

## ХАРАКТЕРИСТИКИ ВОЗБУДИМОСТИ ГЛАДКОМЫШЕЧНОЙ КЛЕТКИ ДЕТРУЗОРА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ КАК ОСНОВА ВЫБОРА ПАРАМЕТРОВ РЕАБИЛИТАЦИОННОЙ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИИ: МОДЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Поступила 20.02.14

При лечении нейроурологических заболеваний (в частности, сопряженных с дефицитом М2/М3-холинорецепторов и опосредуемой ими парасимпатической иннервации гладкомышечных клеток детрузора мочевого пузыря – ГМК ДМП) в комплексе реабилитационных процедур применяется электростимуляция, нацеленная на эти клетки. Обоснование выбора параметров такой стимуляции затруднено ввиду ограниченности знаний о биофизических и физиологических процессах, вызываемых в стимулируемых клетках. Определенная информация о таких процессах может быть получена с использованием компьютерной модели ГМК ДМП. Модель была построена на основе полученных в натурных экспериментах сведений об ионных каналах и насосах сарколеммы и механизмах регуляции внутриклеточной концентрации кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ) в клетке-прототипе. Исследовали стандартные характеристики электровозбудимости модельной ГМК (отношение сила–длительность для порогового тока, динамика рефрактерности после генерации потенциала действия – ПД), а также сопряженные изменения мембранного потенциала, парциальных трансмембранных токов и значений  $[Ca^{2+}]_i$ , вызванные толчками деполяризующего тока. В части вычислительных экспериментов такую стимуляцию осуществляли в условиях более высокой проводимости пуринергических ионотропных рецепторных каналов, имитируя тем самым действие пуриномиметиков. Модельная ГМК ДМП генерировала ПД с параметрами, близкими к прототипу, после чего наблюдались длительные периоды абсолютной и относительной рефрактерности (до 30 и 600 мс соответственно). Период относительной рефрактерности включал в себя раннюю (половинное восстановление ПД, продолжительность до 220 мс) и позднюю фазы, а в каждой из этих фаз выделялись «быстрая» и «медленная» составляющие с постоянными времени, различающимися почти на порядок. Данные временные характеристики рефрактерности определялись кинетическими характеристиками процессов активации/инактивации потенциал- и кальцийзависимых ионных каналов, а также возвращения  $[Ca^{2+}]_i$  к базальному уровню под действием совокупности механизмов экстружии  $Ca^{2+}$ . Важным биофизическим параметром ГМК ДМП был также потенциал инверсии ( $E_{Cl}$ ) кальцийзависимого хлорного тока (активирующегося, в частности, в результате парасимпатического действия на М2/М3-рецепторы). При превышении мембранным потенциалом уровня  $E_{Cl}$  указанный ток изменял свое основное, деполяризующее, направление на гиперполяризующее.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** математическая модель, гладкомышечная клетка (ГМК), детрузор мочевого пузыря (ДМП), электростимуляция, М2/М3-холинорецепторы, пуринорецепторы.

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

<sup>2</sup> Коммунальное учреждение «Днепропетровский специализированный клинический медицинский центр матери и ребенка им. проф. М. Ф. Руднева» Днепропетровского областного совета (Украина).

<sup>3</sup> Государственное учреждение «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины» (Украина).

Эл. почта: kochenov\_artem@yahoo.com (А. В. Коченов);

piddubna.olena@gmail.com (Е. П. Поддубная);

igor\_makedonsky@yahoo.com (И. А. Македонский);

dnipro@biph.kiev.ua (С. М. Корогод).

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время электрическая стимуляция органов и тканей весьма широко применяется при хирургических вмешательствах. Такая стимуляция позволяет выявить в оперируемой ткани участки залегания нервных волокон, что помогает предотвратить денервацию органов и связанные с этим тяжелые функциональные последствия. Зондирующая интраоперационная электростимуляция (ИЭС) используется при органо- и нервосберегающей (nerve-sparing) простатэктомии [1], хирургии рака прямой кишки [2–5] и матки [6]. В последние годы ИЭС успешно применяется также для хирургической коррекции врожденных аноректальных (атрезия прямой кишки – АПК) и урологических (экстрофия мочевого пузыря – тотальная эписпадия – ЭМПТЭ) пороков развития у детей [7, 8]. После операций по поводу указанных пороков чрезтканевая электростимуляция мышц тазового дна и детрузора мочевого пузыря (ДМП) является важным компонентом комплекса процедур медицинской реабилитации [9]. Выбор параметров применяемой в этих случаях электростимуляции затруднен тем, что информация о характеристиках биофизических и физиологических процессов в соответствующих клетках-мишенях весьма ограничена. Дополнительные сложности связаны с тем, что пороки развития органов сопровождаются рядом патологических изменений на клеточном уровне. В ткани ДМП новорожденных, страдающих ЭМПТЭ и АПК, клеточные холинорецепторы М2- и М3-типов по сравнению с нормой малочисленны либо даже отсутствуют [10, 11]. Очевидно, что такая молекулярная патология гладкомышечных клеток (ГМК) ДМП не может не сказаться на функциональных эффектах адресованных им парасимпатических воздействий. Существующие методические (а в случае клинической практики и этические) ограничения делают практически невозможным прямое экспериментальное исследование сопряженных электрических и концентрационных процессов в ГМК ДМП. Поэтому в настоящей работе мы использовали компьютерное моделирование как эффективный комплементарный метод, приобретающий все более широкое распространение в клеточной биофизике и физиологии. Наша модель ГМК ДМП включала в себя присущие клеткам-прототипам основные типы ионных каналов, обменников, а также механизмов регуляции внутриклеточной концентрации кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ). В данной работе мы ограничи-

лись рассмотрением эффектов прямого возбуждающего действия электрических стимулов на ГМК. Эффекты парасимпатических и/или симпатических воздействий и их комбинаций с прямыми влияниями электростимуляции предполагается исследовать в дальнейшем. Рассмотрены также возможные эффекты, связанные с увеличением максимальной проводимости пуриnergических Р2X-рецепторных ионных каналов (что может быть результатом действия пуриномиметиков).

## ОПИСАНИЕ МОДЕЛИ

Исследования были проведены на подробно описанной в нашей предыдущей работе [12] модифицированной модели ГМК ДМП. ГМК данного органа представлялась как мембранный цилиндр длиной 100 мкм и диаметром 5 мкм, что соответствует усредненным размерам прототипа [13–15]. Эти параметры были фиксированными (изометрический режим). Удельная ёмкость мембраны  $C_m = 1.426$  мкФ/см<sup>2</sup> была рассчитана как отношение усредненной полной емкости таких клеток [16] к площади поверхности вышеуказанного мембранного цилиндра. Модель включала в себя характерные для прототипа ионные каналы и насосы, а также механизмы регуляции внутриклеточного кальция. В состав каналов входили описываемые уравнениями типа Ходжкина – Хаксли [12] каналы пассивной утечки, кальциевые каналы L- и T-типов, неактивирующиеся натриевые каналы, калиевые каналы трех типов (задержанного выпрямления, относящиеся к подсемейству Kir2.1 и кальцийзависимые типа BK), активируемые парасимпатическими влияниями кальцийзависимые хлорные каналы и Р2X-рецепторные каналы. Отношение максимальных проводимостей хлорных и Р2X-каналов (95:5) соответствовало экспериментальным данным о соотношении холинergicкого и пуриnergического компонентов реакций на парасимпатические воздействия [17]. Величина  $[Ca^{2+}]_i$  регулировалась кальциевыми насосами сарколеммы и эндосаркоплазматического ретикулума, буферизацией  $Ca^{2+}$  и диффузией этих ионов из примембранного слоя вглубь цитозоля.

Регистрировали реакции модельной ГМК на приложение одиночных и парных толчков тока. Электровозбудимость ГМК характеризовали отношением сила–длительность для толчков деполяризующего тока, пороговых для генерации полно-

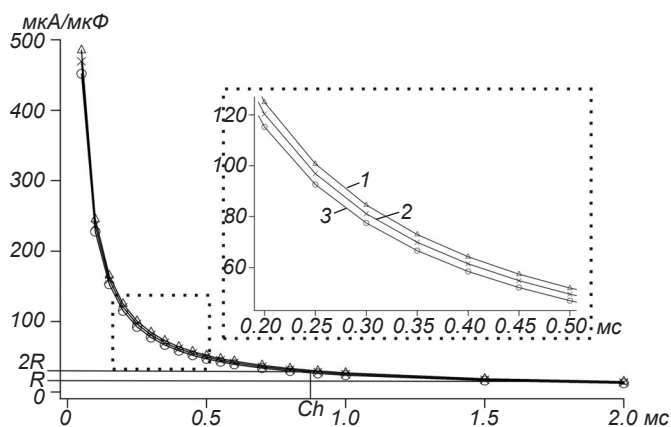
масштабного потенциала действия (ПД), а также зависимостью амплитуды регенеративного ответа, генерируемого после повторной стимуляции, от интервала времени после генерации предшествующего ПД. При этом динамику восстановления ПД количественно описывали двойными экспоненциальными приближающими функциями вида

$$f(t) = K_0 + K_1 \cdot \exp(K_2 \cdot t) + K_3 \cdot \exp(K_4 \cdot t), \quad (1)$$

параметры которых  $K_0$ – $K_4$  определяли по критерию минимума среднеквадратического отклонения  $\sigma = \sum_i = 1^N (f_i - f_i')^2$  ([18]).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*Характеристики электровозбудимости модельной ГМК.* Графики сила–длительность были построены для трех значений проводимости P2X-



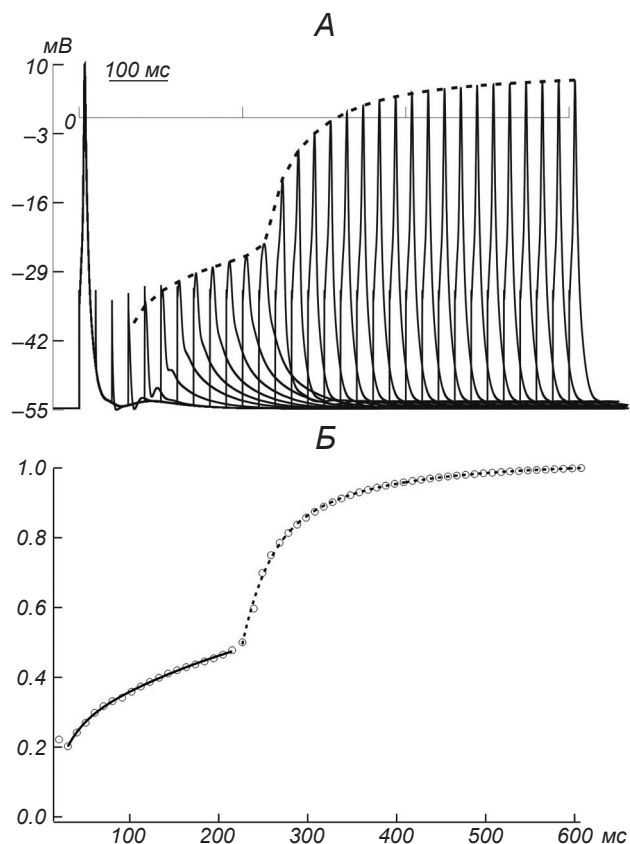
**Р и с. 1.** Отношения сила–длительность для тока стимуляции модельной гладкомышечной клетки детрузора мочевого пузыря в отсутствие и при наличии тонической активации P2X-рецепторных каналов.

По оси абсцисс – амплитуда (мкА/мкФ); по оси ординат – длительность (мс) прямоугольного толчка тока, порогового для вызова потенциала действия. Нулевой, нормальной и повышенный уровни активации P2X-рецепторов представлены постоянными проводимостями, соответственно равными 0 (1), 52.8 (2) и 105.6 (3) мкСм/см<sup>2</sup>. Ограниченный прямоугольником фрагмент, соответствующий используемому в протоколах клинической электростимуляции диапазону длительности стимулов, показан на вставке справа в увеличенном масштабе. Выделенные значения реобазы ( $R = 14.73$  мкА/мкФ) и хронаксии ( $Ch = 0.9178$  мс) рассчитаны при нулевой проводимости P2X-каналов.

**Р и с. 1.** Відношення сила–тривалість для струму стимуляції модельної гладеньком'язової клітини детрузора сечового міхура за відсутності та при наявності тонічної активації P2X-рецепторних каналів.

рецепторных каналов (0, 52.8 и 105.6 мкСм/см<sup>2</sup>), которые соответствовали отсутствию и наличию тонического действия пуриномиметиков, имеющего различную интенсивность. При нулевой проводимости P2X-каналов реобазный ток был равен 14.73 мкА/мкФ, хронаксия – 0.9178 мс. Введение P2X-проводимости, равной 52.8 или 105.6 мкСм/см<sup>2</sup>, вызывало уменьшение реобазного тока до 13.58 или 12.4487 мкА/мкФ, т. е. на 7.8 или 15.49 % соответственно. Хронаксия, характеризующая кинетические свойства возбудимости, увеличилась до 0.9411 или 0.9622 мс соответственно. Таким образом, активация ионотропных пуринорецепторов несколько снижала порог электрического возбуждения ГМК.

Выявленная с использованием парных пороговых толчков тока (125 мкА/мкФ, 0.2 мс) динамика рефрактерности показана на рис. 2, А, Б. Приложение первого стимула вызывало типичный ПД. Амплитуда его составляла 67.7 мВ, а длительность – ~10.5 мс на уровне половины амплитуды и ~50 мс на уровне потенциала покоя. После этого наблюдалась длительная (~160 мс) низкоамплитудная (смещение на 1.31 мВ на 87-й мс) следовая деполяризация. На рис. 3, А–Г такой ответ развернут и представлен вместе с сопровождающими его кальциевым транзиентом и парциальными ионными токами. Изменения возбудимости после генерации ПД имели ряд особенностей. Периоды как абсолютной, так и относительной рефрактерности были весьма продолжительными (порядка 20–22 и 620 мс соответственно). Период относительной рефрактерности мог быть разделен на две фазы (рис. 2, А, Б) – раннюю (25–220 мс) и позднюю (220–620 мс), соответствующие 50 %-ному и полному восстановлению ПД. В пределах каждой фазы процесс восстановления ПД имел «быструю» и «медленную» составляющие. Об их наличии свидетельствовало то, что огибающая амплитуды ответов как в ранней, так и в поздней фазе хорошо аппроксимировалась двойными экспоненциальными функциями (Б), определяемыми уравнением (1). При значениях параметров  $K_0 = 0.69105 \pm 0.102$ ,  $K_1 = -0.3021 \pm 0.0704$  и  $K_2 = 0.052094 \pm 0.0143$ ,  $K_3 = -0.47768 \pm 0.077$ ,  $K_4 = 0.0036767 \pm 0.00142$  для ранней фазы и  $K_0 = 1.0108 \pm 0.00599$ ,  $K_1 = -597.49 \pm 383$  и  $K_2 = 0.033513 \pm 0.00328$ ,  $K_3 = -1.271 \pm 0.559$ ,  $K_4 = 0.0078455 \pm 0.00136$  для поздней фазы эти функции характеризовались очень малыми среднеквадратическими отклонениями ( $\sigma = 9.46708e-05$  и 0.000791676 соответственно). Таким образом, по-



**Рис. 2.** Динамика рефрактерности модельной гладкомышечной клетки детрузора мочевого пузыря после генерации ею потенциала действия (ПД).

*A* – восстановление амплитуды ответа на повторную тест-стимуляцию, прилагаемую с разными задержками после кондиционирующей. Сила (125 мкА/мкФ) и длительность (0.2 мс) обоих стимулов одинаковы. Пунктирная линия – огибающая максимумов регенеративных сдвигов мембранного потенциала. *B* – та же динамика, что и на *A*, но амплитуды ответов  $V = E - E_r$  отсчитаны от уровня потенциала покоя ( $E_r = -54.6727$  мВ) и нормированы относительно максимального значения  $V_{max}$  (указано кружками). Сплошная и штриховая линии – графики приближающих двойных экспоненциальных функций, определяемых уравнением (1) в пределах интервалов времени, которые соответствуют ранней и поздней фазам восстановления ПД.

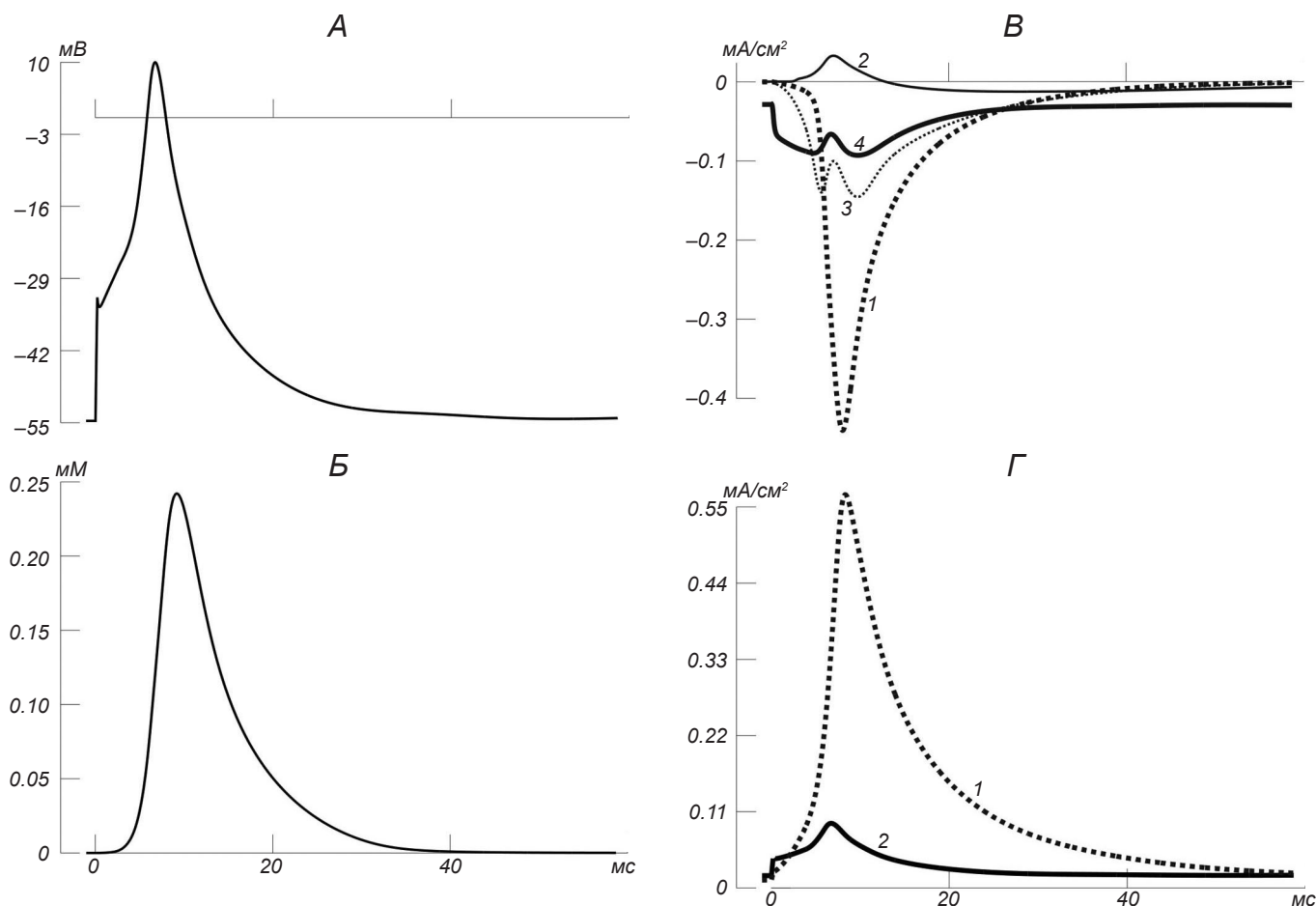
**Рис. 2.** Динаміка рефрактерності модельної гладеньком'язової клітини детрузора сечового міхура після генерації нею потенціалу дії.

стоянные времени «быстрой» и «медленной» составляющих процесса восстановления ПД ( $\tau_f = 1/K_2$  и  $\tau_s = 1/K_4$ ) различались почти на порядок: для ранней фазы  $\tau_f = 19.2$  и  $\tau_s = 271.98$  мс, а для поздней –  $\tau_f = 29.8$  и  $\tau_s = 127.41$  мс.

Расчеты парциальных токов и транзientа  $[Ca^{2+}]_i$ , сопровождавших полномасштабный ПД, показали особенности их временного течения и соотно-

шения величин (рис. 3, *A–Г*). ПД (*A*) сопровождался быстрым и значительным повышением  $[Ca^{2+}]_i$ , которая достигала пика через 2.45 мс после максимума этого потенциала. Далее упомянутая концентрация экспоненциально ( $\tau$  около 6.7 мс) снижалась к 50-й мс до 285 нМ и медленно возвращалась к базальному уровню (34 нМ); на 300-й мс  $[Ca^{2+}]_i$  составляла 60 нМ (*B*). Такое преходящее увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  вызывало соответствующее уменьшение потенциала равновесия  $E_{Ca}$  от 132 мВ в состоянии покоя до 25.42 мВ на максимуме  $[Ca^{2+}]_i$ ; восстановление  $E_{Ca}$  занимало около 600 мс (не иллюстрируется). В пределах фазы нарастания ПД (*A*) среди определяющих ее деполяризующих токов (*B*) наиболее выразительно увеличивался вначале натриевый, а за ним последовательно кальциевые токи Т- и L-типа. Кальцийзависимый хлорный ток инвертировался в гиперполяризационный; он нарастал наиболее медленно (соответственно наиболее медленной кинетике его потенциалзависимой активации, нивелировавшей быструю кальцийзависимую активацию). Следует отметить, что в суммарном кальциевом токе отношение L- и Т-компонентов (74.11 и 25.89 %) было близко к экспериментально зарегистрированным значениям. Потенциалзависимая инактивация Т-тока быстро нарастала, становилась полной в интервале 5–8 мс, после чего быстро уменьшалась, и этот процесс практически заканчивался к 30-й мс (доля деинaktivированных каналов увеличивалась до 95 % на 18-й и до 99 % на 30-й мс). У L-тока аналогичный процесс был менее глубоким и быстрым; максимум наблюдался на 20-й мс, а возврат к начальному уровню был длительным (~600 мс). Кальцийзависимая инактивация L-тока, практически отсутствовавшая в состоянии покоя, по сравнению с потенциалзависимой была почти столь же длительной, но более глубокой. Примечательные особенности токов наблюдались в интервалах времени, соответствующих пику ПД, когда мембранный потенциал  $E$  максимально приближался к потенциалам равновесия – постоянному  $E_{Na} = 50$  мВ и динамически меняющемуся  $E_{Ca}$  (см. выше) – и становился более деполяризационным, чем  $E_{Cl} = -32$  мВ (т. е. тогда, когда движущие потенциалы ( $E - E_{Na}$  и  $E - E_{Ca}$ ) были наименьшими, а ( $E - E_{Cl}$ ) менял знак на противоположный). Соответственно, натриевый ток и кальциевый ток Т-типа уменьшались по абсолютной величине, а кальцийзависимый хлорный ток менял направление на противоположное, гиперполяризующее (*B*). Кальциевый ток L-типа нараст-





**Р и с. 3.** Сопровождающие генерацию потенциалов действия – ПД (А) изменения внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (Б) и парциальных входящих (В) и выходящих (Г) трансмембранных токов.

По оси абсцисс – время, мс; по осям ординат – трансмембранный потенциал, мВ (А, показан первый ПД из рис. 2, А), внутриклеточная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$ , мкМ (Б), плотности парциальных токов – входящих  $I_{\text{Na}}$  (4,  $\text{mA}/\text{cm}^2$ ),  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  (2),  $I_{\text{CaT}}$  (3),  $I_{\text{CaL}}$  (1,  $\text{mA}/\text{cm}^2$ ) (В) и выходящих  $I_{\text{K}}$  (1) и  $I_{\text{Leak}}$  (2,  $\text{mA}/\text{cm}^2$ ) (Г). На В  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  – знакопеременный. Калибровки времени общие для всех записей.

**Р и с. 3.** Супроводжуючі генерацию потенціалів дії (А) зміни внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  (Б) та парціальних вхідних (В) і вихідних (Г) трансмембранных струмів.

тал до максимума через 0.66 мс после максимума ПД и далее спадал. Эти особенности указывают на то, что во время ПД при пиковой деполяризации ослабляющие эффекты уменьшения движущих потенциалов нейтрализуют усиливающие эффекты активации потенциалзависимых проводимостей (натриевой и кальциевой Т-типа).

Примечательны и особенности более сложной динамики кальцийзависимого хлорного тока (рис. 3, В) в сопоставлении не только с динамикой мембранного потенциала, определяющего соответствующую парциальную проводимость (Г), но и с динамикой  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Последний параметр достигал максимума через 8.95 мс после окончания стимула (Б), т. е. в промежутке между максимумами кальциевого

тока L-типа (7.8 мс) и значительно меньшего тока Т-типа (9.5 мс) (В). Начиная с момента 12.775 мс после стимула деполяризация опускалась ниже потенциала инверсии  $E_{\text{Cl}} = -32$  мВ; соответственно хлорный ток вновь становился деполяризационным и на фоне повышенной  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  усиливался до максимума (через 27.875 мс, В), поддерживая следовую деполяризацию. Последняя выглядела как низкоамплитудная волна с максимумом на 87.575 мс (Б). Временной ход тока утечки (Г) ввиду постоянства проводимости при неизменном потенциале инверсии в точности следовал траектории мембранного потенциала (А), а суммарный калиевый ток (Г) достигал максимума на 8.1 мс, т. е. почти одновременно с максимумом  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (8.95 мс), что указывает

на определяющую роль ВК-компонента в генерации этого суммарного тока.

*Возможности и ограничения используемой модели ГМК.* Основные характеристики описанных выше электрических и концентрационных процессов в модельной ГМК ДМП близки к опубликованным данным экспериментальных исследований клеток-прототипов. Это позволяет считать указанную модель достаточно адекватной, хотя ей, как и любым моделям, присущи упрощения и ограничения. Принятые нами упрощения и связанные с ними ограничения обусловлены недостаточной (по сравнению с возбудимыми клетками других типов) изученностью состава и характеристик ионных каналов и внутриклеточных сигнальных механизмов в ГМК ДМП. Тем не менее набор ионных каналов и механизмов регулирования  $[Ca^{2+}]_i$ , использованный в модели, позволил воспроизвести ряд важных свойств прототипа. Так, модельная ГМК имела потенциал покоя  $-54.7$  мВ, близкий к таковому прототипа [21, 22], и генерировала типичный ПД (рис. 3, А). Этот потенциал сопровождался необходимым для мышечного сокращения переходящим повышением  $[Ca^{2+}]_i$  в результате входа указанных ионов через кальциевые каналы и высвобождения кальция из депо. На максимуме ПД соотношение L- и T-компонентов в общем кальциевом токе было близко к экспериментальным данным, согласно которым вклад тока T-типа в клетках детрузора составляет 20–30 % [20]. Следовые де- и гиперполяризационные процессы, присущие прототипу, были приурочены к временным интервалам доминирования соответствующих токов.

Ряд упрощений модели касались как биофизических механизмов (мембранных и внутриклеточных), так и протоколов исследования. Если говорить о динамике  $[Ca^{2+}]_i$ , то, хотя кальциевые насосы сарколеммы и эндосаркоплазматического ретикула представлены довольно подробно, механизмы связывания  $Ca^{2+}$  внутриклеточными белками и буферами объединены в общий механизм восстановления. Базальный уровень  $[Ca^{2+}]_i$  в модели, равный 34 нМ, имеет тот же порядок, что и наблюдаемый в свежеизолированных ГМК ДМП человека (100 нМ) [23]; характеристическая постоянная времени изменений этого параметра также согласуется с опубликованными данными [24]. В отсутствие сведений о концентрации  $Ca^{2+}$  в ГМК ДМП при возбуждении, особенно в условиях повторной электростимуляции, широко применяемой во время реабилитации [19], оценить близость пиковых уровней

$[Ca^{2+}]_i$  в модельной ГМК и таковых в прототипе затруднительно.

Один из важных и, на наш взгляд, дискуссионных моментов касался включения в модель каналов неинактивирующегося натриевого тока. Существенное участие такого не чувствительного к тетродотоксину (ТТХ) тока в генерации платоподобных потенциалов и других видов деполяризационных ответов нейронами ЦНС [25] и периферической нервной системы [26, 27], миентерическими сенсорными нейронами [28, 29] и кардиомиоцитами [30] было описано ранее. В отсутствие прямых данных в отношении ГМК ДМП включение указанных каналов в модель этих клеток основывалось на следующих косвенных соображениях. В недавнем обзоре [31] было отмечено, что в мембране ГМК могут присутствовать истинные (genuine) натриевые каналы, как чувствительные, так и не чувствительные к ТТХ. В пользу наличия неинактивирующихся (или медленно инактивирующихся) натриевых каналов в ГМК мочевыводящих путей свидетельствуют данные исследований Брединга и Брайна [32], обнаруживших, что длительность ПД, генерируемого ГМК уретры (т. е. клетками, по свойствам близкими к ГМК ДМП), в безнатриевой среде существенно сокращалась, причем в основном за счет плато, определяемого открыванием «медленных» натриевых каналов. Остальные типы ионных каналов модели в целом соответствуют обнаруженным в ГМК ДМП [31, 33–35].

Принципиальным ограничением нашей модели ГМК был изометрический режим ее исследования (следует, однако, упомянуть, что он широко используется в экспериментальных исследованиях мышечных клеток [36]). Другим ограничением было то, что в настоящей работе рассматривались только те процессы, которые вызывались прямым действием приложенного извне деполяризующего тока. При чрезкраневой электростимуляции клетка может испытывать не только эти влияния, но и воздействия нейромедиаторов, которые выделяются из окончаний возбужденных теми же стимулами парасимпатических и/или симпатических нервных волокон (данные эффекты явятся предметом отдельных исследований).

*Биофизические механизмы, определяющие электровозбудимость ГМК.* В качестве основных характеристик электровозбудимости исследуемой клетки мы рассматривали кривую сила–длительность (рис. 1) и динамику развивающейся после генерации ПД рефрактерности (рис. 2). Последнюю

описывали на основе сравнения амплитуд регенеративных ответов на приложение разнесённых во времени одинаковых толчков тока пороговой интенсивности (125 мкА/мкФ, 0.2 мс) (рис. 2, А, Б).

Кривая сила–длительность имела классический вид (рис. 1). Наблюдавшееся смещение этой кривой в сторону меньших значений пороговой интенсивности тока при увеличении проводимости P2X-рецепторных каналов (что имитировало действие пуриномиметиков) свидетельствовало о том, что электрическая возбудимость ГМК может подвергаться пуринаргической модуляции.

Особенностью длительного периода рефрактерности был ее двухфазный характер, причем каждая фаза процесса восстановления амплитуды ПД включала в себя «быструю» и «медленную» составляющие (рис. 2, А, Б). Сравнительный анализ временных характеристик ранней и поздней фаз восстановления ПД с кинетическими свойствами активации/инактивации ионных каналов и механизмов регуляции уровня внутриклеточного  $Ca^{2+}$  позволяет высказать ряд соображений о природе и особенностях рассматриваемой рефрактерности. Феномен рефрактерности связывают с инактивацией каналов деполяризующего тока, специфически чувствительных к мембранному потенциалу и/или значениям  $[Ca^{2+}]_i$ . Однако деполяризационный ответ может уменьшаться также в результате уменьшения движущего потенциала для деполяризующего тока, увеличения проводимости «деполяризующих» каналов и движущего потенциала для гиперполяризующего тока. Абсолютная рефрактерность, очевидно, определяется в нашем случае в основном инактивацией кальциевых каналов в течение первых 20–22 мс после инициации ПД. Каналы Т-типа полностью инактивированы в интервале 5–8 мс, а после их деинактивации (к 18-й мс) доминирующей становится инактивация L-каналов. Дополнительными факторами являются уменьшение движущего потенциала для натриевого тока, а также инверсия движущего потенциала для хлорного тока (потенциал становится гиперполяризационным на 15-й мс). Последующая деинактивация кальциевых каналов (потенциалзависимая составляющая) на фоне активировавшегося натриевого тока и вновь инвертированного (деполяризационного) хлорного тока определяет вступление клетки в раннюю фазу относительной рефрактерности. В интервале 100–350 мс процесс восстановления амплитуды ПД замедляется, что соответствует большому постоянному времени кальций- и

потенциалзависимой инактивации, равным 100 и 312 мс соответственно [12]. Вероятной причиной снижения величины ПД в пределах очень больших (~600 мс) интервалов является неполное восстановление базального уровня  $[Ca^{2+}]_i$  и  $E_{Ca}$ , что уменьшает движущий потенциал для кальциевых токов. Следовательно, величинами, определяющими самые «медленные» компоненты процесса восстановления регенеративного возбуждения, являются кинетические параметры механизмов экструзии  $Ca^{2+}$ .

В целом полученные в нашей работе характеристики возбудимости, а также электрических и концентрационных процессов, вызванных в модельной ГМК ДМП стимулирующими токами, могут послужить основой биофизически обусловленного выбора параметров реабилитационной электростимуляции.

Описанные выше результаты впервые иллюстрируют сопряженные электрические и концентрационные процессы в ГМК ДМП, развивающиеся при электростимуляции этих клеток, конкретизируют роль, которую в названных процессах играют отношения между временными параметрами стимуляции, с одной стороны, и кинетическими характеристиками ионных каналов, насосов и процессов буферизации/диффузии внутриклеточного кальция – с другой. Очевидно, что необходимо дальнейшее углубленное исследование упомянутых кинетических характеристик. Это создаст биофизические основы для оптимизации параметров электростимуляции ДМП, применяемой в клинике.

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

А. В. Коченов, Е. П. Поддубная, И. А. Македонский и С. М. Корогод подтверждают, что в процессе работы отсутствовали конфликты любого рода, касающиеся коммерческих или финансовых отношений, отношений с организациями или лицами, которые каким-либо образом могли быть связаны с исследованием, и взаимоотношений соавторов статьи.

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

#### ХАРАКТЕРИСТИКИ ЗБУДЛИВОСТІ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВОЇ КЛІТИНИ ДЕТРУЗОРА СЕЧО- ВОГО МІХУРА ЯК ОСНОВА ВИБОРУ ПАРАМЕТРІВ РЕАБІЛІТАЦІЙНОЇ ЕЛЕКТРОСТИМУЛЯЦІЇ: МОДЕЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

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

<sup>2</sup> Комунальний заклад „Дніпропетровський обласний спеціалізований клінічний медичний центр матері та дитини ім. М. Ф. Руднева Дніпропетровської обласної ради (Україна).

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

#### Резюме

При лікуванні нейроурологічних захворювань (зокрема, сполучених із дефіцитом М2/М3-холінорецепторів та опосередкованої ними парасимпатичної іннервації гладеньком'язових клітин детрузора сечового міхура – ГМК ДСМ) у комплексі реабілітаційних процедур застосовується електростимуляція, націлена на ці клітини. Обґрунтування вибору параметрів такої стимуляції ускладнено через обмеженість знань про біофізичні та фізіологічні процеси, викликані в стимульованих клітинах. Певна інформація про такі процеси може бути отримана з використанням комп'ютерної моделі ГМК ДСМ. Модель була побудована на базі отриманих в натурних експериментах відомостей щодо іонних каналів і насосів сарколеми та механізмів регуляції внутрішньоклітинної концентрації кальцію ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Досліджували стандартні характеристики електростимуляції модельної ГМК (відношення сила-тривалість для порогового струму, динаміка рефрактерності після генерації потенціалу дії – ПД), а також сполучені зміни мембранного потенціалу, парціальних трансмембранних струмів та значень  $[Ca^{2+}]_i$ , викликані поштовхами деполяризуючого струму. В частині обчислювальних експериментів таку стимуляцію здійснювали в умовах більш високої провідності пуринергічних іонотропних рецепторних каналів, імітуючи тим самим дію пуринометиків. Модельна ГМК ДСМ генерувала ПД з параметрами, близькими до прототипу, після чого спостерігалися тривалі періоди абсолютної і відносної рефрактерності (до 30 і 600 мс відповідно). Період відносної рефрактерності складався з ранньої (половинне відновлення ПД, тривалість до 220 мс) і пізньої фаз, а в кожній із цих фаз виділялися „швидка” і „повільна” складові зі сталими часами, що розрізнялися майже на порядок. Дані часові характеристики рефрактерності визначалися кінетичними характеристиками процесів активації/інактивації потенціал- і кальційзалежних іонних каналів, а також повернення  $[Ca^{2+}]_i$  до базального рівня під дією сукупності механізмів екструзії  $Ca^{2+}$ . Важливим біофізичним параметром ГМК ДСМ був також потенціал інверсії ( $E_{Cl}$ ) кальційзалежного хлорного струму (що активується, зокре-

ма, в результаті парасимпатичної дії на М2/М3-рецептори). При перевищенні мембранним потенціалом рівня  $E_{Cl}$  вказаний струм змінював свій основний, деполяризуючий, напрям на гіперполяризуючий.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. T. F. Lue, C. A. Gleason, G. B. Brock, et al., “Intraoperative electrostimulation of the cavernous nerve: technique, results and limitations,” *J. Urol.*, **154**, No. 4, 1426-1428 (1995).
2. N. N. Hanna, J. Guillem, A. Dosoretz, et al., “Intraoperative parasympathetic nerve stimulation with tumescence monitoring during total mesorectal excision for rectal cancer,” *J. Am. Coll. Surg.*, **195**, No. 4, 506-512 (2002).
3. G. M. da Silva, O. Zmora, L. Borjesson, et al., “The efficacy of a nerve stimulator (CaverMap) to enhance autonomic nerve identification and confirm nerve preservation during total mesorectal excision,” *Dis. Colon. Rectum*, **47**, No. 12, 2032-2038 (2004).
4. W. Kneist, A. Heintz, and T. Junginger, “Intraoperative identification and neurophysiologic parameters to verify pelvic autonomic nerve function during total mesorectal excision for rectal cancer,” *J. Am. Coll. Surg.*, **198**, No. 1, 59-66 (2004).
5. W. Kneist and T. Junginger, “Validity of pelvic autonomic nerve stimulation with intraoperative monitoring of bladder function following to talmesorectal excision for rectal cancer,” *Dis. Colon. Rectum*, **48**, No. 2, 262-269 (2005).
6. A. Katahira, H. Niikura, Y. Kaiho, et al., “Intraoperative electrical stimulation of the pelvic splanchnic nerves during nerve-sparing radical hysterectomy,” *Gynecol. Oncol.*, **98**, No. 3, 462-466 (2005).
7. І. О. Македонський, “Профілактика ураження органів сечостатевої системи під час хірургічної корекції аноректальних вад у дітей”, *Урологія*, **15**, № 2 (57), 28-31 (2011).
8. Пат. 63684 Україна, МПК (2011.01) А61В 17/00, *Спосіб лікування аноректальних вад розвитку*, І. О. Македонський, опубл. 10.10.11, бюл. № 19.
9. І. О. Македонський, О. П. Піддубна, “Клінічні можливості систем з біологічним зворотним зв'язком у лікуванні нетримання сечі у дітей з екстропією сечового міхура”, *Мед. перспективи*, **16**, № 2, 59-65 (2011).
10. І. А. Makedonsky, “Immunohistochemical investigation of the M2 and M3 muscarinic receptors in patients with bladder exstrophy,” *Eur. Urol.*, **4**, No. 2, 182 (2004).
11. І. О. Македонський, “Морфологічні та функціональні властивості сечового міхура у дітей з аноректальними аномаліями”, *Хірургія дит. віку*, **4**, № 4, 46-52 (2007).
12. S. M. Korogod, A. V. Kochenov, and I. A. Makedonsky, “Biophysical mechanism of parasympathetic excitation of urinary bladder smooth muscle cells: a simulation study,” *Neurophysiology*, **46**, No. 4, 199-205 (2014).
13. *Физиология человека*, под ред. В. М. Покровского, Г. Ф. Коротько, Медицина, Москва (2003).
14. *Физиология человека*, под ред. Р. Шмидта, Г. Тевса, Мир, Москва (2005).
15. F. Martini, J. L. Nath, and E. F. Bartholomew, *Fundamentals of Anatomy & Physiology*, Publ. Pearson Educat. Inc., San Francisco (2011).
16. K. L. Hristov, M. Chen, W. F. Kellett, et al., “Large-



- conductance voltage- and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels regulate human detrusor smooth muscle function,” *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **301**, No. 4, 903-912 (2011).
17. G. Burnstock, “Purinergic signaling in the gastrointestinal tract and related organs in health and disease,” *Purinerg. Signal.*, **10**, No. 1, 3-50 (2014).
  18. С. М. Корогод, И. Б. Кулагина, В. И. Кукушка, “Кодирование электрических и синаптических воздействий выходным разрядом в нейронах с активными дендритами. Модельное исследование”, *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **44**, № 2, 24-31 (2012).
  19. C. H. Fry, G. Sui, and C. Wu, “T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in non-vascular smooth muscles,” *Cell Calcium*, **40**, No. 2, 231-239 (2006).
  20. N. J. Bramichand and A. F. Brading, “Electrical properties of smooth muscle in the guinea pig urinary bladder,” *J. Physiol.*, **492**, Part 1, 185-198 (1996).
  21. H. Hashitani and A. F. Brading, “Ionic basis for the regulation of spontaneous excitation in detrusor smooth muscle cells of the guinea-pig urinary bladder,” *Br. J. Pharmacol.*, **140**, No. 1, 159-169 (2003).
  22. J. Malysz, E. S. Rovnerand, and G. V. Petkov, “Single-channel biophysical and pharmacological characterizations of native human large-conductance calcium-activated potassium channels in freshly isolated detrusor smooth muscle cells,” *Pflügers Arch.*, **465**, No. 7, 965-975 (2013).
  23. S. Patel and R. Docampo, “Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling,” *Trends Cell Biol.*, **20**, No. 5, 277-286 (2010).
  24. J. Haslam and J. Laycock, *Therapeutic Management of Incontinence and Pelvic Pain. Pelvic Organ Disorders*, Springer-Verlag, London (2008).
  25. W. E. Crill, “Persistent sodium current in mammalian central neurons,” *Annu. Rev. Physiol.*, **58**, 349-362 (1996).
  26. S. Dib-Hajj, J. A. Black, T. R. Cummins, and S. G. Waxman, “NaN/Nav1.9: a sodium channel with unique properties,” *Trends Neurosci.*, **25**, No. 5, 253-259 (2002).
  27. F. Maingret, B. Coste, F. Padilla, et al., “Inflammatory mediators increase Nav1.9 current and excitability in nociceptors through a coincident detection mechanism,” *J. Gen. Physiol.*, **131**, No. 3, 211-225 (2008).
  28. S. M. Korogod, N. Osorio, I. B. Kulagina, and P. Delmas, “Dynamic excitation states and firing patterns are controlled by sodium channel kinetics in myenteric neurons: a simulation study,” *Channels (Austin)*, **8**, No. 6, 536-543 (2014).
  29. N. Osorio, S. Korogod, and P. Delmas, “Specialized functions of Nav1.5 and Nav1.9 channels in electrogenesis of myenteric neurons in intact mouse ganglia,” *J. Neurosci.*, **34**, No. 15, 5233-5244 (2014).
  30. H. L. Tan, “Sodium channel variants in heart disease: expanding horizons,” *J. Cardiovascul. Electrophysiol.*, **17**, Suppl. 1, S151-S157 (2006).
  31. A. F. Brading and K. L. Brain, “Ion channel modulators and urinary tract function,” in: *Urinary Tract (Handbook Exp. Pharmacol.*, Vol. 202), K.-E. Andersson and M. C. Michel (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (2011), pp. 375-393.
  32. M. F. Shuba, “The effect of sodium-free and potassium-free solutions, ionic current inhibitors and ouabain on electrophysiological properties of smooth muscle of guinea-pig ureter,” *J. Physiol.*, **264**, No. 3, 837-851 (1977).
  33. M. C. Michel and S. Parra, “Similarities and differences in the autonomic control of airway and urinary bladder smooth muscle,” *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **378**, No. 2, 217-224 (2008).
  34. S. Kajioka, S. Nakayama, H. Asano, and A. F. Brading, “Involvement of ryanodine receptors in muscarinic receptor-mediated membrane current oscillation in urinary bladder smooth muscle,” *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **288**, No. 1, 100-108 (2005).
  35. S. Nakayama and A. F. Brading, “Inactivation of the voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel current in smooth muscle cells isolated from the guinea-pig detrusor,” *J. Physiol.*, **471**, 107-127 (1993).
  36. J. Laforet, D. Guiraud, D. Andreu, et al., “Smooth muscle modeling and experimental identification: application to bladder isometric contraction,” *J. Neural. Eng.*, **8**, No. 3, 1-13 (2011).