 15$ мс (Г). А–Г, зверху вниз – зміни провідності, МП, $[Ca^{2+}]_i$. На В пікам 1–4 відповідають $[Ca^{2+}]_i = 295, 303, 283$ і 152 мкМ. Калібрування часу 0.5 с (А, Б) і 2 с (В, Г).

3.4.5 Парціальні струми при генерації усталених відповідей на множинну парасимпатичну стимуляцію

Уявлення про біофізичні механізми, що породжуються періодичними парасимпатичними стимулами вимушених коливань МП і $[Ca^{2+}]_i$ можна отримати, аналізуючи сполучені з ними парціальні струми. Відповіді, що спостерігались впродовж одного такого періоду при різних МСІ, показані на рис. 3.18.

При $\Delta T=5$ мс деполяризаційна відповідь амплітудою ~ 0.85 мВ (відносно базового рівня -46.5 мВ) з більш коротким зростанням, ніж спад (рис. 3.18 А, I), супроводжувалась домінуючим струмом через P2X-рецепторні канали. Струми через Ca^{2+} -канали Т- і L-типу були мінімальними внаслідок інактивації (рис. 3.18 А, III), відповідно, давали малий внесок у незначне підвищення концентрації $[Ca^{2+}]_i$ до ~ 1.01 мкМ від вихідних ~ 0.252 мкМ на початку чергового стимулу (рис. 3.18 А II). Серед вихідних струмів (IV) переважав струм пасивного витоку. Менший внесок робили струми через потенціалзалежні K^+ -канали, K^+ -канали типу Kir2.1 та Ca^{2+} -залежні K^+ -канали типу SK, а струм через Ca^{2+} -залежні K^+ -канали типу BK був дуже малим. При $\Delta T=50$ мс пуриновий і мускариновий компоненти деполяризаційної відповіді розділялись (рис. 3.18 Б, I). Основний, мускариновий, компонент мав амплітуду 6.4 мВ (відносно базового рівня у -50.8 мВ) і двофазний пологий спад, на фоні котрого виникав низькоамплітудний пуриновий компонент, обумовлений струмом через P2X-канали (рис. 3.18 Б, III). Піку мускаринового компонента передував швидкий транзієнт $[Ca^{2+}]_i$ амплітудою 5.19 мкМ (II), обумовлений потоком Ca^{2+} із депо і підтриманий Т-струмом (III). Більші, у порівнянні з високочастотною стимуляцією, пікові значення $[Ca^{2+}]_i$ обумовлені тим, що при $\Delta T=50$ мс у депо встановлюється більша концентрація Ca^{2+} (~ 1.6 мМ замість ~ 530 мкМ) і, відповідно, збільшується вихід у відповідь на стимул.

При $\Delta T=450$ мс пікові значення МП і $[Ca^{2+}]_i$ збільшувались, пуринові компоненти були рівновеликими, а затримані на 70 мс мускаринові компоненти від стимулу до стимулу були по чергово високо- і низькоамплітудними (34.2 і 24.1 мВ відносно базових -52.2 мВ, рис. 3.18 В відповідно). Високоамплітудна відповідь супроводжувалась вираженими слідовими гіпер- і деполяризацією, а низькоамплітудний – тільки слідовою деполяризацією (рис. 3.18), причому перший з них на піку перевищував рівноважний потенціал Ca^{2+} -залежного хлорного струму (рис. 3.16 В, I і III), в результаті чого він був знакозмінним. У перші 7.3 мс з моменту активації IP3-каналів цей струм деполяризував мембрану, а після інверсії протягом наступних 6.2 мс – гіперполяризував. Високоамплітудна відповідь супроводжувалась значно більшими, порівняно з високочастотною стимуляцією, кальцієвими струмами (III), які забезпечували підвищення пікової $[Ca^{2+}]_i$ до 92.6 мкМ. Ці зміни, які характеризували низькоамплітудну відповідь, були менш вираженими (рис. 3.18 В II справа та зліва відповідно). Примітною особливістю вихідних струмів було домінування значно збільшеного струму через потенціалзалежні K^+ -канали; наступним за величиною був Ca^{2+} -залежний струм через K^+ -канали типу ВК (у випадку високоамплітудних коливань) або струм пасивного витоку (у випадку низькоамплітудних коливань).

Таким чином, режим чергування рівновеликих відповідей на однакові стимули, що спостерігався при $\Delta T=450$ мс, можна пояснити наступним чином. Низькочастотна стимуляція призводить до настільки значного підвищення деполяризації, кальцієвих струмів і транзйенту $[Ca^{2+}]_i$, що слідом за високоамплітудною відповіддю розвивається глибока і тривала Ca^{2+} -залежна інактивація Ca^{2+} -каналів, що зумовлює зменшення кальцієвого компонента вхідного струму і, відповідно, деполяризаційного відгуку на наступний стимул. У свою чергу, низькоамплітудна відповідь породжує менший транзйент, що сприяє деінактивації Ca^{2+} -каналів та відновленню, до

приходу наступного стимулу, здатності генерувати високоамплітудну відповідь.

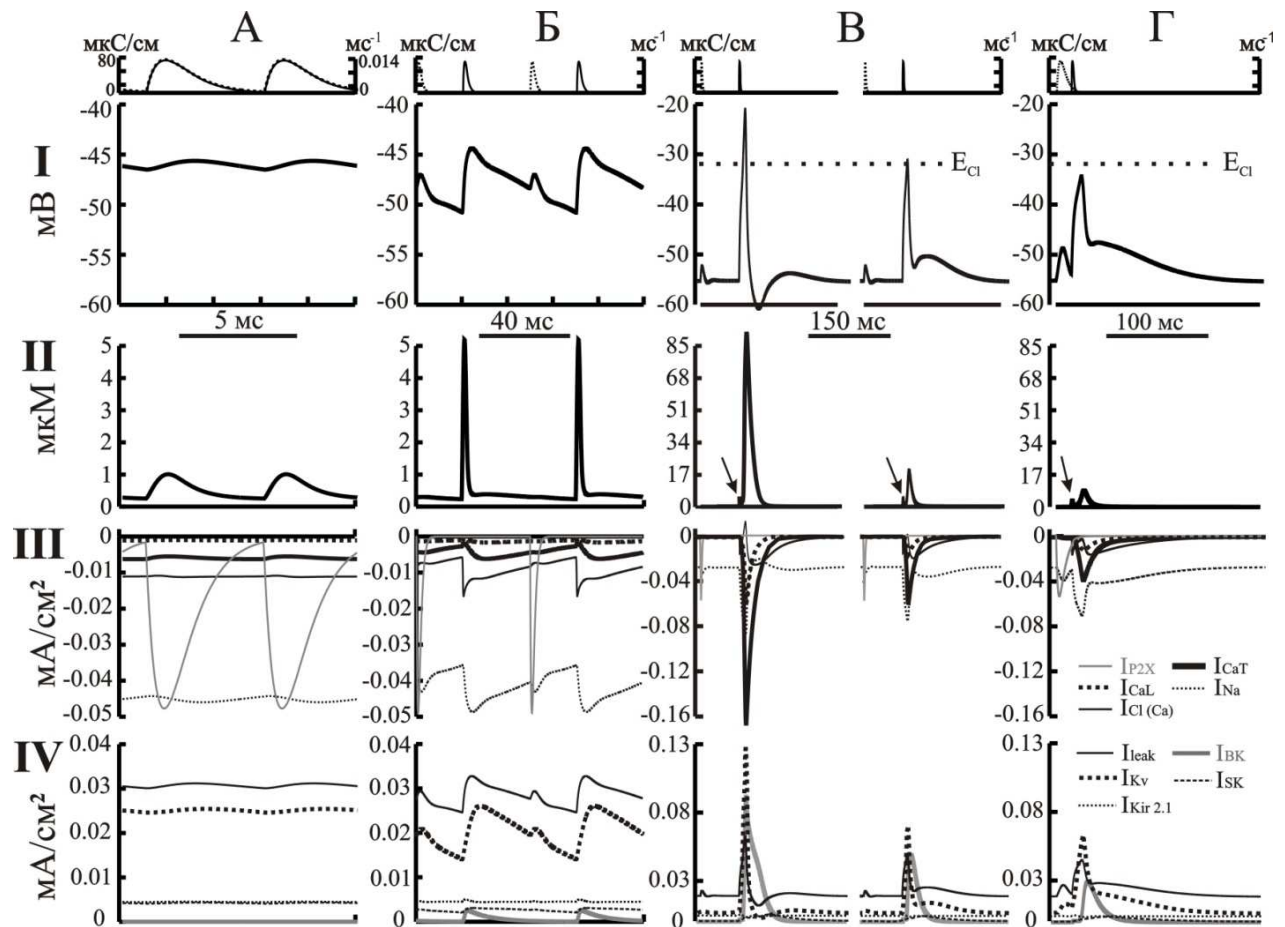


Рисунок 3.18 Сполучені електричні та концентраційні процеси в модельній ГМК при генерації стаціонарних вимушених коливань, викликаних серіями парасимпатичних стимулів різної частоти. А, Б і В) Відповіді при $\Delta T=15, 75$ та 450 мс (час досягнення піку g_{P2X} і P_{IP3} $\tau_{sP2X}=\tau_{sIP3}=0.8$ мс) затримка активації g_{P2X} відносно P_{IP3} $\Delta\tau=70$ мс. Г) теж саме, що на В, але при $\tau_{sP2X}=3.5$ мс і $\Delta\tau=15$ мс. Ряд I зверху – провідність $P2X$ -каналів g_{P2X} (мкСм/см²) і проникності $IP3$ -каналів P_{IP3} (мс⁻¹) (штрихова і суцільна лінії відповідно), знизу – МП. Ряд II – $[Ca^{2+}]_i$. Ряди III і VI – щільності парціальних струмів (мА/см²), входних (I_{Na} , $I_{Cl(Ca)}$, I_{CaT} , I_{CaL} , I_{P2X}) та вихідних (I_{Leak} , I_{BK} , I_{SK} , $I_{Kir\ 2.1}$, I_{Kv}) відповідно. Калібрування часу 5 мс (А), 40 мс (Б), 150 мс (В), 100 мс (Г). На В – низькоамплітудна (ліворуч) і високоамплітудна (праворуч) відповіді, які чергуються. На В і Г (ряд II) стрілками вказано підвищення $[Ca^{2+}]_i$ за рахунок його вивільнення з депо.

При збільшенні τ_{sP2X} до 3.5 мс, зменшенні $\Delta\tau$ до 15 мс і тих самих МСІ 450 мс кожне усталене коливання мало вигляд рівновеликої відповіді з ранньою пуриноюю і пізньою мускариноюю деполяризаційними компонентами амплітудою 6.4 і 20.0 мВ відповідно (відносно базового значення -52.2 мВ, рис. 3.18 Г). Під час розвитку пуринового компоненту Ca^{2+} -струми були незначними, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ не змінювалась. Серед вихідних струмів (рис. 3.18 Г IV) переважав струм через потенціалзалежні K^+ -канали. Наступними за значністю були струм пасивного витоку, струм через Ca^{2+} -залежні K^+ -канали типу ВК. Набагато меншими були струм через K^+ -канали типу Kir2.1 та Ca^{2+} -залежні K^+ -канали типу SK. Мускариновий компонент характеризувався значним Ca^{2+} -залежним хлорним струмом, що породжував деполяризацію, яка активувала натрієвий струм і, у меншому ступені, кальцієві струми, що обумовлювало набагато менший транзієнт $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (пік 8.8 мкМ) (рис. 3.17 Г II).

В умовах повної блокади P2X-провідності ГМК могла генерувати ПД при невеликому деполяризаційному зміщенні потенціалу рівноваги Ca^{2+} -залежного хлорного струму (від -32 до -30.7 мВ) та додаванні повторних холінергічних стимулів, що слідували з інтервалами до 750 мс. У цьому випадку перший відгук у серії був локальним, а за ним слідували ПД амплітудою 45.6–43.1 мВ, в процесі генерації яких спостерігалось домінування кальцієвого струму Т-типу.

3.4.6 Основні клітинні ефекти та біофізичні основи для аналізу і вибору протоколів реабілітаційної електростимуляції

Електрична стимуляція органів і тканин, мішенню якої є електрозбудливі нервові і м'язові клітини, давно і широко застосовується в медицині. Зокрема, при хірургічних втручаннях електростимуляція, завдяки виявленню в тканині, що оперується, тих ділянок, де залягають нервові волокна, дозволяє запобігти денервації органів і пов'язаних з цим важких функціональних наслідків. Такого роду превентивна зондуєча інтраопераційна електростимуляція нервів поширена в орґано- і нервовозбережній (*nerve-sparing*) простаектомії [185], хірургії раку прямої кишки [186–189] і матки [190], а в останні роки успішно застосовується також при хірургічній корекції таких вроджених аноректальних і урологічних вад у дітей, як АПК і ЕСМТЕ [54–55].

Поширеність електростимуляції при хірургічних втручаннях та післяопераційній реабілітації ставлять на порядок денний питання про біофізично і фізіологічно обґрунтований вибір адекватних протоколів і параметрів цього виду впливів. Для цього необхідні ясні уявлення про викликані електричними стимулами біофізичні і фізіологічні процеси у клітинах-мішенях, зокрема в ГМК ДСМ. Представлені результати роблять спробу внести вклад у побудову цих уявлень за допомогою комп'ютерного моделювання реакцій ГМК на електростимуляцію, яка здійснювалась відповідно до протоколів, що застосовуються при реабілітації дітей, прооперованих з приводу АПК і ЕСМТЕ [56]. Результати наших модельних досліджень (рис. 3.15–3.16) показали наступні найбільш істотні риси відповідей ГМК на характерну для реабілітаційних протоколів стимуляцію множинними імпульсами струму, організованими в пачки або конверти.

1. Встановлення через більший або менший проміжок часу після початку стимуляції стаціонарних вимушених коливань МП та $[Ca^{2+}]_i$, частота яких

була рівною частоті проходження імпульсів. Ці коливання були однаковими при стимуляції як пачками, так і конвертами рівної частоти, хоча в пачках сталість амплітуди стимулів була спочатку, а в конвертах – досягалась поступово за певний кінцевий час.

2. Характерна залежність параметрів усталених відповідей від частоти слідування імпульсів у пачці або конверті: чим більша частота (коротший MCI), тим менший розмах коливань і більше деполяризаційне зміщення середнього рівня МП відносно потенціалу спокою $E_r = -54.7$ мВ (біля 6.26 мВ і 10.23 мВ при частотах 20 c^{-1} і 200 c^{-1}).

3. Відмінності у тривалості перехідних процесів: встановлення стаціонарних електричних коливань на порядок більш швидке, ніж концентраційних; більш швидкий перехід в усталений режим і тих, і інших процесів при меншій частоті стимуляції.

4. Адаптаційне підвищення порогу збудження ГМК на початковому етапі стимуляції конвертом: зростання амплітуди стимулів до сталого рівня, що, однак, у довготривалому плані не позначалося на параметрах усталених коливань.

Як зазначалося вище, електростимуляція ДСМ є важливою складовою процедур реабілітації у дітей, прооперованих з приводу природжених пророків (АПК та ЕСМТЕ), які часто супроводжуються дефіцитом М2/М3 холінорецепторів [56]. Протоколи і параметри такої електростимуляції встановлюються (більш або менш жорстко) на апаратно-програмних комплексах, які використовуються для цих цілей, зокрема й такому, як Urostym (Laborie Medical Technologies, Inc.), який широко використовується в медичній практиці, в тому числі нашій [56]. При цьому в документації не розкриваються медико-біологічні обґрунтування тієї чи іншої установки. Ми спробували знайти підхід до обґрунтування вибору параметрів реабілітаційної електростимуляції з використанням модельних розрахунків

електричних і концентраційних процесів, викликаних стимулами в клітинах-мішенях. У нашому прикладі розглянуті процеси в ГМК ДСМ з урахуванням особливостей, властивих пацієнтам з вищезазначеною патологією, при стимуляції, наближеної до реабілітаційних протоколів, які застосовуються для цього контингенту. Саме така особливість, як дефіцит M2/M3 холінорецепторів, зумовила зосередження уваги на ефектах прямого впливу електричних імпульсів на клітини. Вважали навіть, якщо стимули збуджують парасимпатичні нервові волокна, то при такій молекулярній патології метаботропний холінергічний шлях ГМК ослаблений або не діє. Разом з тим, оскільки дефіцит пуринергічних рецепторів при даній патології не описаний, не можна виключити іонотропну дію АТФ, що виділяється збудженими парасимпатичними закінченнями на P2X-рецепторні канали ГМК, а, отже, і внесок струмів через ці канали в деполяризацію і збудливість.

Аналіз процесів, що розвивають в ГМК ДСМ при електростимуляції типовими для згаданих реабілітаційних процедур пачками і конвертами деполяризуючих імпульсів з різними частотами слідування (рис. 3.15 і 3.16), показав наступне.

1. Оскільки при стимуляції як пачками, так і конвертами, однакових імпульсів з однаковими частотами проходження, відповіді ГМК стають однаковими (сталими) по закінченні перехідного процесу, тривалість якого набагато коротша (сотні мілісекунд) порівняно з загальною тривалістю стимуляції (хвилини або десятки хвилин), оскільки відпадає проблема альтернативного вибору між двома названими протоколами. На нашу думку, стимуляція пачками краща, оскільки не вимагає завдання параметрів, додатково необхідних при стимуляції конвертами (часи наростання і спаду амплітуди імпульсів).

2. Відносно високі рівні $[Ca^{2+}]_i$ в сталому режимі, які спостерігалися при високочастотній стимуляції (рис. 3.15 А, В та рис. 3.16 А), ставлять на порядок денний питання про можливість побічних цитотоксичних ефектів,

якщо надмірно висока концентрація підтримується надмірно довго. Тому виникає питання про граничні частоти електростимуляції. Для вирішення цього питання необхідно більш точне, ніж існує на сьогодні, знання величин, від яких залежать кількості і швидкості надходження кальцію в цитозоль (вхід із зовнішнього середовища через потенціалзалежні кальцієві канали мембрани, звільнення з депо, дебуферизація) і його екструзії (викачка насосами, депонування, буферизація). Практична потреба в такому знанні може вказувати напрямки перспективних і затребуваних експериментальних досліджень. В нашій моделі при заданих параметрах вказаних механізмів $[Ca^{2+}]_i$ може повертатися до низького, практично базального, рівню (<100 нМ) при частотах проходження імпульсів <3.57 с⁻¹ (МСІ >280 мс). Ця оцінка може бути уточнена при з'ясуванні параметрів, які характеризують властивості механізмів екструзії кальцію (кальцієвих насосів і обмінників сарколеми і депо, внутрішньоклітинних буферів і т. п.).

3. Зниження порогу генерації ПД при прямій дії електричного імпульсу в умовах підвищеної провідності P2X-рецепторних каналів (неілюстровані дані, див. також рис. 3.7) вхідного струму привертає увагу до можливості функціонально рівнозначної реабілітаційної стимуляції при зниженій (а значить, ймовірно, і менш дискомфортній) інтенсивності електричних імпульсів на тлі премедикації пуриноміметиками. Відповідні біофізичні передумови є предметом нашого подальшого дослідження реакцій ГМК на парасимпатичне збудження, включаючи його комбінацію з прямим електричним збудженням.

3.4.6 Реакції ГМК ДСМ на комбіновану електричну і парасимпатичну багатоімпульсну стимуляцію

У якості електричного стимулу використовували серію П-подібних імпульсів струму тривалістю 0.2 мс і амплітудою 3.15 нА, яка була пороговою для генерації повномасштабного ПД. Одиночний парасимпатичний стимул представляє послідовну, з інтервалом $\Delta\tau=70$ мс, активацію провідності P2X-каналів сарколеми $g_{P2X}(t)=76.6$ мкС/см² і проникності IP3-каналів СР $P_{IP3}(t)=14$ с⁻¹ (кожна величина досягала максимуму за $\tau_{SP2X}=\tau_{SIP3}=0.8$ мс). Реакцію на комбіновану стимуляцію характеризували розмахом (діапазоном) змін і середнім рівнем коливань МП і $[Ca^{2+}]_i$ при різних значеннях МСІ, затримки Δt . Тобто, після надходження електричного імпульсу з деякою затримкою (в нашому випадку 30 мс) активується пуринергічний компонент g_{P2X} ; потім, після ще більшої затримки (в нашому випадку 100 мс) по відношенню до початку електричного стимулу, активується повільний мускариновий компонент P_{IP3} .

При високочастотній стимуляції МСІ=5 мс ($f=200$ с⁻¹) у відповідь на перший стимул виникає ПД, і після перехідного процесу система переходить у режим генерування вимушених коливань. МП коливався з розмахом 21 мВ (у діапазоні від -49 мВ до -28 мВ) і середнім значенням -45.7 мВ. При зменшенні частоти стимуляції до 20 с⁻¹ (МСІ=50 мс) названі параметри мали наступні значення: розмах був дещо більше 23.5 мВ (діапазон від -51.5 мВ до -28 мВ), середній рівень був менш деполяризаційним – -49 мВ. В цьому випадку реакція P2X рецепторів на стимул у сталому режимі виникала після М-відповіді. Також примітним було те, що модельна ГМК генерувала ПД у відповідь на перший електричний стимул і ПД меншої амплітуди (різниця близько 29.3%) у відповідь на активацію м-холінорецепторів і вивільнення Ca^{2+} з депо, чого не спостерігалось ні при стимуляції тільки імпульсами струму, ні при стимуляції одних тільки парасимпатичних волокон,

див. рис 3.17. Далі перехідний процес поступово закінчувався і система переходила в режим генерування вимушених коливань. Подальше зменшення частоти до 2.22 с^{-1} (MCI=450 мс) призводить до того, що модельна ГМК генерує серію ПД у відповідь на стимуляцію імпульсами струму. При цьому в сталому режимі активація P2X рецепторів припадає на область слідової гіперполяризації і не призводить до якихось помітних змін. А результат активації м-холінорецепторів з'являється через 102.1 мс після піку ПД, тобто приходить на область відносної рефрактерності, викликаючи тим самим лише невеликий деполяризаційний сплеск амплітудою 5.5 мВ. За даних умов МП коливався з великим розмахом у 78 мВ (в діапазоні від -61.5 мВ до 16.5 мВ) і середнім значенням -53.6 мВ. У разі, якщо при тій же частоті 2.22 сек^{-1} зменшити $\Delta\tau$, що призводить до зниження затримки між активацією P2X рецепторів і м-холінорецепторів до 15 мс (затримка між приходом імпульсу струму і активацією P2X рецепторів не змінювалася і дорівнювала 30 мс), і при цьому збільшити тривалість активності P2X рецепторів до 35 мс, то амплітуда ПД у відповідь на стимули дещо збільшувалась, при цьому розмах коливань МП склав 78.3 мВ (в діапазоні від -61.1 мВ до 17.2 мВ) з середнім значенням -54.4 мВ. Аналогічні параметри, що характеризують коливання $[\text{Ca}^{2+}]_i$, були наступними: при частоті 200 с^{-1} (MCI=5 мс) розмах становив 4.87 мкМ (у діапазоні від 1.03 мкМ до 5.9 мкМ) і середнім значенням 3.08 мкМ; при частоті 20 с^{-1} (MCI=50 мс) розмах був більшим і становив 20.94 мкМ (у діапазоні від 0.26 мкМ до 21.2 мкМ) і меншим середнім значенням 2.12 мкМ; при частоті 2.22 сек^{-1} (MCI=450 мс) розмах був більшим і становив 293.5 мкМ (в діапазоні від 0.2 мкМ до 293.7 мкМ) і великим середнім значенням 7.74 мкМ; при тій же частоті (2.22 с^{-1}) і зменшення затримки між активацією P2X рецепторів і м-холінорецепторів до 15 мс та збільшенні тривалості активності P2X рецепторів до 35 мс, розмах був більшим і

становив 301.8 мкМ (в діапазоні від 0.2 мкМ до 302 мкМ) і великим середнім значенням 8 мкМ.

В цілому, поведінка системи була аналогічна описаній вище при стимуляції тільки електричними або тільки парасимпатичним імпульсами. Основною відмінною рисою було те, що при комбінованій стимуляції розмах і середнє значення МП були менші, ніж при прямій електричній стимуляції, але більше, ніж при парасимпатичній стимуляції. При аналізі коливань $[Ca^{2+}]_i$, викликаних комбінованою стимуляцією, примітним було те, що і розмах, і середнє значення $[Ca^{2+}]_i$ в сталому режимі були майже на порядок більше таких, що спостерігалися при стимуляції деполяризуючими імпульсами струму і стимуляції парасимпатичних нервових закінчень.

Наведене вище зіставлення одночасно зареєстрованих електричних і концентраційних процесів, викликаних парасимпатичною стимуляцією окремо, або у комбінації з прямою електричною стимуляцією, виявило найбільш важливі параметри, які вимагають детального експериментального дослідження для визначення характеру реакцій клітини на періодичну парасимпатичну стимуляцію, яка застосовується в реабілітаційних цілях. Такими є кінетичні параметри: (а) активація P2X- і IP3-чутливих каналів, а також затримка активації других по відношенню до перших; (б) Ca^{2+} -залежна інактивація Ca^{2+} -каналів; (в) екструзія вільного цитозольного Ca^{2+} . Новим аспектом, розкритим за допомогою даної моделі ГМК ДСМ, є можливість розрахунку через прості математичні вирази, такої частоти f ($MSI \Delta T = 1/f$) періодичної стимуляції, що забезпечує націлену на бажаний функціональний ефект фактичну затримку δ між Р- і М-компонентами парасимпатичної дії, при наявності відомої з експериментів базової затримки Δt між названими компонентами, яка є власною (*intrinsic*), безпосередньо не керованою характеристикою ГМК. Ці розрахунки можуть бути частиною алгоритму біофізично обумовленого вибору параметрів реабілітаційної електростимуляції.

РОЗДІЛ 4

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

У даній роботі досліджено роль співвідношення іонотропних і метаботропних механізмів у клітинній збудливості. Вперше представлено спеціалізовану модель Ca^{2+} -залежного хлорного струму та визначено його роль у збудливості ГМК ДСМ. Досліджено електричні та концентраційні процеси у ГМК ДСМ під час стимуляції з використанням протоколів, типових для процедур реабілітаційної стимуляції. Визначено роль іонних каналів, насосів, механізмів буферизації $[\text{Ca}^{2+}]_i$, яку вони відіграють у цих процесах. Наші результати дозволяють краще зрозуміти механізми розвинення збудження у ГМК ДСМ в різних умовах.

4.1 Особливості моделі Ca^{2+} -залежного хлорного струму

Модель Ca^{2+} -залежного струму, будучи у ряді аспектів спрощеною, досить близько відтворює істотні елементи струмів-прототипів, виявлені в експериментальних дослідженнях. Відкритим залишається питання стосовно молекулярної природи каналів, що пропускають Ca^{2+} -залежні хлорні струми. В основу нашої моделі було покладено експериментальні дані про властивості такого струму через канали, утворені протеїнами аноктамінової родини (Anoctamin/TMEM16) [131]. Деякі канали цієї родини (зокрема Ano1 та Ano2), які активуються зміщенням $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [180] та реагують на зміни МП, широко розповсюджені в організмі людини та тварин. Відомо, що протеїн, який кодується *TMEM16A*, є основним компонентом нативних Ca^{2+} -залежних хлорних каналів [137]. Однак, у зв'язку з тим, що вказана родина протеїнів була відкрита відносно нещодавно, фундаментальні електрофізіологічні дослідження, які дозволили б однозначно визначити залежності кінетик каналів від різних чинників і, відповідно, безпосередньо втілити їх в моделях, до цих пір не проводилися. Це стосується і нашої моделі, побудованої з

використанням доступних даних небагатьох експериментальних робіт [168]. Поки не можна однозначно стверджувати, що канали Ca^{2+} -залежного хлорного струму належать саме до аноктамінової родини (Anoctamin/tmem16), хоч це і виглядає вірогідним. Визначення молекулярної природи каналів, присутніх саме в ГМК ДСМ і разом з цим властивостей їх кінетик активації/інактивації, дозволить відповідним чином уточнити їх роль у збудливості досліджуваного типу клітин. Іншим важливим моментом є визначення біль-менш точної популяції цих каналів у сечовому міхурі та детрузорі як у період розвитку, так і після нього. На даний момент відомо лише про їх наявність, що ускладнює оцінку їх внеску у збудливість. Використані в нашій модельній роботі протоколи обчислювального експерименту і запропонований нами новий тип характеристик – МАХ струму – можуть бути корисними, сприяти наочному представленню концентраційно-залежних властивостей мембранних провідностей. Ці властивості є предметом не лише теоретичних, але й експериментальних досліджень, зокрема, завдяки розробці методів фіксації внутрішньоклітинної концентрації іонів в живих клітинах [191–193].

4.2 Характеристика розробленої моделі ГМК ДСМ

Розроблена модель ГМК хоч і є досить спрощеною, тим не менш, здатна відтворювати генерацію ПД як у відповідь на прикладення деполяризаційного струму ззовні (рис. 3.6), так і на збільшення провідності каналів, які є мішенями комбінованого метаботропного та іотропного парасимпатичного впливу (рис. 3.10, також див. рис. 3.11) з параметрами, характерними для прототипу [43, 174]. Основні характеристики описаних вище електричних і концентраційних процесів у модельній ГМК ДСМ близькі до опублікованих даних експериментальних досліджень клітин-прототипів, що дозволяє вважати її прийнятною відправною точкою для розробки більш складних моделей (з можливістю доповнення поки не врахованими або не деталізованими механізмами, притаманними прототипу). Представленій моделі, як і будь-яким іншим, притаманні спрощення і обмеження, обумовлені недостатньою (порівняно зі збудливими клітинами інших типів) вивченістю складу і характеристик іонних каналів та внутрішньоклітинних сигнальних механізмів в ГМК ДСМ. Тим не менш, набір іонних каналів і механізмів регулювання $[Ca^{2+}]_i$ дозволив відтворити низку важливих властивостей прототипу.

Ряд спрощень моделі стосувався як біофізичних механізмів (мембранних і внутрішньоклітинних), так і протоколів дослідження. Якщо говорити про динаміку $[Ca^{2+}]_i$, то, хоча, кальцієві насоси сарколеми і ендосаркаплазматичного ретикулума представлені досить докладно, механізми зв'язування Ca^{2+} внутрішньоклітинними протеїнами і буферами об'єднані в один загальний механізм. Базальний рівень $[Ca^{2+}]_i$ в моделі, який дорівнює 34 нМ, має той же порядок, як і той, що спостерігається у свіжоізолюваних ГМК ДСМ людини (100 нМ) [194]. Характеристична стала часу змін цього параметра також узгоджується з опублікованими даними [176]. За відсутності відомостей про концентрацію Ca^{2+} в ГМК ДСМ при порушенні, особливо в умовах повторної електростимуляції, яка широко

застосовується під час реабілітації [55, 56], оцінити близькість пікових рівнів $[Ca^{2+}]_i$ в модельній ГМК і у прототипі важко. Проте, якщо порівнювати з доступними даними з клітин інших типів (нервових і м'язових), вимушені коливання концентрації, що спостерігалися нами, дещо перевищують фізіологічний рівень, особливо при високочастотній стимуляції (рис. 3.15). Ця обставина вимагає поставитися з особливою увагою як до параметрів, що визначають надходження Ca^{2+} у цитозоль і його еструзію, так і до протоколів стимуляції. Останнє важливо в плані вибору параметрів реабілітаційної електростимуляції, що забезпечує недопущення тривалого надмірного підвищення рівня вільного $[Ca^{2+}]_i$, яке може призвести до небажаних побічних цитотоксичних ефектів.

Механізми дії пуринергічного компоненту парасимпатичного стимулу спрощено представляли активацією пасивної (P2X-рецепторної) провідності мембрани, що проводить неспецифічний вхідний струм, тоді як в ГМК-прототипах механізм складніше, залучає рецепторні підтипи P2X1 і P2X3 [152, 195]. Кожний з цих підтипів рецепторних каналів робить свій внесок Ca^{2+} у загальний іонний струм [149]. Холінергічний компонент дії парасимпатичного стимулу був представлений активацією проникності IP3-чутливих кальцієвих каналів депо, тобто ефектом кінцевої ланки ланцюга метаболічних реакцій, ініційованої зв'язуванням ацетилхоліну з M3/M2-рецепторами. Проміжні реакції, що вимагають більшого часу, ніж зв'язування АТФ з P2X-рецепторами, спрощено враховуються у затримці відкриття каналів депо щодо P2X-каналів. Факт більш пізнього, у порівнянні з пуриновим компонентом, розвитку мускаринового парасимпатичного компонента дії відомий з експериментів на ГМК ДСМ [174], проте точні часові співвідношення компонентів, як і їх видоспецифічні особливості, потребують уточнення [196]. Наступним важливим моментом у моделюванні ефекту активації м-холінорецепторів є урахування лише Ca^{2+} -залежного хлорного струму, тоді як у відповідь на ту ж саму подію також активується і

неселективний катіонний струм, який також може впливати на збудливість ГМК ДСМ [35, 58]. Але, нажаль, обмежений об'єм дисертаційної роботи не дозволяє урахувати та дослідити всі можливі механізми, які впливають на збудливість ГМК ДСМ. Тому метаботропна (мускаринова) активація каналів неселективного катіонного струму залишається предметом наших подальших досліджень.

Один з важливих, на наш погляд, дискусійних моментів стосувався включення в модель каналів натрієвого струму, які не інактивуються. Істотну участь такого нечутливого до тетродотоксину (ТТХ) струму в генерації платоподібних потенціалів та інших видів деполяризаційних відповідей нейронами ЦНС [197] і периферичної нервової системи [198, 199], мієнтеричними сенсорними нейронами «*myenteric sensory neurons*» [200, 201] та кардіоміоцитами [202] було описано раніше. За відсутності прямих даних відносно ГМК ДСМ включення зазначених каналів у модель цих клітин ґрунтувалося на наступних непрямих міркуваннях. У недавньому огляді [20] було відзначено, що в мембрані ГМК можуть бути істинні (*genuine*) натрієві канали як чутливі, так і не чутливі до ТТХ. На користь наявності натрієвих каналів, що неінактивуються (або повільно інактивуються) в ГМК сечовивідних шляхів, свідчать результати експериментальних досліджень [203]. В них було виявлено, що тривалість ПД, генерованого ГМК уретри (клітинами, за властивостями близькими до ГМК ДСМ), в безнатрієвому середовищі суттєво скорочувалася, причому переважно за рахунок плато, яке визначається відкриттям «повільних» натрієвих каналів. Інші типи іонних каналів моделі в цілому відповідають виявленим в ГМК ДСМ [20, 74, 90, 134].

В рамках зазначених обмежень модель ГМК ДСМ відкриває поки недоступну для експериментальних та клінічних досліджень можливість одночасного спостереження викликаних стимулами змін МП, парціальних струмів і $[Ca^{2+}]_i$. Зіставлення цих електричних і концентраційних процесів

дозволяє охарактеризувати механізми реагування клітин на стимули, охарактеризувати ролі, які у функціонуванні цих механізмів грають струми через іонні канали різних типів, потоки надходження і екструзії кальцію – найважливішого чинника як збудливості, так і скоротливості ГМК.

Отримані результати (рис. 3.9) дозволяють висловити наступні судження про роль різних парціальних іонних струмів. Натрієвий струм, який не інактивується, першим реагуючи на деполяризаційний поштовх і досягаючи свого максимуму, забезпечує первинну регенеративну деполяризацію, яка активує кальцієві канали Т-типу. Струм через Т-канали підтримує зсув МП до рівня активації кальцієвих каналів L-типу. Активація останніх разом з вищеназваними струмами призводить до формування повноцінного ПД, під час якого кальцій поступає у клітину, і пов'язане з цим тривале підвищення $[Ca^{2+}]_i$ призводить до активації Ca^{2+} -залежних хлорних каналів. Деполяризаційний хлорний струм на піку ПД змінює свій напрямок на гіперполяризаційний і тим самим обмежує амплітуду ПД. По закінченні деполяризаційного піку ПД $[Ca^{2+}]_i$ деякий час залишається достатньою для активації Ca^{2+} -залежних хлорних каналів, внаслідок чого струм через ці канали знову змінює свій напрямок і, стаючи деполяризаційним, формує тривалу слідову деполяризацію. Роль струмів через потенціалзалежні калієві канали і калієві канали типу Kir2.1 полягає у формуванні потенціалу спокою і обмеженню амплітуди ПД, тоді як Ca^{2+} -залежні калієві канали типу BK, активація яких відбувається дещо пізніше, обмежують амплітуду ПД і визначають його тривалість, а також амплітуду слідової гіперполяризації. Струм через Ca^{2+} -залежні калієві канали типу SK, які активуються останніми (~42.8 мс після піку ПД), визначають тривалість слідової гіперполяризації (див. вставку на рис. 3.9 Г). Завдяки включенню SK-струму і модифікації BK-струму, дана модель забезпечувала генерацію слідової гіперполяризації яка була більш тривалою і глибокою, ніж та, що спостерігалася у попередніх досліджах, тим самим краще відображаючи слідові процеси, характерні для

прототипу. Розглянута вище картина описана в умовах електричної стимуляції, але вона також справедлива і для М-відповіді при парасимпатичній стимуляції (рис. 3.9).

Незважаючи на вказані спрощення, модель має певне практичне значення. Отримані результати визначають напрями розробки біофізично обґрунтованих методів та засобів реабілітації хворих з патологією парасимпатичних механізмів збудливості ГМК детрузора, пов'язаної з дефіцитом м-холінорецепторів. Зокрема, отримані на моделі попередні дані про зниження порогу ПД, який викликався електростимуляцією на тлі ізольованої активації P2X-каналів, дозволяють говорити про нові підходи до методів такої реабілітації з використанням комбінованої електростимуляції і пуриноміметичної премедикації, а також біофізично і фізіологічно обґрунтованої оптимізації цих комбінованих впливів.

4.3 Роль метаботропних і іонотропних механізмів у збудливості

ГМК ДСМ

Відомо, що визначальну роль у скороченні здорового сечового міхура людини грають ефекти активації м-холінорецепторів, а роль активації пуринорецепторів полягає в забезпеченні ініціації ПД [20]. За відсутності патологій, внесок Р-відповіді дуже малий, та сам по собі не може викликати зміщення МП, необхідне для розвитку повноцінного ПД; тоді як М-відповідь, навіть при великому ЛП, коли Р-відповідь вже не впливає на М-відповідь, здатна призвести до генерації ПД (див. рис. 3.11). Це було продемонстровано нами у двох випадках. У першому, найбільш спрощеному, вважали, що останнім елементом ланцюга реакцій метаботропного шляху є Ca^{2+} -залежні хлорні канали, які активуються (у моделі представлено зміною їх провідності) одночасно з P2X рецепторними каналами (див. рис. 3.10). Ключовими біофізичними характеристиками механізмів такого парасимпатичного збудження виявились: затримка між активацією Р- і М-компонентами стимулу (зі збільшенням затримки зменшувалась амплітуда відповіді аж до припинення генерації ПД), швидкість наростання провідностей Р- і М-компонентів та зниження порогу генерації ПД на фоні збільшення провідності P2X каналів. У другому випадку М-стимул представляли не зміною провідності Ca^{2+} -залежних хлорних каналів, а зміною проникності IP3-чутливих каналів депо (тобто ми зробили крок назад у ланцюгу реакцій від активації м-холінорецепторів), при цьому Р- і М-компоненти стимулу були розділені значною затримкою. ПД, що виникав за цих умов, був чутливий до швидкості наростання проникності IP3-каналів, тобто до швидкості вивільнення Ca^{2+} із депо. Ці результати привертають увагу до нових теоретичних аспектів парасимпатичної іннервації ГМК детрузора – таких, як співвідношення швидкостей «одноступеневої» реакції активації P2X-каналів і «багатоступеневих» реакцій

на шляху від активації метаботропних M2/M3-холінорецепторів до зміни станів іонних каналів вхідного струму.

Під час розвитку ПД в ГМК ДСМ ззовні надходить кальцій, що сприяє скороченню цих клітин. Натурні експерименти на ГМК сечового міхура щурів показали можливість формування локальних кальцієвих транзєнтів, обумовлених активацією пуринорецепторів [67]. Однак, кількісні співвідношення величин і ЛП Р- і М-компонентів парасимпатичної нейропередачі все ще вимагають уточнення – нам не вдалося виявити конкретних літературних даних на цей рахунок. На основі загальних міркувань можна припустити, що співвідношення Р- і М-компонентів може змінюватися при різноспрямованих змінах експресії відповідних рецепторів і/або продукції нейротрансмітерів, що впливають на ці рецептори. У мишей повний дефіцит М3-холінорецепторів в сечовому міхурі отримували в умовах нокауту відповідного гена [204]. Цистометричні дослідження у мишей з нокаутом М3-холінорецепторів показали, що виявлені в цьому випадку функціональні порушення були менш виражені, ніж ті, що спостєрігалися в умовах атропінової блокади М3-рецепторів у мишей без зазначеної генетичної модифікації [204]. Це може свідчити про наявність якогось нехолінергічного компенсаторного механізму, багато аспектів якого залишаються невідомими. Що ж стосується кількісного співвідношення ацетилхоліну й АТФ, які вивільняються з парасимпатичних нервових волокон, то для цього показника характерні значні варіації, зокрема міжвидові відмінності. Так, домінування ацетилхоліну характерне для здорового сечового міхура людини, тоді як у кішок і морських свинок переважає виділення АТФ, а у щурів і собак співвідношення цих передавачів приблизно рівна [150].

Отримані результати дозволяють припустити, що активація пуринергічних рецепторів може грати істотну компенсаторну роль в умовах дефіциту м-холінорецепторів. Представлені вище дані говорять про те, що

ослаблений таким дефіцитом М-компонент відповіді може бути посилений шляхом помірного (в 2–4 рази) підвищення інтенсивності Р-компоненту стимулу. Подібний ефект більш виражений при малих часових затримках між Р- і М- компонентами відповіді. Така ситуація неможлива в умовах поодинокі 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 супроводжувалось необхідним для розвитку скорочення значним підвищенням $[Ca^{2+}]_i$, навіть у випадку тотального дефіциту м-холінорецепторів. До якої саме міри можливе посилення Р-компоненту з використанням існуючих фармако-фізіологічних методів, наприклад, за допомогою впливу пуринометиків? Рішення цього питання досить актуальне, як і встановлення точних часових співвідношень Р- і М-компонентів відповіді, викликані парасимпатичним стимулом. Але з'ясування цих і багатьох інших питань є предметом окремих досліджень, що виходять за рамки завдань даної дисертаційної роботи.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі відповідно до поставленої мети досліджено роль співвідношення іонотропних та метаботропних механізмів у збудливості гладеньком'язової клітини. 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у спокої, рівень $[\text{Ca}^{2+}]_i$ під час його вивільнення із депо при моделюванні парасимпатичної активації та співвідношення Ca^{2+} -струмів на максимумі ПД), отримані на клітинах прототипу [20, 43, 59, 174, 176, 194 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-компоненту 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.

Додаток «А»

Пояснення базової і фактичної затримки між іонотропним та метаботропним компонентом парасимпатичного стимулу при множинній стимуляції

Ефекти варіації інтервалу $\Delta\tau$ між моментами активації P2X- та IP3-каналів представляли особливий інтерес частково тому, що при множинній стимуляції, характерній для реабілітаційних протоколів, в залежності від ΔT моменти фактичної активації і тих, і інших каналів можуть слідувати з іншими, ніж базова затримка $\Delta\tau$ (рис. А.1). Нами отримані прості формули, які характеризують ці обставини.

Кожний послідовний i -й стимул, прикладений у момент t_i , активує P2X-і IP3-канали у моменти τ_i та θ_i відповідно, які віддалені на величину базової затримки $\Delta\tau = \theta_i - \tau_i$.

Очевидно, що ефекти послідовних i -го і $(i+1)$ -го стимулів слідують з однаковими інтервалами $\Delta T = t_{i+1} - t_i = \tau_{i+1} - \tau_i = \theta_{i+1} - \theta_i$. При цьому, якщо ΔT довше базової затримки $\Delta T > \Delta\tau$, то моменти активації каналів у порядку P2X- \rightarrow IP3- \rightarrow P2X - \rightarrow .. чергуються з інтервалами $\delta = \theta_i - \tau_i = \Delta\tau$ та $\delta' = \tau_{i+1} - \theta_i = \Delta T - \delta$. Якщо $\Delta T \leq \Delta\tau$ і затримка кратна ΔT , тобто $\Delta\tau = k \cdot \Delta T$ ($k=1, 2, \dots$ – ціле число, коефіцієнт кратності), то, починаючи з k -го стимулу, активація IP3-каналів i -м стимулом виникає у момент $\theta_i = \tau_i + \Delta\tau = \tau_i + k \cdot \Delta T$, котрий співпадає з моментом активації P2X-каналів $(i+k)$ -м стимулом $\tau_{i+k} = \tau_i + k \cdot \Delta T$. Це означає нульову фактичну затримку $\delta = \theta_i - \tau_{i+k} = 0$. Якщо ж $\Delta T \leq \Delta\tau$ та $\Delta\tau$ не кратна ΔT , тобто $\Delta\tau = (k+\varepsilon) \cdot \Delta T$ ($k=1, 2, \dots$ – ціле, $0 < \varepsilon < 1$), то, починаючи з k -го стимулу, момент активації IP3-каналів i -м стимулом є $\theta_i = \tau_i + \Delta\tau = (k+\varepsilon) \cdot \Delta T = \tau_{i+k} + \varepsilon \cdot \Delta T$, що означає більш коротку, ніж базова, фактичну затримку $\delta = \theta_i - \tau_{i+k} = \varepsilon \cdot \Delta T < \Delta\tau$ по відношенню до найближчого моменту активації P2X-каналів $(i+k)$ -м стимулом.

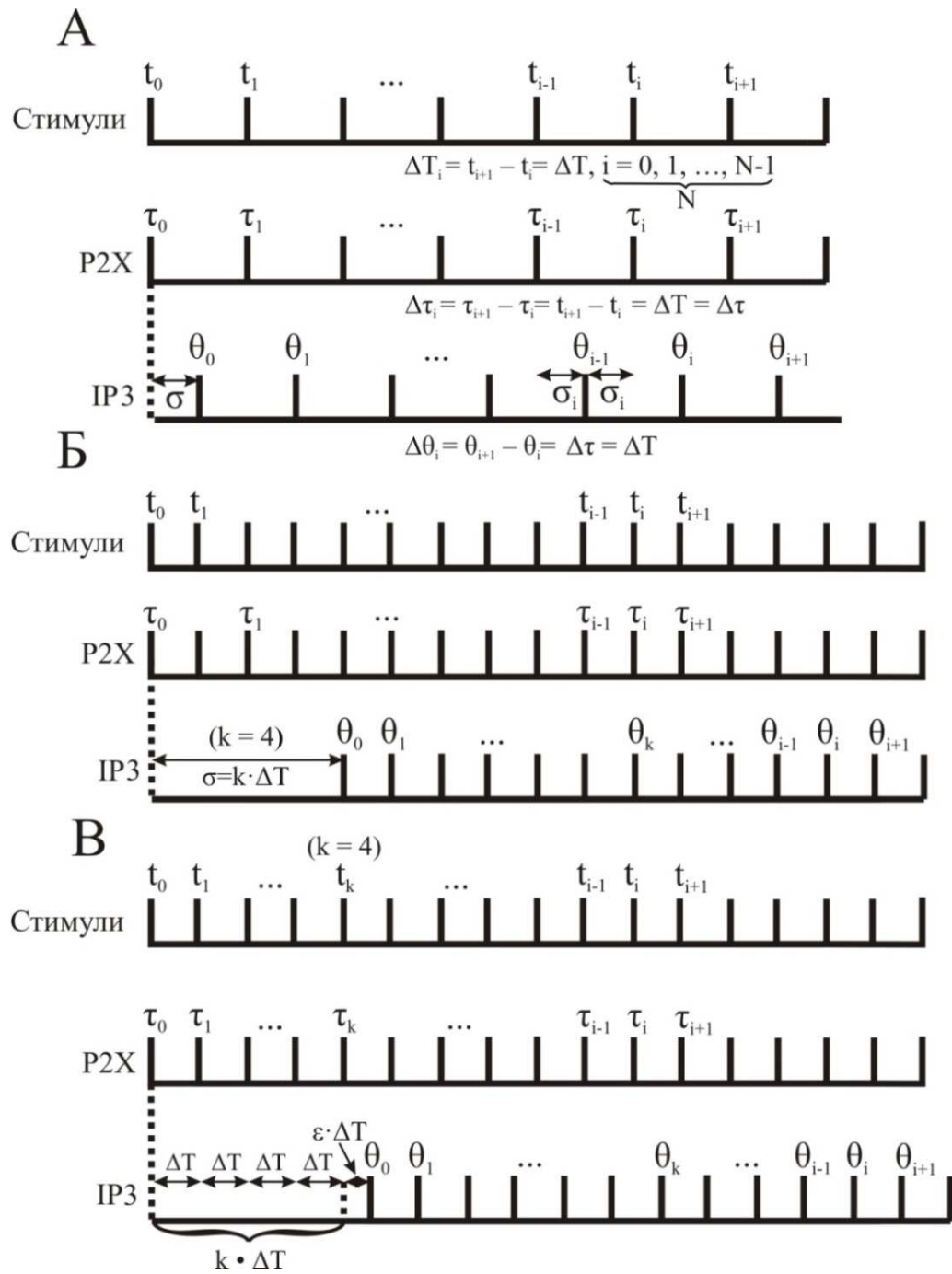


Рисунок А.1 Зміни фактичного моменту активації іонотропних та метаботропних механізмів в залежності від міжстимульного інтервалу (ΔT).

Додаток «Б»

Лістинг коду моделі Ca^{2+} -залежних хлорних каналів

```
INDEPENDENT {t FROM 0 TO 1 WITH 1 (ms)}
NEURON {
    SUFFIX Ca_Cl_current
    USEION cl READ ecl, cli, clo WRITE icl VALENCE -1
    USEION ca READ cai
    RANGE gcl_mv_max, gcl_nv_max, icl, clo, cli, Kd, beta, timekoef, gcl_nv,
gcl_mv, Vh, S, mv, nv
}
UNITS {
    (mA) = (milliamp)
    (mV) = (millivolt)
    (molar) = (1/liter)
    (mM) = (millimolar)
}
PARAMETER {
    v          (mV)
    celsius    (degC)
    ecl        (mV)
    cai  (mM)      : initial [Ca]i
    beta  = 0.03 (1/ms)      : backward rate constant
    Kd   = 0.00048 (mM)      : middle point of activation fct 0.48 mikro moll
    taumin = 0.1 (ms)        : minimal value of the time cst
    timekoef = 1
    cli  (mM)
    clo  (mM)
    gcl_nv_max = 0.11541 (mho/cm2)
    gcl_mv_max = 0.13293 (mho/cm2)
    Vh = 103.5
    S = -37.266
}
STATE { m mv nv }
ASSIGNED {
```

```

icl    (mA/cm2)
m_inf
tau_m  (ms)
gcl_mv (S/cm2)
mvinf
mvtau  (ms)
nvinf
nvtau  (ms)
gcl_nv (S/cm2)
    }
BREAKPOINT {SOLVE states METHOD derivimplicit
    gcl_nv = gcl_nv_max*m*nv
    gcl_mv = gcl_mv_max*m*mv
    icl = gcl_nv*(v - (-32)) + gcl_mv*(v - (-32))
    }
DERIVATIVE states {
    rates (v)
    mv' = (mvinf - mv)/mvtau
    nv' = (nvinf - nv)/nvtau
    evaluate_fct(v,cai)
    m' = ((m_inf - m) / tau_m)
}
UNITSOFF
INITIAL {
    evaluate_fct(v,cai)
    m = m_inf
    rates (v)
    mv = mvinf
    nv = nvinf
}
PROCEDURE evaluate_fct(v(mV),cai(mM)) { LOCAL car, tar
    car = (cai/Kd)^3.4
    m_inf = car / ( 1 + car )
    tar = 1/beta
    tau_m = timekoef*tar / (1 + car)
    if(tau_m < taumin) { tau_m = taumin } : min value of time cst

```

```

}
PROCEDURE rates(v(mV)) { :Computes rate and other constants at current v.
TABLE mvinf, nvinf DEPEND Vh, S, mvtau, nvtau FROM -100 TO 100 WITH 200
      : "mv" voltage dependent activation system
mvinf = (1 / (1 + exp((v-Vh)/S)))
mvtau = 82
      : "nv" voltage dependent activation system
nvinf = (1 / (1 + exp((v-Vh)/S)))
nvtau = 7.83
}

```


Додаток «В»

Лістинг коду моделі внутрішньоклітинної динаміки кальцію

```
INDEPENDENT {t FROM 0 TO 1 WITH 1 (ms)}
NEURON {
    SUFFIX cadyn_IP3R
    USEION ca READ ica, cai WRITE cai
    USEION cad READ cadi WRITE cadi VALENCE 2
    RANGE Kmfs,KmrS,cainf,taur, MfrS, KaP, MfrP, depth, cadepo, drive_SERCA_F,
    drive_SERCA_R, drive_SERCA, drive_PMCA
    RANGE Jip3r, d2, d4, MfrIP3, tau, del, Ti, ProcTime, PBSP, WorkTime, ISI, g, gt, g1,
    tev2, tev, k
}
UNITS {
    (molar) = (1/liter)                : moles do not appear in units
    (mM) = (millimolar)
    (um) = (micron)
    (mA) = (milliamp)
    (msM) = (ms mM)
}
CONSTANT {
    FARADAY = 96489                    (coul)        : moles do not appear in units
}
PARAMETER {
    depth = .1      (um)                : depth of shell, from (3)
    taur = 700      (ms)                 : rate of calcium removal, from (3)
    cainf = 2.4e-6   (mM)                : old value 1e-8, from (3)
    cadepo = 2.5     (mM)
    MfrS = 0.000005 (mM/ms)             : 5 mkM/s - maximum flux rate for SERCA
    Kmfs = 0.00026   (mM)               : Forward mode constant
    KmrS = 1.8       (mM)               : Reverse mode constant
    H = 0.75         : Hill coeff.
    MfrP = 0.0000075 (mM/ms)           : 7.5 mkM/s - maximum flux rate for PMCA
    KaP = 0.0015     (mM)               : Affinity
    MfrIP3 = 0.000667 (1/ms)           : IPR max rate
    : "for alpha function"
```

```

del = 1.0 (ms)<0,1e9>      : dealy of pulse series
amp = 0 (nA)
Ti = 10 (ms)              : pulses set time
ISI = 5 (ms)              : interspike interval
ProcTime = 20 (ms)        : time of the stimulation procedure
PBSP = 20 (ms)            : pause between set of pulses
tau = 0.8 (ms) : tau*10 - time of impuls in the set of pulses
}
STATE {
    cai (mM)
    cadi (mM)
}
INITIAL {
    cai = cainf
    cadi = 1
    tev2 = del
    tev = del
    PSP = del
    on = 0
    state()
    Ticnt = 0
    WorkTime = 0
    k = 0
}
ASSIGNED {
    ica (mA/cm2)
    drive_SERCA_F (mM/ms)
    drive_SERCA_R (mM/ms)
    drive_SERCA (mM/ms)
    drive_PMCA (mM/ms)
    drive_channel (mM/ms)
    Jip3r (mM/ms)
    tev (ms)
    PSP (ms)
    Ticnt
    WorkTime

```

```

on
ag
k
g (uS)
tev2 (ms)
g1 (uS)
gt (uS)
x
}
BREAKPOINT {
    SOLVE state METHOD derivimplicit
    SERCA (cai, cadi)
    PMCA (cai)
    SOP()
    drive_channel = - (10000) * ica / (2 * FARADAY * depth)
    if (drive_channel <= 0.) { drive_channel = 0. }      : cannot pump inward
    : for set of pulses
    x = t - tev2
    g = MfrIP3 * alpha( x / tau )
    g1 = MfrIP3 * k*alpha( (x + ISI) / tau)
    if (tau*10 <= ISI) {gt = g} else { gt = g + g1 }
    Jip3r = gt*(cadi-cai) }
DERIVATIVE state {
    cai' = drive_channel - drive_SERCA - drive_PMCA + Jip3r + (cainf-cai)/taur
    cadi' = drive_SERCA - Jip3r
}
PROCEDURE SERCA(cai(mM), cadi(mM)) {
    drive_SERCA=(MfrS*(cai/KmfS)^H-MfrS*(cadi/KmrS)^H)/(1+(cai/KmfS)^H+(cadi/KmrS)^H)
}
PROCEDURE PMCA(cai(mM)) {
    drive_PMCA = MfrP * cai / (cai + KaP )
}
:set of pulses
PROCEDURE SOP() {
    if (WorkTime < ProcTime){
        if (at_time(PSP)) {

```

```

if (Ticnt < Ti) {           : parameters of the set of pulses
    if (at_time(tev)) {
        if (on == 0) { : turn on
            k = 1
            ag = amp
            on = 1
            if (tau*10 <= ISI) {
                tev = tev + tau*10} else {
                tev = tev + ISI }
            }else{ : turn off
            ag = 0
            on = 0
            if (tau*10 <= ISI) {
                tev = tev + ISI - tau*10} else {
                tev = tev }
            Ticnt = Ticnt + ISI
            tev2 = tev2 + ISI :* P2X
            }
            }
        }else{
            PSP = PSP + Ti + PBSP      : PSP - pulse set
period, PBSP - pause between set of pulses
            Ticnt = 0
            tev = PSP
            tev2 = PSP
            WorkTime = PSP
            k=0
        }
    }
}
}
}
FUNCTION alpha(x) {
    if (x < 0 || x > 10) { alpha = 0 } else { alpha = x * (exp(1 - x)) }
}

```

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kinder R.B. Pathophysiology of idiopathic detrusor instability and detrusor hyper-reflexia. An in vitro study of human detrusor muscle. / Kinder R.B., Mundy A.R. // Br J Urol.- 1987.-V.60, № 6.-p. 509-515.
2. Mills I.W. Studies of the pathophysiology of idiopathic detrusor instability: the physiological properties of the detrusor smooth muscle and its pattern of innervation. / Mills I.W., Greenland J.E., McMurray G., McCoy R., Ho K.M., Noble J.G., Brading A.F. // J Urol.-2000.-V.163, № 2.-p. 646-651.
3. Sibley G.N. An experimental model of detrusor instability in the obstructed pig. / Sibley G.N. // Br J Urol.-1985.-V.57, № 3.-p. 292-298.
4. Kreder K. The Overactive Bladder. Evaluation and Management. / Kreder K., Dmochowski R. — Informa: London, 2007. — 446 p.
5. Ruggieri M.R. Sr. Regulation of bladder muscarinic receptor subtypes by experimental pathologies. / Ruggieri M.R. Sr, Braverman A.S. // Auton Autacoid Pharmacol.-2006.-V.26, № 3.-p. 311-325.
6. Stevens L.A. Muscarinic receptor function, density and G-protein coupling in the overactive diabetic rat bladder. / Stevens L.A., Sellers D.J., McKay N.G., Chapple C.R., Chess-Williams R. // Auton Autacoid Pharmacol.-2006.-V.26, № 3.-p. 303-309.
7. German K. Physiological and morphometric studies into the pathophysiology of detrusor hyperreflexia in neuropathic patients. / German K., Bedwani J., Davies J., Brading A.F., Stephenson T.P. // J Urol.-1995.-V.153, № 5.-p. 1678-1683.
8. Stevens L.A. Human idiopathic and neurogenic overactive bladders and the role of M2 muscarinic receptors in contraction. / Stevens L.A., Chapple C.R., Chess-Williams R. // EurUrol.-2007.-V.52, № 2.-p. 531-538.
9. Kao C.Y. Cellular Aspects of Smooth Muscle Function [Text] / C. Y. Kao and Mary E. Carsten // - Cambridge University Press: New York, 2005. — 312 p.
10. Soder R.P. Large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel activation with NS1619 decreases myogenic and neurogenic contractions of rat detrusor smooth muscle. / Soder R.P., Petkov G.V. // Eur J Pharmacol.-2011.-V.670, № 1.-p.252-259.

11. Milsom I. How widespread are the symptoms of an overactive bladder and how are they managed? A population-based prevalence study. / Milsom I., Abrams P., Cardozo L., Roberts R.G., Thüroff J., Wein A.J. // BJU Int.-2001.-V.87, № 9.-p.760-766.
12. Coyne K.S. Economic burden of urgency urinary incontinence in the United States: a systematic review. / Coyne K.S., Wein A., Nicholson S., Kvasz M., Chen C.I., Milsom I. // J Manag Care Pharm.-2014.-V.20, № 2.-p.130-140.
13. Sellers D.J. Muscarinic agonists and antagonists: effects on the urinary bladder [Text] / D.J. Sellers, R. Chess-Williams // Fryer A.D., Christopoulos A., Nathanson N.M. Muscarinic Receptors. Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 208 / Springer: Heidelberg, Dordrecht, London, et al., 2012. - p. 375-400.
14. Зоркин С. Н. Нейрогенный мочевой пузырь у детей. Возможности фармакотерапии. / Зоркин С.Н., Гусарова Т.Н., Борисова С.А. // Мед. науч.-практ. журн. «Лечащий врач».-2009.-V.1, № 1.-с.37-39.
15. Stewart W.F. Prevalence and burden of overactive bladder in the United States. / Stewart W.F., Van Rooyen J.B., Cundiff G.W., Abrams P., Herzog A.R., Corey R., Hunt T.L., Wein A.J. // World J Urol.-2003.-V.20, № 6.-p.327-336.
16. Makedonsky I.A. Immunohistochemical investigation of the M2 and M3 muscarinic receptors in patients with bladder exstrophy. / I.A. Makedonsky // Eur. Urol.-2004.-V.4, № 2.-p. 182.
17. Македонський І.О. Морфологічні та функціональні властивості сечового міхура у дітей з аноректальними аномаліями. / Македонський І.О. // Хірургіядит.віку.-2007-V.4, № 4.-с.46-52.
18. Karl-Erik Andersson. Urinary Tract. Handbook of Experimental Pharmacology. Volume 202. / Karl-Erik Andersson, Martin C. Michel.- Springer: Heidelberg, Dordrecht, London, New York, 2011. – 591 p.
19. Hegde S.S. Muscarinic receptors in the bladder: from basic research to therapeutics. / Hegde S.S. // Br J Pharmacol.-2006.-V.147, Suppl 2.-p.S80-87.
20. Brading A.F. Ion channel modulators and urinary tract function [Text] / A.F. Brading, K.L. Brain // Karl-Erik Andersson, Martin C. Michel Urinary Tract.

Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 202 / Springer: Heidelberg, Dordrecht, London, et al., 2011. - p. 375-393.

21. Giglio D. Muscarinic receptor subtypes in the lower urinary tract. / Giglio D., Tobin G. // Pharmacology.-2009.-V.83, № 5.-p.259-269.

22. Hunter P. The IUPS human Physiome Project. / Hunter P., Robbins P., Noble D. // Pflugers Arch.-2002.-V.445, № 1.-p. 1-9.

23. Hunter P.J. Integration from proteins to organs: The Physiome Project. / Hunter P.J., Borg, T.K. // Nat Rev Mol Cell Biol.-2003.-V.4, № 3.-p. 237-243.

24. Popel A.S. Systems biology and physiome projects. / Popel A.S., Hunter P.J // Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.-2009.-V.1, № 2.-p. 153-158.

25. Smith N.P. The Cardiac Physiome: at the heart of coupling models to measurement. / Smith N.P., Hunter P.J., Paterson D.J. // Exp Physiol.-2009.-V.94, № 5.-p. 469-471.

26. Laforet J. Smooth muscle modeling and experimental identification: application to bladder isometric contraction. / Laforet J., Guiraud D., Andreu D., Taillades H., Coste C.A. // J Neural Eng.-2011.-V.8, № 3.-p.1-13.

27. Dave V. A mathematical model of the calcium transient in urinary bladder smooth muscle cells. / Dave V., Mahapatra C., Manchanda R. // Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.-2015.-p.5359-5362.

28. Martini F. Fundamentals of Anatomy & Physiology [Text] / F. Martini, J.L. Nath, E.F. Bartholomew //- Publ. Pearson Educat. Inc.: San Francisco, 2011. – 1272 p.

29. Покровский В.М. **Физиология человека.** [Текст] /. В.М. Покровский, Г.Ф. Коротько. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 2003. — 656 с.

30. *Неврологический портал* [Электронный ресурс] // Вегетативная иннервация мочевого пузыря. Режим доступа: <http://nevro-enc.ru/anatomija-nervnoj-sistemy/vegetativnaja-nervnaja-sistema/vegetativnaja-innervacija-mochevogo-puzyrja.html> – Дата последнего звернения: 2016. - Назва з екрана.

31. Уроклиник [Электронный ресурс] / Гиперактивный мочевой пузырь. – Режим доступа: http://uroclinica.ru/giperaktivnyy_mochevoy_puzyr_gamp - Дата последнего обращения: 2016. – Название с экрана.

- 32.** Allison D. Fryer. Muscarinic Receptors. Handbook of Experimental Pharmacology. Volume 208. / Allison D. Fryer, Arthur Christopoulos, Neil M. Nathanson.- Springer: Heidelberg, Dordrecht, London, New York, 2012. – 502 p.
- 33.** Kumari S. Behavioral therapy for urinary incontinence in India. / Kumari S., Jain V., Mandal A.K., Singh A. // Int J Gynaecol Obstet.-2008.-V.103, № 2.-p.125-130.
- 34.** Prabhu S.A. Prevalence and risk factors of urinary incontinence in women residing in a tribal area in maharashtra, India. / Prabhu S.A., Shanbhag S.S. // J Res Health Sci.-2013.-V.13, № 2.-p.125-130.
- 35.** Kajioka S. Involvement of ryanodine receptors in muscarinic receptor-mediated membrane current oscillation in urinary bladder smooth muscle. / Kajioka S., Nakayama S., Asano H., Brading A.F. // Am J Physiol Cell Physiol.-2005.-V.288, № 1.-p.C100-108.
- 36.** Manack A. Epidemiology and healthcare utilization of neurogenic bladder patients in a US claims database. / Manack A., Motsko S.P., Haag-Molkenteller C., Dmochowski R.R., Goehring E.L. Jr., Nguyen-Khoa B.A., Jones J.K. // Neurourol Urodyn.-2011.-V.30, № 3.-p.395-401.
- 37.** Urinary Incontinence. // -: Proceedings. – Mode of access: WWW.URL: <http://www.allaboutincontinence.co.uk/urinary-incontinence> - Last access: 2016. – Title from the screen.
- 38.** Andersson K.E. The role of the transient receptor potential (TRP) superfamily of cation-selective channels in the management of the overactive bladder. / Andersson K.E., Gratzke C., Hedlund P. // BJU Int.-2010.-V.106, № 8.-p.1114-1127.
- 39.** Даренков С.П., Селюков Р.В. «Нейрогенный мочевой пузырь при травматической болезни спинного мозга» // *Реабилитация больных с травматической болезнью спинного мозга; Под общ. ред. Г.Е. Ивановой В.В. Крылова, М.Б. Цыкунова, Б.А. Поляева. - М., 2010. С. 126-143.* Режим доступа: <http://reabilitaciya.org/biblioteka/59-psmt-tbsm/185-nejrogennyj-mochevoj-puzыр-pri-travmaticheskoy-bolezni-spinnogo-mozga-darenkov-sp-selyukov-rv.html> – Дата последнего обращения: 2016. – Название с экрана.

40. Visser A.J. Simultaneous recording of mechanical and intracellular electrical activity in human urinary bladder smooth muscle. / Visser A.J., Van Mastrigt R. // *BJU Int.*-2000.-V.86, № 1.-p.113-120.
41. Thorneloe K.S. Properties and molecular basis of the mouse urinary bladder voltage-gated K⁺ current. / Thorneloe K.S., Nelson MT. // *J Physiol.*-2003.-V.549, Pt. 1.-p.65-74.
42. Abrams P. Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. / Abrams P., Andersson K.E., Buccafusco J.J., Chapple C., de Groat W.C., Fryer A.D., Kay G., Laties A., Nathanson N.M., Pasricha P.J., Wein A.J. // *Br J Pharmacol.*-2006.-V.148, № 5.-p.565-578.
43. Andersson K.E. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. / Andersson K.E., Arner A. // *Physiol Rev.*-2004.-V.84, № 3.-p.935-986.
44. Daly D.M. Age-related changes in afferent pathways and urothelial function in the male mouse bladder. / Daly D.M., Nocchi L., Liaskos M., McKay N.G., Chapple C., Grundy D. // *J. Physiol.*-2014.-V.592, Pt. 3.-p.537-549.
45. Uvin P. Chronic administration of anticholinergics in rats induces a shift from muscarinic to purinergic transmission in the bladder wall. / Uvin P., Boudes M., Menigoz A., Franken J., Pinto S., Gevaert T., Verplaetse R., Tytgat J., Vennekens R., Voets T., De Ridder D. // *Eur. Urol.*-2013.-V.64, № 3.-p.502-510.
46. Kageyama A. Alteration of muscarinic and purinergic receptors in urinary bladder of rats with cyclophosphamide-induced interstitial cystitis. / Kageyama A., Fujino T., Taki Y., Kato Y., Nozawa Y., Ito Y., Yamada S. // *Neurosci. Lett.*-2008.-V.436, № 1.-p.81-84.
47. Andersson K.E. New roles for muscarinic receptors in the pathophysiology of lower urinary tract symptoms. / Andersson K.E. // *BJU Int.*- 2000.-V.86, № 2.-p.36–42.
48. Cortes E. The cost of not treating overactive bladder. / Cortes E., Kelleher C. // *Eur. Urol. Rev.*-2007.-V.2, № 1.-p.70-72.

49. David A. Gordon, Karl-Erik Andersson, Pamela I. Ellsworth, Gary G. Kay “Advances in OAB Therapy: The Promise of M₃-Selective Antimuscarinic Therapy for Optimal Patient Management”. // 2004. -: Proceedings. – Mode of access: WWW.URL: <http://www.medscape.org/viewprogram/3323> and <http://www.medscape.org/viewarticle/487222> - Last access: 2016. – Title from the screen.
50. Hristov K.L. Suppression of human detrusor smooth muscle excitability and contractility via pharmacological activation of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. / Hristov K.L., Parajuli S.P., Soder R.P., Cheng Q., Rovner E.S., Petkov G.V. // Am J Physiol Cell Physiol.-2012.-V.302, № 11.-p.C1632-1641.
51. Xin W. Inhibition of phosphodiesterases relaxes detrusor smooth muscle via activation of the large-conductance voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channel. / Xin W., Cheng Q., Soder R.P., Petkov G.V. // Am J Physiol Cell Physiol.-2012.V.302, № 9.-p.C1361-1370.
52. Matsumoto Y. Differential roles of M2 and M3 muscarinic receptor subtypes in modulation of bladder afferent activity in rats. / Matsumoto Y., Miyazato M., Furuta A., Torimoto K., Hirao Y., Chancellor M.B., Yoshimura N. // Urology.-2010.-V.75, № 4.-p.862-867.
53. Smith C.P. Enhanced ATP release from rat bladder urothelium during chronic bladder inflammation: effect of botulinum toxin A. / Smith C.P., Vemulakonda V.M., Kiss S., Boone T.B., Somogyi G.T. // Neurochem. Int.-2005.-V.47, № 4.-p.291-297.
54. Македонський І.О. Профілактика ураження органів сечостатевої системи підчас хірургічної корекції аноректальних вад у дітей. / Македонський І.О. // Урологія.-2011.-V.15, № 2 (57).-с.28-31.
55. Македонський І.О. Пат. 63684 Україна, МПК (2011.01) A61B 17/00, Спосіб лікування аноректальних вад розвитку. / Македонський І.О. // опубл. 10.10.11, Бюл. № 19.
56. Македонський І.О. Клінічні можливості систем з біологічним зворотним зв'язком у лікуванні нетримання сечі у дітей з екстрофією сечового міхура. / Македонський І.О., Піддубна О.П. // Мед. перспективи.-2011.- Т.16, № 2.-с.59-65.

- 57.** Hashitani H. Ionic basis for the regulation of spontaneous excitation in detrusor smooth muscle cells of the guinea-pig urinary bladder. / Hashitani H., Brading A.F. // Br. J. Pharmacol.-2003.-V.140, № 1.-p.159-169.
- 58.** Yamamoto M. Two types of cation channel activated by stimulation of muscarinic receptors in guinea-pig urinary bladder smooth muscle. / Yamamoto M., Unno T., Matsuyama H., Kohda M., Masuda N., Nishimura M., Ishii T., Komori S. // J Pharmacol Sci.-2008.-V.108, № 3.-p.248-257.
- 59.** Bramich N.J. Electrical properties of smooth muscle in the guinea-pig urinary bladder. / Bramich N.J., Brading A.F. // J. Physiol.-1996.-V.492, Part 1.-p.185-198.
- 60.** Hashitani H. Electrical properties of detrusor smooth muscles from the pig and human urinary bladder. / Hashitani H., Brading A.F. // Br J Pharmacol.-2003.-V.140, № 1.-p.146-158.
- 61.** Malysz J. Single-channel biophysical and pharmacological characterizations of native human large-conductance calcium-activated potassium channels in freshly isolated detrusor smooth muscle cells. / Malysz J., Rovnerand E.S., Petkov G.V. // Pflugers Arch.-2013.-V.465, № 7.-p.965-975.
- 62.** Hristov K.L. Large-conductance voltage- and Ca^{2+} -activated K^{+} channels regulate human detrusor smooth muscle function. / Hristov K.L., Chen M., Kellett W.F., Rovner E.S., Petkov G.V. // Am J Physiol Cell Physiol.-2011.-V.301, № 4.-p.C903-912.
- 63.** Petkov G.V. Role of potassium ion channels in detrusor smooth muscle function and dysfunction. / Petkov G.V. // Nat Rev Urol.-2011.-V.9, № 1.-p.30-40.
- 64.** Nakayama S. Evidence for multiple open states of the Ca^{2+} channels in smooth muscle cells isolated from the guinea-pig detrusor. / Nakayama S., Brading A.F. // J Physiol.-1993.-V.471.-p.87-105.
- 65.** Wu C. The role of the L-type Ca^{2+} channel in refilling functional intracellular Ca^{2+} stores in guinea-pig detrusor smooth muscle. / Wu C., Sui G., Fry C.H. // J Physiol.-2002.-V.538, Pt. 2.-p.357-369.
- 66.** Young J.S. Spontaneous purinergic neurotransmission in the mouse urinary bladder. / Young J.S., Meng E., Cunnane T.C., Brain K.L. // J. Physiol.-2008.-V.586, Pt. 23.-p.5743-5755.

- 67.** Heppner T.J. Elementary purinergic Ca^{2+} transients evoked by nerve stimulation in rat urinary bladder smooth muscle. / Heppner T.J., Bonev A.D., Nelson M.T. // J. Physiol.-2005.-V.564, Pt. 1.-p.201-212.
- 68.** Giachini F.R. STIM1/Orai1-mediated store-operated Ca^{2+} entry: the tip of the iceberg. / Giachini F.R., Lima V.V., Hannan J.L., Carneiro F.S., Webb R.C., Tostes R.C. // Braz J Med Biol Res.-2011.-V.44, № 11.-p.1080-1087.
- 69.** Fowler C.J. The neural control of micturition. / Fowler C.J., Griffiths D., de Groat W.C. // Nat. Rev. Neurosci.-2008.-V.9, № 6.-p.453-466.
- 70.** Burnstock G. Expanding field of purinergic signalling. / Burnstock G. // Drug. Dev. Res.-2001.-V.52, № 1.-p.1-10.
- 71.** Burnstock G. Purinergic signalling in the gastrointestinal tract and related organs in health and disease. / Burnstock G. // Purinerg. Signal.-2014.-V.10, № 1.-p.3-50.
- 72.** Frazier E.P. Signal transduction underlying the control of urinary bladder smooth muscle tone by muscarinic receptors and beta-adrenoceptors. / Frazier E.P., Peters S.L., Braverman A.S., Ruggieri M.R. Sr, Michel M.C. // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.-2008.-V.377, № 4/6.-p.449-462.
- 73.** Abrams P. Incontinence, 3rd International Consultation on Incontinence, Vol. 1: Basics and Evaluation. [Text] / P. Abrams, L. Cardozo, S. Khoury, A. Wein. - Paris: Health Publications Ltd., 2005. – 797p.
- 74.** Michel M.C. Similarities and differences in the autonomic control of airway and urinary bladder smooth muscle. / Michel M.C., Parra S. // Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.-2008.-V.378, № 2.-p.217-224.
- 75.** Laforet J. Smooth muscle model for functional electrical stimulation applications: simulation of realistic bladder behavior under FES. / Laforet J., Guiraud D. // Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.-2008.-p.3702-3705.
- 76.** Hill-Eubanks D.C. Local elementary purinergic-induced Ca^{2+} transients: from optical mapping of nerve activity to local Ca^{2+} signaling networks. / Hill-Eubanks D.C., Werner M.E., Nelson M.T. // J Gen Physiol.-2010.-V.136, № 2.-p.149-154.

77. Piper A.S. Direct effect of Ca^{2+} -calmodulin on cGMP-activated Ca^{2+} -dependent Cl-channels in rat mesenteric artery myocytes. / Piper A.S., Large W.A. // J Physiol.-2004.-V.559, Pt. 2.-p.449-457.
78. Hashitani H. Interaction between interstitial cells and smooth muscles in the lower urinary tract and penis. / Hashitani H. // J Physiol.-2006.-V.576, Pt. 3.-p.707-714.
79. Sadegh M.K. Deletion of Dicer in smooth muscle affects voiding pattern and reduces detrusor contractility and neuroeffector transmission. / Sadegh M.K., Ekman M., Rippe C., Uvelius B., Sward K., Albinsson S. // PLoS One.-2012.-V.7, № 4.-p.e35882.
80. Hollywood M.A. T- and L-type Ca^{2+} currents in freshly dispersed smooth muscle cells from the human proximal urethra. / Hollywood M.A., Woolsey S., Walsh I.K., Keane P.F., McHale N.G., Thornbury K.D. // J Physiol.-2003.-V.550, Pt. 3.-p.753-764.
81. Fry C.H. T-type Ca^{2+} channels in non-vascular smooth muscles. / Fry C.H., Sui G., Wu C. // Cell Calcium.-2006.-V.40, № 2.-p.231-239.
82. Nakayama S. Effects of excitatory neurotransmitters on Ca^{2+} channel current in smooth muscle cells isolated from guinea-pig urinary bladder. / Nakayama S. // Br J Pharmacol.-1993.-V.110, № 1.-p.317-325.
83. Blanks A.M. Characterization of the molecular and electrophysiological properties of the T-type calcium channel in human myometrium. / Blanks A.M., Zhao Z.H., Shmygol A., Bru-Mercier G., Astle S., Thornton S. // J Physiol.-2007.-V.581, Pt. 3.-p.915-926.
84. Bittner K.C. The relationship between single-channel and whole-cell conductance in the T-type Ca^{2+} channel $\text{CaV}3.1$. / Bittner K.C., Hanck D.A. // Biophys J.-2008.-V.95, № 2.-p.931-941.
85. Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. / Perez-Reyes E. // Physiol Rev.-2003.-V.83, № 1.-p.117-161.
86. Hildebrand M.E. Selective inhibition of $\text{CaV}3.3$ T-type calcium channels by Galphq/11-coupled muscarinic acetylcholine receptors. / Hildebrand M.E., David

L.S., Hamid J., Mulatz K., Garcia E., Zamponi G.W., Snutch T.P. // J Biol Chem.-2007.-V.282, № 29.-p.21043-21055.

87. Kinoshita K. Decrease in activity of smooth muscle L-type Ca^{2+} channels and its reversal by NF-kappaB inhibitors in Crohn's colitis model. / Kinoshita K., Sato K., Hori M., Ozaki H., Karaki H. // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.-2003.-V.285, № 3.-p.G483-493.

88. Zühlke R.D. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. / Zühlke R.D., Pitt G.S., Deisseroth K., Tsien R.W., Reuter H. // Nature.-1999.-V.399, № 6732.-p.159-162.

89. Cold Spring Harbor Perspectives Biology [Electronic resource] // William A. Catterall Voltage-Gated Calcium Channels. 2011: Proceedings. – Mode of access: WWW.URL: <http://cshperspectives.cshlp.org/content/3/8/a003947.full.pdf+html> - Last access: 2016. – Title from the screen.

90. Nakayama S. Inactivation of the voltage-dependent Ca^{2+} channel current in smooth muscle cells isolated from the guinea-pig detrusor. / Nakayama S., Brading A.F. // J Physiol.-1993.-V.471.-p.107-127.

91. Gerald W. Zamponi. Voltage-Gated Calcium Channels. [Text] / Gerald W. Zamponi.- Molecular Biology Intelligence Unit.edited by Springer.: New York, 2005. – 392 p.

92. Bertil Hille. Ion Channels of Excitable Membranes. – 2nd ed. [Text] / Bertil Hille.- Sunderland, Massachusetts, 1992. - 617 p.

93. Risso S. Ca channel kinetics during the spontaneous heart beat in embryonic chick ventricle cells. / Risso S., DeFelice L.J. // Biophys J.-1993.-V.65, № 3.-p.1006-1018.

94. Lipscombe D. L-type calcium channels: highs and new lows. / Lipscombe D. // Circ Res.-2002.-V.90, № 9.-p.933-935.

95. Lipscombe D. L-type calcium channels: the low down. / Lipscombe D., Helton T.D., Xu W. // J Neurophysiol.-2004.-V.92, № 5.-p.2633-2641.

96. Ohya Y. Single L-type calcium channels in smooth muscle cells from resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. / Ohya Y., Tsuchihashi T., Kagiya S., Abe I., Fujishima M. // Hypertension.-1998.-V.31, № 5.-p.1125-1129.

- 97.** Talavera K. Biophysics and structure-function relationship of T-type Ca^{2+} channels. / Talavera K., Nilius B. // *Cell Calcium*.-2006.-V.40, № 2.-p.97-114.
- 98.** Carbone E. Ion trafficking through T-type Ca^{2+} channels: a way to look at channel gating position. / Carbone E. // *J Gen Physiol*.-2004.-V.124, № 6.-p.619-622.
- 99.** Brueggemann L.I. Low voltage-activated calcium channels in vascular smooth muscle: T-type channels and AVP-stimulated calcium spiking. / Brueggemann L.I., Martin B.L., Barakat J., Byron K.L., Cribbs L.L. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.-2005.-V.288, № 2.-p.H923-935.
- 100.** Burgess D.E. Mechanism of inactivation gating of human T-type (low-voltage activated) calcium channels. / Burgess D.E., Crawford O., Delisle B.P., Satin J. // *Biophys J*.-2002.-V.82, № 4.-p.1894-1906.
- 101.** Khan N. Permeation and gating in $\text{Ca}_v3.1$ ($\alpha 1G$) T-type calcium channels effects of Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , and Na^{+} . / Khan N., Gray I.P., Obejero-Paz C.A., Jones S.W. // *J Gen Physiol*.-2008.-V.132, № 2.-p.223-238.
- 102.** Park J.Y. Activation of protein kinase C augments T-type Ca^{2+} channel activity without changing channel surface density. / Park J.Y., Kang H.W., Moon H.J., Huh S.U., Jeong S.W., Soldatov N.M., Lee J.H. // *J Physiol*.-2006.-V.577, Pt. 2.-p.513-523.
- 103.** Platoshyn O. Identification of functional voltage-gated Na^{+} channels in cultured human pulmonary artery smooth muscle cells. / Platoshyn O., Remillard C.V., Fantozzi I., Sison T., Yuan J.X. // *Pflugers Arch*.-2005.-V.451, № 2.-p.380-387.
- 104.** Herrera G.M. Differential regulation of SK and BK channels by Ca^{2+} signals from Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in guinea-pig urinary bladder myocytes. / Herrera G.M., Nelson M.T. // *J Physiol*.-2002.-V.541, Pt. 2.-p.483-492.
- 105.** Yamamoto Y. Outward current in single smooth muscle cells of the guinea pig taenia coli. / Yamamoto Y., Hu S.L., Kao C.Y. // *J Gen Physiol*.-1989.-V.93, № 3.-p.551-564.
- 106.** Chemin J. A phospholipid sensor controls mechanogating of the K^{+} channel TREK-1. / Chemin J., Patel A.J., Duprat F., Lauritzen I., Lazdunski M., Honoré E. // *EMBO J*.-2005.-V.24, № 1.-p.44-53.

- 107.** Hibino H. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. / Hibino H., Inanobe A., Furutani K., Murakami S., Findlay I., Kurachi Y. // *Physiol Rev.*-2010.-V.90, № 1.-p.291-366.
- 108.** Anumonwo J.M. Cardiac strong inward rectifier potassium channels. / Anumonwo J.M., Lopatin A.N. // *JMol Cell Cardiol.*-2010.-V.48, № 1.-p.45-54.
- 109.** Michael Barany. Biochemistry of Smooth Muscle Contraction. [Text] / Michael Barany.- Academic Press (1 edition): London, New York, Tokyo. - 1995, 418 p.
- 110.** Vogalis F. Activation of small conductance $\text{Ca}(2+)$ -dependent K^+ channels by purinergic agonists in smooth muscle cells of the mouse ileum. / Vogalis F., Goyal R.K. // *J Physiol.*-1997.-V.502, Pt. 3.-p.497-508.
- 111.** Bronstein-Sitton N. Ca^{2+} - dependent K^+ channels at the crossroads of cell metabolism. / Bronstein-Sitton N. // *Modulator.*-2005.-№ 5.-p.10–14.
- 112.** Wang Y. $\text{Ca}(2+)$ -dependent K^+ channels of high conductance in smooth muscle cells isolated from rat cerebral arteries. / Wang Y., Mathers D.A. // *J Physiol.*-1993.-V.462.-p.529-545.
- 113.** Vergara C. Conduction, Blockade and Gating in a Ca^{2+} -activated K^+ Channel Incorporated into Planar Lipid Bilayers. / Vergara C., Moczydlowski E., Latorre R. // *Biophys J.*-1984.V.45, № 1.-p.73-76.
- 114.** Silva E.G. Role of $\text{Ca}(2+)$ -dependent K^+ -channels in the membrane potential and contractility of aorta from spontaneously hypertensive rats. / Silva E.G., Frediani-Neto E., Ferreira A.T., Paiva A.C., Paiva T.B. // *Br J Pharmacol.*-1994.-V.113, № 3.-p.1022-1028.
- 115.** Oger S. Signalling pathways involved in sildenafil-induced relaxation of human bladder dome smooth muscle. / Oger S., Behr-Roussel D., Gorny D., Lebreton T., Validire P., Cathelineau X., Alexandre L., Giuliano F. // *Br J Pharmacol.*-2010.-V.160, № 5.-p.1135-1143.
- 116.** Braun A.P. Distinct post-translational modifications regulate BK channel activity: the interplay between protein palmitoylation and phosphorylation. / Braun A.P. // *Channels (Austin).*-2009.-V.3, № 3.-p.144-145.
- 117.** Bao R. A close association of RyRs with highly dense clusters of Ca^{2+} -activated Cl^- channels underlies the activation of STICs by Ca^{2+} sparks in mouse

airway smooth muscle. / Bao R., Lifshitz L.M., Tuft R.A., Bellvé K., Fogarty K.E., ZhuGe R. // J Gen Physiol.-2008.-V.132, № 1.-p.145-160.

118. Cotton K.D. Ca^{2+} current and Ca^{2+} -activated chloride current in isolated smooth muscle cells of the sheep urethra. / Cotton K.D., Hollywood M.A., McHale N.G., Thornbury K.D. // J Physiol.-1997.-V.505, Pt. 1.-p.121-131.

119. Greenwood I.A. Modulation of the decay of Ca^{2+} -activated Cl^- currents in rabbit portal vein smooth muscle cells by external anions. / Greenwood I.A., Large W.A. // J Physiol.-1999.-V.516, Pt. 2.-p.365-376.

120. ZhuGe R. Dynamics of signaling between Ca^{2+} sparks and Ca^{2+} -activated K^{+} channels studied with a novel image-based method for direct intracellular measurement of ryanodine receptor Ca^{2+} current. / ZhuGe R., Fogarty K.E., Tuft R.A., Lifshitz L.M., Sayar K., Walsh J.V. Jr. // J Gen Physiol.-2000.-V.116, № 6.-p.845-864.

121. Lin M.T. Modulation of BK channel calcium affinity by differential phosphorylation in developing ovine basilar artery myocytes. / Lin M.T., Hessinger D.A., Pearce W.J., Longo L.D. // Am J Physiol Heart Circ Physiol.-2006.-V.291, № 2.-p.H732-740.

122. Xin W. Constitutively active phosphodiesterase activity regulates urinary bladder smooth muscle function: critical role of KCa1.1 channel. / Xin W., Cheng Q., Soder R.P., Rovner E.S., Petkov G.V. // Am J Physiol Renal Physiol.-2012.-V.303, № 9.-p.F1300-1306.

123. Yang Y. Function of BKCa channels is reduced in human vascular smooth muscle cells from Han Chinese patients with hypertension. / Yang Y., Li P.Y., Cheng J., Mao L., Wen J., Tan X.Q., Liu Z.F., Zeng X.R. // Hypertension.-2013.-V.61, № 2.-p.519-525.

124. Ponte C.G. Selective, direct activation of high-conductance, calcium-activated potassium channels causes smooth muscle relaxation. / Ponte C.G., McManus O.B., Schmalhofer W.A., Shen D.M., Dai G., Stevenson A., Sur S., Shah T., Kiss L., Shu M., Doherty J.B., Nargund R., Kaczorowski G.J., Suarez-Kurtz G., Garcia M.L. // Mol Pharmacol.-2012.-V.81, № 4.-p.567-577.

125. Ilan N. Kcnkø: single, cloned potassium leak channels are multi-ion pores. / Ilan N., Goldstein S.A. // *Biophys J.*-2001.-V.80, № 1.-p.241-253.

126. Staudacher K. Carvedilol targets human K2P 3.1 (TASK1) K⁺ leak channels. / Staudacher K., Staudacher I., Ficker E., Seyler C., Gierten J., Kisselbach J., Rahm A.K., Trappe K., Schweizer P.A., Becker R., Katus H.A., Thomas D. // *Br J Pharmacol.*-2011.-V.163, № 5.-p.1099-1110.

127. Goldstein S.A. International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. / Goldstein S.A., Bayliss D.A., Kim D., Lesage F., Plant L.D., Rajan S. // *Pharmacol Rev.*-2005.-V.57, № 4.-p.527-540.

128. Sanders K.M. Two-pore-domain potassium channels in smooth muscles: new components of myogenic regulation. / Sanders K.M., Koh S.D. // *J Physiol.*-2006.-V.570, Pt. 1.-p.37-43.

129. Mathie A. Neuronal two-pore-domain potassium channels and their regulation by G protein-coupled receptors. / Mathie A. // *J Physiol.*-2007.-V.578, Pt 2.-p.377-385.

130. Waniishi Y. Cyclic GMP-dependent but G-kinase-independent inhibition of Ca²⁺-dependent Cl⁻ currents by NO donors in cat tracheal smooth muscle. / Waniishi Y., Inoue R., Morita H., Teramoto N., Abe K., Ito Y. // *J. Physiol.*-1998.-V.511, Pt. 3.-p.719-731.

131. Hartzell H.C. Anoctamin/TMEM16 family members are Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. / Hartzell H.C., Yu K., Xiao Q., Chien L.T., Qu Z. // *J. Physiol.*-2009.-V.58, № 10.-p.2127-2139.

132. McGahon M.K. Ca²⁺-activated Cl⁻ current in retinal arteriolar smooth muscle. *Invest.* / McGahon M.K., Needham M.A., Scholfield C.N., McGeown J.G., Curtis T.M. // *Ophthalmol. Vision. Sci.*-2009.-V.50, № 1.-p.364-371.

133. Cotton K.D. Ca²⁺ current and Ca²⁺-activated chloride current in isolated smooth muscle cells of the sheep urethra. / Cotton K.D., Hollywood M.A., McHale N.G., Thornbury K.D. // *J. Physiol.*-1997.-V.505, №. 1.-p.121-131.

134. Kajioka S., Nakayama S., Asano H., Brading A.F. Involvement of ryanodine receptors in muscarinic receptor-mediated membrane current oscillation in urinary

bladder smooth muscle. / Kajioka S., Nakayama S., Asano H., Brading A.F. // *Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)*.-2005.-V.288, № 1.-p.100-108.

135. Sakamoto T. Three distinct muscarinic signalling pathways for cationic channel activation in mouse gut smooth muscle cells. / Sakamoto T., Unno T., Kitazawa T., Taneike T., Yamada M., Wess J., Nishimura M., Komori S. // *J Physiol.*-2007.-V.582, Pt. 1.-p.41-61.

136. Piper A.S. Multiple conductance states of single Ca^{2+} -activated Cl^- -channels in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells. / Piper A.S., Large W.A. // *J Physiol.*-2003.-V.547, Pt. 1.-p.181-196.

137. Angermann J.E. Activation of Ca^{2+} -activated Cl^- channels by store-operated Ca^{2+} entry in arterial smooth muscle cells does not require reverse-mode $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange. / Angermann J.E., Forrest A.S., Greenwood I.A., Leblanc N. // *Can J Physiol Pharmacol.*-2012.-V.90, № 7.-p.903-921.

138. Yu K. Explaining calcium-dependent gating of anoctamin-1 chloride channels requires a revised topology. / Yu K., Duran C., Qu Z., Cui Y.Y., Hartzell H.C. // *Circ Res.*-2012.-V.110, № 7.-p.990-999.

139. Wiwchar M. Phosphorylation alters the pharmacology of Ca^{2+} -activated Cl^- channels in rabbit pulmonary arterial smooth muscle cells. / Wiwchar M., Ayon R., Greenwood I.A., Leblanc N. // *Br J Pharmacol.*-2009.-V.158, № 5.-p.1356-1365.

140. Pedemonte N. Structure and function of TMEM16 proteins (anoctamins). / Pedemonte N., Galiotta L.J. // *Physiol Rev.*-2014.-V.94, № 2.-p.419-459.

141. Silva H.S. A mathematical model of plasma membrane electrophysiology and calcium dynamics in vascular endothelial cells. / Silva H.S., Kapela A., Tsoukias N.M. // *Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)*.-2007.-V.293, № 1.-p. 277-293.

142. Angermann J.E. Mechanism of the inhibition of Ca^{2+} -activated Cl^- currents by phosphorylation in pulmonary arterial smooth muscle cells. / Angermann J.E., Sanguinetti A.R., Kenyon J.L., Leblanc N., Greenwood I.A. // *J. Gen. Physiol.*-2006.-V.128, № 1.-p.73-87.

143. Tong W.C. A computational model of the ionic currents, Ca^{2+} dynamics and action potentials underlying contraction of isolated uterine smooth muscle. / Tong

W.C., Choi C.Y., Kharche S., Holden A.V., Zhang H., Taggart M.J. // PLoS ONE.-2011.-V.6, № 4.-p.1-21.

144. Lees-Green R. Computational modeling of anoctamin 1 calcium-activated chloride channels as pacemaker channels in interstitial cells of Cajal. / Lees-Green R., Gibbons S.J., Farrugia G., Sneyd J., Cheng L.K. // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.-2014.-V.306, № 8.-p.G711-727.

145. Khakh B.S. Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. / Khakh B.S., North R.A. // Neuron.-2012.-V.76, № 1.-p.51-69.

146. Coddou C. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. / Coddou C., Yan Z., Obsil T., Huidobro-Toro J.P., Stojilkovic S.S. // Pharmacol Rev.-2011.-V.63, № 3.-p.641-683.

147. Evans R.J. Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. / Evans R.J., Lewis C., Virginio C., Lundstrom K., Buell G., Surprenant A., North R.A. // J Physiol.-1996.-V.497, Pt. 2.-p.413-422.

148. MacKenzie A.B. Functional and molecular diversity of purinergic ion channel receptors. / MacKenzie A.B., Surprenant A., North R.A. // Ann N Y Acad Sci.-1999.-V.868.-p.716-729.

149. Egan T.M. Contribution of calcium ions to P2X channel responses. / Egan T.M., Khakh B.S. // J Neurosci.-2004.-V.24, № 13.-p.3413-3420.

150. Burnstock G. Purinergic signalling in the urinary tract in health and disease. / Burnstock G. // PurinergicSignal.-2014.-V.10, № 1.-p.103-155.

151. Creed K.E. Functional expression of muscarinic and purinoceptors in the urinary bladder of male and female rats and guinea pigs. / Creed K.E., Loxley R.A., Phillips J.K. // J SmoothMuscle Res.-2010.-V.46, № 4.-p.201-215.

152. Anthony P.D.W. Ford ATP and P2X Purinoceptors in Urinary Tract Disorders [Text] / Anthony P.D.W. Ford, Debra A. Cockayne // Karl-Erik Andersson, Martin C. Michel Urinary Tract. Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 202 / Springer: Heidelberg, Dordrecht, London, et al., 2011. - p. 485-527.

- 153.** Li M. Subtype-specific control of P2X receptor channel signaling by ATP and Mg^{2+} . / Li M., Silberberg S.D., Swartz K.J. // Proc Natl Acad Sci USA.-2013.-V.110, № 36.-p.E3455-3463.
- 154.** Uchiyama T. Muscarinic receptor subtypes of the bladder and gastrointestinal tract. / Uchiyama T., Chess-Williams R. // J Smooth Muscle Res.-2004.-V.40, № 6.-p.237-247.
- 155.** Witte L.P. Muscarinic receptor subtypes and signalling involved in the attenuation of isoprenaline-induced rat urinary bladder relaxation. / Witte L.P., de Haas N., Mammen M., Stangeland E.L., Steinfeld T., Aiyar J., Michel M.C. // Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.-2011.-V.384, № 6.-p.555-563.
- 156.** Шмидт Р. **Физиология человека:** В 3-х томах. Т. 1. Пер. с англ. [Текст] /. Р. Шмидт и Г. Тевс. — 3-е изд. — М.: Мир, 2005. — 323 с.
- 157.** Hines M.L. The NEURON simulation environment. / Hines M.L., Carnevale N.T. // Neural Comput.-1997.-V.9, № 6.-p.1179-1209.
- 158.** What is NEURON? // 2014 -: Proceedings. – Mode of access: WWW.URL: http://www.neuron.yale.edu/neuron/what_is_neuron - Last access: 2016. – Title from the screen.
- 159.** Schuhmann K. Intracellular Ca^{2+} inhibits smooth muscle L-type Ca^{2+} channels by activation of protein phosphatase type 2B and by direct interaction with the channel. / Schuhmann K., Romanin C., Baumgartner W., Groschner K. // J Gen Physiol.-1997.-V.110, № 5.-p.503-513.
- 160.** Wang R. Two types of calcium channels in isolated smooth muscle cells from rat tail artery. / Wang R., Karpinski E., Pang P.K. // Am J Physiol.-1989.-V.256, № 5 Pt. 2.-p.H1361-1368.
- 161.** Koschak A. $\alpha 1D$ (Cav1.3) subunits can form l-type Ca^{2+} channels activating at negative voltages. / Koschak A., Reimer D., Huber I., Grabner M., Glossmann H., Engel J., Striessnig J. // J Biol Chem.-2001.-V.276, № 25.-p.22100-22106.
- 162.** Mazzanti M. Gating of L-type Ca^{2+} channels in embryonic chick ventricle cells: dependence on voltage, current and channel density. / Mazzanti M., DeFelice L.J., Liu Y.M. // J Physiol.-1991.-V.443.-p.307-334.

- 163.** Zong X. Ca(2+)-dependent inactivation of the class C L-type Ca²⁺ channel is a property of the alpha 1 subunit. / Zong X., Hofmann F. // FEBS Lett.-1996.-V.378, № 2.-p.121-125.
- 164.** Schuhmann K. Intracellular Ca²⁺ inhibits smooth muscle L-type Ca²⁺ channels by activation of protein phosphatase type 2B and by direct interaction with the channel. / Schuhmann K., Romanin C., Baumgartner W., Groschner K. // J Gen Physiol.-1997.-V.110, № 5.-p.503-513.
- 165.** Traboulsie A. Subunit-specific modulation of T-type calcium channels by zinc. / Traboulsie A., Chemin J., Chevalier M., Quignard J.F., Nargeot J., Lory P. // J Physiol.-2007.-V.578, Pt. 1.-p.159-171.
- 166.** Jaffe D.B. Shaping of action potentials by type I and type II large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. / Jaffe D.B., Wang B., Brenner R. // Neuroscience.-2011.-V.192.-p.205-218.
- 167.** Makary S.M. A difference in inward rectification and polyamine block and permeation between the Kir2.1 and Kir3.1/Kir3.4 K⁺ channels. / Makary S.M., Claydon T.W., Enkvetchakul D., Nichols C.G., Boyett M.R. // J Physiol.-2005.-V.568, Pt. 3.-p.749-766.
- 168.** Koumi S. Characterization of the calcium-activated chloride channel in isolated guinea-pig hepatocytes. / Koumi S., Sato R., Aramaki T. // J. Gen. Physiol.-1994.-V.104, № 2.-p.357-373.
- 169.** Destexhe A. Ionic mechanisms for intrinsic slow oscillations in thalamic relay neurons. / Destexhe A., Babloyantz A., Sejnowski T.J. // Biophys J.-1993.-V.65, № 4.-p.1538-1552.
- 170.** Croisier H. Activation of store-operated calcium entry in airway smooth muscle cells: insight from a mathematical model. / Croisier H., Tan X., Perez-Zoghbi J.F., Sanderson M.J., Sneyd J., Brook B.S. // PLoS One.-2013.-V.8, № 7.-p.e69598.
- 171.** Means S. Reaction diffusion modeling of calcium dynamics with realistic ER geometry. / Means S., Smith A.J., Shepherd J., Shadid J., Fowler J., Wojcikiewicz R.J., Mazel T., Smith G.D., Wilson B.S. // Biophys J.-2006.-V.91, № 2.-p.537-557.

- 172.** Jaffe D.B. Shaping of action potentials by type I and type II large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. / Jaffe D.B., Wang B., Brenner R. // Neuroscience.-2011.-V.192.-p.205-218.
- 173.** Hashitani H. Mechanisms of excitatory neuromuscular transmission in the guinea-pig urinary bladder. / Hashitani H., Bramich N.J., Hirst G.D. // J Physiol.-2000-V.524, № 2.-p.565-579.
- 174.** Heppner T.J. Nerve-evoked purinergic signalling suppresses action potentials, Ca^{2+} flashes and contractility evoked by muscarinic receptor activation in mouse urinary bladder smooth muscle. / Heppner T.J., Werner M.E., Nausch B., Vial C., Evans R.J., Nelson M.T. // The Journal of Physiology.-2009.-V.587, Pt. 21.-p.5275-5288.
- 175.** Carnevale N. T. The NEURON Book. / Carnevale N. T., Hines M. L. - Cambridge Univ. Press: Cambridge, 2006. – 742 p.
- 176.** Haslam J. Therapeutic Management of Incontinence and Pelvic Pain. Pelvic Organ Disorders [Text] / J. Haslam, J. Laycock. - Springer-Verlag: London, 2008. – 301 p.
- 177.** Petkov G.V. Central role of the BK channel in urinary bladder smooth muscle physiology and pathophysiology. / Petkov G.V. // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.-2014.-V.307, № 6.-p.R571-584.
- 178.** Shimizu T. TMEM16F is a component of a Ca^{2+} -activated Cl^{-} channel but not a volume-sensitive outwardly rectifying Cl^{-} channel. / Shimizu T., Iehara T., Sato K., Fujii T., Sakai H., Okada Y. // Am. J. Physiol. (Cell Physiol.).-2013.-V.304, № 8.-p.748-759.
- 179.** Xiao Q. Voltage- and calcium-dependent gating of TMEM16A/Ano1 chloride channels are physically coupled by the first intracellular loop. / Xiao Q, Yu K, Perez-Cornejo P, Cui Y, Arreola J, Hartzell HC. // PNAS.-2011.-V.108, № 21.-p.8891-8896.
- 180.** Duran C., Qu Z., Osunkoya A.O., Cui Y., Hartzell H.C. ANOs 3-7 in the anoctamin/Tmem16 Cl^{-} channel family are intracellular proteins. / Duran C., Qu Z., Osunkoya A.O., Cui Y., Hartzell H.C. // Am.J. Physiol. (Cell Physiol.).-2012.-V.302, № 3.-p.482-493.

- 181.** Kuruma A. Bimodal control of a Ca^{2+} -activated Cl^- channel by different Ca^{2+} signals. / Kuruma A., Hartzell H.C. // J. Gen. Physiol.-2000.-V.115, № 1.-p.59-80.
- 182.** Arreola J. Activation of calcium-dependent chloride channels in rat parotid acinar cells. / Arreola J., Melvin J.E., Begenisich T. // J. Gen. Physiol.-1996.-V.108, № 1.-p.35-47.
- 183.** Sui G.P. The electrophysiological properties of cultured and freshly isolated detrusor smooth muscle cells. / Sui G.P., Wu C., Fry C.H. // J. Urol.-2001.-V.165, № 2.-p.627-632.
- 184.** Green K.A. A patch-clamp study of K^+ -channel activity in bovine isolated tracheal smooth muscle cells. / Green K.A., Foster R.W., Small R.C. // Br J Pharmacol.-1991.-V.102, № 4.-p.871-878.
- 185.** Lue T.F. Intraoperative electrostimulation of the cavernous nerve: technique, results and limitations. / Lue T.F., Gleason C.A., Brock G.B., Carroll P.R., Tanagho E.A. // J Urol.-1995.-V.154, № 4.-p.1426–1428.
- 186.** Hanna N.N. Intraoperative parasympathetic nerve stimulation with tumescence monitoring during total mesorectal excision for rectal cancer. / Hanna N.N., Guillem J., Dosoretz A., Steckelman E., Minsky B.D., Cohen A.M. // J AmCollSurg.-2002.-V.195, № 4.-p.506–512.
- 187.** da Silva G.M. The efficacy of a nerve stimulator (CaverMap) to enhance autonomic nerve identification and confirm nerve preservation during total mesorectal excision. / da Silva G.M., Zmora O., Börjesson L., Mizhari N., Daniel N., Khandwala F., Efron J., Weiss E.G., Nogueras J.J., Vernava A.M. 3rd, Wexner S.D. // Dis Colon Rectum.-2004.-V.47, № 12.-p.2032–2038.
- 188.** Kneist W. Intraoperative identification and neurophysiologic parameters to verify pelvic autonomic nerve function during total mesorectal excision for rectal cancer. / Kneist W., Heintz A., Junginger T. // J Am Coll Surg.-2004.-V.198, № 1.-p.59–66.
- 189.** Kneist W. Validity of pelvic autonomic nerve stimulation with intraoperative monitoring of bladder function following to talmesorectal excision for rectal cancer. / Kneist W., Junginger T. // Dis Colon Rectum.-2005.-V.48, № 2.-p.262–269.

- 190.** Katahira A. Intraoperative electrical stimulation of the pelvic splanchnic nerves during nerve-sparing radical hysterectomy. / Katahira A., Niikura H., Kaiho Y., Nakagawa H., Kurokawa K., Arai Y., Yaegashi N. // *Gynecol Oncol.*-2005.-V.98, № 3.-p.462–466.
- 191.** Park M.K. Local uncaging of caged $\text{Ca}^{(2+)}$ reveals distribution of $\text{Ca}^{(2+)}$ -activated $\text{Cl}^{(-)}$ channels in pancreatic acinar cells. / Park M.K., Lomax R.B., Tepikin A.V., Petersen O.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*-2001.-V.98, № 19.-p.10948-10953.
- 192.** Belan P.V. Calcium clamp in single nerve cells. / Belan P.V., Kostyuk P.G., Snitsarev V.A., Tepikin A.V. // *Cell Calcium.*-1993.-V.14, № 6.-p.419-425.
- 193.** Belan P. Calcium clamp in isolated neurons of the snail *Helix pomatia*. / Belan P., Kostyuk P., Snitsarev V., Tepikin A. // *J. Physiol.*-1993.-V.462.-p.47-58.
- 194.** Patel S. Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular Ca^{2+} signaling. / Patel S., Docampo R. // *Trends Cell Biol.*-2010.-V.20, № 5.-p.277-286.
- 195.** D'Agostino G. Purinergic P2X₃ heteroreceptors enhance parasympathetic motor drive in isolated porcine detrusor, a reliable model for development of P2X selective blockers for detrusor hyperactivity. / D'Agostino G., Condino A.M., Calvi V., Boschi F., Gioglio L., Barbieri A. // *Pharmacol Res.*-2012.-V.65, № 1.-p.129-136.
- 196.** Bolton T.B. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. / Bolton T.B. // *Physiol Rev.*-1979.-V.59, № 3.-p.606-718.
- 197.** Crill W.E. Persistent sodium current in mammalian central neurons. / Crill W.E. // *Annu Rev Physiol.*-1996.-V.58.-p.349-362.
- 198.** Dib-Hajj S. Na_v1.9: a sodium channel with unique properties. / Dib-Hajj S., Black J.A., Cummins T.R., Waxman S.G. // *Trends Neurosci.*-2002.-V.25, № 5.-p.253-259.
- 199.** Maingret F. Inflammatory mediators increase Nav1.9 current and excitability in nociceptors through a coincident detection mechanism. / Maingret F., Coste B., Padilla F., Clerc N., Crest M., Korogod S.M., Delmas P. // *J Gen Physiol.*-2008.-V.131, № 3.-p.211-225.

- 200.** Korogod S.M. Dynamic excitation states and firing patterns are controlled by sodium channel kinetics in myenteric neurons: a simulation study. / Korogod S.M., Osorio N., Kulagina I.B., Delmas P. // *Channels (Austin)*.-2014.-V.8, № 6.-p.536-543.
- 201.** Osorio N. Specialized functions of Nav1.5 and Nav1.9 channels in electrogenesis of myenteric neurons in intact mouse ganglia. / Osorio N., Korogod S., Delmas P. // *J Neurosci*.-2014.-V.34, № 15.-p.5233-5244.
- 202.** Tan H.L. Sodium channel variants in heart disease: expanding horizons. / Tan H.L. // *J Cardiovasc Electrophysiol*.-2006.-V.17, Suppl. 1.-p.S151-S157.
- 203.** Shuba M.F. The effect of sodium-free and potassium-free solutions, ionic current inhibitors and ouabain on electrophysiological properties of smooth muscle of guinea-pig ureter. / Shuba M.F. // *J Physiol*.-1977.-V.264, № 3.-p.837-851.
- 204.** Igawa Y. Cystometric findings in mice lacking muscarinic M2 or M3 receptors. / Igawa Y., Zhang X., Nishizawa O., Umeda M., Iwata A., Taketo M.M., Manabe T., Matsui M., Andersson K.E. // *J. Urol*.-2004.-V.172, № 6, Pt. 1.-p.2460-2464.