

## МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ КАЛЬЦИЙЗАВИСИМОГО ХЛОРНОГО ТОКА В ГЛАДКОМЫШЕЧНОЙ КЛЕТКЕ

Поступила 16.07.13

С применением формализма Ходжкина–Хаксли разработана математическая модель кальцийзависимого хлорного тока, основанная на опубликованных экспериментальных данных о кинетике такого тока в клетках разных типов. Полученные результаты предназначены для дальнейшего использования в разрабатываемой модели гладкомышечной клетки детрузора мочевого пузыря. Особенность моделируемого тока – наличие двух компонентов с общей кинетикой кальцийзависимой активации и разными (быстрой и медленной) кинетиками потенциалзависимой активации. В вычислительных экспериментах, выполненных с использованием протокола ступенчатой фиксации потенциала или внутриклеточной концентрации кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ), получены статические и динамические зависимости величины тока от мембранного потенциала и  $[Ca^{2+}]_i$  – вольт- и моль-амперные характеристики (ВАХ и МАХ соответственно), а также аналогичные зависимости кинетических переменных кальций- и потенциалзависимой активации тока. Полученные характеристики исследуемого тока оказались близкими к таковым токов-прототипов. Для тока были характерны следующие основные свойства: «направленное наружу» («выходящее») выпрямление (outward rectification), усиление эффекта выпрямления с увеличением  $[Ca^{2+}]_i$  и более высокая чувствительность к отклонениям  $[Ca^{2+}]_i$  от базального уровня в диапазоне до 1 мкМ по сравнению с таковой в диапазоне более высоких концентраций (что проявлялось в больших отношениях приращение тока/концентрация).

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** математическая модель, кальцийзависимый хлорный ток, вольт- и моль-амперные характеристики, кинетика активации.

### ВВЕДЕНИЕ

Кальцийзависимые хлорные токи, впервые обнаруженные в яйцеклетках *Xenopus* [1, 2], были зарегистрированы во множестве клеток, в том числе в гладкомышечных клетках (ГМК) воздухоносных путей [3], желудка [4], кровеносных сосудов [5], уретры [6] и мочевого пузыря [7], а также в клетках секреторных желез [4] и гепатоцитах [8]. Предполагается, что эти токи играют важную роль в клеточных электрических процессах. В частности, благодаря своему менее негативному равновесному потенциалу по сравнению с обычным потенциалом покоя (согласно разным источникам – от –32

[7] до приблизительно +2.2 мВ [5]) данный входящий ток может существенно смещать мембранный потенциал (МП) клетки в сторону деполяризации, тем самым способствуя развитию электрического возбуждения [7, 9], мышечного сокращения [3] и других функционально важных процессов, присутствующих в клетках того или иного типа. Вместе с тем многие аспекты биофизики и молекулярной физиологии, относящиеся к этим функционально важным токам, остаются нерешенными. Не вполне известно, какие мембранные протеины могут играть роль каналов для данного тока; еще менее изучены конкретные роли этого тока в формировании ряда клеточных электрических и биохимических процессов. Математическое моделирование клеточных процессов, все шире применяемое в качестве дополнительного метода исследования, могло бы помочь решению перечисленных вопросов, однако модели указанного типа токов пока единичны. Они

<sup>1</sup>Международный центр молекулярной физиологии (Днепропетровское отделение) НАН Украины (Украина).

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

kochenov\_artem@yahoo.com (А. В. Коченов).

были недавно созданы лишь для эндотелиальных клеток [10] и ГМК легочной артерии [11]. Для ГМК детрузора мочевого пузыря (объекта, представляющего для нас особый интерес) такие модели отсутствуют. Эта ситуация и мотивировала выполнение данной работы. Целью ее было построение и исследование модели кальцийзависимого хлорного тока, которую в дальнейшем можно будет использовать при построении биологически реалистичной модели ГМК детрузора мочевого пузыря.

## ОПИСАНИЕ МОДЕЛИ

Модель кальцийзависимого хлорного тока описывали с применением уравнений типа Ходжкина–Хаксли [12]. Плотность тока (ток на единицу поверхности)  $J_{Cl}$  определялась уравнением:

$$J_{Cl} = G_{Cl} (E - E_{Cl}), \quad (1)$$

где  $E$  – МП,  $E_{Cl}$  – потенциал инверсии,  $G_{Cl}$  – отнесенная к единице площади поверхности мембраны проводимость хлорных каналов, включающая в себя две составляющие, которые характеризовались одинаковой зависимостью от внутриклеточной концентрации кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ), но разными зависимостями от МП. Потенциалзависимая активация у одной из составляющих была быстрой, а у другой – медленной. Такие свойства проводимости отображали уравнением

$$G_{Cl} = G_{Cl,f} \cdot m \cdot p_f + G_{Cl,s} \cdot m \cdot p_s, \quad (2)$$

где  $G_{Cl,f} = 0.74352 \text{ См/см}^2$  и  $G_{Cl,s} = 0.85648 \text{ См/см}^2$  – максимальные удельные проводимости быстро и медленно активирующихся каналов соответственно,  $p_f$  и  $p_s$  – кинетические переменные быстрой и медленной потенциалзависимой активации соответственно, а  $m$  – общая для обеих составляющих кинетическая переменная кальцийзависимой активации. Последнюю описывали дифференциальным уравнением

$$dm/dt = (m_\infty - m)/\phi_m, \quad (3)$$

где

$$m_\infty = 1 / \{1 + (K_D / [Ca^{2+}]_i)^H\} \quad (4)$$

с параметрами  $j_m = 33.3 \text{ мс}$ ,  $K_D = 0.48 \text{ мкМ}$  и  $H = 3.4$ .

Кинетические переменные потенциалзависимой активации  $p = p_f, p_s$  описывали подобными уравнениями:

$$dp/dt = (p_\infty - p)/\phi_p \quad (5)$$

с идентичными выражениями и параметрами (МП половинной активации  $E_{1/2} = 103.5 \text{ мВ}$ , фактор крутизны  $s = 37.266 \text{ мВ}$ ) у стационарных значений:

$$p_\infty = 1 / [1 + \exp(-(E - E_{1/2})/s)], \quad (6)$$

но с разными константами времени ( $j_p = j_f = 7.826 \text{ мс}$  для  $p = p_f$  и  $j_p = j_s = 82.028 \text{ мс}$  для  $p = p_s$ ).

Уравнение (4) идентично уравнению Хилла, использованному Коуми и соавт. [8] для описания концентрационнозависимой активации тока через кальцийактивируемые хлорные каналы в мембране изолированных гепатоцитов морской свинки. Согласно сообщениям цитированных авторов, такое выражение обеспечивало лучшее (по критерию наименьших квадратов) приближение к данным их натуральных экспериментов, в которых оценивалась относительная вероятность открытого состояния канала (соответственно результатам inside-out patch clamp-регистрации тока через одиночные каналы при разных концентрациях  $Ca^{2+}$  на цитозольной стороне мембраны и фиксированном МП +50 мВ). Величина  $j_m$  не зависела от концентрации  $Ca^{2+}$ , как в случае кальцийзависимых калиевых каналов типа ВК. Уравнение (6) аналогично уравнению Больцмана, а его параметры  $E_{1/2}$  и  $s$  подобраны нами с целью обеспечения лучшего приближения стационарной вольт-амперной характеристики (ВАХ) моделируемого тока к подобной характеристике, которая была построена Хартцеллом и соавт. ([4], рис. 1, С) по данным регистраций тока через кальцийактивируемые хлорные каналы, образованные протеинами аноктаминового семейства.

Разработка и исследование вышеописанной модели были осуществлены в программной среде «NEURON» [13]. Вычислительные эксперименты выполняли на однокомпартментном мембранном цилиндре, размеры которого (длина  $L = 100 \text{ мкм}$ , диаметр  $d = 5 \text{ мкм}$ ) соответствовали размерам ГМК детрузора мочевого пузыря [14–16]. Модель включала в себя проводимость для исследуемого тока  $J_{Cl}$ , а также аналог электрода для фиксации МП. Электрические процессы в рассматриваемом компартменте в целом описывались уравнением:

$$C_m \cdot dE/dt = J_{Cl} + I_{stim}/p \cdot d \cdot l, \quad (7)$$

где  $C_m = 3 \text{ мкФ/см}^2$  – удельная емкость мембраны, а  $I_{stim}$  – ток от внешнего генератора.

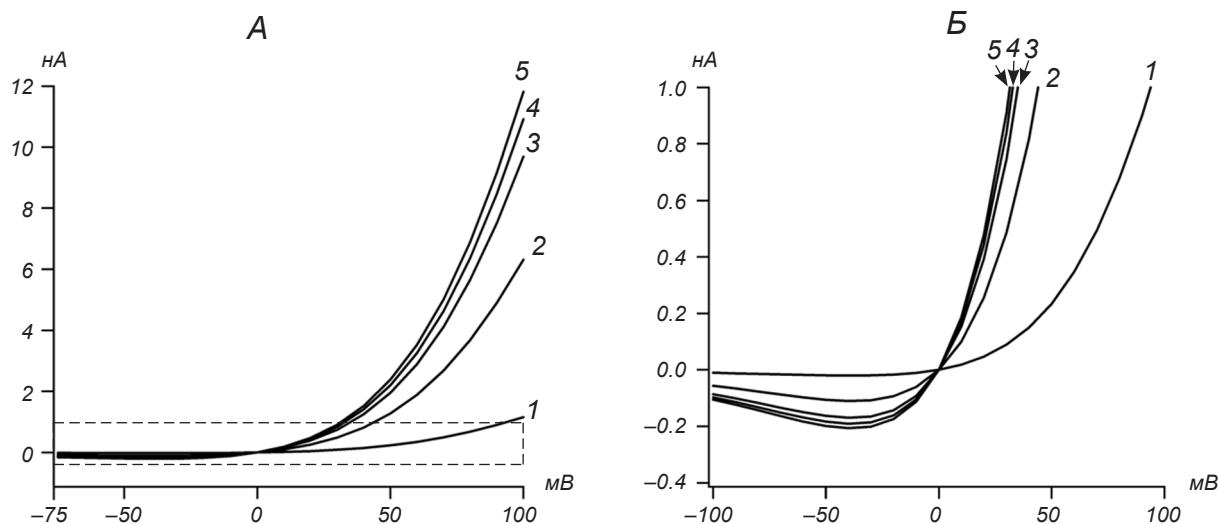
Протокол вычислительных экспериментов предусматривал расчеты стационарных и динамических ВАХ моделируемого тока (его плотности  $J_{Cl}$ ) при определенном значении  $[Ca^{2+}]_i$ . Рассчитывали также так называемые стационарные и динамические моль-амперные характеристики (МАХ), которые основываются на значениях отношений  $[Ca^{2+}]_i$  и, соответственно, стационарных или мгновенных величин  $J_{Cl}$  при определенном уровне МП. Динамические ВАХ и МАХ определяли с использованием метода ступенчатой фиксации потенциала  $E$  или концентрации  $[Ca^{2+}]_i$  соответственно на разных уровнях, измеряя соответствующие каждому уровню мгновенные значения тока в определенный момент времени после начала ступеньки. При этом моменты измерения следовали с равными интервалами от начала ступеньки до времени достижения стационарного состояния.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В первой серии вычислительных экспериментов рассчитывали стационарные ВАХ моделируемого кальцийзависимого хлорного тока при нескольких

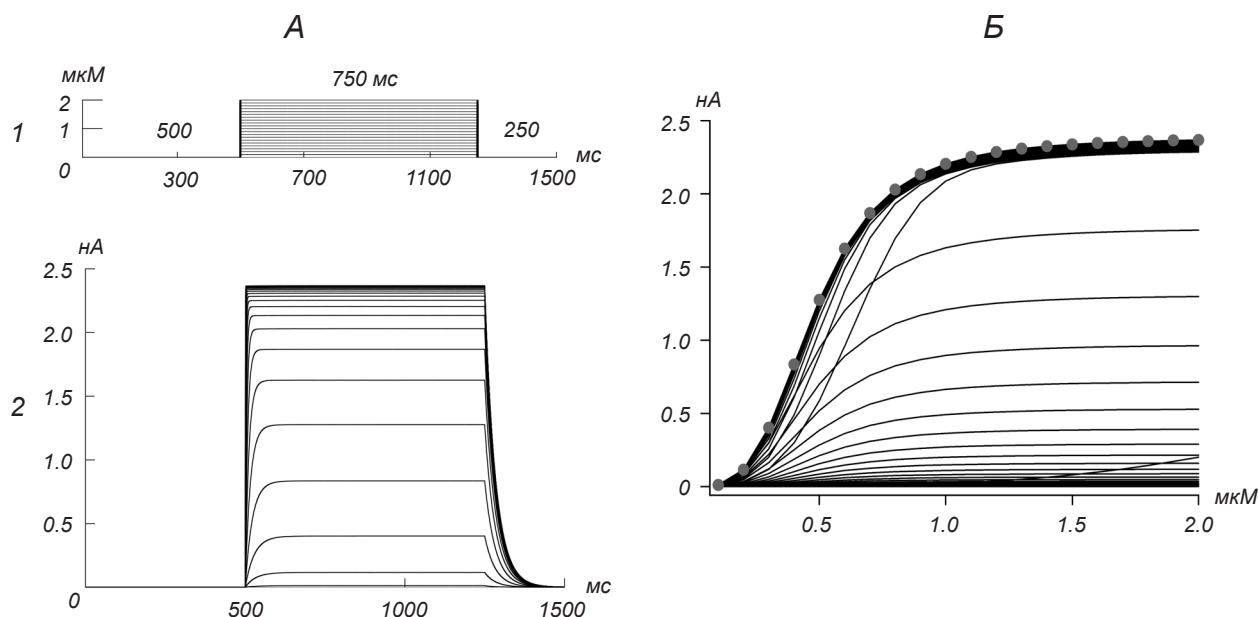
фиксированных значениях  $[Ca^{2+}]_i$  (рис. 1). Эти нелинейные характеристики имели две основные особенности. Во-первых, при всех значениях  $[Ca^{2+}]_i$  выходящий (имеющий положительное направление) ток, вызванный смещением МП  $E$  в сторону деполяризации относительно равновесного значения  $E_{Cl}$ , по абсолютной величине существенно превышал входящий (отрицательный) ток, вызванный противоположным смещением МП. Такая особенность характерна для токов «направленного наружу» выпрямления (outward rectification – термин, часто переводимый как «выходящее выпрямление»). Во-вторых, при любых отклонениях МП  $E$  от равновесного значения  $E_{Cl} = 0 \text{ мВ}$  увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  приводило к увеличению как выходящего, так и входящего токов (ср. кривые 1–5 на рис. 1), причем равные приращения концентрации (0.25 мкМ) в области малых значений последней (от 0.25 до 0.5 мкМ) вызывали существенно большие приращения абсолютных значений тока по сравнению с теми, которые наблюдались в случае таких же приращений в области больших концентраций (от 0.5 до 0.75 мкМ; ср. кривые 1, 2 и 2, 3 на рис. 1). Эта особенность указывает на существенную нелинейность концентрационной зависимости активации рассматриваемого тока.

Упомянутую концентрационную зависимость тока подробно исследовали в следующей серии вычислительных экспериментов. На рис. 2 пред-



**Рис. 1.** Статические вольт-амперные характеристики модельного кальцийзависимого хлорного тока в гладкомышечной клетке при разных значениях внутриклеточной концентрации кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ). На А кривые 1–5 соответствуют значениям  $[Ca^{2+}]_i$ , равным 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 и 5.0 мкМ. Б – представленный в развернутом масштабе фрагмент, выделенный на А штриховыми линиями.

**Рис. 1.** Статичні вольт-амперні характеристики модельного кальційзалежного хлорного струму в гладеньком'язовій клітині при різних значеннях внутрішньоклітинної концентрації кальцію.



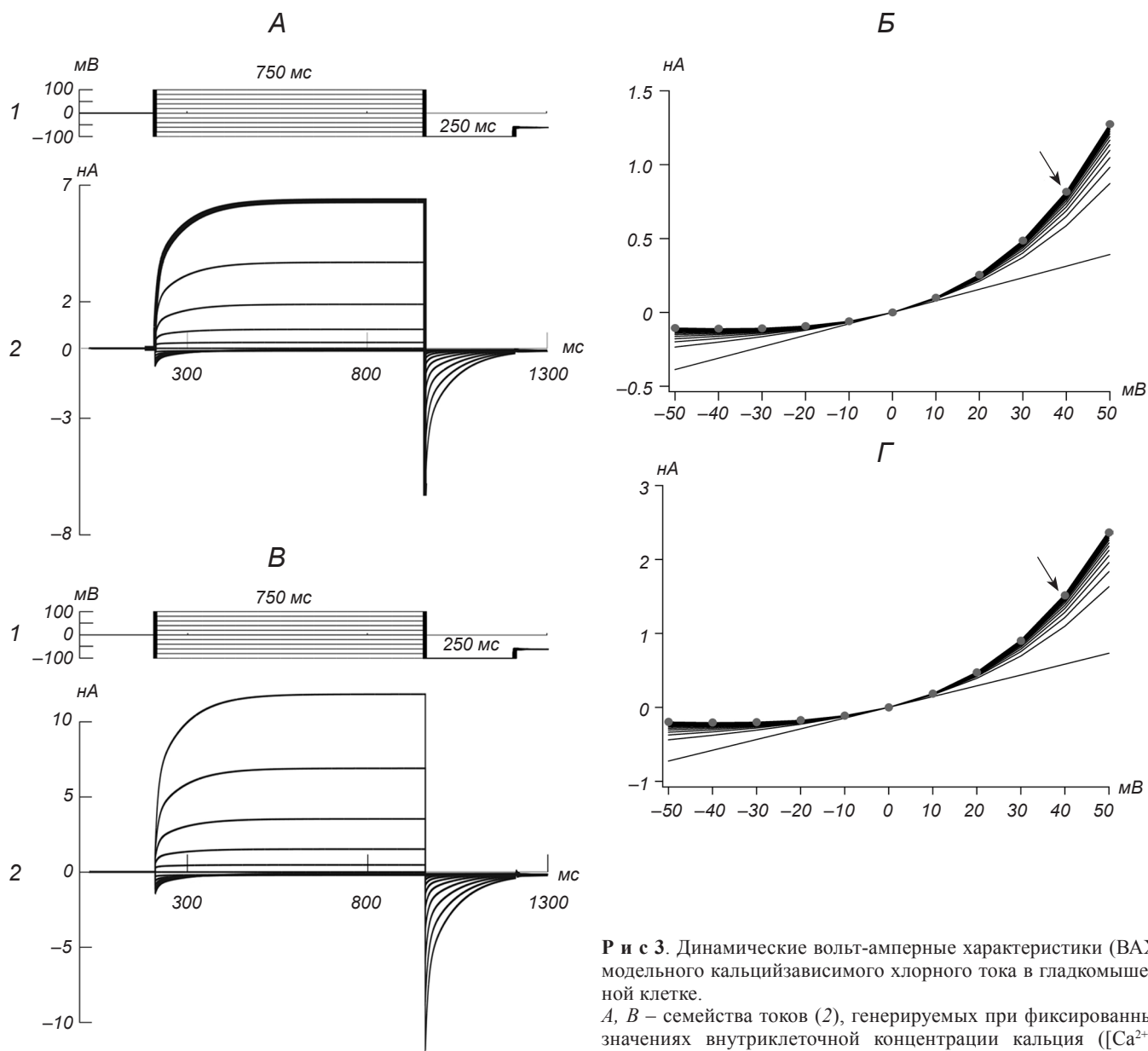
**Р и с. 2.** Моль-амперные характеристики (МАХ) модельного кальцийзависимого хлорного тока в гладкомышечной клетке. *А* – семейство токов (2), генерируемых при фиксированном мембранном потенциале +50 мВ и ступенчатых изменениях внутриклеточной концентрации кальция –  $[Ca^{2+}]_i$  (1) от нулевого до фиксированного уровня в диапазоне 0.1–2.0 мкМ (шаг приращения 0.1 мкМ, длительность ступеньки 750 мс). *Б* – статическая (показана кружками) и динамические (показаны сплошными линиями) МАХ тока, представленные семейством зависимостей его мгновенных значений от  $[Ca^{2+}]_i$ . Каждая кривая семейства *Б* получена соответственно записям *А* путем измерения мгновенных значений тока при разных значениях  $[Ca^{2+}]_i$  в определенный момент времени после начала ступеньки. Моменты измерения следовали с шагом 10 мс в диапазоне 0–750 мс (время действия тест-скачка  $[Ca^{2+}]_i$ ). Статическая МАХ соответствует времени установления стационарного значения тока (750 мс).

**Р и с. 2.** Моль-амперні характеристики модельного кальційзалежного хлорного струму в гладеньком'язовій клітині.

ставлен типичный результат таких модельных исследований. МАХ тока определяли с применением метода ступенчатой фиксации  $[Ca^{2+}]_i$  на различных уровнях в диапазоне 0–2.0 мкМ (*А*, 1). МП фиксировали на уровне +50 мВ. Выбор указанного значения определялся возможностью сравнения с результатами натуральных экспериментальных исследований [8]. Динамические МАХ представляли семейством концентрационных зависимостей мгновенных значений тока (*Б*), измеренных с равными 10-миллисекундными интервалами на протяжении концентрационной ступеньки (750 мс) с использованием записей значений тока, которые приведены на *А*. Как видно из представленных данных, моделируемый ток достигал стационарной величины в пределах порядка 50–260 мс после начала концентрационного скачка (тем быстрее, чем выше был скачок). Указанные стационарные значения возрастали S-образно с увеличением  $[Ca^{2+}]_i$ , достигая насыщения при значениях данного параметра, превышающих 1.0–1.5 мкМ. Соответственно мгновенные динамические МАХ (*Б*, показаны сплошными линиями) со временем сходились к стационарной

МАХ (показана кружками, там же). Подобная зависимость наблюдалась при разных фиксированных уровнях МП.

В следующей серии вычислительных экспериментов с использованием ступенчатой фиксации МП исследовали динамические ВАХ моделируемого тока. Результаты этой серии иллюстрируются рис. 3, на котором приведен типичный пример данных, полученных при двух фиксированных уровнях повышенной  $[Ca^{2+}]_i$ , а именно 0.5 (*А-Б*) и 5.0 (*В-Г*) мкМ. Значение 0.5 мкМ было выбрано также из соображений возможности сравнения с данными экспериментальных исследований [4] (подробности см. в Обсуждении). Динамические ВАХ представляли как семейства мгновенных значений величины тока (*Б*, *Г*), измеренных с равными 20-миллисекундными интервалами на протяжении 750 мс (длительности ступеньки потенциала); использовали записи временного течения тока, которые приведены на *А* и *В*. Ток достигал своего стационарного значения приблизительно через 340 мс после начала ступеньки при смещении МП до уровня +100 мВ и через 250 мс при смещении до –100 мВ



(т. е. тем быстрее, чем меньше была амплитуда ступеньки). Соответственно мгновенные динамические ВАХ (Б, Г, показаны сплошными линиями) со временем сходились к стационарной ВАХ (там же, показана кружками).

Динамические свойства моделируемого тока, характеризуемые семействами мгновенных МАХ (рис. 2) и ВАХ (рис. 3), определяются динамическими свойствами соответствующих процессов его кальций- и потенциалзависимой активации. Вычислительные эксперименты позволили осуществить декомпозицию этих процессов (что практически невозможно в натурном эксперименте) и охарактеризовать природу их компонентов с помощью

**Р и с 3.** Динамические вольт-амперные характеристики (ВАХ) модельного кальцийзависимого хлорного тока в гладкомышечной клетке.

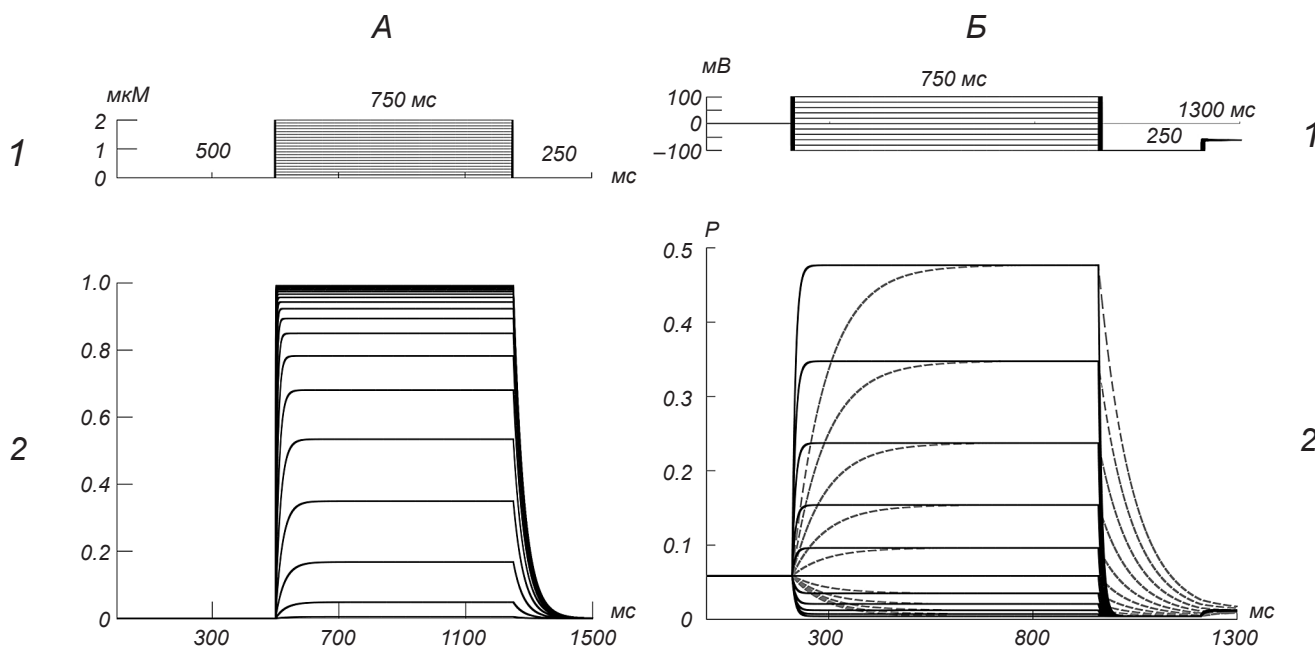
А, В – семейства токов (2), генерируемых при фиксированных значениях внутриклеточной концентрации кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ) на уровне 0.5 (А) или 5.0 (В) мкМ и ступенчатых (длительность ступеньки 750 мс) изменениях мембранного потенциала – МП (1) от нулевого до фиксированного уровня в диапазоне  $-100 \dots +100$  мВ с последующей 250-миллисекундной фиксацией на уровне  $-100$  мВ (шаг приращения 20 мВ на А и 10 мВ на В). Б, Г – статические (показаны кружками) и динамические (показаны сплошными линиями) ВАХ тока, представленные семействами его зависимостей от МП. Каждая кривая семейства Б или Г получена соответственно записям А или В путем измерения мгновенных значений тока при разных значениях МП в определенный момент времени после начала ступеньки. Моменты измерения следовали с шагом 20 мс в диапазоне 0–750 мс (длительность ступеньки). Статическая ВАХ измерена на 750-й мс, когда устанавливались стационарные значения тока.

**Р и с 3.** Динамічні вольт-амперні характеристики модельного кальційзалежного хлорного струму в гладеньком'язовій клітині.

расчета изменений во времени соответствующих кинетических переменных в тех же условиях, в которых определялись общие динамические свойства указанного тока. Кроме того, были получены данные для сравнения с результатами некоторых натурных экспериментов (см. ниже). Результаты наших расчетов, представленные на рис. 4, позволили отметить следующие особенности динамики кальций- (*A*) и потенциалзависимой (*B*) активации, проявляющиеся в реакциях на ступенчатые изменения уровня  $[Ca^{2+}]_i$  и МП *E* соответственно. Во-первых, это были существенно различающиеся скорости изменения переменных и значения времени достижения ими стационарных величин. Наибольшая скорость и, соответственно, наименьшее время были присущи кинетической функции быстрой потенциалзависимой активации  $p_f$  (*B*, указано сплошными линиями), несколько меньшая скорость нарастания и, соответственно, большее время стабилизации – кинетической переменной кальцийзависимой активации *m* (*A*). Наконец, существенно меньшей оказалась скорость и большим – время нарастания

до стационарного уровня у кинетической переменной медленной потенциалзависимой активации  $p_s$  (*B*, указано штриховыми линиями). Следует отметить, что при фиксации потенциала на любом уровне обе кинетические переменные ( $p_f$  и  $p_s$ ) достигали одного и того же стационарного значения, соответствовавшего данному уровню, хотя и за разное время.

Во-вторых, характер приращений кинетических переменных в условиях равных приращений величин, управляющих этими переменными –  $[Ca^{2+}]_i$  и *E*, – имел и общие черты, и ряд особенностей. Общей чертой, присущей обоим кинетическим переменным зависимой от потенциала активации, было то, что равные приращения уровня фиксируемого напряжения во всем диапазоне значений (–100 ... +100 мВ) вызывали прогрессивно большие приращения указанных переменных (*B*). Существенно иным был характер приращений кинетической переменной кальцийзависимой активации *m* (*A*). Эти приращения вначале увеличивались, а затем уменьшались до нуля при равномерном возрас-



**Р и с. 4.** Динамические свойства кинетических функций активации модельного кальцийзависимого хлорного тока в гладкомышечной клетке.

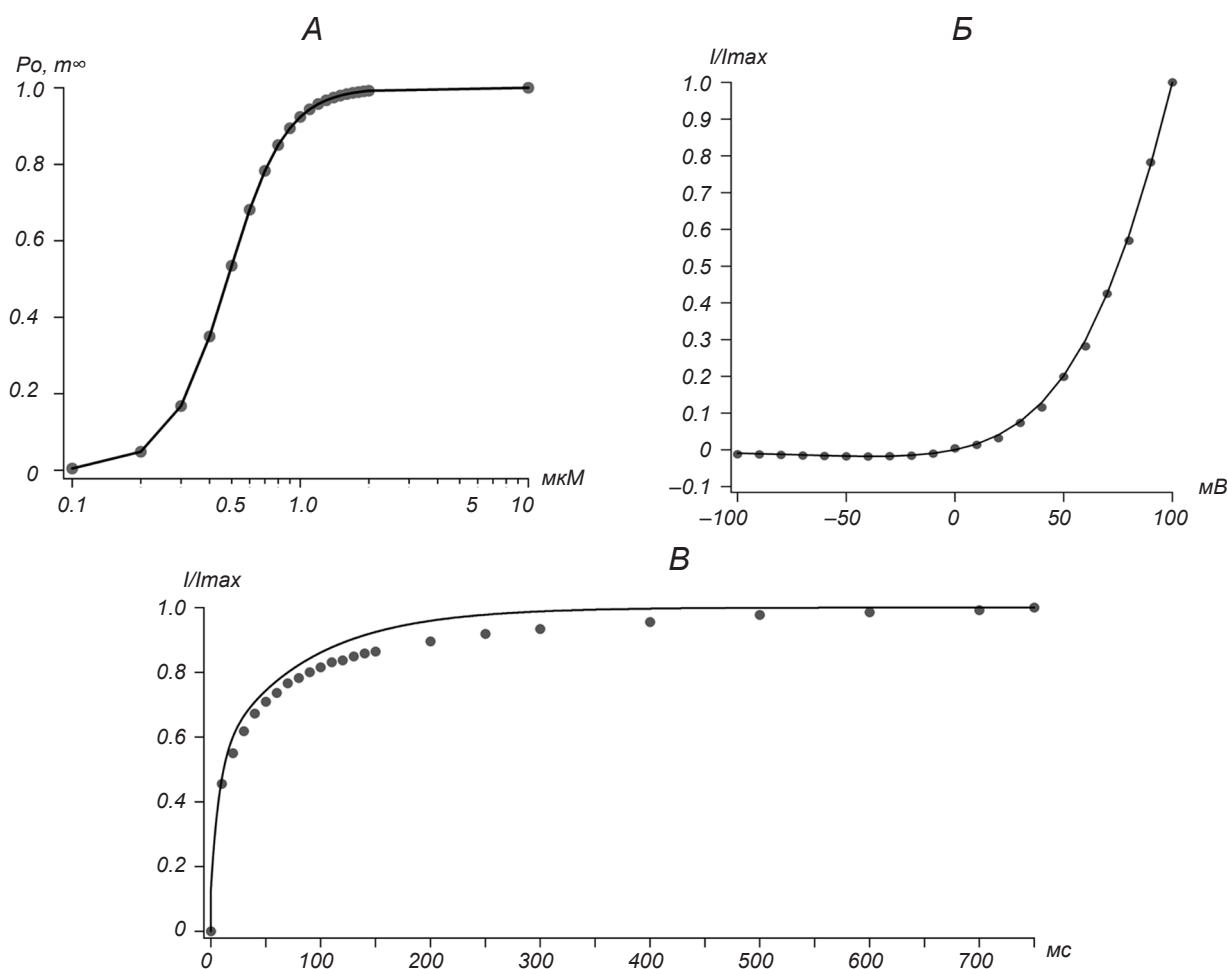
*A* – изменения во времени кинетической переменной концентрационнозависимой активации *m* (2) при таких же, как и на рис. 2, *A*, ступенчатых изменениях внутриклеточной концентрации кальция –  $[Ca^{2+}]_i$  (1) в условиях фиксации мембранного потенциала (МП) на уровне  $E = +50$  мВ. *B* – изменения во времени кинетических переменных потенциалзависимой активации (2), быстрой  $p_f$  (указано сплошной линией) и медленной  $p_s$  (указано пунктирной линией) при таких же, как и на рис. 3, *A* и *B*, ступенчатых изменениях МП в условиях фиксации  $[Ca^{2+}]_i$  на уровне 0.5  $\mu M$ .

**Р и с. 4.** Динамічні властивості кінетичних функцій активації модельного кальційзалежного хлорного струму в гладеньком'язовій клітині.

тании концентрации с шагом 0.1 мкМ в диапазоне 0–2.0 мкМ, так что стационарное значение указанной переменной активации достигало единицы (своего рода «уровня насыщения») в случае нарастания  $[Ca^{2+}]_i$  до 1.7 мкМ.

Завершающим этапом нашей работы было сопоставление полученных результатов вычислительных экспериментов с данными экспериментальных исследований кальцийзависимых хлорных токов-прототипов. Как правило, эти экспериментальные данные относятся к токам через одиночные каналы, характеризуемым потенциал- или концентрационнозависимыми вероятностями открытых ( $P_o$ ) или закрытых ( $P_c$ ) состояний каналов, а также к интегральным (популяционным) токам. Последние представлены либо их нативными записями, иллюстрирующими реакцию на приложенные напряжения, действие фармакологических веществ и т. п., либо стационарными или динамическими ВАХ, построенными на основании указанных записей [17]. Наша модель позволяет симулировать интегральный ток, исследованный с использованием протоколов ступенчатой фиксации потенциала или  $[Ca^{2+}]_i$ . Это и определило выбор данных для сравнений, представленных тремя примерами на рис. 5. Адекватность сравнения обеспечивалась, в частности, соответствием условий (протоколов) вычислительного эксперимента условиям, при которых были получены натурные данные. По физическому смыслу вероятностям открытого (активированного) состояния канала соответствуют стационарные значения кинетической переменной (концентрационнозависимой  $m_{\bar{y}}$  или потенциалзависимой  $p_{\bar{y}}$ ) активации интегрального тока. В первом случае (А) сравнивали зависимости от значений  $[Ca^{2+}]_i$  таких величин, как стационарная кинетическая переменная кальцийуправляемой активации модельного тока  $m_{\bar{y}}$  (указано сплошными линиями) и описанная в работе Коуми и соавт. [8] вероятность открытого состояния  $P_o$  пропускающих подобный ток каналов в мембране гепатоцитов (указано кружками) при одинаковых значениях фиксированного МП +50 мВ. Представленная здесь зависимость  $m_{\bar{y}}$  была получена из записей, показанных на рис. 4, А для момента времени 750 мс после начала ступеньки (аналогично процедуре получения стационарной МАХ). Соответствующая зависимость вероятности  $P_o$  определялась уравнением 2 из работы Коуми и соавт. [8], где оно было выведено по результатам измерения токов через одиночные каналы ([8], рис. 8). Близость сравниваемых зависимостей вполне оче-

видна. Вместе с тем при сравнении зависимостей от значений МП таких величин, как стационарные кинетические переменные потенциалуправляемой активации модельного тока  $p_{\bar{y}} = p_f = p_s$  (рис. 4, Б) и вероятности открытого состояния  $P_o$  каналов того же типа (по экспериментальным данным Коуми и соавт. [8], рис. 9), установленных в одинаковых условиях фиксированной концентрации кальция 0.5 мкМ такой близости не наблюдалось (не иллюстрируется, обсуждение см. ниже). На рис. 5, Б показано сравнение статических ВАХ модельного тока (указано сплошной линией) и зарегистрированного в экспериментах Хартцелла и соавт. [4] кальцийзависимого хлорного тока через каналы аноктаминового семейства (указано кружками). Сопоставимость обеспечивалась единообразием протоколов и условий вычислительного и натурального экспериментов. Это ступенчатая фиксация потенциала (длительность ступеньки 750 мс, амплитуда от –100 до +100 мВ, префиксация на уровне 0 мВ) при  $[Ca^{2+}]_i = 0.26$  мМ, а также нормирование токов. Последнее требовалось в связи с режимом «целая клетка» при фиксации потенциала (whole-cell voltage clamp) и неопределенностью размеров исследуемых клеток в упомянутых экспериментах Хартцелла и соавт. [4]. Нормирование осуществляли путем деления каждого значения тока  $I$  (оси ординат на нашем рис. 4, Б или рис. 1, С в цитированной работе [4]) на максимальное значение  $I_{max}$ , которое имело место в конце 750-миллисекундного периода фиксации потенциала на уровне +100 мВ (А, указано толстой линией, или [4], верхняя запись тока на рис. 1, А). Пример, приведенный на рис. 5, Б, также подтверждает близкое соответствие статической ВАХ модельного тока и аналогичной характеристики тока-прототипа через каналы аноктаминового типа. Сходства и различия динамики тех же токов иллюстрируются на рис. 5, В, где представлено временное течение модельного тока (указано сплошной линией) и зарегистрированного в экспериментах Хартцелла и соавт. [4] тока-прототипа (указано кружками), генерируемых в одинаковых условиях (префиксация потенциала на уровне 0 мВ, ступенчатая фиксация потенциала в течение 750 мс на уровне 100 мВ, значение  $[Ca^{2+}]_i = 0.26$  мкМ); данные нормированы так, как описано выше. При этом в качестве исходных (ненормированных) данных использованы верхняя запись тока из вышеупомянутой экспериментальной работы ([4], рис. 1, А) и такая же запись модельного тока, как и на рис. 3, А (указано жирной ли-



**Рис. 5.** Сопоставление результатов моделирования кальцийзависимого хлорного тока с данными экспериментальных исследований [4, 8].

*A* – концентрационные зависимости полученных согласно записям рис. 4, *A* (на 750-й мс после начала ступеньки) стационарных значений кинетической переменной кальцийуправляемой активации модельного тока  $m_{\infty}$  (показано сплошной линией) и вероятностей открытого состояния канала кальцийзависимого хлорного тока в гепатоцитах (показано кружками), по данным Коуми и соавт. [8], зарегистрированным в исследованиях активности одиночных каналов (шкала концентраций по оси абсцисс – логарифмическая). *B* – нормированные статические вольт-амперные характеристики модельного тока (указано сплошной линией) и зарегистрированного Хартцеллом и соавт. [4] кальцийзависимого хлорного тока через каналы аноктаминового семейства (указано кружками), полученные с применением одинаковых протоколов ступенчатой фиксации потенциала. *B* – нормированные записи временного течения модельного тока (указано сплошной линией) и тока-прототипа, зарегистрированного в экспериментах Хартцелла и соавт. [4] (указано кружками). Подробности, касающиеся условий экспериментов и процедур нормирования, приведены в тексте.

**Рис. 5.** Співставлення результатів моделювання кальційзалежного хлорного струму з даними експериментальних досліджень [4, 8].

нией), но для указанной выше  $[Ca^{2+}]_i = 0.26$  мкМ. Как показывает сравнение нормированных графиков, представленных на рис. 5, *B* (указано сплошной линией и кружками), модельный ток по своему временному течению весьма близок к току-прототипу, но несколько опережает последний по времени достижения стационарного уровня. Такие соотношения количественно характеризуются весьма

малой величиной среднеквадратического отклонения модельных данных от экспериментальных на протяжении всего 750-миллисекундного интервала сравнения (0.00175) и несколько большей величиной этого показателя (0.0021) в пределах первых 350 мс после начала ступеньки (усреднение по равноотстоящим точкам указанных интервалов при  $N = 100$ ).



## ОБСУЖДЕНИЕ

Разработанная нами модель позволяет воспроизводить кальцийзависимый хлорный ток с характеристиками, которые соответствуют обнаруженным у тока такого типа в натуральных экспериментах на гепатоцитах и у тока через каналы, сформированные белками аноктаминового семейства (Anoctamin/TMEM16) [4]. В частности, моделированный ток имеет динамические и статические ВАХ, весьма близкие к таковым у прототипов. Указанный ток также демонстрирует выраженное свойство «направленного наружу» (или «выходящего») выпрямления (outward rectification), присущее этому току у разных реальных клеток [4, 11]. Данное свойство отражено также в ВАХ, приведенных Коули и соавт. [8]. Примечательными особенностями такого модельного тока являются усиление вышеуказанного эффекта выпрямления при увеличении  $[Ca^{2+}]_i$ , а также большие отношения приращение тока/концентрация в диапазоне относительно низких значений  $[Ca^{2+}]_i$  (до 1 мкМ) по сравнению с таковыми в диапазоне более высоких концентраций. Это означает более высокую чувствительность тока к относительно небольшим отклонениям  $[Ca^{2+}]_i$  от базального уровня. Подобные эффекты в условиях повышения величины  $[Ca^{2+}]_i$  наблюдались в ряде экспериментальных исследований кальцийзависимых хлорных каналов (в частности, см. рис. 8, В [18], рис. 1, F [19] и рис. 1, B [20]).

Ключевым предположением, на котором было основано построение нашей модели, является возможность наличия у кальцийзависимого хлорного тока двух независимых компонентов с одинаковой кинетикой кальцийуправляемой активации, но с разными кинетиками потенциалзависимой активации – быстрой и медленной. Это предположение базируется на заключении, сделанном Хартцеллом и соавт. [4] по результатам экспериментальных исследований, из которых следовало наличие у каналов аноктаминового семейства, проводящих кальцийзависимый хлорный ток, множественных открытых состояний, различающихся по кинетике открывания и селективности. Общая для обеих составляющих кинетическая функция, описывающая зависимость активации тока от  $[Ca^{2+}]_i$ , выбрана нами аналогичной по виду и параметрам описанной Коуми и соавт. [8] функции вероятности открытого состояния каналов; эта функция была построена авторами по результатам экспериментов на одиночных каналах с использованием метода «inside-out

patch clamp» в условиях поддержания примембранной концентрации  $Ca^{2+}$  на уровне 0.5 мкМ. Такой выбор кинетической функции и обеспечил явную близость ее стационарных значений, определенных в условиях ступенчатой фиксации потенциала при той же внутриклеточной концентрации кальция (0.5 мкМ) (рис. 5, А). Вместе с тем соответствие кинетики потенциалзависимой активации в нашей модели тока таковой у прототипа из той же работы, выполненной на гепатоцитах [8], было не столь близким (не иллюстрировано). Что же касается близости к соответствующим данным, полученным для тока через аноктаминовые каналы [4], то она оказалась достаточно существенной (хотя и с несколько большим расхождением в пределах относительно малых интервалов времени после начала ступенчатой фиксации потенциала) (В). Отмеченные расхождения можно объяснить в первом случае спецификой свойств каналов кальцийзависимого хлорного тока, экспрессируемых в разных клетках. Эти каналы исследовались в Хартцеллом и соавт. [4] и Коуми и соавт. [8] и послужили первоисточниками для разных компонентов нашей модели. Во втором же случае (сопоставление с током через аноктаминовые каналы) расхождение обуславливалось тем, что потенциалзависимая активация этих каналов характеризуется постоянной времени, являющейся не константой (как в нашей модели), а функцией потенциала и/или концентрации. В пользу такого объяснения говорит и тот факт, что упомянутое расхождение между модельным и экспериментально зарегистрированным токами в пределах первых 350 мс после начала ступенчатой фиксации потенциала (В) существенно уменьшалось в условиях повторения тех же расчетов при вдвое большей, чем в натурном эксперименте,  $[Ca^{2+}]_i$  (0.5 вместо 0.26 мкМ). Эти аспекты можно выяснить в дальнейших исследованиях нашей модели, а сама модель может быть соответствующим образом усложнена.

Сопоставление с данными немногих аналогичных модельных исследований показало следующее. Модели кальцийзависимых хлорных токов основывались на данных экспериментов с клетками разных типов [11, 23–25] и отражали различные гипотезы относительно воротных механизмов у соответствующих каналов. Так, например, Тонг и соавт. [24] предполагали, что открывание каналов является кальцийзависимым, а закрывание – потенциалчувствительным. Арреола и соавт. [25] считали, что активация каналов сопря-

женно зависит от значений как МП, так и  $[Ca^{2+}]_i$ . Это сопряжение таково, что при отсутствии изменений  $[Ca^{2+}]_i$  сдвиги МП недостаточны для активации канала, чувствительность канала к  $[Ca^{2+}]_i$  повышается в условиях деполяризации, а временной ход активации является двухкомпонентным (один компонент мгновенный, а другой – продолжительный). Наиболее близким к нашему является описание хлорного тока, включенного в комплексную модель эндотелиальной клетки [10]. В указанной работе для описания кинетики данного тока использовались аналогичные функции, также обеспечивавшие свойство направленного наружу выпрямления (outward rectification) с несколько большим значением константы полуактивации у потенциалзависимой кинетической функции. При этом основные различия состояли в динамическом представлении постоянной времени (в нашей модели данная величина – константа) и в сопряженной чувствительности к величинам  $[Ca^{2+}]_i$  и МП (в нашей модели – это независимые функции). Для сравнения двух моделей в плане качества воспроизведения свойств токов-прототипов необходимы дальнейшие исследования с использованием одинаковых условий и протоколов.

Особый вопрос, который пока не имеет общепринятого решения, касается молекулярной природы каналов, проводящих кальцийзависимые хлорные токи. В основу нашей модели были положены экспериментальные данные о свойствах такого тока через каналы, образованные белками семейства аноктаминов (Anoctamin/ТМЕМ16) [4]. Некоторые каналы этого семейства (в частности, Anol1 и Anol2), которые активируются смещениями  $[Ca^{2+}]_i$  [20] и реагируют на изменения МП, широко распространены в организме человека и животных. Известно, что белок, кодируемый *ТМЕМ16А*, является основным компонентом нативных кальцийзависимых хлорных каналов. [22]. Однако в связи с тем, что данное семейство белков было открыто относительно недавно, фундаментальные электрофизиологические исследования, которые позволили бы однозначно определить зависимости кинетик каналов от различных факторов и, соответственно, непосредственно воплотить их в моделях, до сих пор не проводились. Это касается и нашей модели, построенной с использованием доступных данных немногих экспериментальных работ [8]. Пока нельзя однозначно утверждать, что каналы кальцийзависимого хлорного тока принадлежат именно к упомянутому семейству аноктаминов (Anoctamin/

ТМЕМ16), хотя это и выглядит вероятным.

В целом же оказалось, что наша модель кальцийзависимого тока, будучи в ряде аспектов упрощенной, достаточно близко воспроизводит существенные черты токов-прототипов, выявленные в экспериментальных исследованиях. Используемые в нашей модельной работе протоколы вычислительного эксперимента и предложенный нами новый тип характеристик – МАХ тока – могут быть полезными, способствуя наглядному представлению концентрационнозависимых свойств мембранных проводимостей. Эти свойства являются предметом не только теоретических, но и экспериментальных исследований, в частности благодаря разработке методов фиксации внутриклеточной концентрации ионов в живых клетках [26–28].

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

*С. М. Корогод<sup>1</sup>, А. В. Коченов<sup>1</sup>*

#### МАТЕМАТИЧНА МОДЕЛЬ КАЛЬЦІЙЗАЛЕЖНОГО ХЛОРОНОГО СТРУМУ В ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВІЙ КЛІТИНІ

<sup>1</sup>Міжнародний центр молекулярної фізіології (Дніпропетровське відділення) НАН України (Україна).

#### Резюме

Із застосуванням формалізму Ходжкіна–Хакслі розроблено математичну модель кальційзалежного хлорного струму, основу на опублікованих експериментальних даних щодо кінетики такого струму в клітинах різних типів. Отримані результати призначені для подальшого використання в моделі гладеньком'язової клітини детрузора сечового міхура, що зараз розробляється. Особливість модельованого струму – наявність двох компонентів із загальною кінетикою кальційзалежної активації та різними (швидкою та повільною) кінетиками потенціалзалежної активації. В обчислювальних експериментах, виконаних із застосуванням протоколу ступінчастої фіксації потенціалу або внутрішньоклітинної концентрації кальцію ( $[Ca^{2+}]_i$ ), отримані статичні та динамічні залежності величини струму від мембранного потенціалу та  $[Ca^{2+}]_i$  – вольт- та моль-амперні характеристики (ВАХ і МАХ відповідно), а також аналогічні залежності кінетичних змінних кальцій- і потенціалзалежної активації струму. Отримані характеристики досліджуваного струму виявилися близькими до таких у струмів-прототипів. Для струму були характерні наступні основні властивості: «спрямоване назовні» («вихідне») випрямлення (outward rectification), посилення ефекту випрямлення зі збільшенням концентрації  $[Ca^{2+}]_i$  та більш висока чутливість до відхилень  $[Ca^{2+}]_i$  від базального рівня в діапазоні до 1 мкМ порівняно з та-

кою в діапазоні значніших концентрацій (що знайшло прояв у більших відношеннях прирощення струму/концентрація).

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. M. E. Barish, "A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte," *J. Physiol.*, **342**, 309-325 (1983).
2. R. Miledi, "A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes," *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B, Biol. Sci.*, **215**, No. 1201, 491-497 (1982).
3. Y. Waniishi, R. Inoue, H. Morita, et al., "Cyclic GMP-dependent but G-kinase-independent inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{Cl}^-$  currents by NO donors in cat tracheal smooth muscle," *J. Physiol.*, **511**, No. 3, 719-731 (1998).
4. H. C. Hartzell, K. Yu, Q. Xiao, et al., "Anoctamin/TMEM16 family members are  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channels," *J. Physiol.*, **58**, No. 10, 2127-2139 (2009).
5. M. K. McGahon, M. A. Needham, C. N. Scholfield, et al., " $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  current in retinal arteriolar smooth muscle," *Invest. Ophthalmol. Vision. Sci.*, **50**, No. 1, 364-371 (2009).
6. K. D. Cotton, M. A. Hollywood, N. G. McHale, and K. D. Thornbury, " $\text{Ca}^{2+}$  current and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated chloride current in isolated smooth muscle cells of the sheep urethra," *J. Physiol.*, **505**, No. 1, 121-131 (1997).
7. A. F. Brading and K. L. Brain, "Ion channel modulators and urinary tract function," in: *Urinary Tract. Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 202, Karl-Erik Andersson and Martin C. Michel (eds.), Springer, Heidelberg, Dordrecht, London, et al. (2011), pp. 376-389.
8. S. Koumi, R. Sato, and T. Aramaki, "Characterization of the calcium-activated chloride channel in isolated guinea-pig hepatocytes," *J. Gen. Physiol.*, **104**, No. 2, 357-373 (1994).
9. 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).
10. H. S. Silva, A. Kapela, and N. M. Tsoukias, "A mathematical model of plasma membrane electrophysiology and calcium dynamics in vascular endothelial cells," *Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)*, **293**, No. 1, 277-293 (2007).
11. J. E. Angermann, A. R. Sanguinetti, J. L. Kenyon, et al., "Mechanism of the inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  currents by phosphorylation in pulmonary arterial smooth muscle cells," *J. Gen. Physiol.*, **128**, No. 1, 73-87 (2006).
12. A. L. Hodgkin and A. F. Huxley, "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve," *J. Physiol.*, **117**, No. 4, 500-544 (1952).
13. M. L. Hines and N. T. Carnevale, "The NEURON simulation environment," *Neural Comput.*, **9**, No. 6, 1179-1209 (1997).
14. *Физиология человека*, под ред. В. М. Покровского и Г. Ф. Коротько, Медицина, Москва (2003).
15. *Физиология человека*, под ред. Р. Шмидта и Г. Тевса, Мир, Москва (2005).
16. F. Martini, J. Lindsley Nath, and Edwin F. Bartholomew, *Fundamentals of Anatomy & Physiology*, Publ. Pearson Educat. Inc., San Francisco (2011).
17. B. Hille, *Ionic Channels of Excitable Membrane*, Sinauer, Sanderland, MA (1992).
18. T. Shimizu, T. Iehara, K. Sato, et al., "TMEM16F is a component of a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channel but not a volume-sensitive outwardly rectifying  $\text{Cl}^-$  channel," *Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)*, **304**, No. 8, 748-759 (2013).
19. Q. Xiao, K. Yu, P. Perez-Cornejo, et al., "Voltage- and calcium-dependent gating of TMEM16A/Ano1 chloride channels are physically coupled by the first intracellular loop," *PNAS*, **108**, No. 21, 8891-8896 (2011).
20. C. Duran, Z. Qu, A. O. Osunkoya, et al., "ANOs 3-7 in the anoctamin/Tmem16  $\text{Cl}^-$  channel family are intracellular proteins," *Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)*, **302**, No. 3, 482-493 (2012).
21. А. М. Рубцов, "Роль саркоплазматического ретикулума в регуляции сократительной активности мышц," *Сорос. обзор. журн.*, **6**, № 9, 17-24 (2000).
22. J. E. Angermann, A. S. Forrest, I. A. Greenwood, and N. Leblanc, "Activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channels by store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in arterial smooth muscle cells does not require reverse-mode  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange," *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **90**, No. 7, 903-921 (2012).
23. W. C. Tong, C. Y. Choi, S. Khariche, et al., "A computational model of the ionic currents,  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics and action potentials underlying contraction of isolated uterine smooth muscle," *PLoS ONE*, **6**, No. 4, 1-21 (2011).
24. A. Kuruma and H. C. Hartzell, "Bimodal control of a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channel by different  $\text{Ca}^{2+}$  signals," *J. Gen. Physiol.*, **115**, No. 1, 59-80 (2000).
25. J. Arreola, J. E. Melvin, and T. Begenisich, "Activation of calcium-dependent chloride channels in rat parotid acinar cells," *J. Gen. Physiol.*, **108**, No. 1, 35-47 (1996).
26. M. K. Park, R. B. Lomax, A. V. Tepikin, and O. H. Petersen, "Local uncaging of caged  $\text{Ca}^{2+}$  reveals distribution of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channels in pancreatic acinar cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, No. 19, 10948-10953 (2001).
27. P. V. Belan, P. G. Kostyuk, V. A. Snitsarev, and A. V. Tepikin, "Calcium clamp in single nerve cells," *Cell Calcium*, **14**, No. 6, 419-425 (1993).
28. P. Belan, P. Kostyuk, V. Snitsarev, and A. Tepikin, "Calcium clamp in isolated neurons of the snail *Helix pomatia*," *J. Physiol.*, **462**, 47-58 (1993).