

Хайруллин Адель Евгеньевич

**АГОНИСТЫ И АНТАГОНИСТЫ ПУРИНОРЕЦЕПТОРОВ В
РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СКЕЛЕТНЫХ
МЫШЦ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

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

Научные консультанты: доктор медицинских наук, профессор
Зиганшин Айрат Усманович
доктор биологических наук, доцент
Гришин Сергей Николаевич

Официальные оппоненты:

Спасов Александр Алексеевич – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакологии и биоинформатики, заведующий кафедрой

Воронина Татьяна Александровна – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», руководитель отдела нейropsychофармакологии

Сайфутдинов Марат Саматович – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научная лаборатория Клиники патологии позвоночника и редких заболеваний, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ года в __ часов на заседании диссертационного совета 21.2.012.01 при ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России по адресу: 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д.49

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России по адресу: 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д.49Б и на сайте организации (<http://kazan-gmu.ru>).

Автореферат разослан «__» _____ года

Учёный секретарь диссертационного совета,
д.м.н., профессор

Хасанова Г.Р.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Пуринергическая сигнализация является одной из самых древних и достаточно распространенных регуляторных систем (Abbracchio M.P. et al., 2009). Основные эндогенные участники этой системы – аденозин и аденозинтрифосфат (АТФ) – воздействуют на специфические трансмембранные рецепторы. В настоящее время известно четыре типа аденозиновых (A1, A2A, A2B и A3), семь подтипов ионотропных P2X (P2X1-7) и восемь подтипов метаботропных P2Y (P2Y₁₋₁₄) рецепторов (Alexander S.P. et al., 2013). Эти рецепторы широко распространены в тканях человека и животных, в том числе в скелетной мускулатуре (Burnstock G., 2013). Ранее было показано, что АТФ и ее метаболиты определяют эффективность нервно-мышечной передачи на всех значимых этапах: некантовой и спонтанной кантовой секреции, кантового состава вызванной секреции, состояния швановской клетки и постсинаптической мембраны (Grishin S.N. et al., 2005; Galkin A.V. et al., 2001; Маломуж А.И., Никольский Е.Е., 2007).

Считается, что в физиологических условиях P2-рецепторы являются лишь модуляторами разнообразных функций клеток и органов (Burnstock G. 2012); при этом их регуляторная роль значительно возрастает в патологических условиях, когда они могут осуществлять главенствующую роль в качестве сигнальных молекул (Burnstock G. 2013).

В настоящее время в клинической практике успешно применяются блокаторы P2Y₁₂-рецепторов тромбоцитов (клопидогрел, кангрелор, тикагрелол) в качестве эффективных антиагрегантов (Gragnano F. et al., 2023; Nappi F. 2024), а агонист P2Y₂-рецепторов – диквафазол – для лечения синдрома «сухого глаза» (Ohashi Y. et al., 2020). В экспериментальных условиях обнаружено противовоспалительное, противоопухолевое, обезболивающее, седативное и другие эффекты различных агонистов и антагонистов P2-рецепторов, некоторые из которых в настоящее время находятся либо на этапе доклинических, либо на разных стадиях клинических исследований (Burnstock G. 2017; da Silva Ferreira T.A. et al., 2019; Inoue Y. 2022; Di Virgilio F. et al., 2024).

Скелетные мышцы составляют гетерогенную популяцию, различают быстрые, медленные и смешанные, отличающиеся качественным составом сократительных белков, силой и скоростью сокращения, устойчивостью к утомлению, разным ответом на изменяющиеся условия функционирования.

Задача поиска эффективного, нетоксического, предпочтительно эндогенной природы фактора, способного корректировать нарушения двигательной активности после повреждения нервных структур в настоящее время не решена (Masini D. et al., 2022; Sharma P.K. et al., 2020).

Результаты этого исследования дополняют знания о процессах в системе мотонейрон-скелетная мышца млекопитающих в физиологических и патологических условиях. Одновременно обоснована перспективность

использования агонистов и антагонистов P2-рецепторов в различных нефизиологических, в том числе экстремальных, ситуациях, что создает основу для поиска новых лекарственных средств, способных осуществлять коррекцию тех патологических состояний, при развитии которых мишенью станут P2-рецепторы.

Степень разработанности проблемы

Более 20 лет назад было обнаружено, что АТФ и аденозин оказывают схожее действие на квантовый выход нейромедиатора в мионевральном синапсе теплокровных – снижают наполовину частоту спонтанных одноквантовых ответов, однако только АТФ (но не аденозин) ингибирует неквантовый выброс ацетилхолина (АХ). Определён эффектор пресинаптического действия АТФ в нервно-мышечной передаче теплокровных – протеинкиназа С (PKC) (Galkin A.V. et al., 2001).

С помощью микроэлектродной техники гальванического зажима (voltage-clamp) было обнаружено, что АТФ и аденозин почти одинаково на треть снижают амплитуду токов концевой пластинки в нервно-мышечном синапсе лягушки. Ингибирование выброса АХ в нервно-мышечной передаче АТФ и аденозином опосредовано через разные пресинаптические пуриновые рецепторы, метаботропные P2Y для АТФ и аденозиновые для аденозина (Grishin S.N. et al., 2002).

Вместе с тем, выявлено, что обнаруженные механизмы и направление пресинаптического действия АТФ не универсальны. Так, в синапсах «смешанной» мышцы диафрагмы АТФ оказывает пресинаптический облегчающий эффект (Grishin S.N. et al., 2006), аналогичный эффект наблюдается в истинно тонических мышцах, что широко распространено у холоднокровных. У теплокровных такие мышцы обнаруживаются только в зрительной и слуховой сенсорных системах. Протеинкиназа С выступает общим эффекторным участником реализации действия АТФ во всех этих мышцах (Grishin S.N. et al., 2011, 2013).

Показано, что степень P2-рецептор-опосредованного угнетения нервно-мышечной передачи в скелетной мышце лягушки зависит от температуры: снижение температуры увеличивает, а повышение – уменьшает угнетающее действие АТФ на сократительные ответы и токи концевой пластинки скелетной мышцы (Ziganshin A.U. et al., 2005). Высказаны предположения о существовании и функциональной значимости постсинаптических P2-рецептор-опосредованных процессов (Гришин С.Н. и др., 2022).

Несмотря на определенные успехи в исследовании биологической роли пуринергической системы в организме, многие механизмы её функционирования в нервно-мышечном синапсе остаются неисследованными.

Цель работы – изучение пуринергической регуляции сократимости скелетной мускулатуры в норме и патологии, а также исследование механизмов, модулирующих эффекты агонистов и антагонистов пуринорецепторов.

Задачи:

1. Изучить пресинаптические и постсинаптические эффекты и механизмы действия агонистов и антагонистов пуринорецепторов в различных типах скелетных мышц экспериментальных животных.
2. Установить влияние агонистов и антагонистов пуринорецепторов на сократительную активность быстрых и медленных скелетных мышц крысы при экспериментальной гипотермии.
3. Провести оценку иммуногистохимического исследования экспрессии подтипов P2-рецепторов в камбаловидной, диафрагмальной мышцах и длинном разгибателе пальцев крысы.
4. На моделях контузионной травмы и перерезки спинного мозга, а также при перерезке седалищного нерва исследовать участие P2-рецепторов в нервно-мышечной передаче в скелетных мышцах крысы.
5. Выявить влияние агонистов и антагонистов P2-рецепторов на сократительную активность в быстрых и медленных скелетных мышцах экспериментальных животных в условиях белковой сенсibilизации.
6. На модели бокового амиотрофического склероза у мышей оценить участие P2-рецепторов в нервно-мышечной передаче в скелетных мышцах.

Научная новизна

Впервые в скелетных мышцах различных фенотипов крыс определен весь набор подтипов P2-рецепторов, вовлеченных в синаптический механизм модуляции нервно-мышечной передачи. Показано, что в скелетных мышцах крыс пресинаптические эффекты АТФ, которые опосредуются P2Y₁₃-рецепторами, преобладают над его постсинаптическими эффектами, которые связаны с влиянием на P2X₁- и P2X₂-рецепторы, маскируя их.

Приоритетным результатом работы явилось представление о том, что денервация способствует инициации сокращения мышц под действием АТФ.

Новым является то, что ряд травм спинного мозга и развитие нейродегенеративных заболеваний сопровождается нарушением модулирующего влияния АТФ на нервно-мышечную передачу. При травме спинного мозга, перерезке спинного мозга и седалищного нерва происходит значительное снижение, а при моделировании бокового амиотрофического склероза – полностью исчезает модулирующее действие АТФ на силу сокращений скелетных мышц.

Впервые установлена локализация проблем в нервно-мышечном синапсе при ряде патологических состояний: гипотермия и белковая сенсibilизация сопровождаются изменениями пуринергической модуляции в постсинаптической области нервно-мышечного контакта, а при моделировании травм и бокового амиотрофического склероза изменения происходят преимущественно в пресинаптической зоне.

Теоретическая и практическая значимость работы

Выявленный в работе набор вовлеченных в синаптический механизм модуляции подтипов P2-рецепторов (P2X1-, P2X2- и P2Y₁₃-рецепторы) является перспективной мишенью для возможного фармакологического воздействия, направленного против негативных последствий ряда патологий. Данные о том, что гипотермия и белковая сенсибилизация сопровождаются изменениями пуринергической модуляции в постсинаптическом полюсе, а травмы и боковой амиотрофический склероз – в пресинаптическом могут позволить осуществлять адресную коррекцию этих состояний.

Из результатов исследований в условиях гипотермии следует практическая рекомендация о том, что при исследовании роли пуринорецепторов необходимо учитывать изменение эффективности агонистов и антагонистов этих рецепторов, в том числе при пониженной температуре.

Особую значимость имеют результаты исследования постсинаптических эффектов внеклеточной АТФ, скрытых в физиологических условиях в результате перекрывания их противоположными по знаку пресинаптическими действиями АТФ, но проявляющихся при ряде патологических состояний.

Впервые обнаруженное сокращение денервированной скелетной мышцы под действием экзогенной АТФ имеет важное значение для более полного понимания механизмов функционирования нервно-мышечной системы и в том числе для разработки принципиально новых подходов к лечению заболеваний, связанных с нарушениями мышечной активности.

Методология и методы исследования

В настоящей работе использованы фармакологический, механомиографический, электрофизиологический, иммуногистохимический и биохимический методы исследования, что позволяет оценить эффективность агонистов и антагонистов P2-рецепторов в модуляции сократительной активности скелетных мышц экспериментальных животных *in vitro* в норме и на различных моделях патологий.

Положения, выносимые на защиту

1. Пуринергическая система является важным компонентом регуляции функционирования скелетных мышц, которая осуществляется посредством избирательной экспрессии P2- и аденозиновых рецепторов, компонентов систем внутриклеточных вторичных посредников и экто-нуклеотидаз.

2. В синапсах скелетных мышц экспериментальных животных эффекты АТФ реализуются как в пре-, так и в постсинаптической области в отличие от эффектов аденозина, которые являются исключительно пресинаптическими. Пресинаптические эффекты пуринов в скелетных мышцах опосредованы активацией P2- и аденозиновых рецепторов, G_{i/o}-белка, систем внутриклеточных вторичных посредников и кальциевых каналов L-типа, тогда как постсинаптическое действие АТФ связано с изменением активности никотиновых холинорецепторов.

3. Антагонист P2-рецепторов сурамин предупреждает влияния АТФ на сократительную способность мышц; в то время как антагонист аденозиновых рецепторов 8-пара-сульфобензил-теофиллин угнетает влияния аденозина на сокращения исследуемых мышц, но не изменяет эффекты АТФ.

4. Экспериментальная гипотермия и белковая сенсibilизация сопровождаются специфическими изменениями в постсинаптической области пуринергической регуляции функционирования скелетных мышц. При контузионной травме, перерезке спинного мозга, денервации и боковом амиотрофическом склерозе угнетается пресинаптическое звено пуринергической регуляции.

Степень достоверности результатов

Планирование всех исследований проведено на основе тщательно проведенного литературного анализа научной проблемы. Дизайн экспериментальных процедур включал обязательное использование как опытных, так и контрольных групп животных. Достоверность полученных в исследовании результатов базируется на использовании необходимого и достаточного числа экспериментов, применении адекватных задач методов исследования, проведении тщательного анализа полученных результатов, включающего соответствующие методы статистической обработки.

Апробация работы

Результаты диссертационного исследования доложены на XVIII и XIX Всемирном конгрессе по фармакологии (Киото, 2018; Глазго, 2023), VI Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (Москва, 2020), Всероссийской научной конференции «Теоретические и практические аспекты действия естественной и искусственной гипотермии на организм» (Махачкала, 2021), VII и VIII Съездах физиологов СНГ (Сочи-Дагомыс, 2021, 2022), XIX симпозиуме с международным участием «Эколого-физиологические проблемы адаптации» (Казань, 2022), IX Российской, с международным участием, конференции по управлению движением, посвященной 95-летию со дня рождения И. Б. Козловской (Казань, 2022), IX Молодежной международной научно-технической конференции «Прикладная электродинамика, фотоника и живые системы» (Казань, 2022), I Всероссийской научно-практической конференции, (Йошкар-Ола, 2022), Международной междисциплинарной конференции «ICMESC 2022» (Барселона, 2022), Съезде биофизиков России (Краснодар, 2023), Съезде российского физиологического общества (Санкт-Петербург, 2023), VI Съезде фармакологов России (Москва, 2023), Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология» (Санкт-Петербург, 2023), XI Всероссийской с международным участием школеконференции по физиологии мышц и мышечной деятельности (Москва, 2024), XXVI Всероссийском конгрессе с международным участием «Давиденковские чтения» (Санкт-Петербург, 2024), Всероссийской научно-практической

конференции с международным участием «Учение академика И. П. Павлова в современной системе нейронаук» (Санкт-Петербург, 2024).

Апробация работы проведена на заседании научно-проблемной комиссии «Фундаментальные медицинские и биологические науки» ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (протокол № 3 от 29 октября 2024 г.).

Личный вклад автора

Автором самостоятельно проведен литературный поиск, определен дизайн исследования, проведены необходимые серии экспериментов. Автор принимал непосредственное участие во всех этапах исследования, осуществлял экспериментальные процедуры, проводил статистическую обработку и обобщение экспериментальных данных, готовил к публикации статьи и тезисы, оформлял автореферат и рукопись диссертации.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 47 научных работ, из них 22 в российских и зарубежных журналах, входящих в базы Scopus и Web of Science, одна монография и один патент.

Внедрение результатов работы

Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедрах фармакологии, биохимии, нормальной физиологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России и используются при обучении студентов и ординаторов.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 199 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов, использованных в исследованиях, результатов исследований, обсуждения, заключения, практических рекомендаций, списка литературы и 16 приложений. Работа иллюстрирована 38 рисунками и 12 таблицами. Список литературы включает 369 источников, из них 14 отечественных и 355 зарубежных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Объекты

Исследование выполнено на базе кафедры фармакологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Исследования проводились на нервно-мышечных препаратах белых лабораторных крыс и белых мышей, которые содержались в группах по 5 особей с водой и кормом *ad libitum*. Всего в этом исследовании было использовано 302 крысы и 83 мыши. В исследовании проведено 13 серий экспериментов (Таблица 1).

Таблица 1 – Описание экспериментальных серий в исследовании

№	Экспериментальные серии	Животное, число (n)
1.	Электрофизиологические эксперименты	мыши, n=14
2.	Механомиографические эксперименты по определению пресинаптических эффектов пуринов	крысы, n=38
3.	Механомиографические эксперименты по определению постсинаптических эффектов пуринов	крысы, n=28; мыши, n=12
4.	Модель гипотермии	крысы, n=108; мыши, n=30
5.	Определение активности экто-нуклеотидаз в скелетных мышцах	крысы, n=24
6.	Определение подтипов P2-рецепторов в скелетных мышцах	крысы, n=32
7.	Модель денервации	крысы, n=12
8.	Модель гиподинамии	крысы, n=12
9.	Модель контузионной травмы спинного мозга	крысы, n=12
10.	Модель перерезки спинного мозга	крысы, n=12
11.	Модель белковой сенсibilизации	мыши, n=12
12.	Модель расстройств аутистического спектра	крысы, n=24
13.	Модель бокового амиотрофического склероза	мыши, n=15

Для проведения экспериментов *in vitro* животных предварительно наркотизировали, выводили из эксперимента, обескровливали и выделяли из задних конечностей *m. soleus* (камбаловидную мышцу) и *m. EDL* (длинный разгибатель пальцев), а также *m. diaphragma* (диафрагмальную мышцу). Эксперименты были проведены согласно протоколу ухода за животными и требованиям Директивы Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС.

Регистрация потенциалов концевой пластинки (ПКП)

Эксперименты выполняли на изолированном нервно-мышечном препарате *m. diaphragma – n. phrenic* белых мышей обоего пола, весом 20-25 г. Изолированный препарат помещали в ванночку объемом 5 мл, через которую протекал раствор Рингера для теплокровных, рН 7,3-7,4. Микроэлектродные эксперименты проводили при температуре $20,0 \pm 0,3^\circ\text{C}$, стабилизацию которой осуществляли при помощи встроенных в дно ванночки элементов Пельтье.

Диафрагмальный нерв раздражали через всасывающий электрод прямоугольными импульсами сверхпороговой амплитуды и длительностью 0,2 мс с частотой 0,5 Гц (Рисунок 1).

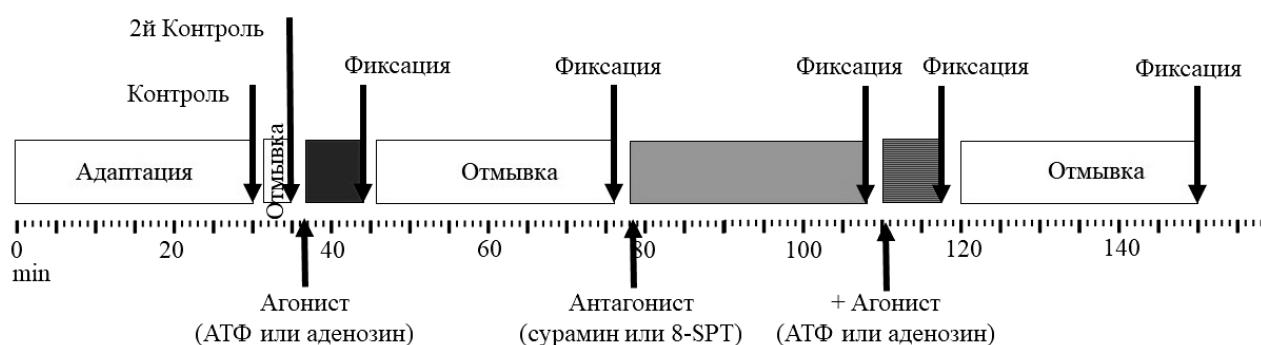


Рисунок 1 – Общая схема электрофизиологических и фармакологических экспериментов *in vitro*

Изометрическая регистрация сократительных ответов изолированных нервно-мышечных препаратов крыс и мышей

Выделенные мышцы фиксировали к датчику двигательной активности и погружали в ванночки объемом 10 мл, наполненные раствором Кребса, рН=7,4, $t=37 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Электростимуляцию проводили через культю нерва с помощью всасывающего электрода. Для раздражения использовали электростимулятор Digitimer MultiStimul D330 (Англия). Мышцы стимулировали в течение 2 минут прямоугольными импульсами амплитудой 10 В, продолжительностью 0,5 мс при частоте 0,1 Гц, либо сократительные ответы вызывали добавлением в ванночку карбахолина в субмаксимальной концентрации (Ziganshin A.U. et al., 2017).

Силу сокращений мышц регистрировали датчиком двигательной активности Linton FCG-01 (Англия), аналоговый сигнал преобразовывался системой сбора данных Biopack MP100MSW (США). Все полученные ответы в течение 2 минут (12 сократительных ответов) усредняли и обрабатывали как один результат.

В ванночку добавляли 100 мкМ одного из агонистов (АТФ или аденозина) и через 10 минут оценивали механические ответы мышцы. Затем исследуемые объекты инкубировали с раствором одного из антагонистов: 100 мкМ 8-(*p*-сульфофенил) теофиллином (8-SPT), 0,1 мкМ DPCPX, 100 мкМ сурамином, 10 мкМ N-этилмалеимидом, 50 мкМ Rp-cAMP, 5 мкМ хелеритрином, 5 мкМ нитрендипином либо 10 мкМ d-тубокурарином (d-ТБК) в

течение 15 минут с последующим добавлением АТФ или аденозина и снова регистрировали механические ответы мышц. В контрольных экспериментах нервно-мышечную ткань инкубировали одним из антагонистов в концентрации 100 мкМ, через 20 минут регистрировали сократительные ответы мышц, возникающие в ответ на непрямую стимуляцию электрическим током. Для регистрации тетанических сокращений увеличивали частоту электрических импульсов до 15 Гц для *m. soleus* и до 20 Гц для *m. EDL*. Все полученные данные рассчитывали в % относительно исходных результатов, полученных в начале эксперимента при 37 °С.

Температурная зависимость

Оценка влияния агонистов и антагонистов пуринорецепторов на сократительную активность *m. soleus* и *m. EDL*, инициированную как электрическим током, так и аппликацией карбахолина, проводилась вначале при температуре 37 °С. Далее температуру последовательно снижали до 34, 30, 26, 22, 18 и 14 °С. Температуру раствора регулировали водяным насосом ТЕ-8А (Techne, Англия), быстрое снижение температуры жидкости в водяном насосе производили добавлением льда (Ziganshin A.U. et al., 2017).

Изучение роли экто-нуклеотидаз в скелетных мышцах крысы

Активность фермента экто-нуклеотидазы определяется посредством инкубирования кусочков мышечной ткани (*m. soleus*, *m. EDL*, *m. diaphragma*) крыс с АТФ (субстрат реакции) в течение определенного времени с дальнейшей оценкой содержания субстрата и продуктов реакции (АДФ, АМФ) в инкубате методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Эксперименты проводили на хроматографе производства Shimadzu (Япония), состоящем из спектрофотометрического детектора SPD-20А, дегазатора DGU-20А3, насоса LC-20АD и термостата СТО-20А, с использованием программного обеспечения LC Solution (Khairullin A.E. et al., 2023).

Иммуногистохимический метод оценки экспрессии P2-рецепторов

Препараты готовили по принципу whole-mount (Hong and Chang, 1998). Подготовленные срезы тканей инкубировали с первичными антителами (1:200, rabbit polyclonal anti-P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6, P2X7, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄, Affinity Biosciences) 8-10 часов при +4 °С, а затем инкубировали со вторичными антителами (1:800, Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit, A21206, Life Technologies) в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте. Окрашенные препараты затем помещали в среду Shandon Immu-Mount на предметном стекле. Для визуализации использовали конфокальный микроскоп Leica TCS SP5 MP (Leica, Germany), оснащенный аргоновым, гелий-неоновым и твердотельным лазерами. Изображения фиксировали программой Leica Application Suite, с разрешением изображений 2048*2048 пикселей, частотой лазера 100 Гц. Для получения корректных значений все анализируемые микрофотографии были сняты при одинаковых настройках микроскопа. Анализ изображений производился в программе Imagej Fiji.

Модель денервации на крысах

Под комбинированной анальгезией с использованием 25 мг/кг золетила (Zoletil 50, «Virbac») и 0,5 мл/кг ксилавета (XylaVET, «Pharmamagist Ltd») производили выделение седалищного нерва в стерильных условиях, отделение его от сопровождающих кровеносных сосудов с последующим удалением участка нерва размером 5 мм. Конечным этапом операции являлось ушивание раны, антисептическая обработка операционного поля.

После 7-дневного восстановления животных выводили из эксперимента, обескровливали и выделяли *m. soleus* с культей седалищного нерва (Khairullin A.E. et al., 2021).

Модель гиподинамии на крысах

Для имитации гиподинамии была использована модель антиортостатического вывешивания крыс с разгрузкой задних конечностей. В этой экспериментальной модели сведены к минимуму влияния таких нежелательных побочных факторов, как фиксация и ограничение возможности перемещения в пространстве. Сохранение подвижности благоприятно сказывается на общем состоянии животного, снимает беспокойство и агрессивность (Ильин Е.А., Новиков В.Е. 1980).

Модель контузионной травмы на крысах

Контузионную травму спинного мозга осуществляли по методике (Baltin M.E. et al., 2023). Наркотизированным животным в асептических условиях осуществляли препарирование 7-8 грудных позвонков. Проводили ламинэктомию, устанавливали трубку высотой 20 см на корни дужек ламинэктомированного позвонка и опускали внутри нее груз весом 2,5 г с высоты 5 см. Падающий груз и трубку после нанесения удара сразу же удаляли.

После семисуточного восстановления животных предварительно наркотизировали, обескровливали и выделяли *m. soleus*, *m. EDL*, *m. diaphragma* с культями нервов.

Модель спинализации на крысах

Проводили по схеме контузионной травмы, но после ламинэктомии на уровне Th6 – Th7 позвонков производили перерезку спинного мозга на данном уровне.

Модель белковой сенсibilизации на мышах

Мышей сенсibilизировали овальбумином с гелем гидроокиси алюминия (адьювант) внутрибрюшинно, дважды, вторая инъекция – через 14 дней после первой. В эксперимент животных забирали на 7-й день после второй сенсibilизирующей инъекции. В качестве контроля использовали несенсibilизированных мышей (Торшин В.И., Теплов А.Ю. 2011).

Модель бокового амиотрофического склероза на мышах

Объектом исследования были камбаловидная мышца (*m. soleus*), диафрагма (*m. diaphragma*) и длинный разгибатель большого пальца ног (*m.*

EDL) с культями нервов мышей дикого типа (n=10) и трансгенных животных (n=10), экспрессирующих мутантный ген FUS(1-359) (Funikov S.Y. et al., 2018).

Анализ данных

Статистическую обработку данных производили в программе Origin Lab.

Механо-миографические и электрофизиологические эксперименты анализировали с использованием ANOVA. Экспериментальные данные представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартная ошибка среднего.

Данные для иммуногистохимических экспериментов представлены как среднее арифметическое значение \pm стандартная ошибка среднего. Статистическая значимость между контрольной и опытной группами была подтверждена критерием Вилкоксона.

Проверку соответствия полученных данных в экспериментах на ВЭЖХ нормальному распределению проводили с помощью критерия Колмогорова. Рассчитывали средние арифметические анализируемых параметров и стандартную ошибку. Статистическую значимость наблюдаемых изменений оценивали с помощью критерия Стьюдента для независимых и попарно сопряжённых выборок. Различия рассматривали как значимые при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние агонистов и антагонистов пуринорецепторов на сократимость скелетных мышц крысы

АТФ (100 мкМ) угнетала вызванные электрической стимуляцией (ЭС) сокращения камбаловидной мышцы до $70,6 \pm 5,2\%$ от исходных значений (n=18, $p < 0,05$). Предварительная инкубация с антагонистом P2-рецепторов сурамином (100 мкМ) отменяла действие АТФ на амплитуду сокращений $101,9 \pm 7,0\%$ (n=12). Аденозин снижал амплитуду вызванных стимуляцией электрическим полем сокращений камбаловидной мышцы до $70,3 \pm 6,4\%$ (n=16, $p < 0,05$). Антагонист аденозиновых рецепторов, 8-SPT, почти полностью угнетал эффект аденозина на сокращения камбаловидной мышцы ($94,5 \pm 6,0\%$; n=9).

АТФ вызывала достоверное снижение силы сокращения *m. EDL*, тем не менее оно было в полтора раза менее выраженным, чем в случае камбаловидной мышцы. В присутствии 100 мкМ АТФ сила сокращения *m. EDL* была $86,2 \pm 3,9\%$ (n=18), и эти данные достоверно отличаются ($p < 0,05$) как от интактных сокращений, так и от выраженности эффекта АТФ у камбаловидной мышцы.

Отмена ингибиторного действия АТФ происходила под действием сурамина. Так, в его присутствии 100 мкМ АТФ действовала до $97,5 \pm 8,1\%$ (n=11, $p > 0,05$) от силы контрольных сокращений (до подачи АТФ), взятых за 100% (Рисунок 2).

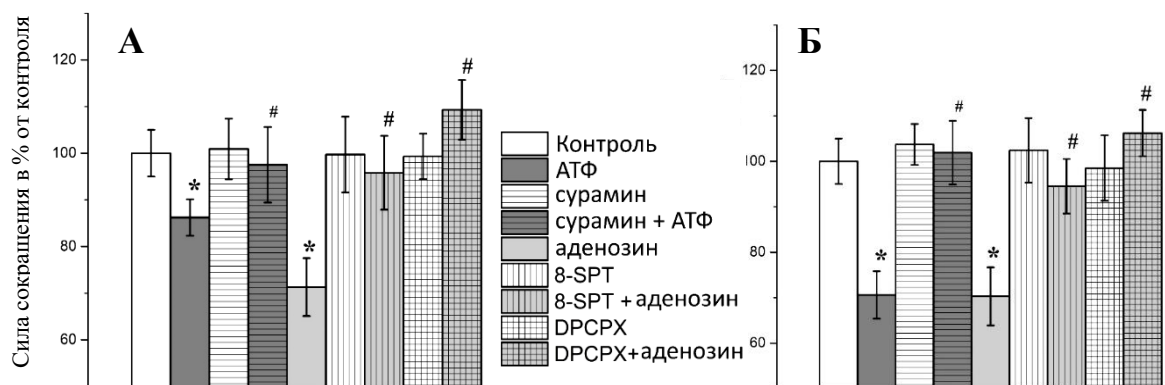


Рисунок 2 – Сила сокращений *m. soleus* и *m. EDL*, вызванных электрической стимуляцией в контроле и при добавлении в среду АТФ (100 мкМ), сурамина (100 мкМ), аденозина (100 мкМ), 8-SPT (100 мкМ), DPCPX (0,1 мкМ) или их комбинации. Примечание – *m. soleus* (А), *m. EDL* (Б); *- $p < 0,05$ по сравнению с контролем, #- $p < 0,05$ по сравнению с действием агониста

Аденозин оказывал сходное действие. К 7-й минуте его действия сила сокращения *m. EDL* составила $71,3 \pm 6,2\%$ ($n=16$, $p < 0,05$). 8-SPT практически полностью угнетал эффект аденозина на сокращения камбаловидной мышцы ($95,8 \pm 7,9\%$; $n=9$). На фоне же сурамина аденозин оказывал своё обычное ингибиторное действие.

В присутствии селективного антагониста А1 рецепторов DPCPX аппликация аденозина вызывала извращённое действие, потенцируя сокращения обеих мышц. Так, через 15 мин после добавления 100 мкМ аденозина на фоне 0,1 мкМ DPCPX сила сокращений камбаловидной мышцы выросла до $106,2 \pm 5,1\%$ ($n=8$, $p > 0,05$), а у *m. EDL* – до $109,3 \pm 6,4\%$ ($n=8$, $p > 0,05$) от контроля.

Стремясь оценить, вызывали ли параметры ЭС, используемые в экспериментах, сокращения путем стимуляции нервных окончаний, а не прямой стимуляции мышц, добавляли d-ТБК, блокатор Н-холинорецепторов, в ванночки и проводили стимуляцию. d-ТБК устранял все сократительные реакции *m. soleus* и *m. EDL* крыс, вызванные ЭС со стандартными параметрами. Увеличение напряжения с 10 В до 100 В приводило к сокращениям *m. soleus* и *m. EDL* крыс, которые не ингибировались d-ТБК. Присутствие использованных в исследовании агонистов или антагонистов не влияло на эти сокращения.

Эти эксперименты подтвердили, что используемые параметры ЭС индуцировали только процессы, опосредованные нервами, поскольку d-ТБК, антагонист никотиновых рецепторов, полностью предотвращал ЭС-индуцированные сокращения. Использование очень высокого напряжения ЭС, вероятно, вызывало прямую стимуляцию мышечных препаратов, которая не была опосредована рецепторами, поскольку не ингибировалась d-ТБК и не подвергалась влиянию АТФ или аденозина.

Влияние агонистов и антагонистов пуриnergической сигнализации на токи концевой пластинки

Аденозин концентрационно-зависимо угнетал амплитуду ПКП диафрагмы мыши – до двух третей от исходной при концентрации 100 мкМ. При этом неселективный антагонист аденозиновых рецепторов 100 мкМ 8-SPT приводит к угнетению действия аденозина на ПКП диафрагмы мышцей. Что касается АТФ, то она, наоборот, концентрационно-зависимо потенцирует амплитуду ПКП. Так, на фоне 100 мкМ АТФ потенциация достигает уже четверти от исходной величины (в контроле, перед подачей пурина). Блокада P2-рецепторов сурамином (100 мкМ) приводит к угнетению действия АТФ на ПКП диафрагмы мышцей (Таблица 2).

Таблица 2 – Эффекты аденозина и АТФ на ПКП диафрагмы мышцей в % от контроля, принятого за 100% (n=7)

Мышца	Аденозин 100 мкМ	8-SPT 100 мкМ + аденозин	АТФ 100 мкМ	сурамин 100 мкМ + АТФ
<i>m. diaphragma</i>	71,1±4,7*	94,8±5,4 [#]	123,8±4,4*	102,6±6,3 [#]

Примечание – * - p<0,05 от контроля, [#] - p<0,05 от эффекта агониста.

Было отмечено, что временные параметры вызванных ответов: время нарастания переднего фронта и тау спада ответа на фоне как АТФ, так и аденозина во всех использованных концентрациях не претерпевали достоверных изменений.

Выявление внутриклеточных посредников, участвующих в эффектах АТФ и аденозина

Известно, что P2Y-рецепторы и все аденозиновые рецепторы относятся к метаботропным, а, следовательно, активируют тот или иной подтип G-белка, поэтому в следующей серии экспериментов проверяли, не оказывают ли влияние блокатор G_{i/o}-белка N-этилмалеимид (Shapiro M.S. et al., 1994) на эффект аденозина.

N-этилмалеимид (10 мкМ) не повышал силу сокращения исследованных мышц. Так, после 20 мин его действия сила сокращения составила 105,2±4,3% (n=8; p>0,05) и 103,7±5,3% (n=8; p>0,05) от контроля, соответственно у *m. EDL* и камбаловидной мышцы. N-этилмалеимид отменял депрессивное действие аденозина на сократимость мышц. Так, на 7 минуте действия 100 мкМ аденозина сила сокращения составила 103,4±7,7% (n=8; p>0,05) от контроля у *m. EDL*, и 104,6±6,2% (n=8; p>0,05) у камбаловидной мышцы.

На фоне N-этилмалеимида устранялось и ингибиторное действие АТФ на сократимость *m. EDL* и камбаловидной мышцы (сила сокращения составила 102,7±8,0% и 99,2±7,1%, соответственно (n=8, p<0,05, Рисунок 3).

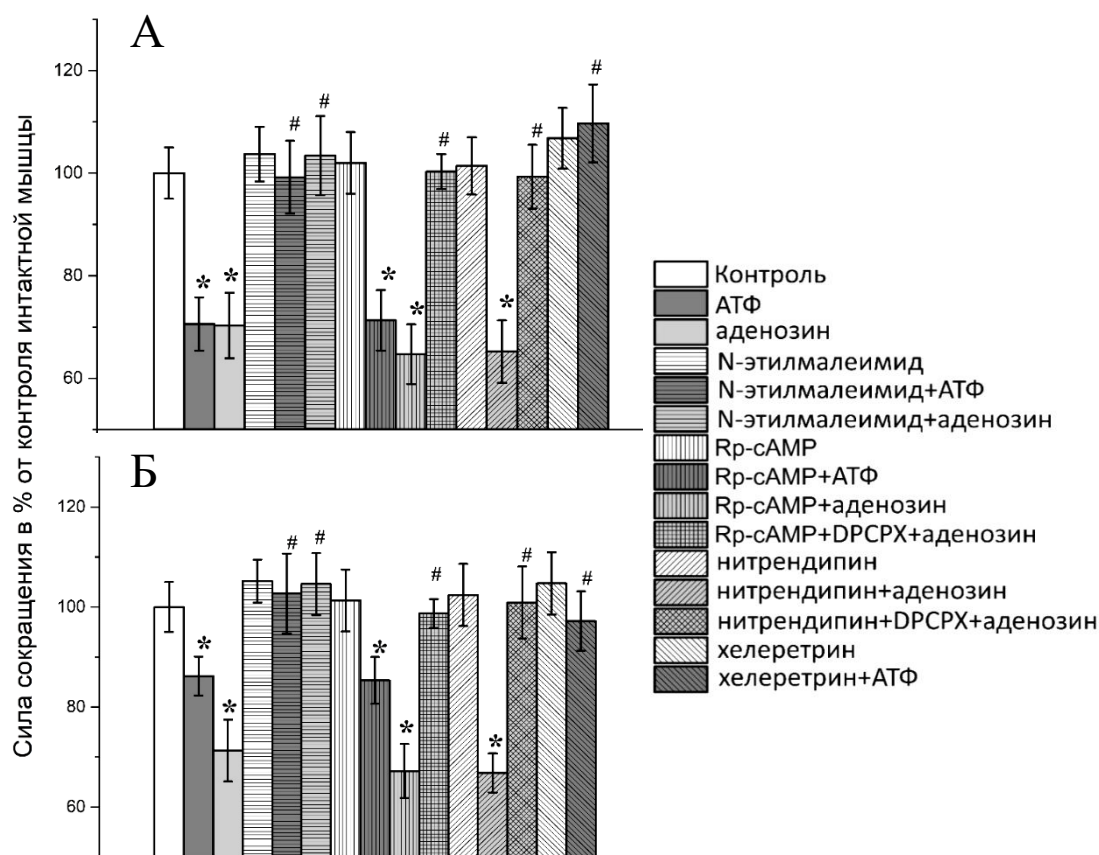


Рисунок 3 – Сила сокращений *m. soleus* и *m. EDL*, вызванных электрической стимуляцией в контроле и при добавлении АТФ (100 мкМ), аденозина (100 мкМ), N-этилмалеимида (10 мкМ), Rp-сАМФ (50 мкМ), DPCPX (0,1 мкМ), нитрендипина (5 мкМ), хелеритрина (5 мкМ) или их сочетание с агонистом. Примечание – *m. soleus* (А), *m. EDL* (Б); *- $p < 0,05$ по сравнению с контролем, #- $p < 0,05$ по сравнению с действующим веществом.

Депрессорный эффект 100 мкМ аденозина на силу сокращения камбаловидной мышцы и *m. EDL* крысы усиливался на фоне действующей концентрации ингибитора протеинкиназы А – аденозин-3',5'-цикломонофосфата (Rp-сАМФ). Так, в присутствии 50 мкМ Rp-сАМФ, аденозин снизил силу сокращения *m. soleus* до $64,7 \pm 5,8\%$ ($n=8$; $p < 0,05$), *m. EDL* - $67,2 \pm 5,4\%$ ($n=8$; $p < 0,05$) от контроля. Эти данные коррелируют с полученными ранее результатами, полученными при инкубации с антагонистом А₁ рецепторов DPCPX, поэтому в следующей серии экспериментов тестировали действие аденозина при сочетании DPCPX и Rp-сАМФ. При такой комбинации уже не наблюдалось потенцирующего эффекта аденозина на силу сокращения камбаловидной мышцы $100,3 \pm 3,4\%$ ($n=8$; $p < 0,05$) и *m. EDL* - $98,7 \pm 2,9\%$ ($n=8$; $p < 0,05$).

В следующей серии экспериментов проверяли потенцирующий эффект аденозина на фоне DPCPX при блокаде L-типа кальциевых каналов нитрендипином. На фоне нитрендипина усугублялся базовый ингибиторный эффект аденозина на обеих мышцах. Так, сокращения камбаловидной мышцы

снижались до $65,2 \pm 6,1\%$ ($n=8$, $p < 0,05$), а *m. EDL* – до $66,8 \pm 3,9\%$ ($n=8$, $p < 0,05$). На фоне Rp-cAMP не было обнаружено достоверного изменения ингибиторных эффектов АТФ на препаратах обеих исследуемых мышц. Это предполагает, что модулирующие эффекты АТФ реализуются независимо от протеинкиназы А.

Хелеритрин, блокатор протеинкиназы С, в действующей концентрации 5 мкМ (Han R. et al., 2003) существенно не изменял амплитуду сокращения исследуемых мышц. Так, через 15 мин после его аппликации сила сокращения камбаловидной мышцы составила $106,8 \pm 5,9\%$ ($n=7$; $p > 0,05$), *m. EDL* – $104,7 \pm 6,2\%$ ($n=7$; $p > 0,05$) от контроля.

Пресинаптическое действие АТФ на функциональное состояние мышц оказалось зависимым от блокады протеинкиназы С. Так, на фоне 5 мкМ хелеритрина 100 мкМ прекращалось ингибиторное действие АТФ на силу сокращения *m. EDL* ($97,2 \pm 5,9\%$ ($n=8$; $p > 0,05$)) и камбаловидной мышцы крысы ($109,7 \pm 7,6\%$ ($n=8$; $p > 0,05$)).

Иммуногистохимическое определение подтипов P2-рецепторов в мышцах

Иммуногистохимический анализ срезов *m. soleus*, *m. EDL*, *m. diaphragma* показал наличие P2X1-, P2X2-, P2Y₁₃-, подтипов рецепторов и отсутствие подтипов рецепторов P2X3, P2X4, P2X5, P2X6, P2X7, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₄ (Таблица 3).

Таблица 3 – Результаты иммуногистохимического анализа нервно-мышечных синапсов *m. soleus*, *m. EDL* и *m. diaphragma* крысы на наличие и локализацию P2-рецепторов

		Ионотропные P2X						
Мышца	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7	
<i>m. soleus</i>	+	+	-	-	-	-	-	
<i>m. EDL</i>	+	+	-	-	-	-	-	
<i>m. diaphragma</i>	+	+	-	-	-	-	-	
		Метаботропные P2Y						
Мышца	P2Y ₁	P2Y ₂	P2Y ₄	P2Y ₆	P2Y ₁₁	P2Y ₁₂	P2Y ₁₃	P2Y ₁₄
<i>m. soleus</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>m. EDL</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>m. diaphragma</i>	-	-	-	-	-	-	+	-

Из семейства ионотропных P2X-рецепторов подтипы P2X1 и P2X2 показали высокую экспрессию в исследуемых образцах ткани.

Среди семейства P2Y-рецепторов экспрессия наблюдалась в срезах, окрашенных антителами к подтипу P2Y₁₃ (Рисунок 4).

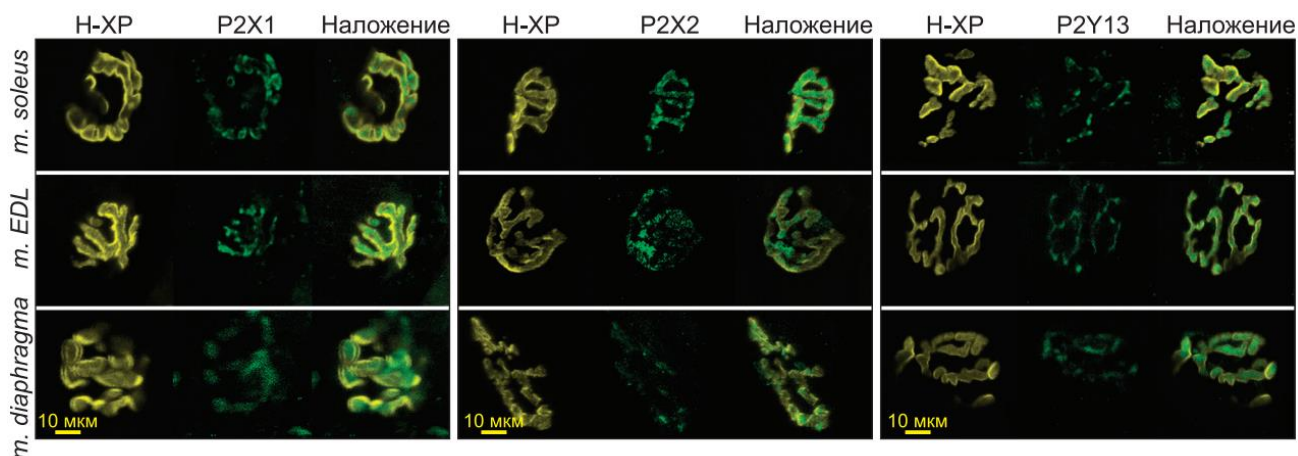


Рисунок 4 – Гистологические препараты нервно-мышечных синапсов *m. soleus*, *m. EDL* и *m. diaphragma* крысы. Иммунофлюоресцентный анализ с альфа-бунгаротоксином к Н-холинорецепторам (Н-ХР) (жёлтый) и антителами к P2X1, P2X2, P2Y13 рецепторам (зелёный)

Влияние АТФ и сурамина на амплитудно-временные характеристики сокращения медленной (*m. soleus*) и быстрой (*m. EDL*) мышц в зависимости от температуры

Параметры одиночных мышечных сокращений

При температуре 37°C усредненные по 18 экспериментам параметры сокращения *m. soleus* имели следующие характеристики: сила сокращения $2,61 \pm 0,07$ г, время сокращения $0,081 \pm 0,008$ с, время полурасслабления $0,092 \pm 0,007$ с. При снижении температуры отмечался прирост как силы сокращения, так и времени полурасслабления *m. soleus*. Так, при 14 °C сила сокращения камбаловидной мышцы достигала $4,06 \pm 0,07$ г. ($n=8$; $p<0,05$; Рисунок 5А), а время полурасслабления $0,120 \pm 0,009$ с. ($n=8$; $p<0,05$; Рисунок 5А).

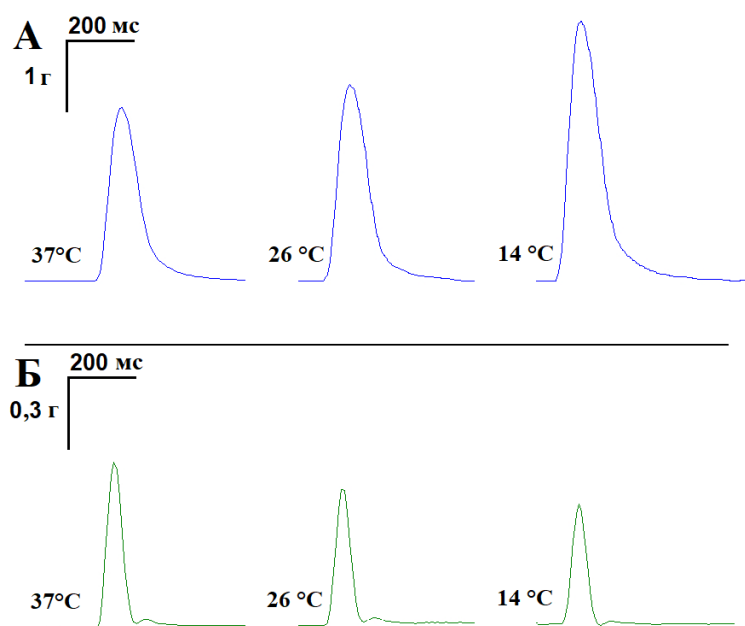


Рисунок 5 – Вид одиночных сократительных ответов *m. soleus* (А) и *m. EDL* (Б), вызванных электрической стимуляцией при различных температурах

При физиологической температуре (37 °С) усредненная по 18 экспериментам сила сокращения *m. EDL* составляла $748,3 \pm 38,9$ мг, время сокращения $0,057 \pm 0,003$ с, время полурасслабления $0,067 \pm 0,005$ с. При снижении температуры амплитуда достоверно менялась ($p < 0,05$). Как показано на рисунке 5Б, амплитуда сокращения *m. EDL* линейно снижалась и составила $491,6 \pm 49,4$ мг при 14 °С ($n=8$; $p < 0,05$), время полурасслабления *m. EDL* достоверно не изменяется, достигая $0,071 \pm 0,006$ с ($n=8$; $p < 0,05$).

При всех используемых температурах 8-SPT никак не влиял на амплитудно-временные параметры сокращения.

Сурамин предотвращал все изменения амплитудно-временных параметров сокращения камбаловидной мышцы крысы, наблюдаемые при снижении температуры. Так, на его фоне не менялась ни сила сокращения, ни время полурасслабления исследуемых мышц. В экспериментах сурамин не только противодействовал АТФ-зависимому ингибированию сокращений мышц крысы, но и предотвращал гипотермия-зависимое уменьшение сократимости – независимо от вида стимуляции. Это может означать, что так же, как и в других тканях (Salgado A.I. et al., 2000), в *m. EDL* теплокровных существует естественный механизм, с помощью которого P2-рецепторы опосредуют увеличение высвобождения АХ, что становится более заметным при низких температурах и полностью угнетается сурамином.

Влияние АТФ и сурамина на сократительные ответы мышц в условиях гипотермии

АТФ угнетала сокращения камбаловидной мышцы, вызванные электрической стимуляцией, до $66,0 \pm 3,9\%$ ($n=12$, $p < 0,05$);, но не модифицировала временные параметры таких сокращений *m. soleus* ($105,2 \pm 4,9\%$ от исходных значений, $n=18$, $p > 0,05$). АТФ угнетала сокращения длинного разгибателя пальцев до $84,2 \pm 3,7\%$ ($n=10$, $p < 0,05$), но не влияла на время полурасслабления *m. EDL* $102,7 \pm 6,1\%$ ($n=18$, $p > 0,05$) от исходных значений.

При понижении температуры омывающего камбаловидную мышцу раствора ингибиторный эффект экзогенной АТФ снижался вплоть до полного исчезновения при 14 °С.

Действие АТФ на длинный разгибатель пальцев при снижаемой от серии к серии температуре усугублялось и при 14 °С составило $36,1 \pm 5,1\%$ ($n=8$) от уровня до подачи этого пурина, что достоверно отличается ($p < 0,05$) как от контрольных значений, так и от эффекта АТФ на этой мышце при 37 °С.

На фоне действия неселективного антагониста P2-рецепторов сурамина отменялось ингибиторное действие АТФ при всех температурных режимах.

При блокаде Н-холинорецепторов тубокурарином сокращения, вызванные непрямой стимуляцией, не наблюдались. При повышении напряжения раздражающих импульсов до 100 В наблюдалась реакция на прямую стимуляцию мышечной ткани, при этом добавление 100 мкМ АТФ не оказало эффекта на силу сокращения мышц крысы.

Влияние АТФ и сурамина на тетанические сократительные ответы мышц, вызванные электрической стимуляцией в условиях гипотермии

Для регистрации «гладких» тетанических сокращений увеличивали частоту электрических импульсов до 15 Гц для *m. soleus* и до 20 Гц для *m. EDL*. Передний фронт гладких тетанусов обеих мышц, зафиксированных в условиях *in vitro*, был «классической» формы: имел постоянный прирост к силе в районе фазы «плато».

На рисунке 6 показаны, в том числе, и зубчатые тетанусы, которые регистрировались на более низких частотах, что обосновывает выбранные рабочие частоты стимуляции.

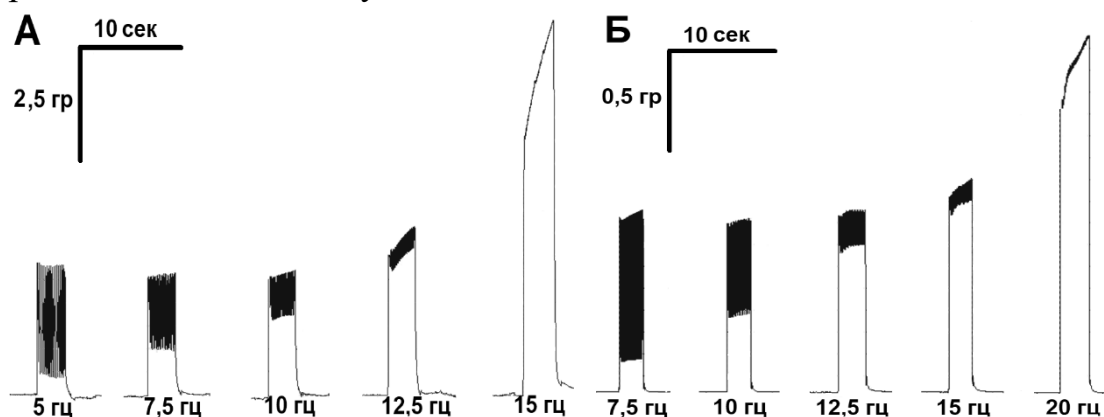


Рисунок 6 – Вид тетанусов *m. soleus* (А) и *m. EDL* (Б) при различных частотах стимуляции

АТФ и сурамин, в целом, при исследованных температурах (37, 26 и 14 °С) проявляли эффекты на амплитуды тетанических сокращений обеих типов скелетных мышц крысы, схожие с соответствующим действием этих агентов на силу одиночного мышечного сокращения в тех же условиях (Таблица 3).

Кроме того, было обнаружено снижение частоты слияния тетанических мышечных сокращений при понижении температуры на *m. soleus*, но не на *m. EDL*. АТФ и сурамин модулировали частоту слияния тетанических сокращений на *m. soleus*, понижая и повышая её, соответственно, при гипотермии. На *m. EDL* эти эффекты не проявлялись.

Таблица 3 – Эффект АТФ на силу «гладкого» тетанического сокращения в % от контроля при 37 °С *m. soleus* и *m. EDL* в контроле и при аппликации 100 мкМ сурамина при различных температурных режимах (n=8)

Мышца	Условия	Температура		
		37 °С	26 °С	14 °С
<i>m. soleus</i>	Контроль	100	112±7,1	153±5,9*
	АТФ 100 мкМ	69±8,0 [#]	82±7,7 [#]	157±9,5*
	Сурамин + АТФ	103±5,7	95±6,4	107±6,8 [#]
<i>m. EDL</i>	Контроль	100	79±5,8	64±7,2*
	АТФ 100 мкМ	86±5,5 [#]	58±7,9 [#]	43±6,2* [#]
	Сурамин + АТФ	98±7,1	97±8,5	94±9,1 [#]

Примечание – * - p<0,05 от эффекта при 37 °С, # - p<0,05 от контроля

Влияние температуры на сокращения *m. soleus* и *m. EDL*, вызванные карбахолином

Субмаксимальная концентрация карбахолина, вызывающая сокращения камбаловидной мышцы, составила $8 \cdot 10^{-4}$ М, для длинного разгибателя пальцев крысы – $2 \cdot 10^{-4}$ М. Было установлено, что при 20-минутных интервалах между сокращениями мионевральный препарат способен в течение всего времени эксперимента (2-4 часа) развивать идентичные изометрические сокращения.

При физиологической температуре (37 °С) усредненные по 18 экспериментам параметры сокращения *m. soleus* имели следующие характеристики: сила сокращения $0,68 \pm 0,08$ г, время сокращения $13,18 \pm 0,61$ с, время полурасслабления $15,05 \pm 0,74$ с. для *m. EDL* сила сокращения $187,2 \pm 9,9$ мг, время сокращения $8,24 \pm 0,43$ с, время полурасслабления $11,09 \pm 0,68$ с. При снижении температуры отмечался прирост как силы сокращения камбаловидной мышцы, так и времени полурасслабления. При 14 °С сила сокращения камбаловидной мышцы составила $1,01 \pm 0,07$ г, и $20,31 \pm 0,82$ с ($n=10$; $p<0,05$; Рисунок 7А) соответственно. Сила сокращения длинного разгибателя пальцев линейно снижалась с понижением температуры и составила $131,0 \pm 7,5$ мг при 14 °С ($n=10$; $p<0,05$), а время полурасслабления достоверно не менялось с понижением температуры и составило $12,08 \pm 0,71$ с при 14 °С ($n=10$; $p<0,05$; Рисунок 7Б).

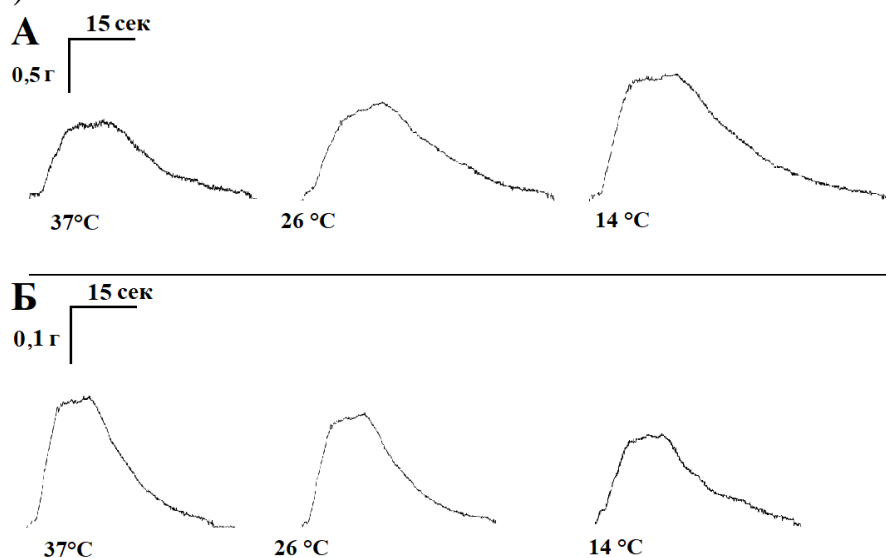


Рисунок 7 – Вид одиночных сократительных ответов *m. soleus* (А) и *m. EDL* (Б), вызванных стимуляцией карбахолином при различных температурах

На фоне 100 мкМ неселективного антагониста P2-рецепторов сурамина отменялось модулирующее влияние температуры на обеих мышцах при каждом из исследованных температурных режимов. Интересно отметить, что неселективный антагонист аденозиновых рецепторов 8-SPT не оказывал никакого заметного действия на амплитудно-временные параметры карбахолин-вызванного сокращения.

Влияние АТФ и сурамина на сократительные ответы *m. soleus* и *m. EDL*, вызванные карбахолом в условиях гипотермии

АТФ при 37 °С никак достоверно не модифицировала карбахолин-вызванные сокращения камбаловидной мышцы $101,3 \pm 3,5\%$ от исходных значений ($n=10$, $p>0,05$), вызывая при этом достоверное снижение силы сокращения длинного разгибателя пальцев до $89,0 \pm 4,4\%$ ($n=10$, $p>0,05$). Кроме того, АТФ не модифицировала временные параметры карбахолин-вызванных сокращений *m. soleus* $106,1 \pm 5,5\%$ от исходных значений ($n=15$, $p>0,05$; Рисунок 9), и $103,8 \pm 5,3\%$ ($n=15$, $p>0,05$; Рисунок 8) для *m. EDL*.

При понижении температуры омывающего камбаловидную мышцу раствора эффект экзогенной АТФ проявлялся в повышении силы сокращения и времени полурасслабления вплоть до полуторного увеличения при 14 °С. Так, при этой температуре на 10-й минуте действия 100 мкМ АТФ сила сокращения камбаловидной мышцы составила $192,5 \pm 3,4\%$ ($n=9$, $p<0,05$), а время полурасслабления $153,9 \pm 6,4\%$ ($n=9$, $p<0,05$, Рисунок 8) от усредненного значения этого параметра до подачи АТФ. Ингибиторное действие АТФ на длинном разгибателе пальцев с понижением температуры усугублялось и при 14 °С составило $46,1 \pm 5,3\%$ ($n=9$, $p>0,05$), при этом время полурасслабления составило $113,5 \pm 5,3\%$ ($n=9$, $p>0,05$, Рисунок 8).

На фоне 100 мкМ неселективного антагониста P2-рецепторов сурамина отменялось модулирующее действие 100 мкМ АТФ и температуры на обеих мышцах при каждом из исследованных температурных режимов (Рисунок 8).

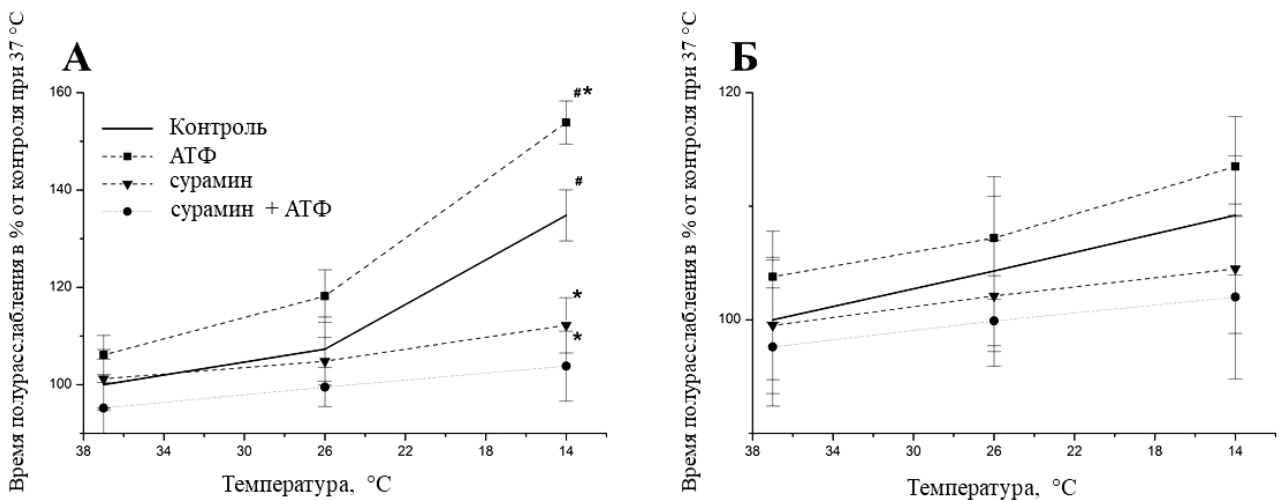


Рисунок 8 – Эффект АТФ на время полурасслабления *m. soleus* и *m. EDL* вызванных карбахолом, в контроле и при аппликации 100 мкМ сурамина, при различных температурных режимах. Примечание – *m. soleus* (А), *m. EDL* (Б); # - $p<0,05$ от эффекта при 37 °С, * - $p<0,05$ от контроля

Влияние аденозина на сократительные ответы *m. soleus* и *m. EDL*, вызванные карбахолом в условиях гипотермии

При температуре 37 °С аденозин не влиял на амплитудно-временные параметры вызванных карбахолом сокращений. При снижении температуры вплоть до 14 °С эффект аденозина на параметры карбахолин-вызванных

сокращений не проявлялся. При этом, неселективный антагонист аденозиновых рецепторов 8-SPT не оказывал никакого заметного действия на амплитудно-временные параметры карбахолин-вызванных сокращений.

В этой работе на препаратах скелетной медленной фазной мышцы крысы не обнаружили зависимых от температуры эффектов аденозина в режиме электрической стимуляции, а при аппликации карбахолина аденозин вообще не проявлял никакого действия, что указывает на исключительно пресинаптический характер модуляции синаптической передачи этим пурином.

Роль эктонуклеотидаз в синаптической передаче.

Термоллабильность метаболизма АТФ

В норме активность эктонуклеотидаз в различных типах скелетных мышц примерно равна, варьируется в пределах 5–7 МЕ, что говорит о гомогенном энзиматическом метаболизме внеклеточной АТФ в исследуемых тканях. При понижении температуры до 22 °С наблюдается многократное, неравномерное снижение энзиматического метаболизма АТФ в различных тканях (Таблица 4).

Путем регуляции уровня АТФ и его производных в межклеточном пространстве эктонуклеотидазы контролируют активность различных подтипов пуринорецепторов и тем самым участвуют в регуляции сократимости мышц.

Таблица 4 – Активность эктонуклеотидаз в скелетных мышцах крыс в международных единицах

Мышца	37 °С	22 °С
<i>m. diaphragma</i>	6,001±1,140 (n=12)	1,793±0,340* (n=11)
<i>m. soleus</i>	6,578±1,249 (n=10)	0,906±0,172* (n=10)
<i>m. EDL</i>	5,318±1,010 (n=12)	0,668±0,126* (n=12)

Примечание – * - Достоверное отличие от контроля при 37 °С, $p < 0,05$

Влияние АТФ и сурамина на сокращения скелетных мышц крысы, вызванных электрической стимуляцией, при денервации

Семидневная денервация привела к увеличению силы сокращения *m. soleus* до 124,6±10,1% (n=8, $p < 0,05$) от контроля. Инкубация денервированной ткани с АТФ никак не повлияла на сокращения исследуемых мышц, вызванных электрической стимуляцией. Введение в ванночку сурамина (100 мкМ) не изменило сократительной активности денервированных мышц (Рисунок 9).

При повышении напряжения раздражающих импульсов до 100 В наблюдалась прямая стимуляция мышечной ткани, при этом добавление 100 мкМ АТФ не оказало эффекта на силу сокращения исследуемых мышц.

Показано, что при 20-мин интервалах между аппликациями неселективный холиномиметик карбахолин в концентрации 50 мкМ способен в течение всего времени эксперимента (2–4 ч) инициировать стабильные воспроизводимые сокращения *m. soleus* и *m. EDL* мышцы.

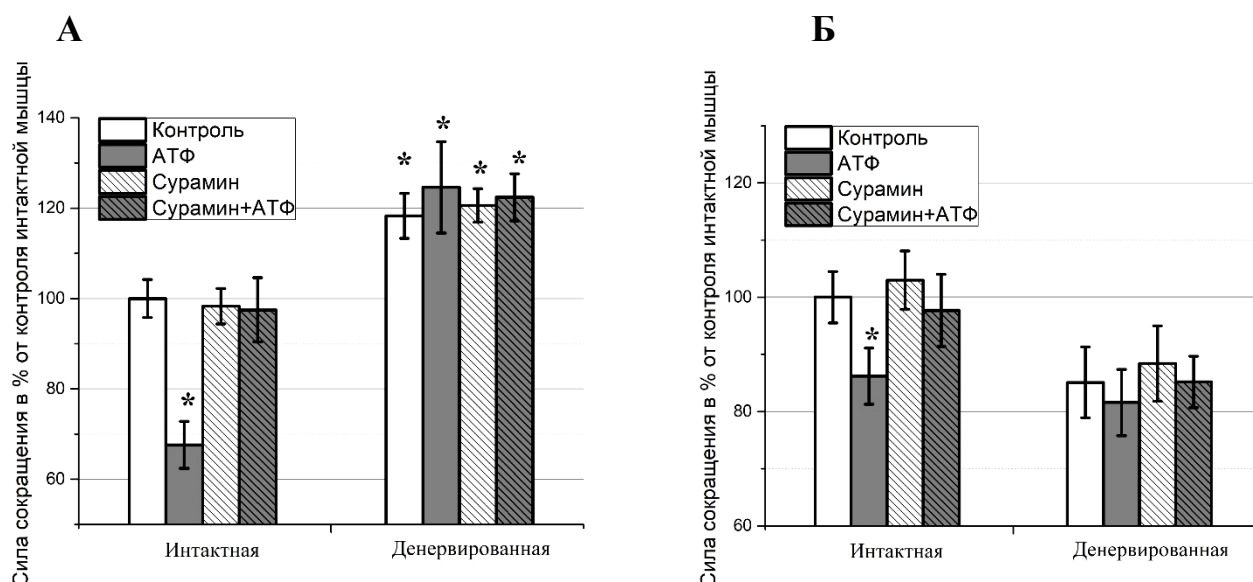


Рисунок 9 – Влияние денервации на силу сокращений *m. soleus* и *m. EDL* крысы, вызванных электрической стимуляцией, в отсутствие и в присутствии АТФ (100 мкМ) и сурамина (100 мкМ). Результаты представлены в виде $M \pm m$ в% от исходных величин, принятых за 100%. Примечание – *m. soleus* (А), *m. EDL* (Б); * – $p < 0,05$ от контроля интактной мышцы

В экспериментах на интактных мышцах карбахолин в концентрации 50 мкМ вызывал сокращение силой 206 ± 11 мг для *m. soleus* и 58 ± 4 мг для *m. EDL* с латентным периодом (ЛП) в $1,4 \pm 0,3$ секунды ($n=12$). При денервировании сила сокращения *m. soleus* и *m. EDL*, индуцированного 50 мкМ карбахолином, увеличивалась до 255 ± 9 мг и 74 ± 8 мг соответственно ($p < 0,05$; $n=12$) без изменения параметров ЛП. Вероятнее всего, увеличение силы сокращения связано с сенсibilизацией постсинаптических холинорецепторов, спровоцированной усилением неквантовой секреции АХ. Это согласуется с полученными данными и объясняет повышение сократимости денервированных мышц. Усиление неквантовой секреции приводит к увеличению количества основного медиатора АХ в синаптической щели.

Изучение вызванного АТФ сокращения денервированных *m. soleus* и *m. EDL* мышцы (Рисунок 10) показало, что первое добавление АТФ провоцировало сокращение мышцы силой 64 ± 24 мг и ЛП $3,0 \pm 0,5$ с ($n=12$) и 22 ± 11 мг и ЛП $2,7 \pm 0,4$ с ($n=12$). Повторное добавление АТФ после 20-мин отмывки не вызывало сокращения мышц. При этом аппликация АТФ на интактные (не денервированные) мышцы вообще сокращений не вызывала.

К настоящему моменту нет объяснения феномена однократного сократительного ответа денервированной мышцы на внесение АТФ. В качестве одной из возможностей можно предложить, что в покое у денервированных мышц концентрация ионов кальция в цитозоле ниже, чем у интактных. При повышенном уровне в покое у интактной мышцы поступление Ca^{2+} в цитозоль из наружной среды через P2X-рецепторы не приводит к сокращению, поскольку система находится на другой регуляторной ветви. В

денервированной же мышце первая аппликация АТФ запускает сократимость через P2X-рецепторы, но в дальнейшем стимуляция P2Y-рецепторов инициирует долговременное увеличение концентрации Ca^{2+} , что восстанавливает Ca^{2+} -регуляцию до состояния, близкого к нативному.

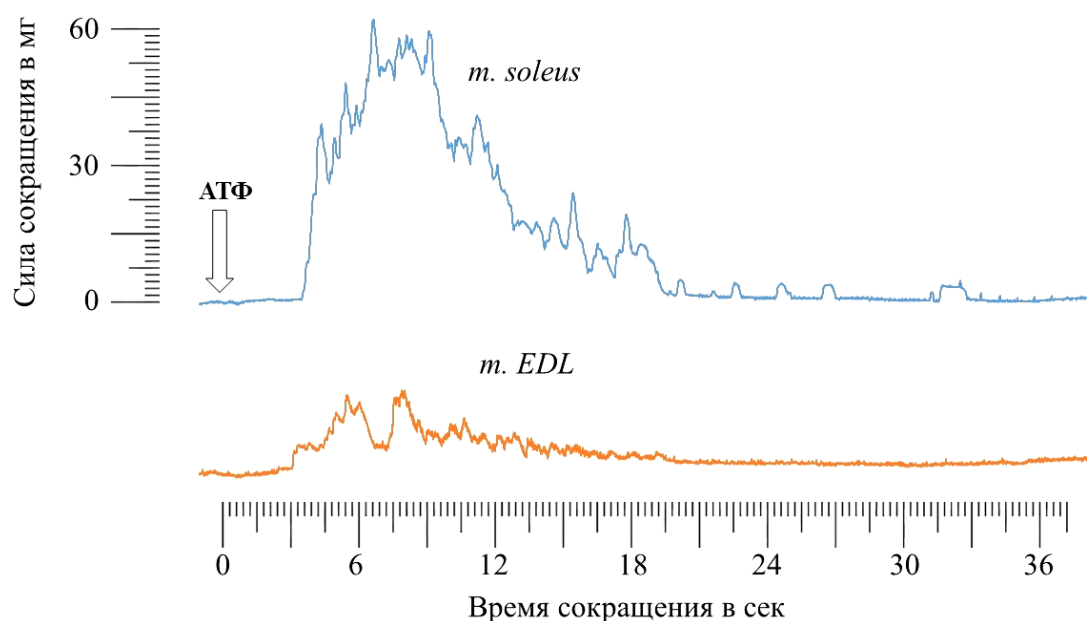


Рисунок 10 – Репрезентативные кривые сокращения *m. soleus* и *m. EDL* в ответ на аппликацию 100 мкМ АТФ при денервации

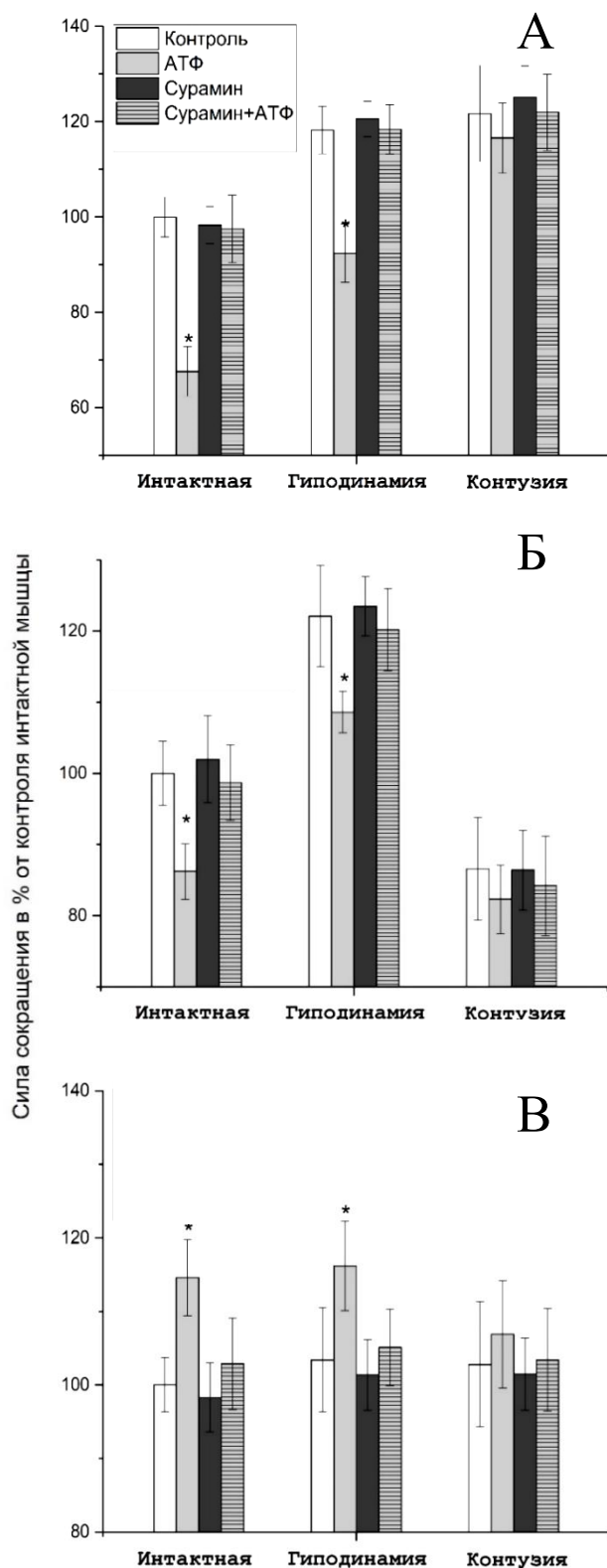
На фоне неселективного антагониста P2-рецепторов сурамина прекращалось действие АТФ. В современной литературе отсутствуют сведения о способности денервированных мышц отвечать на АТФ, по всей видимости факт сокращения денервированных *m. soleus* и *m. EDL* мышцы в ответ на АТФ выявлен впервые.

Влияние АТФ и сурамина на сокращения скелетных мышц крысы, вызванные электрической стимуляцией, на моделях гиподинамии и контузионной травмы

Семидневная ортостатическая разгрузка и контузионная травма спинного мозга оказывали облегчающее влияние на сократимость исследуемой мышцы, так, сила сокращения составила $118,3 \pm 5,0\%$ ($n=8$, $p<0,05$) и $121,7 \pm 3,9\%$ ($n=10$, $p<0,05$) соответственно, от исходных значений интактной мышце (Рисунок 11).

АТФ обратимо ингибировала амплитуду вызванных стимуляцией электрическим полем сокращений интактной камбаловидной мышцы - до $67,6 \pm 5,2\%$ ($n=10$, $p<0,05$). Её эффект сохранялся и на объектах, подвергшихся ортостатической разгрузке. Однако не было получено достоверных данных на контуженных животных, такое снижение модулирующей способности АТФ согласуется с данными, полученными ранее на модели денервации.

Усредненная по 12-ти экспериментам сила сокращения *m. diaphragma* интактных крыс составила $1,51 \pm 0,075$ г ($n=12$), что было принято за 100%. Гиподинамия и контузионная травма спинного мозга существенно не влияли на сократимость дыхательной мышцы. Аппликация 100 мкМ АТФ на *m. diaphragma* обратимо усиливала контрактильную способность интактной



мышцы до $114,6 \pm 5,2\%$ ($n=12$, $p<0,05$) и до $116,2 \pm 6,1\%$ ($n=7$, $p<0,05$) на диафрагме крыс, подвергшихся гиподинамии. На фоне контузии наблюдалось стойкое снижение модулирующей способности АТФ до статистически незначимых $106,9 \pm 7,3\%$ ($n=8$, $p>0,05$).

Сила сокращения *m. EDL* интактных крыс составила $0,75 \pm 0,039$ г ($n=10$), что было принято за 100%. Гиподинамия усиливала сократимость исследуемой мышцы, до $121,1 \pm 7,1\%$ ($n=9$, $p<0,05$) от исходных значений на интактной мышце. В противоположность этому контузионная травма спинного мозга сказывается снижением силы сокращения до $86,6 \pm 7,2\%$ ($n=10$, $p<0,05$) от контроля.

Аппликация 100 мкМ АТФ на *m. EDL* обратимо угнетала контрактильную способность интактной мышцы до $86,2 \pm 3,9\%$ ($n=10$, $p<0,05$) и до $108,6 \pm 2,9\%$ ($n=9$, $p<0,05$) на *m. EDL* крыс, подвергшихся гиподинамии. На фоне контузии не наблюдалось значимой АТФ-индуцированной модуляции.

Во всех сериях экспериментов этого раздела сурамин (100 мкМ) никаких достоверных эффектов не проявил. При этом, на его фоне почти полностью угнеталось действие экзогенной АТФ.

Рисунок 11 – Зависимость силы сокращений *m. soleus*, *m. EDL* и *m. diaphragma* крыс, вызванных электрической стимуляцией, от экспериментальных условий в контроле и добавлении в среду АТФ (100 мкМ), сурамина (100 мкМ) или их сочетание. Примечание – *m. soleus* (А), *m. EDL* (Б), *m. diaphragma* (В); * - $p<0,05$ от контрольных значений

Влияние АТФ и сурамина на сокращения скелетных мышц крысы, вызванные электрической стимуляцией, при перерезке спинного мозга (спинализации)

Сократительные ответы *m. soleus* и *m. EDL* после спинализации демонстрируют разнонаправленные изменения в силе сокращений и модификацию временных параметров (Рисунок 12). В отличие от них *m. diaphragma* сохраняет стабильность амплитудно-временных параметров, что может быть связано с более высоким положением тел мотонейронов диафрагмального нерва, в меньшей степени затронутых при спинализации.

Аппликация 100 мкМ АТФ на мышцы интактных грызунов модулирует параметры сокращения, так 10-ти минутная аппликация исследуемого пурина снижала силу сокращения локомоторных *m. soleus* и *m. EDL* и усиливала сократимость дыхательной *m. diaphragma*. На нервно-мышечные препараты животных подвергнутых предварительной спинализации АТФ практически не действовала. Только *m. diaphragma* не утрачивает чувствительности к исследуемому нуклеотиду. Сурамин почти полностью угнетал действие экзогенной АТФ на всех исследуемых объектах.

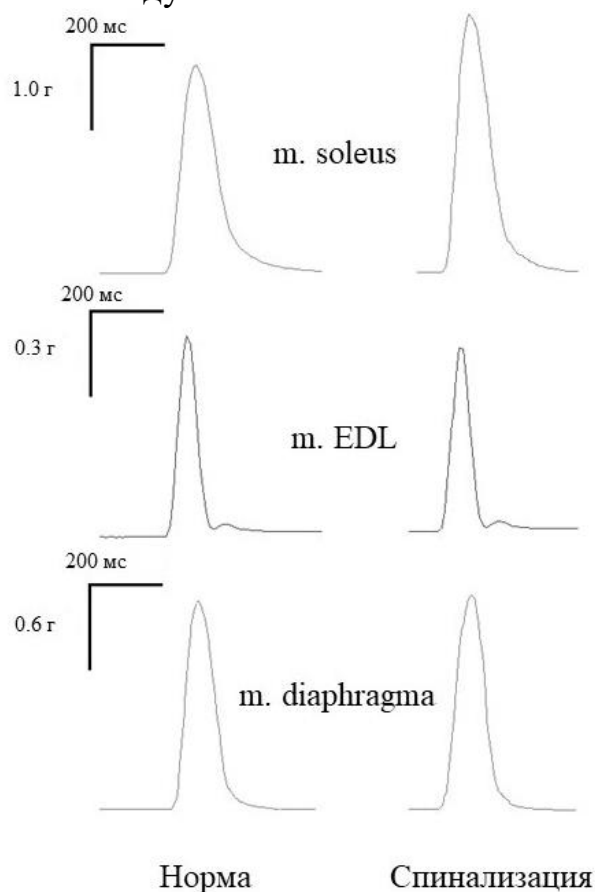


Рисунок 12 – Вид одиночных сократительных ответов *m. soleus*, *m. EDL* и *m. diaphragma* вызванных электрической стимуляцией в норме и после спинализации (представлены отдельные репрезентативные треки)

Полученные результаты показывают, что после травмы спинного мозга происходит значительное ухудшение функции периферической нервной системы. Изменение в синаптическом звене передачи сигнала свидетельствует

в пользу дегенеративных изменений в аксонах после поражения верхнего уровня спинного мозга.

Влияние АТФ и сурамина на сокращения *m. soleus* и *m. EDL* мышцы, вызванные электрической стимуляцией, на модели белковой сенсibilизации

«Быстрая» мышца в условиях электростимуляции снижала силу своего сокращения при белковой сенсibilизации (БС) с $302,4 \pm 15,7$ мг ($n=14$) до $278,5 \pm 19,3$ мг ($n=10$).

Влияние экзогенной АТФ на *m. EDL* обеих групп животных демонстрировало следующую динамику силы сокращения. У несенсibilизированных мышцей этот показатель возрастал до 18,2% ($n=14$, $p<0,05$). У сенсibilизированных животных – до 47,3% относительно контроля ($n=10$, $p<0,05$). Более выраженное увеличение силы сокращения «быстрой» мышцы у второй группы животных свидетельствует о вероятном участии пуринергических механизмов в процессах адаптации.

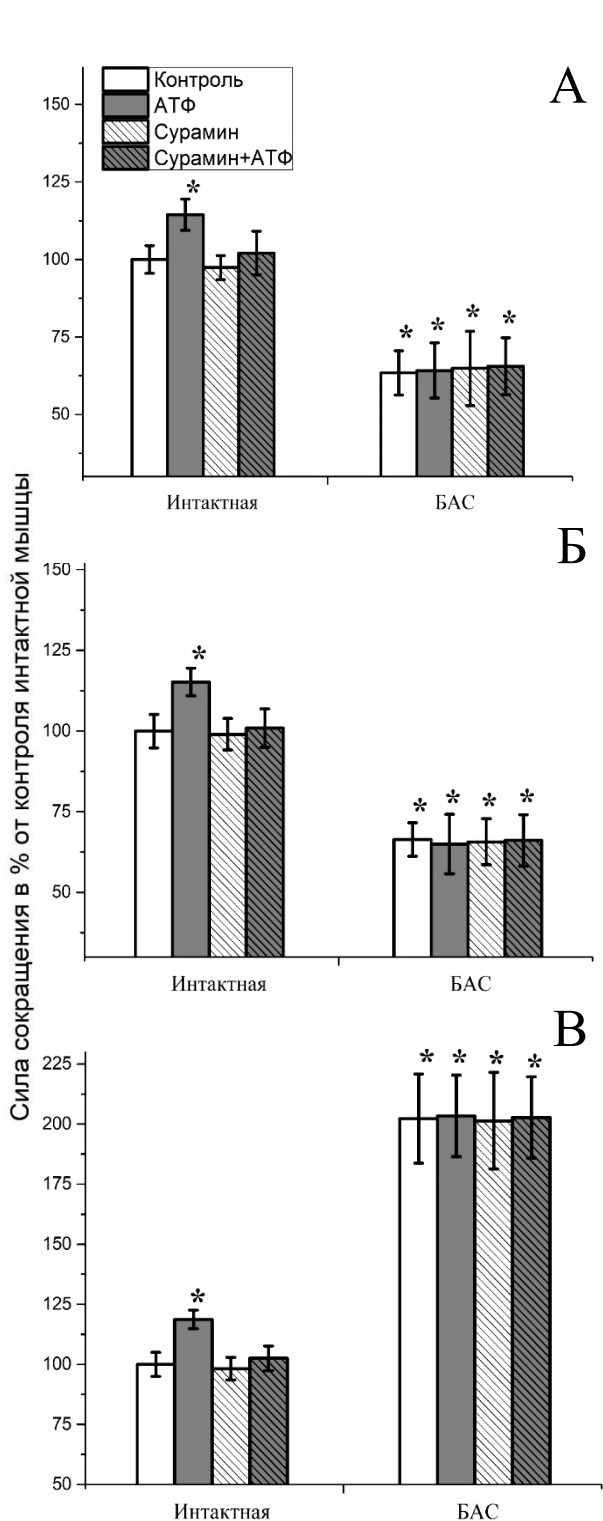
В условиях электростимуляции «медленная» мышца увеличивала силу своего сокращения при БС. Если у несенсibilизированной мышцы она была $411,5 \pm 18,5$ мг ($n=14$), то в опытной серии – $533,3 \pm 29,2$ мг ($n=10$).

Влияние экзогенной АТФ на *m. soleus* обеих групп животных на различия в силе сокращения носило потенцирующий характер. Были получены следующие значения: у несенсibilизированных мышцей показатель силы сокращения возрастал до $471,1 \pm 16$ мг ($n=14$, $p<0,05$). У сенсibilизированных животных до $568,7 \pm 25,5$ мг ($n=10$, $p>0,05$).

Электростимуляция полосы *m. diaphragma* сенсibilизированного животного практически не вызывала изменения силы ее сокращения в сравнении с контролем. Если у последних она была 542 ± 24 мг ($n=14$), то в случае белковой сенсibilизации – 538 ± 27 мг ($n=10$). Влияние экзогенного АТФ на мышцы обеих групп показало следующую динамику. У несенсibilизированных мышцей сила сокращения в присутствии АТФ повышалась до 115,1±4,2% ($n=14$); а в условиях белковой сенсibilизации – до 129,8±5,8% ($n=10$) ($p<0,05$). Более выраженное повышение сокращения дыхательной мышцы после влияния АТФ у второй группы в сравнении с первой говорит об участии пуринергических механизмов в адаптации *m. diaphragma* к белковой сенсibilизации.

Во всех экспериментах этого раздела инкубация мышцы сурамином (100 мкМ) полностью предупреждала влияние АТФ на силу сокращений.

Влияние АТФ и сурамина на сокращения скелетных мышц мыши, вызванные электрической стимуляцией, на модели бокового амиотрофического склероза у мышей



Сила сокращения камбаловидной мышцы здоровых мышей составила $0,467 \pm 0,04$ г, время сокращения $0,12 \pm 0,02$ с и время полурасслабления $0,243 \pm 0,015$ с. У мышей с моделью бокового амиотрофического склероза (БАС) наблюдалось значительное снижение амплитудных характеристик сокращений $0,296 \pm 0,07$ г ($n=10$, $p < 0,05$) при неизменной скорости сокращения $0,13 \pm 0,02$ с ($n=10$, $p > 0,05$) и незначительном увеличении времени полурасслабления $0,289 \pm 0,018$ с ($n=10$, $p > 0,05$) по сравнению с интактными животными.

АТФ обратимо усиливала амплитуду вызванных стимуляцией электрическим полем сокращений интактной камбаловидной мышцы – до $118,7 \pm 3,9\%$ ($n=10$, $p < 0,05$, Рисунок 13). Однако не было получено достоверных данных на животных из группы БАС.

Сила сокращения *m. diaphragma* интактных мышцей составила $0,48 \pm 0,09$ г ($n=10$), время сокращения $0,05 \pm 0,003$ с и время полурасслабления $0,05 \pm 0,006$ с. В отличие от других мышц диафрагма мышцей с моделью БАС демонстрировала двукратное усиление сократимости $0,97 \pm 0,20$ г ($n=10$, $p < 0,05$), при этом время сокращения исследуемой мышцей не менялось $0,05 \pm 0,005$ с ($n=10$, $p > 0,05$), а времени полурасслабления значительно увеличилось и составило $0,092 \pm 0,009$ ($n=10$, $p < 0,05$) по сравнению с интактными животными.

Рисунок 13 – Зависимость силы сокращений *m. soleus*, *m. diaphragm* и *m. EDL* мышцей с моделью бокового амиотрофического склероза, вызванных электрической стимуляцией, в контроле и добавлении в среду АТФ (100 мкМ),

сурамина (100 мкМ) или их сочетания. Примечание – *m. soleus* (А), *m. diaphragma* (Б), *m. EDL* (В); * - $p < 0,05$ от контрольных значений

Аппликация АТФ на *m. diaphragma* обратимо усиливала контрактильную способность интактной мышцы до $118,7 \pm 3,9\%$ ($n=10$, $p < 0,05$). На животных с моделью БАС наблюдалось отсутствие модулирующей способности АТФ. Амплитуда сокращения *m. EDL* интактных животных составила $0,741 \pm 0,05$ г ($n=10$), что было принято за 100%. Время сокращения $0,05 \pm 0,003$ с и время полурасслабления $0,035 \pm 0,005$ с. У мышцей из экспериментальной группы БАС сила сокращений *m. EDL* была достоверно ниже $0,492 \pm 0,12$ г ($n=10$, $p < 0,05$) при неизменной скорости сокращения $0,05 \pm 0,006$ с ($n=10$, $p > 0,05$) и достоверном увеличении времени полурасслабления $0,065 \pm 0,008$ с ($n=10$, $p < 0,05$) по сравнению с интактными животными.

Аппликация 100 мкМ АТФ на *m. EDL* мышцы обратимо потенцировала контрактильную способность интактной мышцы до $115,2 \pm 4,3\%$ ($n=10$, $p < 0,05$). На фоне БАС не наблюдалось значимой АТФ-индуцированной модуляции.

Во всех экспериментах данного раздела сурамин никаких достоверных эффектов не проявил, на его фоне почти полностью угнеталось действие экзогенной АТФ (100 мкМ).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе всестороннего изучения механизмов, была предложена концепция комбинированного модулирующего пресинаптического действия аденозина и дополняющего его пре- и постсинаптического действия АТФ, обеспечивающих тонкую настройку нервно-мышечного синапса на изменяющиеся условия. АТФ, будучи хорошо изученным основным макроэргическим соединением, играет важную роль в качестве одной из сигнальных молекул, которая вместе со своим метаболитом аденозином, действуя через мембранные P2- и аденозиновые рецепторы соответственно, модулирует высвобождение медиатора (Рисунок 14).

В процессе исследования выявлены подтипы рецепторов АТФ, задействованных в синаптической модуляции. В быстрых и медленных скелетных мышцах крыс выявлены (P2Y₁₃ (пресинаптические) и P2X₁, P2X₂ (постсинаптические)) подтипы P2-рецепторов, в то время как другие подтипы P2X и P2Y не обнаружены.

Пуринергическая модуляция синаптической передачи, в целом, усиливается при ряде патологических состояний, сопровождающихся снижением функции двигательных единиц. Пресинаптическое действие АТФ вовлечено в развитие ряда нейропатологий, травм спинного мозга и нейродегенеративных заболеваний. Гипотермия и белковая сенсibilизация сопровождаются изменениями пуринергической модуляции, приложенной к постсинаптическому полюсу, а при моделировании травм, боковом амиотрофическом склерозе - к пресинаптическому. Несомненно, пуриновая

2. В нервно-мышечном синапсе медленной и быстрой скелетных мышц крыс эффекты аденозина реализуются посредством одновременной активации двух подтипов пресинаптических аденозиновых рецепторов: A1 (ингибирующий) и A2A (стимулирующий). Стимуляция A2A рецепторов аденозином вызывает $G_{i/o}$ -белок опосредованную активацию аденилатциклазы с последующим открытием кальциевых каналов L-типа. Инкубация мышц с 8-пара-сульфофенил-теофиллином (100 мкМ) полностью предупреждает влияние аденозина на силу сокращений. Постсинаптические эффекты аденозина в нервно-мышечном синапсе медленной и быстрой скелетных мышц крыс в условиях *in vitro* отсутствуют.

3. Влияние АТФ на сократимость скелетных мышц усиливается при гипотермии, и ключевым фактором такого усиления является снижение активности экто-нуклеотидаз в этих условиях. В отличие от АТФ, влияние аденозина при снижении температуры на сокращения скелетных мышц не изменяется.

4. Эффекты АТФ в условиях гипотермии различаются в быстрой и медленной скелетных мышцах: при температуре 14°C сила сокращения медленной камбаловидной мышцы в присутствии АТФ возрастает до 192,5% от контроля, а в быстрой длинном разгибателе пальцев снижается до 46,1%. При гипотермии блокатор P2-рецепторов сурамин предупреждает развитие всех эффектов АТФ в быстрой и медленной скелетных мышцах.

5. В нервно-мышечных синапсах камбаловидной, диафрагмальной мышц и длинном разгибателе пальцев крысы иммуногистохимически обнаруживаются ионотропные P2X1, P2X2 и метаботропные P2Y₁₃ подтипы P2-рецепторов, тогда как P2X3, P2X4, P2X5, P2X6, P2X7, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₄ подтипы P2-рецепторов не обнаружены.

6. При экспериментальной контузионной травме и перерезке спинного мозга, а также денервации наблюдается снижение чувствительности к модулирующей активности АТФ на сократимость всех изученных скелетных мышц. Перерезка седалищного нерва приводит к возникновению АТФ-индуцированных сокращений быстрой (длинный разгибатель пальцев) и медленной (камбаловидной) мышц.

7. В условиях белковой сенсibilизации АТФ усиливает сократительную способность быстрой (длинный разгибатель пальцев) и смешанной (диафрагма) мышц мышей на 29,1% и 14,7%, соответственно, по сравнению с контролем, а в медленной (камбаловидной) мышце эффект АТФ не отличается от контрольных значений.

8. У мышей с моделью бокового амиотрофического склероза наблюдается увеличение силы сокращений смешанной (диафрагмы) мышцы и снижение силы сокращений быстрой (длинный разгибатель пальцев) и медленной (камбаловидной) мышц; при этом во всех типах мышц пропадает модулирующий эффект АТФ на сократительную активность.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В экспериментальной практике при исследовании роли пуринорецепторов в различных тканях следует учитывать изменение эффективности агонистов и антагонистов этих рецепторов при пониженной температуре.

2. При проведении экспериментов с использованием блокаторов Ca^{2+} -каналов следует учитывать возможное изменение эффективности агонистов пуринорецепторов (АТФ и аденозина).

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Результаты диссертации определяют направления будущих научных исследований, посвященных использованию агонистов и антагонистов P2-рецепторов в различных патологических процессах, что создает основу для поиска новых лекарственных препаратов, направленных на коррекцию ряда патологических состояний, при развитии которых мишенью станут P2-рецепторы.

Автор выражает благодарность заведующему кафедрой нормальной физиологии Казанского ГМУ д.м.н, доценту М.А. Мухамедьярову, заведующей НИЛ «Механобиология» ИФМиБ КФУ к.б.н., доценту Т.В. Балтиной, директору Института фармации Казанского ГМУ к.фарм.н., доценту Р.И. Мустафину, ассистенту Института фармации Казанского ГМУ к.фарм.н. А.Ю. Ситенкову, м.н.с. Института нейронаук Казанского ГМУ к.м.н. А.Н. Хабибрахманову за оказанную помощь в организации исследований.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Foot-shock stimulation decreases the inhibitory action of ATP on contractility and end-plate current of frog sartorius muscle / A. U. Ziganshin, R. R. Kamaliev, A. I. Gabdrakhmanov [et al.] // **International Journal of Pharmacology**. – 2018. – Vol. 14. – P. 1198-1202. (**Scopus**)

2. Effects of ATP and adenosine on the contractions of rat and mouse fast skeletal muscle at low temperature conditions / A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, A. I. Gabdrakhmanov [et al.] // The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology : Proceedings for Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society WCP2018, 2018 – P. 81.

3. Потенцирующее действие гипотермии на эффективность веществ, воздействующих посредством P2-рецепторов / А. У. Зиганшин, А. Е. Хайруллин, А. И. Габдрахманов [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81. – С. 91-92.

4. The effects of ATP on the contractions of rat and mouse fast skeletal muscle / A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, A. Y. Teplov [et al.] // **Muscle and Nerve**. – 2019. – Vol. 59, № 4. – P. 509-516. (**Scopus**)

5. The thermal sensitivity of purinergic modulation of contractile activity of locomotor and respiratory muscles in mice / A. E. Khairullin, A. Yu. Teplov, S. N. Grishin [et al.] // **Biophysics**. – 2019. – Vol. 64, № 5. – P. 812-817. (**Scopus**)
6. The rat skeletal muscle under the simulated weightlessness / A. E. Khairullin, A. O. Fedianin, A. A. Ereemeev [et al.] // *Human Gene Therapy*. – 2019. – Vol. 30, № 11. – P. 170-171.
7. Khairullin A.E. Synaptic Aspects of Hypogravity Motor Syndrome / A. E. Khairullin, A. A. Ereemeev, S. N. Grishin // **Biophysics**. – 2019. – Vol. 64, № 5. – P. 828-835. (**Scopus**)
8. Modulatory Roles of ATP and Adenosine in Cholinergic Neuromuscular Transmission / A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, C. H. V. Hoyle, S. N. Grishin // **International Journal of Molecular Sciences**. – 2020. – Vol. 21, № 17. – P. 6423. (**Scopus**)
9. Khairullin A.E. The Influence of Hypothermia on Purinergic Synaptic Modulation in the Rat Diaphragm / A. E. Khairullin, A. U. Ziganshin, S. N. Grishin // **Biophysics**. – 2020. – Vol. 65. – P. 858-862. (**Scopus**)
10. Успехи и неудачи в создании новых пуринергических препаратов / А. У. Зиганшин, Д. В. Иванова, А. Е. Хайруллин [и др.] // Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии : Сборник тезисов докладов VI Междисциплинарной конференции. – Москва: Издательство "Перо", 2020. – С. 34.
11. The Effect of Acute Unilateral Denervation Injury on Purinergic Signaling in the Cholinergic Synapse / A. E. Khairullin, D. V. Efimova, V. A. Markosyan [et al.] // **Biophysics**. – 2021. – Vol. 66. – P. 483-486. (**Scopus**)
12. Contractions dynamic of fast and slow rat muscle under spinal shock and modulators of contraction / V. V. Valiullin, A. A. Ereemeev, A. Y. Teplov [et al.] // **Kazan Medical Journal**. – 2021. – Vol. 102, № 3. – P. 329-334. (**Scopus**)
13. The Effect of Cesium Ions on the Inhibitory Action of Purines in the Neuromuscular Synapse / A. E. Khairullin, V. V. Valiullin, A. Y. Teplov [et al.] // **Biophysics**. – 2021. – Vol. 66. – P. 965-967. (**Scopus**)
14. Хайруллин А. Е. Влияние пуринов на временные параметры одиночных и тетанических сокращений быстрой и медленной мышц крысы в норме и при гипотермии / А. Е. Хайруллин, С. Н. Гришин // Теоретические и практические аспекты действия естественной и искусственной гипотермии на организм : тезисы докладов Всероссийской научной конференции. – Махачкала: Издательство ДГУ, 2021. – С. 69-70.
15. Хайруллин А. Е. Влияние острой односторонней травматической денервации на пуринергическую сигнализацию в холинергическом синапсе / А. Е. Хайруллин, Д. В. Ефимова, А. У. Зиганшин // VII Съезд физиологов СНГ : Научные труды. – М.: Издательство «Перо», 2021. – С. 41-42.
16. Вовлечение пуринергических механизмов в адаптацию локомоторных «быстрой» и «медленной» мышц мыши в условиях аллергической перестройки / А. Е. Хайруллин, А. Ю. Теплов, С. Н. Гришин, А.

У. Зиганшин // Съезд физиологов СНГ: Научные труды. – М.: Издательство «Перо», 2021. – С. 42.

17. Neuromuscular Transmission in a Barium Environment / S. N. Grishin, A. E. Khairullin, A. Yu. Teplov, M. A. Mukhamedyarov // **Biophysics**. – 2022. – Vol. 67, № 3. – P. 457-460. (**Scopus**)

18. Purinergic Mechanisms in the Adaptation of the Mouse Diaphragm to Allergic Disorders / A. E. Khairullin, A. Yu. Teplov, S. N. Grishin, A. U. Ziganshin // **Biophysics**. – 2022. – Vol. 67, № 3. – P. 474-476. (**Scopus**)

19. Хайруллин А. Е. P2-рецептор опосредованная адаптация скелетных мышц теплокровных к гипотермии / А. Е. Хайруллин, С. Н. Гришин, А. Ю. Теплов // Эколого-физиологические проблемы адаптации : Материалы XIX симпозиума с международным участием. – Москва: Российский университет дружбы народов (РУДН), 2022. – С. 199-200.

20. Хайруллин А. Е. Роль АТФ в синаптической передаче / А. Е. Хайруллин, Д. В. Ефимова, С. Н. Гришин // Motor control 2022 : Сборник тезисов IX Российской, с международным участием, конференции по управлению движением. – Казань, 2022. – С. 96.

21. Ефимова Д. В. Метаболизм АТФ и роль эктонуклеотидаз в синаптической трансмиссии / Д. В. Ефимова, А. Е. Хайруллин // Motor control 2022 : Сборник тезисов IX Российской, с международным участием, конференции по управлению движением. – Казань, 2022. – С. 76.

22. Синаптические аспекты гипогравитационного двигательного синдрома / С. Н. Гришин, А. Е. Хайруллин, А. А. Еремеев, А. У. Зиганшин // Сборник тезисов IX Российской, с международным участием, конференции по управлению движением. – Казань, 2022. – С. 104.

23. Хайруллин А. Е. Постсинаптические эффекты АТФ в нервно-мышечном синапсе / А. Е. Хайруллин, Д. В. Ефимова, С. Н. Гришин // Прикладная электродинамика, фотоника и живые системы – 2022 : материалы IX Молодежной международной научно-технической конференции. – Казань: ИП Сагиева А.Р., 2022. – С. 331-332.

24. Purinergic Mechanisms of Adaptation of Different Types of Motor Units under Conditions of Allergic Reorganization / A. E. Khairullin, A. Yu. Teplov, S. N. Grishin, A. U. Ziganshin // **Biophysics**. – 2022. – Vol. 67, № 6. – P. 996-999. (**Scopus**)

25. Ефимова Д. В. Адаптационные механизмы дыхательной мышцы на модели аллергической перестройки / Д. В. Ефимова, А. Ю. Теплов, А. Е. Хайруллин // Медицина: от науки к практике : Сборник статей I Всероссийской научно-практической конференции. Выпуск 1. – Йошкар-Ола: Марийский государственный университет, 2022. – С. 18-19.

26. Kinematic Analysis of Rat Motion After Spinal Cord Injury / M. E. Baltin, V. V. Smirnova, O. A. Sachenkov [et al.] // Proc. of the Interdisciplinary Conference on Mechanics, Computers and Electrics, Barcelona, Spain, 2022. – P. 101-104.

27. A High Calcium Level-Based Model for Identifying Postsynaptic Effects of ATP / A. E. Khairullin, S. N. Grishin, A. Yu. Teplov [et al.] // **Biophysics**. – 2022. – Vol. 67, № 6. – P. 1007-1010. (**Scopus**)

28. Synaptic Aspects of the Pathogenesis of Autism, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Alzheimer's Disease / A. E. Khairullin, M. A. Mukhamedyarov, S. N. Grishin [et al.] // **Biophysics**. – 2023. – Vol. 68, № 1. – P. 137-145. (Scopus)
29. Khairullin A.E. P2 Receptor Signaling in Motor Units in Muscular Dystrophy / A. E. Khairullin, S. N. Grishin, A. U. Ziganshin // **International Journal of Molecular Sciences**. – 2023. – Vol. 24, № 2. – P. 1587. (Scopus)
30. Effects of ATP on Time Parameters of Contractility of Rats' Slow and Fast Skeletal Muscles in Normal and Hypothermic Conditions / A. E. Khairullin, S. N. Grishin, A. I. Gabdrahmanov, A. U. Ziganshin // **Muscles**. – 2023. – Vol. 2, № 1. – P. 23-35.
31. Effect of Spinal Cord Injury on P2 Signaling in the Cholinergic Synapse / A. E. Khairullina, D. V. Efimova, A. A. Ereemeev [et al.] // **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**. – 2023. – Vol. 59, № 3. – P. 822-830. (WoS)
32. Передаточная функция электромеханического сопряжения / С. Н. Гришин, А. Е. Хайруллин, А. И. Габдрахманов [и др.] // Сборник научных трудов VII Съезда биофизиков России: Сборник материалов съезда. В 2-х томах. – Краснодар: Кубанский государственный технологический университет, 2023. – С. 245-246.
33. Поиск новых подходов для коррекции нарушений двигательной активности на модели расстройств аутистического спектра / А. Е. Хайруллин, С. Н. Гришин, А. У. Зиганшин [и др.] // Сборник "Всероссийская научная школа "Медицина молодая". – Москва: Международный фонд развития биомедицинских технологий им. В.П. Филатова, 2023. – С. 793-797.
34. Влияние спинализации на динамику сокращений скелетных мышц крысы при активации P2-рецепторов / А. Е. Хайруллин, Д. В. Ефимова, С. Н. Гришин, А. У. Зиганшин // Сборник тезисов XXIV съезда физиологического общества им. И. П. Павлова. – СПб.: ООО "Издательство ВВМ", 2023. – С. 434.
35. Перспективы создания новых лекарств, действующих на P2-рецепторы (памяти профессора Джеффри Бернстока) / А. У. Зиганшин, Д. В. Иванова, А. М. Зяпбаров [и др.] // **Experimental and Clinical Pharmacology**. – 2023. – Vol. 86, № 11S. – P. 60.
36. Хайруллин А. Е. Изменение двигательной активности у крыс с моделью расстройств аутистического спектра / М. Э. Балтин, А. Е. Хайруллин, Т. В. Балтина // Интегративная физиология : Всероссийская конференция с международным участием. Тезисы докладов. – СПб.: Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2023. – С. 122.
37. Effects of ATP on time parameters of rat slow and fast muscle contractions in normal and hypothermic conditions / A. Ziganshin, A. Khairullin, D. Ivanova [et al.] // **British Journal of Pharmacology**. – 2023. – Vol. 180, № S1. – P. 1003.
38. On the Role of Ectonucleotidases in Synaptic Transmission. Thermolability of ATP Metabolism / A. E. Khairullin, D. V. Efimova, D. V. Ivanova [et al.] // **Biophysics**. – 2023. – Vol. 68. – P. 576-580. (Scopus)
39. ATP Causes Contraction of Denervated Skeletal Muscles / A. E. Khairullin, A. Y. Teplov, S. N. Grishin, A. U. Ziganshin // **Biochem. Moscow Suppl. Series A: Membrane and Cell Biology**. – 2023. – Vol. 17, № S1. – P. 73-77. (Scopus)

40. Khairullin A.E. Presynaptic Purinergic Modulation of the Rat Neuro-Muscular Transmission / A. E. Khairullin, S. N. Grishin, A. U. Ziganshin // **Curr. Issues Mol. Biol.** – 2023. – Vol. 45. – P. 8492-8501. (WoS, Scopus)
41. Disorders of Motor Activity in a Model of Autism Spectrum Disorders / A. E. Khairullin, D. V. Efimova, D. V. Ivanova [et al.] // **Neurosci. Behav. Physi.** – 2024. – Vol. 54. – P. 465-473. (Scopus)
42. Динамика сокращений скелетных мышц крысы при активации P2-рецепторов после перерезки спинного мозга / А. Е. Хайруллин, Д. В. Ефимова, М. А. Мухамедьяров [и др.] // **Анналы клинической и экспериментальной неврологии.** – 2024. – Т. 18, № 2. – С. 45-51. (Scopus, ВАК К1)
43. Хайруллин А. Е. Влияние гиподинамии на пуринаргическую сигнализацию в мионевральном синапсе / Д. В. Ефимова, А. А. Еремеев, А. Е. Хайруллин // Материалы XI Всероссийской с международным участием школы-конференции по физиологии мышц и мышечной деятельности. – Москва: "Научная книга", 2024. – С. 100.
44. Ефимова Д. В. Исследование нарушений двигательной активности крыс на модели расстройств аутистического спектра / Д. В. Ефимова, А. А. Еремеев, А. Е. Хайруллин // XXVI Всероссийский конгресс с международным участием «Давиденковские чтения» : Материалы конгресса, – СПб.: 2024. – С. 104.
45. Подтипы P2-рецепторов в нервно-мышечном синапсе крысы/ А.Е. Хайруллин, А.Н. Хабибрахманов, Д.В. Ефимова [и др.] // **Бюллетень экспериментальной медицины и биологии.** – 2024. – Т. 187, № 11. – С. 550-553. (Scopus, ВАК К1)

Монография

Пуринаргическая модуляция нервно-мышечной передачи холонокровных и теплокровных / С. Н. Гришин, А. Е. Хайруллин, А. Ю. Теплов, А. У. Зиганшин. – СПб.: Нестор-История, 2022. - 232 с.

Патент

Патент на полезную модель № 216564 U1. Всасывающий культю нерва электрод для электрической стимуляции : № 2022131919 : заявл. 07.12.2022 : опубл. 14.02.2023 / С. Н. Гришин, А. Е. Хайруллин, А. У. Зиганшин, Д. В. Ефимова; заявители, патентообладатели ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России.

Работа выполнена при финансовой поддержке: грантов РФФИ (13-04-00188, 13-04-01345, 16-04-00101), гранта ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России для поддержки научных исследований, проводимых под руководством Казанского ГМУ 2022 (2/22-5), гранта Международного научного совета ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России для молодых ученых 2023 года. Издание монографии осуществлено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 21-14-00017.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- 8-SPT – 8-(*p*-сульфобензил) теofilлин
AC – аденилатциклаза
AChR – Н-холинорецептор
cAMP – 3'-5'-циклический аденозинмонофосфат
DAG – диацилглицерол
d-ТБК – d-тубокурарин
m. EDL – *musculus extensor digitorum longus*, длинный разгибатель пальца
PBS – фосфатно-щелочной буфер
PKA – протеинкиназа *A*
PKC – протеинкиназа *C*
PLA2 – фосфолипаза *A2*
PLC – фосфолипаза *C*
Rp-cAMP – аденозин-3',5'-цикломонофосфоротиоата
АТФ – аденозин 5'-трифосфорная кислота
АХ – ацетилхолин
БАС – боковой амиотрофический склероз
БС – белковой сенсibilизации
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
КХ – карбахолин
ПКП – потенциалы концевой пластинки
СЭП – стимуляция электрическим полем
ЭС – электростимуляция