

*На правах рукописи*

**Иванова Дарья Викторовна**

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АГОНИСТОВ ПУРИНО-,  
ХОЛИНО- И АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ НА  
ГЛАДКОМЫШЕЧНЫЕ ТКАНИ КРЫС ПРИ  
МОДЕЛИРОВАНИИ АУТИЗМА**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Казань – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор **Зиганшин Айрат Усманович**

**Официальные оппоненты:**

**Воронина Татьяна Александровна** - доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела нейropsychofarmacology, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»

**Суханов Илья Михайлович** - доктор медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией фармакологии поведения Института фармакологии им. А.В. Вальдмана Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт–Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 году в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 21.2.012.01 при ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России по адресу: 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, 49.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России по адресу: 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, 49Б и на сайте: <https://kazangmu.ru>

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор медицинских наук, профессор

Г.Р. Хасанова

## **Общая характеристика работы**

### **Актуальность темы исследования**

Аутизм, или расстройства аутистического спектра (РАС) – гетерогенная группа сложных неврологических расстройств, обусловленных нарушениями развития детского организма (Kong X. et al., 2021). Показано, что у пациентов с РАС наблюдается дисфункция вегетативной нервной системы, которая затрагивает в том числе мочеполовую систему (Gubbiotti M. et al., 2019) и желудочно-кишечный тракт (Poletaev A.V. et al., 2016; Geir B. et al., 2020), и может негативно влиять на тяжесть течения РАС и приводить к снижению качества жизни (Loyacono N. et al., 2020). Ввиду того, что основные симптомы аутизма, затрагивающие коммуникативную и поведенческую сферы, могут усугубляться сопутствующими соматическими нарушениями, актуальным представляется поиск возможных причин их развития и путей коррекции (Van der Meer J. M. J., 2017).

Пуринергический сигналинг – важный модулятор многих нейрональных и ненейрональных механизмов, включая эндокринную и экзокринную секрецию, воспаление, иммунные реакции, боль, агрегацию тромбоцитов и эндотелиально-опосредованную вазодилатацию. Пролиферация, дифференцировка и апоптоз клеток, происходящие при развитии и регенерации, также в значительной степени зависят от работы пуринергических рецепторов (Burnstock G. et al., 2004; Шес Р. et al., 2021), которые делят на два типа: аденозиновые P1 и P2.

Ряд авторов предполагают, что патогенез РАС также связан с нарушением функционирования пуринергической сигнальной системы, элементы которой, соответственно, можно рассматривать в качестве потенциальных терапевтических мишеней для разработки новых подходов к фармакокоррекции РАС (Naviaux R. K., 2018; Hirsch M. M. et al., 2020).

Важной частью этой системы являются экто-нуклеотидазы – семейство ферментов, катализирующих распад аденозинтрифосфата (АТФ), аденозиндифосфата (АДФ), уридинтрифосфата (УТФ) и других нуклеотидов на внешней стороне мембраны клетки или во внеклеточном пространстве. Они

могут существенно изменять влияние эндогенных лигандов на пуриnergические рецепторы (Zimmermann H., 2021). Изучение работы этих ферментов важно для прояснения роли пуриnergической сигнализации при развитии аутизма (Grković I. et al., 2019).

### **Степень разработанности проблемы**

Моделирование аутизма путем пренатального введения вальпроевой кислоты используется во многих исследовательских центрах, в том числе, в лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», где на модели фетального вальпроатного синдрома были разработаны методические подходы для исследования нарушений у экспериментальных животных, характерных для РАС (Капица И.Г., 2018).

Ранее на кафедре фармакологии Казанского ГМУ был проведен сравнительный анализ поведенческих нарушений у крыс с экспериментальной моделью аутизма, вызванного пренатальным введением вальпроевой кислоты (Семина И.И. и др., 2022). Это исследование проводилось совместно с этой исследовательской группой и было посвящено оценке сопутствующих соматических нарушений при аутизме, в том числе и в разных возрастных группах. В современной литературе отсутствуют сведения о характере и глубине изменений механической активности внутренних органов у животных при моделировании аутизма. Вместе с тем, нарушения функции желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы часто регистрируются у пациентов с РАС.

### **Цель исследования**

Изучить влияние агонистов пурино-, холино- и адренорецепторов на механическую активность гладкомышечных тканей крыс разного возраста при моделировании аутизма.

### **Задачи исследования**

1. Оценить и сравнить влияние агонистов P2-рецепторов (АТФ, альфа, бета-метилен-АТФ, бета,гамма-метилен-АТФ, 2-метилтио-АТФ) на механическую активность гладкомышечных образцов кишечника, мочевого

пузыря, семявыносящего протока и матки крыс с вальпроатной моделью аутизма в возрасте 3 и 9 месяцев.

2. Провести оценку влияния карбахолина на сократительную активность гладкомышечных образцов кишечника, мочевого пузыря и матки крыс с вальпроатной моделью аутизма в возрасте 3 и 9 месяцев.

3. Сравнить влияние норэпинефрина на сократительную активность семявыносящего протока крыс с вальпроатной моделью аутизма в возрасте 3 и 9 месяцев.

4. Исследовать активность экто-нуклеотидазы в гладкомышечных тканях крыс с вальпроатной моделью аутизма в возрасте 3 и 9 месяцев.

### **Научная новизна**

Впервые проведена оценка влияния агонистов пурино-, холино- и адренорецепторов на сократительную активность гладкомышечных тканей 12-перстной и подвздошной кишки, мочевого пузыря, семявыносящего протока и матки крыс 3 и 9 месяцев с вальпроатной моделью аутизма.

Показано снижение сократительного ответа изолированных гладкомышечных образцов ткани семявыносящего протока и матки крыс с вальпроатной моделью аутизма разного возраста в ответ на агонисты P2X-рецепторов.

Обнаружено, что сократительный ответ на агонист холинорецепторов карбахолин значительно повышен в гладкомышечных образцах ткани мочевого пузыря, 12-перстной и подвздошной кишки крыс с вальпроатной моделью аутизма в возрасте 9 месяцев. Впервые получены экспериментальные данные, о том, что у крыс с вальпроатной моделью аутизма в возрасте 9 месяцев сократительные ответы образцов ткани матки, вызванные карбахолином, значительно ниже сокращений контрольных образцов.

Обнаружено, что у крыс с вальпроатной моделью аутизма сокращения изолированных гладкомышечных образцов ткани мочевого пузыря, вызванные электростимуляцией, были значительно ниже контрольных величин. Показано, что расслабления карбахолин-тонизированной подвздошной кишки повышены

под действием электрической стимуляции у крыс с вальпроатной моделью аутизма в возрасте 3 месяцев.

Впервые получены данные об активности экто-нуклеотидазы в образцах гладкомышечных тканей 12-перстной кишки, мочевого пузыря, семявыносящего протока и матки крыс с вальпроатной моделью аутизма в возрасте 3 и 9 месяцев. Установлено, что у крыс с вальпроатной моделью аутизма в возрасте 3 месяцев активность экто-нуклеотидаз статистически значимо выше контрольных значений в образцах гладкомышечных тканей 12-перстной кишки, семявыносящего протока и мочевого пузыря по сравнению с контролем. Выявлено, что значение активности экто-нуклеотидаз в образцах семявыносящего протока и матки крыс с вальпроатной моделью аутизма 9 месяцев статистически значимо ниже контрольных значений.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Установленные в работе изменения сократительной активности гладкомышечных тканей внутренних органов крыс при моделировании аутизма в ответ на действие агонистов различных рецепторов могут свидетельствовать о вовлечении пурино- и холинорецепторов в происходящие при аутизме нарушениях функций мочеполовой и пищеварительной систем пациентов с РАС. Более того, выявление спектра нарушений, происходящих в функционировании внутренних органов крыс с моделью аутизма, изучение механизмов их развития и взаимосвязи, может внести вклад в объяснение патофизиологии РАС и сопутствующих ему нарушений. Это в последующем позволит определить группы лекарственных препаратов, которые могут быть использованы для коррекции нарушений функций ЖКТ и мочеполовой системы у пациентов с РАС.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. При моделировании аутизма введением вальпроевой кислоты беременным самкам, у рожденного потомства происходят разнонаправленные изменения сократительной активности изолированных гладкомышечных тканей

кишечника и мочеполовой системы в ответ на действие агонистов холино- и пуринорецепторов.

2. У крыс с вальпроатной моделью аутизма значительно снижены сократительные ответы изолированной матки, вызванные агонистами P2X-рецепторов  $\alpha,\beta$ -метилена-АТФ и  $\beta,\gamma$ -метилена-АТФ и карбахолином, по сравнению с контрольными животными того же возраста.

3. Карбахолин вызывает более сильные сокращения изолированного кишечника крыс с вальпроатной моделью аутизма по сравнению с контролем, тогда как влияние агонистов P2-рецепторов на сократительную активность изолированного кишечника крыс существенно не отличается у двух групп животных.

### **Степень достоверности**

Исследование выполнено на необходимом и достаточном количестве экспериментального материала с использованием адекватных методов исследования. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием современных методов математической статистики. При подготовке обзора литературы и обсуждении результатов использована современная и актуальная литература по теме диссертационного исследования.

### **Апробация работы**

Основные результаты работы доложены и обсуждены на: Международной научно-практической конференции молодых ученых «Белые цветы» (г. Казань, 2020, 2021, 2022 и 2023 г.); очном этапе конкурса научно-исследовательских и научно-практических работ на соискании именных стипендий Мэра г. Казани (г. Казань, 2020 г.); VII междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» (г. Москва, 2021г.); заочной конференции, посвященной 100-летию проф. И.В. Заиконниковой (г. Казань, 2021 г.), междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» (г. Санкт-Петербург, 2023 г.); VI Съезде фармакологов России (Московская обл., 2023 г.).

По материалам диссертационной работы опубликовано 12 работ, включая 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикаций результатов диссертационных исследований.

### **Внедрение результатов исследования**

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс на кафедре фармакологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России.

### **Личный вклад автора**

Автором непосредственно выполнен поиск и анализ литературных источников по теме диссертационной работы, проведены экспериментальные исследования, анализ и обобщение полученных результатов. Автор лично участвовал в подготовке и публикации статей и тезисов докладов. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования, от экспериментально-теоретической реализации поставленных задач до оформления автореферата и рукописи диссертации.

### **Структура и объем диссертационной работы**

Диссертация изложена на 105 страницах машинописного текста. Состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списков сокращений, литературы и иллюстративного материала. Библиографический указатель включает 140 источников, из них 24 отечественных и 116 зарубежных. Работа содержит 9 таблиц и 39 рисунков.

### **Содержание работы**

#### **Материалы и методы**

Диссертационное исследование выполнено на кафедре фармакологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России. Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, протокол № 2 от 15 февраля 2022 года.

#### **Экспериментальные животные**

В экспериментах использовались 154 белых крыс Wistar, полученных из питомника лабораторных животных «Столбовая» (Московская обл.), из которых 23 самки и 23 самца использовались для получения потомства. Животных

содержали в помещении для экспериментальных животных при температуре 22-24°C, относительной влажности воздуха 40-50% с естественным световым режимом на полнорационной сбалансированной диете (ГОСТ 33215-2014) при соблюдении правил лабораторной практики проведения доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 1000.4-96), а также Правил и Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1986).

### **Моделирование аутизма на крысах**

Для выработки у потомства фетального вальпроатного синдрома самкам на 12-13 день беременности однократно подкожно в область холки вводили натриевую соль вальпроевой кислоты в дозе 500 мг/кг. Потомство таких крыс в возрасте 3 и 9 месяцев использовали для экспериментов. В качестве контроля использовали крыс 3 и 9 месяцев, рожденных от животных, не подвергавшихся воздействию вальпроевой кислоты.

### **Фармакологический метод исследования**

Сократительную активность изолированных гладкомышечных тканей желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы регистрировали, используя аппарат для поддержания функциональной активности сократительных тканей. Эксперименты проводили по достижении крысами  $90 \pm 8$  дней и  $270 \pm 8$  дней с момента рождения. Крыс контрольной и опытных групп гильотинировали. Мочевой пузырь, матку, семявыносящие протоки, 12-перстную и подвздошную кишку выделяли и готовили 3-4 гладкомышечных препарата размером приблизительно  $2 \times 10$  мм. Для этого мочевой пузырь вскрывали с боков, семявыносящие протоки и рога матки вскрывали вдоль органа. В забранных участках 12-перстной и подвздошной кишки аккуратно с помощью влажного ватного тампона снимали наружный продольный гладкомышечный слой. Образцы тканей помещали в термостатируемый стаканчик с раствором Кребса-Хенселейта ( $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) объемом 10 мл для регистрации механической активности.

Один конец гладкомышечного препарата жестко фиксировали, другой конец с помощью шелковой нити прикрепляли к изометрическому датчику механической активности FSG-01 (Linton, Великобритания). Запись проводили с использованием компьютера с помощью программы MP100WSW Data Acquisition System, интерфейс которой разработан компанией Biopack (Великобритания). К препаратам мочевого пузыря, семявыносящих протоков и матки прилагали начальную нагрузку в 1 г, а для 12-перстной и подвздошной кишки – 500 мг. После этого мышечные препараты оставляли в покое на 1 час для стабилизации, меняя раствор Кребса-Хенселейта в сосуде каждые 15 минут. Раствор Кребса-Хенселейта имел следующий состав (в mM): NaCl – 118,0, KCl – 4,75, CaCl<sub>2</sub> – 2,5, NaHCO<sub>3</sub> – 24,8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,18, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 1,18, глюкоза – 11,0, pH 7,4 ± 0,1. Раствор в течение всего эксперимента аэрировался газовой смесью 95% кислорода и 5% углекислого газа.

Проводили отдельные серии экспериментов, в которых оценивали сокращение или расслабление тканей под влиянием различных агонистов. Сокращения тканей вызывали стимуляцией электрическим полем (СЭП, прямоугольные импульсы длительностью 0,5 мс при напряжении 100 В частотой 1-20 Гц), агонистом холинорецепторов карбахолоном (10<sup>-8</sup>-10<sup>-5</sup> М), агонистом адренорецепторов норэпинефрином (10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> М), агонистами P2X-рецепторов α,β-метилена АТФ (10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> М), β,γ-метилена АТФ (10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> М). СЭП проводили с использованием стимулятора MultiStim D330 (Digitimer, Великобритания). При действии агонистов, после достижения максимума сокращения и снижения примерно на одну треть, образцы мышечных тканей несколько раз отмывали свежим раствором Кребса-Хенселейта. Перед каждым последующим внесением в инкубационную среду карбахолина, норэпинефрина или проведением СЭП делали интервал не менее 10 минут. Во избежание десенситизации P2X-рецепторов перед каждым последующим внесением α,β-метилена АТФ и β,γ-метилена АТФ делали интервал не менее 30 минут.

Все сократительные ответы вычисляли как процент от сокращения ткани, вызванного раствором KCl (240 mM), который добавляли в конце каждого эксперимента, принятого за 100%.

Расслабление продольных мышц 12-перстной и подвздошной кишки исследовали на гладкомышечных препаратах, предварительно тонизированных карбахолином в концентрации  $3 \times 10^{-7}$  М. Эта концентрация карбахолина вызывает стойкое сокращение мышц, плато которого держится в течение 8-10 минут. Между каждым последующим добавлением раствора карбахолина делали интервал не менее 10 минут. Расслабление вызывали СЭП (1-5 Гц), неселективным агонистом P2-рецепторов АТФ ( $10^{-7}$ - $10^{-4}$  М) и агонистом P2Y-рецепторов 2-метилтио-АТФ ( $10^{-8}$ - $10^{-6}$  М). Расслабление тканей оценивали в процентах от максимально возможного расслабления, принятого за 100%.

### **Изучение активности экто-нуклеотидаз тканей крысы**

Для исследования из гладкомышечных тканей исследованных органов крысы готовили образцы ткани (2-4 мг). Общую экто-нуклеотидазную активность определяли путем инкубирования образцов гладкомышечных тканей с АТФ (300 мкМ, субстрат реакции) в течение 10 мин, с дальнейшей оценкой содержания субстрата и продуктов реакции (АДФ, АМФ) в инкубате методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Эксперименты проводили при  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  в буфере следующего состава (в mM): HEPES 10, NaCl 135, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 2, глюкоза 10 (pH 7,4). В серии контрольных экспериментов инкубировали ткани с буфером, не содержащим АТФ, а также буфер с АТФ инкубировали без тканей. Реакцию останавливали добавлением 300 мкл 3% хлорной кислоты. Инкубационную жидкость центрифугировали, центрифугат замораживали для последующего хроматографического анализа. Анализ проводили на хроматографе производства Shimadzu (Япония) с использованием силикагелевых колонок Supelco с внутренним диаметром 4,6 мм и длиной 150 мм, применяя программу LC Solution. Мобильная фаза состояла из 0,2 М раствора KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> с содержанием 3% метанола (pH 6,0), скорость потока 1,5 мл/мин, длина волны 260 нм, объем образца 20 мкл. Полное разделение

исследуемых нуклеотидов происходило в течение 5,5 мин. Определение концентрации АТФ проводили путем сравнения площади под кривой экспериментального образца с соответствующей площадью у контрольного образца. Активность экто-нуклеотидаз выражали в пмоль АТФ, разрушенных 1 мг ткани за 1 мин.

### **Статистическая обработка результатов исследования**

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel и IBM SPSS Statistics 26.0. Сравнение групп осуществляли с использованием непараметрического U критерия Манна — Уитни. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  ошибка среднего ( $M \pm m$ ), n – количество использованных мышечных препаратов. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

### **Результаты исследований**

#### **Влияние агонистов P2Y-рецепторов на механическую активность кишечника крыс**

Для оценки величины расслабления продольных мышц 12-перстной и подвздошной кишки, образцы этих тканей предварительно тонизировали карбахолином ( $3 \times 10^{-7}$  М) и при достижении сократительного ответа плато добавляли агонисты P2Y-рецепторов АТФ ( $10^{-7}$ - $10^{-4}$  М) и 2-метилтио-АТФ ( $10^{-8}$ - $10^{-6}$  М).

Было установлено, что во всех сериях экспериментов АТФ и 2-метилтио-АТФ вызывают расслабления тонизированной карбахолином изолированных образцов 12-перстной и подвздошной кишки крыс 3 и 9 месяцев, которые существенно не отличались у крыс с вальпроатной моделью аутизма (ВМА) от сокращения соответствующих тканей контрольных животных того же возраста.

## **Влияние агонистов P2X-рецепторов на сократительную активность мочевого пузыря, семявыносящего протока и матки крыс**

Агонисты P2X-рецепторов  $\alpha,\beta$ -метилен-АТФ ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  М) и  $\beta,\gamma$ -метилен-АТФ ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  М) вызывают сокращения изолированных образцов гладкомышечных тканей мочевого пузыря, семявыносящего протока и матки у 3 и 9 месячных крыс.

Сокращения мочевого пузыря, вызванные  $\alpha,\beta$ -метилен-АТФ или  $\beta,\gamma$ -метилен-АТФ, у 3-месячных крыс контрольной и экспериментальной группы, статистически не различались между собой. Сокращения семявыносящего протока 3-месячных крыс с ВМА, вызванные  $\alpha,\beta$ -метилен-АТФ в концентрации  $10^{-5}$  М, были статистически значимо ниже ( $12,86 \pm 3,09\%$ ,  $n=14$ ), чем в контрольной группе ( $31,71 \pm 8,17$ ,  $n=6$ ).

Исследованные агонисты P2X-рецепторов -  $\alpha,\beta$ -метилен-АТФ и  $\beta,\gamma$ -метилен-АТФ вызывали сокращения изолированного семявыносящего протока и мочевого пузыря крыс возрастом 9 месяцев с ВМА, которые статистически не отличались у крыс с моделью РАС от таковых контрольных животных.

У крыс 3-х и 9-ти месяцев с ВМА сокращения изолированной матки, вызванные как  $\alpha,\beta$ -метилен-АТФ, так и  $\beta,\gamma$ -метилен-АТФ, были менее выражены, чем сокращения матки контрольных животных соответствующего возраста. У крыс в возрасте 3 месяца статистическая значимость этих изменений выявлялась лишь в наивысшей концентрации обоих агонистов ( $10^{-5}$  М, Рисунок 1), тогда как у 9-ти месячных животных статистически значимо более слабые сокращения матки животных с ВМА наблюдались при оценке всех концентраций исследованных агонистов (Рисунок 2).

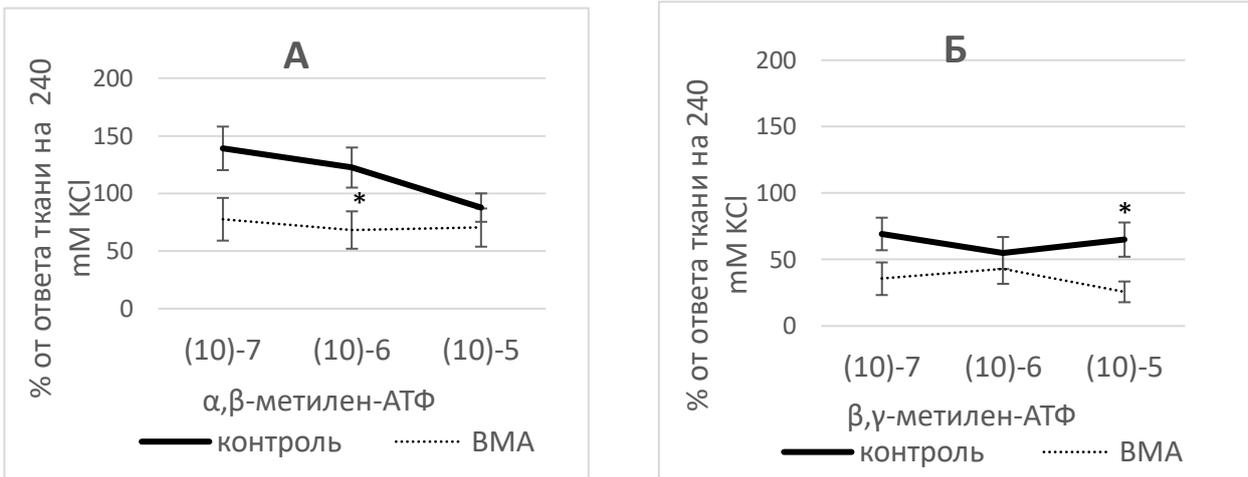


Рисунок 1 – Сокращения изолированных тканей матки крыс с вальпроатной моделью аутизма (ВМА) 3-х месяцев, вызванные  $\alpha,\beta$ -метилден-АТФ (А) и  $\beta,\gamma$ -метилден АТФ (Б). Результаты представлены в виде  $M \pm m$  в % от сокращения ткани на КСl в концентрации 240 mM, принятого за 100%. \*- $p < 0,05$ , по сравнению с контрольной группой (контроль  $n=12$ , ВМА=14)

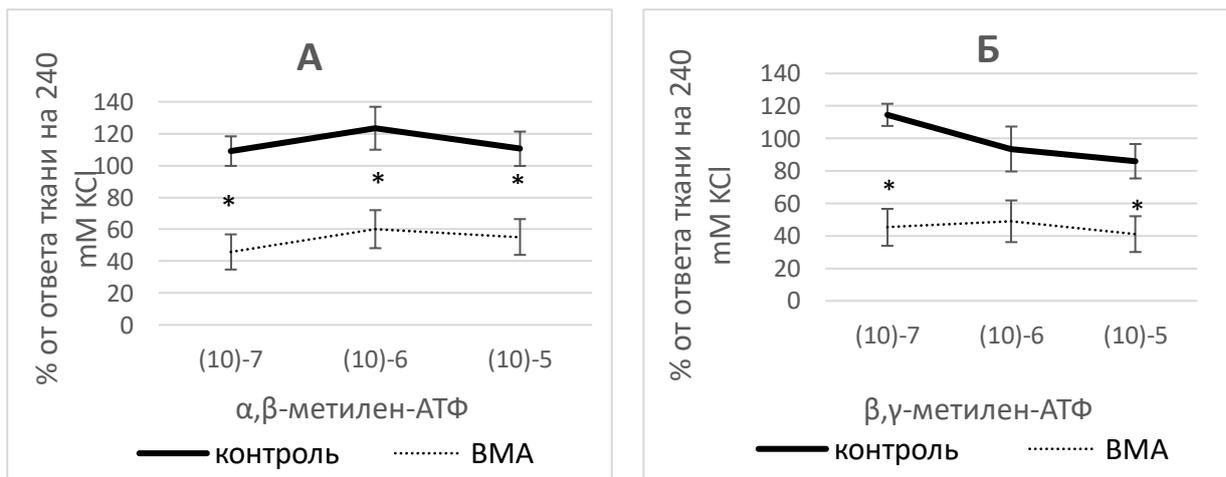


Рисунок 2 – Сокращения изолированных тканей матки крыс с вальпроатной моделью аутизма (ВМА) 9-ти месяцев, вызванные  $\alpha,\beta$ -метилден-АТФ (А) и  $\beta,\gamma$ -метилден АТФ (Б). Результаты представлены в виде  $M \pm m$  в % от сокращения ткани на КСl в концентрации 240 mM, принятого за 100%. \*- $p < 0,05$ , по сравнению с контрольной группой (контроль  $n=12$ , ВМА=16)

### Влияние карбахолина на сократительную активность кишечника крыс

Для оценки сократительной способности изолированных гладкомышечных образцов 12-перстной и подвздошной кишки крыс 3 и 9 месяцев с ВМА был использован неселективный агонист холинорецепторов

карбахолин. Карбахолин в концентрациях  $10^{-8}$ - $10^{-5}$  М вызывает концентрационно-зависимые сокращения изолированных продольных мышц 12-перстной и подвздошной кишок крыс. При этом, у 3-месячных крыс с ВМА при добавлении карбахолина в концентрациях  $10^{-8}$ - $10^{-6}$  М сокращения как 12-перстной, так и подвздошной кишки были значительно более выражены, чем у крыс контрольной группы (Рисунок 3). У 9-месячных крыс с ВМА сокращения образцов обоих участков тонкой кишки существенно не отличались от показателей контрольной группы.

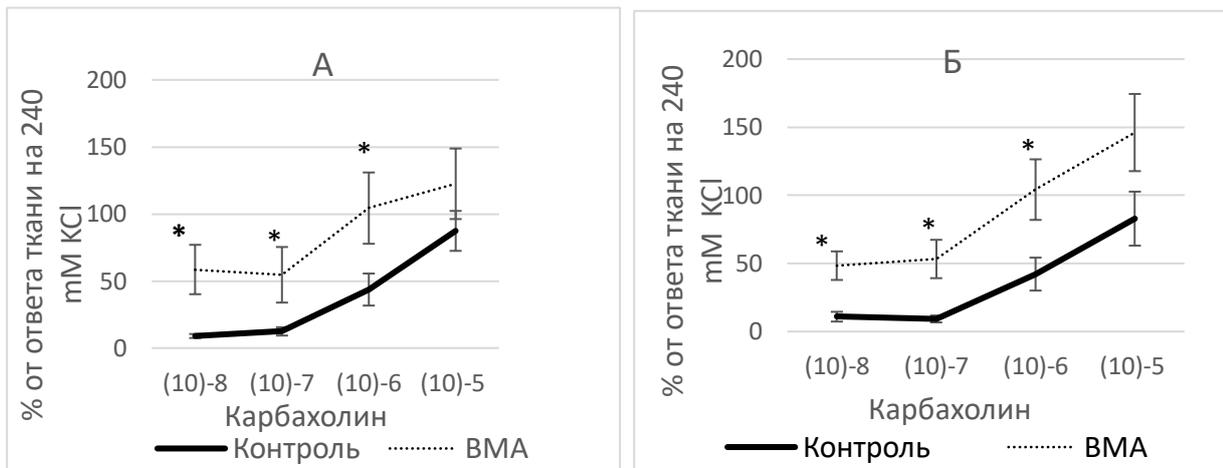


Рисунок 3 – Сокращения изолированных тканей 12-перстной (А) и подвздошной кишки (Б) крыс 3 месяцев с вальпроатной моделью аутизма (ВМА), вызванные карбахолином. Результаты представлены в виде  $M \pm m$  в % от сокращения ткани на КС1 в концентрации 240 mM, принятого за 100%. \*-  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой

### Влияние карбахолина на сократительную активность матки крыс

Под действием карбахолина наблюдались концентрационно-зависимые сокращения образцов изолированной матки крыс обоих возрастов. Сокращения матки крыс с ВМА 3-х месячного возраста статистически значимо не отличались от значений контрольных животных, тогда как у крыс с ВМА в возрасте 9 месяцев было отмечено снижение сокращения в среднем в 2 раза по сравнению с сокращениями контрольной группы животных (Таблица 1).

Таблица 1 – Сокращения изолированной матки крыс в возрасте 3 и 9 месяцев с вальпроатной моделью аутизма (ВМА), вызванные карбахолином. Результаты представлены в виде  $M \pm m$  в % от сокращения ткани на КС1 в концентрации 240 мМ, принятого за 100%

Концентрация карбахолина, М	3 месяца		9 месяцев	
	Контроль (n=10)	ВМА (n=16)	Контроль (n=10)	ВМА (n=16)
$10^{-7}$	68,81±15,44	47,02±13,65	97,34±17,71	55,44±14,14*
$10^{-6}$	102,83±15,63	79,14±13,96	104,14±18,47	43,41±12,83*
$10^{-5}$	125,71±22,43	122,26±19,32	125,94±14,01	69,13±10,34*

Примечание: \*-  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой

### **Влияние норэпинефрина на сократительную активность семявыносящего протока крыс**

Норэпинефрин в концентрациях  $10^{-7}$ – $10^{-5}$  М вызывал концентрационно-зависимые сокращения изолированного семявыносящего протока крыс, которые у животных с ВМА статистически значимо не отличались от контрольной группы животных, как в 3, так и в 9 месяцев. В современной литературе отсутствуют какие-либо свидетельства изменений или нарушений фертильности пациентов с РАС, эта работа обосновывает необходимость проведения таких исследований.

### **Влияние стимуляции электрическим полем на механическую активность кишечника крыс**

Низкочастотная СЭП (1-5 Гц) вызывает расслабление карбахолин-тонизированных образцов кишечника у 3- и 9-месячных крыс. У крыс возрастом 3 месяца с ВМА расслабления 12-перстной кишки, вызванные СЭП, мало отличаются от контрольных животных (Рисунок 4 А), тогда как в подвздошной кишке крыс с ВМА расслабления становятся более значимыми, чем у контрольных животных (Рисунок 4 Б). У крыс в возрасте 9 месяцев статистически значимых изменений во влиянии СЭП на расслабления кишечника крыс с ВМА и контрольных животных не найдено. Таким образом, очевидно, что в гладкомышечных тканях кишечника крыс с моделью аутизма основные изменения происходят в возрасте 3 месяца, а к 9 месяцам они исчезают.

Меньшие сокращения кишечника, вызванные возбуждением эндогенных процессов посредством СЭП с одновременным повышением эффективности карбахолина позволяют предположить, что нарушения происходят как на пре-, так и на пост-синаптическом уровне холинергического синапса. Можно предполагать, что у пациентов с РАС происходят аналогичные нарушения, которые проявляются как в виде запоров, так и диареи (McElhanon B.O. et al., 2014; Vuie T. et al., 2010).

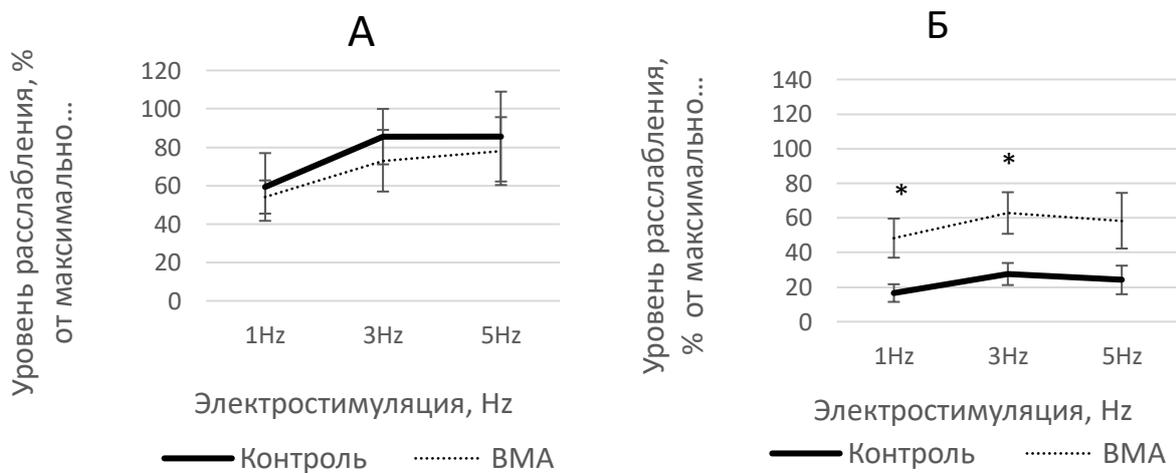


Рисунок 4 – Расслабление карбахолин-тонизированных 12-перстной (А) и подвздошной кишки (Б) крыс в возрасте 3 месяцев с вальпроатной моделью аутизма (ВМА), вызванные стимуляцией электрическим полем. Результаты представлены в виде  $M \pm m$  в % от максимально возможного расслабления, принятого за 100%. \*-  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой

#### **Влияние стимуляции электрическим полем на сократительную активность мочевого пузыря, семявыносящего протока и матки крыс**

Сокращения мочевого пузыря крыс с ВМА возрасте 3 месяцев, вызванные СЭП частотой 3 и 5 Гц, статистически значимо ниже примерно в 1,5 раза ( $21,78 \pm 3,24\%$ ,  $27,14 \pm 3,86\%$ ,  $n=19$ ), чем в контрольной группе животных ( $33,8 \pm 4,0\%$ ,  $43,2 \pm 5,24\%$ ,  $n=14$ ,  $p < 0,05$ ). В сокращениях мочевого пузыря 9-ти месячных крыс с ВМА, вызванных СЭП, не обнаружено статистически значимой разницы с контрольными значениями.

При сокращении семявыносящего протока крыс в возрасте 3 месяцев электростимуляций статистически достоверных различий между группами не выявлено. Сокращения семявыносящего протока крыс с ВМА в возрасте 9 месяцев, вызванные СЭП частотой 5 Гц, были статистически значимо сильнее ( $36,90 \pm 7,80\%$ ,  $n=12$ ), чем в контроле почти в 3 раза ( $13,1 \pm 4,15\%$ ,  $n=8$ ,  $p < 0,05$ ).

СЭП вызывала сокращения изолированного препарата матки крыс в возрасте 3 и 9 месяцев, которые статистически значимо не различались в опытной и контрольной группах ( $n=11-16$ ). В матке выявленные нарушения носят другой характер. Изменения сократительной активности регистрируются как в возрасте 3 месяца, так и на позднем сроке (9 месяцев). Поскольку в матке существенно изменяются сократительные ответы на прямые агонисты рецепторов и не изменяются сокращения, вызванные СЭП, предположительно, что нарушения локализованы на постсинаптическом уровне. Это может приводить к нарушению фертильности животных.

#### **Активность экто-нуклеотидаз в тканях кишечника крыс**

У крыс с ВМА в образцах 12-перстной кишки крыс наблюдалась повышенная активность экто-нуклеотидазы в 3 раза по сравнению с контрольными образцами, при этом в опытных образцах подвздошной кишки крыс аналогичного возраста активность этого фермента была ниже в 1,5 раза контрольных значений (Рисунок 5).

Активность экто-нуклеотидазы в образцах 12-перстной кишки крыс с ВМА 9 месяцев ( $1808,42 \pm 184,50$ ;  $n=12$ ) статистически значимо не отличались от контроля ( $2115,05 \pm 393,30$ ;  $n=11$ ), тогда как в образцах подвздошной кишки крыс с ВМА 9 месяцев активность фермента была выше более чем в 2,5 раза ( $1766,32 \pm 186,92$   $n=10$ ) по сравнению с контрольными значениями ( $632,19 \pm 163,93$   $n=8$ ).

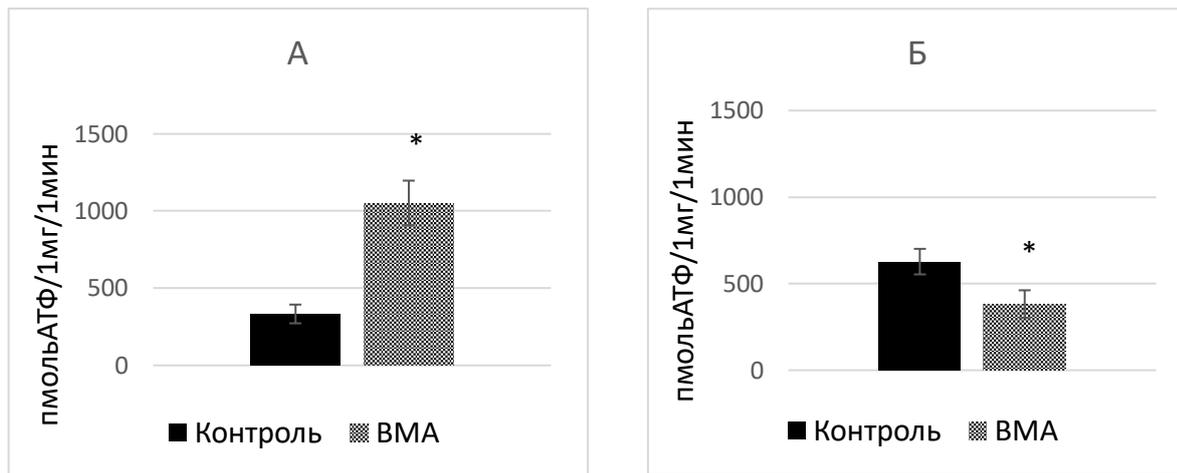


Рисунок 5 – Активность экто-нуклеотидазы гладкомышечных тканей 12-перстной кишки (А) и подвздошной кишки (Б) крыс вальпроевой моделью аутизма (ВМА) 3 месяцев. Данные представлены в виде  $M \pm m$ . \* $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой; активность фермента выражена в пикомолях АТФ, разрушенных 1 мг сырой ткани в 1 мин

#### Активности экто-нуклеотидаз в тканях мочевого пузыря, семявыносящего протока и матки крыс

Активность экто-нуклеотидазы в образцах семявыносящего протока крыс с ВМА 3 месяцев статистически значимо выше в 2 раза контрольных значений. У крыс с ВМА 9 месяцев активность экто-нуклеотидазы в образцах семявыносящего протока в 3,5 раза ниже, чем в контроле (Таблица 2).

Таблица 2 – Активность экто-нуклеотидазы в гладкомышечных тканях семявыносящего протока крыс с вальпроевой моделью аутизма (ВМА) 3 и 9 месяцев,  $M \pm m$  (n)

Возраст	Контроль	ВМА
3 месяца	165,1±36,7 (12)	332,3±48,5* (32)
9 месяцев	2114,6±524,3 (15)	609,5±153,9* (10)

Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой; активность фермента выражена в пикомолях АТФ, разрушенных 1 мг сырой ткани в 1 мин

В образцах мочевого пузыря наблюдается повышенная активность фермента в 2 раза у крыс с ВМА 3 месяцев по сравнению с контролем. У 9-месячных крыс с ВМА в образцах мочевого пузыря активность экто-нуклеотидазы

статистически не отличается от значений активности фермента в образцах ткани интактных животных (Таблица 3).

Таблица 3 – Активность экто-нуклеотидазы в гладкомышечных тканях мочевого пузыря крыс с вальпровой моделью аутизма (ВМА) 3 и 9 месяцев,  $M \pm m$  (n)

Возраст	Контроль	ВМА
3 месяца	208,1±31,3 (11)	477,6±45,6* (31)
9 месяцев	2302,3±615,8 (19)	1021,3±280,7 (12)

Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой; активность фермента выражена в пикомолях АТФ, разрушенных 1 мг сырой ткани в 1 мин

Активность экто-нуклеотидазы в образцах матки 3-месячных крыс с ВМА статистически значимо ниже контрольных значений, так же, как и у крыс 9 месяцев (Таблица 4).

Таблица 4 – Активность экто-нуклеотидазы в гладкомышечных тканях матки крыс с вальпровой моделью аутизма (ВМА) 3 и 9 месяцев,  $M \pm m$  (n)

Возраст	Контроль	ВМА
3 месяца	175,0±22,0 (25)	112,4±17,4* (25)
9 месяцев	539,6±63,5 (6)	232,7±2* (19)

Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой; активность фермента выражена в пикомолях АТФ, разрушенных 1 мг сырой ткани в 1 мин

В ходе хроматографического анализа была определена активность экто-нуклеотидазы в гладкомышечных тканях крыс 3 и 9 месяцев с вальпроатной моделью аутизма. Было установлено, что пуринергическая сигнализация вносит незначительный вклад в механическую активность кишечника, мочевого пузыря и семявыносящего протока 3-месячных крыс с вальпроатной моделью аутизма, а также подтверждает предположение о том, что нарушения сократимости матки связаны с изменениями на постсинаптической мембране.

### Выводы:

1. Агонисты P2-рецепторов (АТФ,  $\alpha, \beta$ -метилен-АТФ,  $\beta, \gamma$ -метилен-АТФ, 2-метилтио-АТФ), холинорецепторов карбахолин и адренорецепторов норэпинефрин оказывают разнонаправленные влияния на механическую

активность изолированных гладкомышечных тканей кишечника, мочевого пузыря, семявыносящих протоков и матки крыс с вальпроатной моделью аутизма в возрасте 3 и 9 месяцев.

2. Агонисты P2X-рецепторов  $\alpha,\beta$ -метилен-АТФ и  $\beta,\gamma$ -метилен-АТФ вызывают сокращения изолированной матки крыс с вальпроатной моделью аутизма, которые у животных в возрасте как 3, так и 9 месяцев статистически значимо менее выражены по сравнению с показателями контрольных животных того же возраста. Сила сокращения изолированного семявыносящего протока трёхмесячных крыс с вальпроатной моделью аутизма, вызванные  $\alpha,\beta$ -метилен-АТФ, статистически значимо меньше по сравнению с аналогичными сокращениями семявыносящего протока контрольных животных. В других исследованных тканях крыс с вальпроатной моделью аутизма не происходят существенных изменений в сократительных ответах, вызванных агонистами P2-рецепторов, по сравнению с показателями контрольных животных.

3. Карбахалин вызывает более выраженные сократительные ответы изолированной 12-перстной и подвздошной кишки крыс в возрасте 3 месяцев с вальпроатной моделью аутизма по сравнению с контрольными животными. Расслабление карбахалин-тонизированной подвздошной кишки крыс 3 месяцев с моделью аутизма, вызванные стимуляцией электрическим полем, статистически значимо менее выражено по сравнению с контрольной группой.

4. Сократительные ответы изолированной матки крыс с моделью аутизма в возрасте 9 месяцев, вызванные карбахалином, статистически значимо ниже, чем в контрольной группе.

5. Норэпинефрин не изменяет своего влияния на сократительную активность изолированного семявыносящего протока крыс с моделью аутизма в возрасте 3 и 9 месяцев по сравнению с контролем.

6. У крыс 3 месяцев с вальпроатной моделью аутизма активность экто-нуклеотидаз статистически значимо выше контрольных значений в гладкомышечных тканях 12-перстной кишки, семявыносящего протока и мочевого пузыря, тогда как у крыс в возрасте 9 месяцев показатели активности

экто-нуклеотидаз ниже контрольных значений в тканях семявыносящего протока и матки.

### **Практические рекомендации**

1. При проведении исследований с использованием крыс с вальпроатной моделью аутизма следует оценивать не только поведенческие реакции экспериментальных животных, но и характер и выраженность нарушений функции желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы.

2. Следует обратить внимание, что у самок крыс с вальпроатной моделью аутизма может быть существенно нарушена функция репродуктивной системы.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы**

Результаты диссертации определяют направления будущих научных исследованиях, посвященных более глубокому изучению причин и механизмов развития нарушений ЖКТ и мочеполовой системы животных с моделью аутизма в экспериментах *in vivo*.

### **Список работ, опубликованных по теме исследования**

1. Иванова Д.В. Соматические нарушения при аутизме как один из факторов нарушения поведения и социального взаимодействия/ Д.В. Иванова, И.И. Сёмина, А.У. Зиганшин // Казанский медицинский журнал. – 2019. – Т. 100, № 4. – С.689-694. DOI: 10.17816/KMJ2019-689
2. Иванова Д.В. Нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта и возможные механизмы их развития при расстройствах аутистического спектра / Д.В. Иванова, А.У. Зиганшин // Казанский медицинский журнал. – 2020. – Т.101, № 6. – С. 834-840. DOI:10.17816/KMJ2020-834
3. Иванова Д.В. Влияние лигандов холино- и пуринорецепторов на механическую активность кишечника крыс с моделью аутизма / Д.В. Иванова // Сборник материалов VII Международного молодежного научного медицинского форума «Белые цветы». – Казань, 2020. – С. 159.
4. Иванова Д.В. Оценка сократительной активности гладкомышечных тканей при моделировании аутизма у крыс / Д.В. Иванова // Сборник материалов VIII

Международного молодежного научного медицинского форума «Белые цветы». – Казань, 2021. – С. 1117-1118.

5. Зиганшин А.У. Участие пурино-, адрено- и холинорецепторов в дисфункции внутренних органов при расстройствах аутистического спектра / А.У. Зиганшин, Д.В. Иванова // Тезисы докладов VII конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии». - Москва, 2021. - С 21.

6. **Зиганшин А.У. Вызванные карбахолом сокращения изолированной тонкой кишки возрастают у крыс с экспериментальным аутизмом, вызванным вальпроевой кислотой / А.У. Зиганшин, Д.В. Иванова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2021. – № 84. – С. 99-103. DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-2-99-103**

7. **Иванова Д.В. Оценка нарушений сократительной активности гладкомышечных тканей 9-месячных крыс с моделью аутизма / Д.В. Иванова, А.У. Зиганшин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. – Т. 174 (9). – С. 306-310. DOI: 10.47056/0365-9615-2022-174-9-306-310**

8. Иванова Д.В. Влияние лигандов холино- и пуринорецепторов на механическую активность матки крыс с моделью аутизма / Д.В. Иванова // Тезисы докладов 28-ой конференции молодых ученых «Белые цветы». Казань, 2022. – С. 922-923.

9. **Иванова Д.В. Сравнительная оценка нарушений сокращений изолированной матки крыс с моделью аутизма в возрасте 3 и 9 мес / Д.В. Иванова, А.У. Зиганшин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2023. –Т. 175 (3). – С. 321-325. DOI: 10.47056/0365-9615-2023-175-3-321-325**

10. Иванова Д.В. Оценка механической активности матки крыс с вальпроатной моделью аутизма / А.У. Зиганшин, Д.В. Иванова // Сборник тезисов докладов VIII конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии». – Санкт-Петербург, 2023. – С. 50.

11. Иванова Д.В. Изучение нарушений механической активности гладкомышечных изолированных тканей желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы крыс с вальпроатной моделью аутизма /Д.В. Иванова, А.У. Зиганшин // Экспериментальная и клиническая фармакология. Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2023. – Т. 86, № S11. – С. 63. DOI: 10.30906/ekf-2023-86s-63

### **Список сокращений**

АТФ — аденозинтрифосфат

АДФ — аденозиндифосфат

УТФ — уридинтрифосфат

ВМА — вальпроатная модель аутизма

ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография

ЖКТ — желудочно-кишечный тракт

РАС — расстройство аутистического спектра

СЭП — стимуляция электрическим полем

ЦНС — центральная нервная система