

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

На правах рукописи

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Научные консультанты:

д.м.н., профессор А.У. Зиганшин

д.б.н., доцент С.Н. Гришин

Казань - 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение		8
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ		17
1.1 Р2 - рецепторы и АТФ.....		17
1.1.1 История изучения.....		17
1.1.2 Классификация пуринорецепторов		17
1.1.3 Аденозиновые рецепторы.....		18
1.1.4 Р2-рецепторы.....		19
1.1.5 Р2Х-рецепторы.....		20
1.1.6 Р2У-рецепторы.....		23
1.1.7 Роль пуриновых рецепторов в сокращении скелетных мышц		26
1.2 Общая характеристика скелетных мышц.....		28
1.2.1 Классификация и типы мышечных волокон позвоночных		28
1.3 Влияние внешних факторов на синаптическую модуляцию		31
1.3.1 Влияние температуры на синаптическую модуляцию.....		31
1.3.2 Влияние гипогравитации на синаптическую модуляцию...		37
1.4 Влияние патологий опорно-двигательного аппарата на синаптическую модуляцию		39
1.4.1 Нарушения синаптической модуляции при травматических расстройствах		39
1.4.2 Нарушения синаптической модуляции при боковом амиотрофическом склерозе		42
1.4.3 Синаптическая модуляция при расстройствах аутистического спектра		43
1.4.4 Нарушения синаптической модуляции при мышечных дистрофиях.....		45
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ		48
2.1 Эксперименты на изолированных нервно-мышечных препаратах мышц крысы		49

2.1.1	Одиночные и тетанические сокращения, вызванные электрической стимуляцией.....	50
2.1.2	Сокращения, вызванные аппликацией карбахолина	51
2.1.3	Оценка температурной зависимости сокращения скелетных мышц крысы.....	51
2.1.4	Эксперименты в условиях гиперкальциевой среды	52
2.1.5	Сокращения, вызванные высокочастотной электрической стимуляцией	52
2.1.6	Регистрация потенциалов концевой пластинки.....	52
2.1.7	Изучение активности экто-нуклеотидаз скелетных мышц крысы.....	53
2.1.8	Иммуногистохимический метод оценки экспрессии P2-рецепторов.....	56
2.1.9	Анализ двигательной активности животных.....	57
2.1.10	Моделирование белковой сенсibilизации на мышцах.....	60
2.1.11	Моделирование расстройств аутистического спектра на крысах.....	60
2.1.12	Моделирование денервации на крысах.....	61
2.1.13	Моделирование контузионной травмы и гиподинамии на крысах.....	61
2.1.14	Моделирование спинализации на крысах.....	64
2.1.15	Моделирование бокового амиотрофического склероза на мышцах.....	65
2.2	Использованные вещества.....	65
2.3	Анализ данных	66
2.4	Соблюдение этических норм и стандартов.....	66
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ		68
3.1	Влияние агонистов и антагонистов пуринергической сигнализации на потенциалы концевой пластинки	68
3.2	Влияние пуринов на параметры сокращения камбаловидной	

	мышцы и <i>m. EDL</i> крысы	70
3.3	Выявление внутриклеточных эффекторов, участвующих в эффектах АТФ и аденозина	72
3.4	Гиперкальциевая модель выявления постсинаптических эффектов.....	75
3.5	Иммуногистохимическое определение подтипов P2-рецепторов.....	79
3.6	Влияние температуры на временные параметры одиночных сократительных ответов <i>m. soleus</i> и <i>m. EDL</i> , вызванных электрической стимуляцией.....	83
3.7	Влияние АТФ и сурамина на временные параметры одиночных сократительных ответов <i>m. soleus</i> и <i>m. EDL</i> , вызванных электрической стимуляцией в норме и при гипотермии.....	85
3.8	Влияние АТФ на тетанические сократительные ответы <i>m. soleus</i> и <i>m. EDL</i> , вызванные электрической стимуляцией в норме и при гипотермии.....	87
3.9	Влияние температуры на временные параметры одиночных сократительных ответов <i>m. soleus</i> и <i>m. EDL</i> , вызванных карбахолином.....	90
3.10	Влияние АТФ и сурамина на временные параметры одиночных сократительных ответов <i>m. soleus</i> и <i>m. EDL</i> , вызванных карбахолином в норме и при гипотермии.....	92
3.11	Роль эктонуклеотидаз в синаптической передаче. Термолабильность метаболизма АТФ.....	94
3.12	Оценка температурной зависимости P2-опосредованных эффектов и эктонуклеотидазной активности.....	94
3.13	Влияние АТФ и сурамина на сокращения <i>m. soleus</i> и <i>m. EDL</i> крысы, вызванные электрической стимуляцией, на модели белковой сенсibilизации.....	95

3.14	Влияние АТФ и сурамина травм на сокращения <i>m. soleus</i> и <i>m. EDL</i> крысы, вызванные электрической стимуляцией, при денервации	99
3.15	Влияние АТФ и сурамина на сокращения скелетных мышц крысы, вызванные электрической стимуляцией, на моделях гиподинамии и контузионной травмы.....	103
3.16	Влияние АТФ и сурамина на сокращения скелетных мышц крысы, вызванные электрической стимуляцией, при перерезке спинного мозга (спинализации).....	107
3.17	Влияние АТФ и сурамина на сокращения скелетных мышц мышцы на модели бокового на модели расстройств аутистического спектра.....	109
3.18	Влияние АТФ и сурамина на сокращения скелетных мышц мышцы, вызванные электрической стимуляцией, на модели бокового амиотрофического склероза у мышей.....	114
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ		119
ВЫВОДЫ.....		133
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....		135
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....		136
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		137
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....		175
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....		181
Приложение А (обязательное) Зависимость тонуса изолированной <i>m. soleus</i> крыс от температуры в контроле и при добавлении в среду инкубации сурамина или 8-SPT в концентрации 100 мкМ.....		184
Приложение Б (обязательное) Изменение амплитуды сокращений <i>m. soleus</i> крыс, вызванных электрической стимуляцией, от температуры в контроле и при аппликации сурамина и 8-SPT в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах.....		185

Приложение В (обязательное) Эффект АТФ на силу вызванных электрическим полем сокращения <i>m. soleus</i> в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах.....	186
Приложение Г (обязательное) Влияние аденозина на амплитуду сокращений <i>m. soleus</i> крыс, вызванных электрической стимуляцией, от температуры в контроле и при аппликации 8-SPT в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах.....	187
Приложение Д (обязательное) Эффекты АТФ при повышенной концентрации Ca^{2+} (7,2 мМ) на силу вызванных электрическим полем сокращений <i>m. soleus</i> в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ., при различных температурных режимах...	188
Приложение Е (обязательное) Изменение амплитуды сокращений <i>m. soleus</i> крыс, вызванных карбахолином, от температуры в контроле и при аппликации сурамина и 8-SPT в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах.....	189
Приложение Ж (обязательное) Эффект АТФ на силу сокращения <i>m. soleus</i> , вызванных карбахолином, в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах.....	190
Приложение З (обязательное) Эффект аденозина на силу сокращения в <i>m. soleus</i> , вызванных карбахолином, в контроле и при аппликации 8-SPT в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах...	191
Приложение И (обязательное) Зависимость тонуса изолированной <i>m. EDL</i> крыс от температуры в контроле и при добавлении в среду инкубации сурамина или 8-SPT в концентрации 100 мкМ.....	192
Приложение К (обязательное) Изменение амплитуды сокращений <i>m. EDL</i> крыс, вызванных электрической стимуляцией, от температуры в контроле и при аппликации сурамина и 8-SPT в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах.....	193

Приложение Л (обязательное) Эффект АТФ на силу вызванных электрическим полем сокращения <i>m. EDL</i> крысы в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах.....	194
Приложение М (обязательное) Эффект аденозина на силу вызванных электрическим полем сокращения <i>m. EDL</i> крысы в контроле и при аппликации 8-SPT в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах.....	195
Приложение Н (обязательное) Эффекты АТФ при повышенной концентрации Ca^{2+} (7,2 мМ) на силу вызванных электрическим полем сокращений <i>m. EDL</i> в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах	196
Приложение О (обязательное) Изменение амплитуды сокращений <i>m. EDL</i> крыс, вызванных карбахолином, от температуры в контроле и при аппликации сурамина и 8-SPT в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах.....	197
Приложение П (обязательное) Эффект АТФ на силу сокращения <i>m. EDL</i> крысы вызванных карбахолином, в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах.....	198
Приложение Р (обязательное) Эффект аденозина на силу сокращения <i>m. EDL</i> крысы вызванных карбахолином, в контроле и при аппликации 8-SPT в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах.....	199

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Пуринергическая сигнализация является одной из самых древних и достаточно распространенных регуляторных систем [20, 62]. Основные эндогенные участники этой системы – аденозин и аденозинтрифосфат (АТФ) – воздействуют на специфические трансмембранные рецепторы. В настоящее время известно четыре типа аденозиновых (A_1 , A_{2A} , A_{2B} и A_3), семь подтипов ионотропных $P2X$ ($P2X_{1-7}$) и восемь подтипов метаботропных $P2Y$ ($P2Y_{1-14}$) рецепторов [25]. Эти рецепторы широко распространены в тканях человека и животных, в том числе в скелетной мускулатуре [62]. 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 [10, 31, 342].

Считается, что в физиологических условиях $P2$ -рецепторы являются лишь модуляторами разнообразных функций клеток и органов [61], при этом их регуляторная роль значительно возрастает в патологических условиях, когда они могут осуществлять главенствующую роль в качестве сигнальных молекул [62].

В настоящее время в клинической практике успешно применяются блокаторы $P2Y_{12}$ -рецепторов тромбоцитов (клопидогрел, кангрелор, тикагрелол) в качестве эффективных антиагрегантов, а агонист $P2Y_2$ -рецепторов – диквафазол – для лечения синдрома сухого глаза. 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.

Скелетные мышцы составляют гетерогенную популяцию и среди них различают быстрые, медленные и смешанные, отличающиеся качественным

составом сократительных белков, силой и скоростью сокращения, устойчивостью к утомлению, но самое главное разным ответом на изменяющиеся условия функционирования.

Современные направления фармакологии сталкиваются с проблемой поиска эффективного, нетоксического, предпочтительно эндогенной природы фактора, способного корректировать нарушения двигательной активности после повреждения нервных структур, поскольку она является основополагающей для общей функциональной активности организма

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), и был выявлен эффектор пресинаптического действия АТФ в нервно-мышечной передаче теплокровных - протеинкиназа С (РКС) [31].

С помощью микроэлектродной техники voltage-clamp было обнаружено, что АТФ и аденозин почти одинаково на треть снижают амплитуду токов концевой пластинки в нервно-мышечном синапсе лягушки. Кроме того, было продемонстрировано, что ингибирование выброса АХ в нервно-мышечной передаче АТФ и аденозином опосредовано через разные пресинаптические

пуриновые рецепторы, метаботропные P2Y для АТФ и аденозиновые для аденозина. Пресинаптический ингибиторный эффект аденозина на амплитуду токов концевой пластинки осуществляется посредством активации A1 аденозиновых рецепторов, сопряженных с А-типом K⁺-каналов, и A_{2A} рецепторов.

Вместе с тем, выявлено, что обнаруженные механизмы и даже сам знак пресинаптического действия АТФ не универсальны. Так, в синапсах «смешанной» мышцы диафрагмы АТФ оказывает пресинаптический облегчающий эффект, аналогичный эффект наблюдается в истинно тонических мышцах, что широко распространено у холоднокровных, но у теплокровных такие мышцы обнаруживаются только в зрительной и слуховой сенсорных системах. Но РКС остается общим эффекторным участником реализации действия АТФ во всех этих мышцах [155].

Ранее было обнаружено, что степень P2-рецептор опосредованного угнетения нервно-мышечной передачи в скелетной мышце лягушки зависит от температуры: показано, что снижение температуры увеличивает, а повышение – уменьшает угнетающее действие АТФ на сократительные ответы и токи концевой пластинки скелетной мышцы [324].

Был проведен анализ возможных точек влияния внеклеточных пуринов как сигнальных молекул в нервно-мышечном синапсе. Высказаны предположения существования и функциональной значимости постсинаптических P2-рецептор-опосредованных процессов.

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.

Исходя из поставленной цели, были определены следующие **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 круг 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 и наиболее значимым установленным результатом работы явилось то, 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

Выявленные 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 сенсibilизация 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 условия 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-сульфофенил-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 пуриnergической регуляции функционирования скелетных мышц. При контузионной травме, перерезке спинного мозга, денервации и боковом амиотрофическом склерозе угнетается пресинаптическое звено пуриnergической 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, применение адекватных задачам методов исследования, проведение тщательного анализа полученных результатов, включающего соответствующие методы статистической обработки.

Апробации работы

Результаты диссертационного исследования доложены на XVIII Всемирном конгрессе по фармакологии (Киото, Япония, 2018), VI Междисциплинарной конференции Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии (Москва, Россия, 2020), Всероссийской научной конференции

«Теоретические и практические аспекты действия естественной и искусственной гипотермии на организм» (Махачкала, Россия, 2021), III Объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов, VII Съезде физиологов СНГ, X Российском симпозиуме «Белки и пептиды», VII Съезд биохимиков России (Сочи, Дагомыс, Россия, 2021), XIX симпозиуме с международным участием «Эколого-физиологические проблемы адаптации» (Казань, Россия, 2022), IX Российской, с международным участием, конференции по управлению движением, посвященной 95-летию со дня рождения И. Б. Козловской (Казань, Россия, 2022), IX Молодежной международной научно-технической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Прикладная электродинамика, фотоника и живые системы» (Казань, Россия, 2022), I Всероссийской научно-практической конференции, (Йошкар-Ола, Россия, 2022), Международной междисциплинарной конференции «ICMECE 2022» (Барселона, Испания, 2022), Съезд физиологов СНГ, Сочи-Дагомыс, Россия, 2022), Съезд биофизиков России (Краснодар, Россия, 2023), XIX Всемирном конгрессе по фармакологии (Глазго, Великобритания, 2023), Съезд российского физиологического общества (Санкт-Петербург, Россия, 2023). VI Съезд фармакологов России (Москва Россия, 2023), Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология» (Санкт-Петербург, Россия, 2023), XI Всероссийской с международным участием школы-конференции по физиологии мышц и мышечной деятельности, посвященной 70-летию открытия механизма мышечного сокращения (Москва, Россия, 2024), XXVI Всероссийский конгресс с международным участием «Давиденковские чтения» (Санкт-Петербург, Россия, 2024), Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Учение академика И. П. Павлова в современной системе нейронаук» (Санкт-Петербург, Россия, 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.).

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

Личный вклад автора

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

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 P2 - рецепторы и АТФ

1.1.1 История изучения

Пуринергическая внеклеточная сигнальная система обеспечивается пуриновыми, а также пиримидиновыми нуклеотидами/нуклеозидами со своими аденозиновыми, P2X- и P2Y-рецепторами [25, 337].

Первая публикация об АТФ как возможной сигнальной молекуле была еще в 1972 году [59]. Вскоре были обозначены и пуринергические рецепторы: P1 - к аденозину и P2 - к АТФ [52, 59]. После клонирования некоторых подтипов этих рецепторов [238] было предложено разделение P2-рецепторов на 2 семейства: P2X - ионотропные и P2Y - метаботропные рецепторы. Данная классификация общепринята в настоящее время. Выделяют 7 подтипов P2X- и 8 подтипов P2Y-рецепторов [25, 337].

Внедрены в настоящее время как эффективные антиагреганты в клиническую практику антагонисты P2Y₁₂-рецепторов кровяных пластинок человека [142].

1.1.2 Классификация пуринорецепторов

Неоднократно делались попытки внести изменения в номенклатуру рецепторов пурины [52, 53, 93, 176, 187, 238]. По настоящей классификации [25, 337] рецепторы пуринов подразделяются на 3 класса; это - аденозиновые рецепторы (ранее - P1-рецепторы), P2X-рецепторы и P2Y-рецепторы (Рисунок 1).

Уходит из общего употребления термин «пуриноцепторы», так как некоторые пиримидины: УТФ (уридин-5'-трифосфат), а также, УДФ (уридин-5'-дифосфат) являются более эффективными агонистами для ряда рецепторов: P2Y₄, P2Y₆ и других [6].

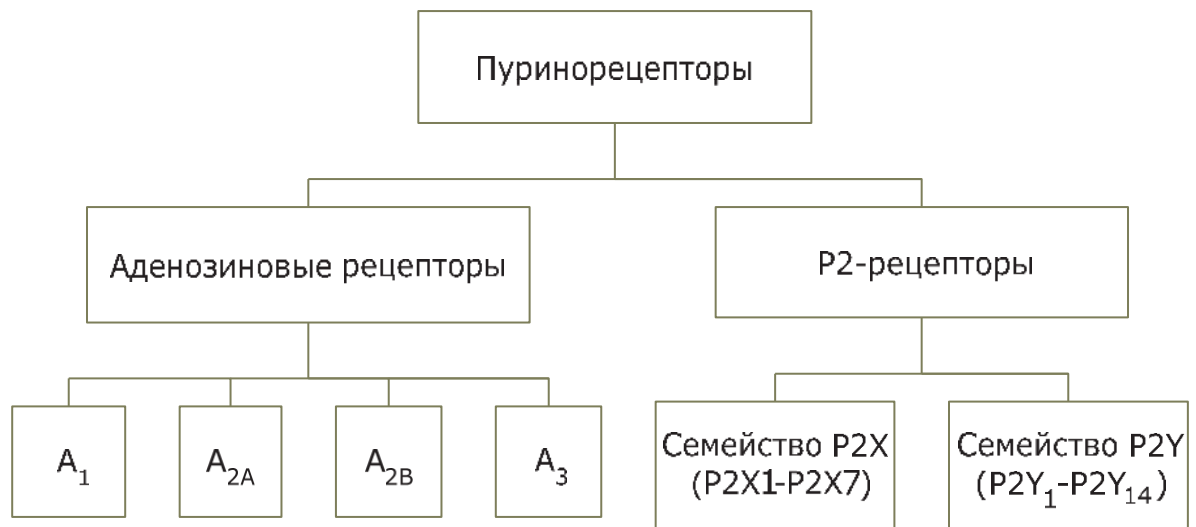


Рисунок 1 – Классификация пуриновых рецепторов [25, 337]

Также есть сведения о невошедших в данную классификацию рецепторах, со следующими агонистами: аденином [123], гуаниловыми нуклеотидами [300] и динуклеозидполифосфатами [103, 162]. Эти рецепторы нуждаются в более детальном исследовании.

1.1.3 Аденозиновые рецепторы

Изначально было описано 2 рецептора для аденозина: A_1 (стимуляция снижала активность аденилатциклазы) и A_2 (стимулировала эту активность) [79, 175, 176]. Позже выявлено, что A_2 -рецепторы имеют различные по аффинности участки связывания, что стало основанием их разделения на A_{2A} - и A_{2B} - подтипы [57, 369]. Еще позднее был найден третий тип рецепторов: A_3 (Таблица 1) [335].

Таблица 1 – Фармакологическая характеристика подтипов аденозиновых рецепторов (адаптировано из [63, 337])

Подтип рецептора	Локализация в тканях (клетках)	Агонисты (pK_i)	Антагонисты (pK_i)
A ₁	ЦНС, сердце, семенники, автономные нервные терминали	5-Cl-5-deoxy-ENBA (9,3); GR79236 (8,5); ССРА (7,7-8,1); СРА (6,5-9,4)	PSB36 (9,9); SLV320 (9,0); DPCPX (7,4-9,2)
A _{2A}	Головной мозг, сердце, легкие, селезенка, лейкоциты, тромбоциты	Apadenoson (9,3); CGS21680 (6,7-8,1)	SCH442416 (8,4-10,3); SCH58261 (8,3-9,2); ZM241385 (8,8-9,1)
A _{2B}	Толстый кишечник, мочевой пузырь	Bay60-6583 (8,0-8,5)	PSB0788 (9,4); PSB603 (9,3); MRS1754 (8,8); PSB1115 (7,3)
A ₃	Головной мозг, сердце, легкие, печень, семенники	IB-MECA (8,7-9,2); 2-Cl-IB-MECA (8,0-8,9)	MRS1220 (8,2-9,2); VUF5574 (8,4); MRS1523 (7,7); MRS1191 (7,5)

1.1.4 P2-рецепторы

Мишенями АТФ как сигнальной молекулы являются P2X и P2Y рецепторы [6]. У семейства P2X рецепторов восемь, а у P2Y семь подтипов рецепторов [25, 337].

P2X рецепторы являются ионотропными, пропускающими через свой канал Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и, даже, Cl^- . P2X-рецепторы повсеместно экспрессированы в нервных и мышечных клетках, а также клетках иммунной системы, крови, эпителия [49]. Известно множество процессов, где задействовано данное семейство рецепторов [171].

P2Y-рецепторы являются метаботропными рецепторами. Имеется семь трансмембранных фрагментов, образующих по 3 петли внутриклеточно, а также внеклеточно. Подтипы различаются трансмембранными фрагментами. Считается, что вторичным посредником подтипов P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ является инозитолтрифосфат, а у P2Y₁₂₋₁₄-рецепторов - аденилатциклаза. Для P2Y₁₁ - как фосфолипаза C, так и аденилатциклаза [179].

1.1.5 P2X-рецепторы

Два десятка лет назад расшифровали структуру основных подтипов P2X-рецепторов и провели клонирование [50, 51]. Молекула их белка содержит от 379 до 595 аминокислот. P2X-рецепторы идентичны на 30-50% по аминокислотам. Большая часть молекулы вне клетки образует петлю с лиганд-связывающим сайтом, имеется две трансмембранные гидрофобные части (TM1 и TM2); оба концевых фрагмента располагаются внутриклеточно (Рисунок 2). Различия подтипов отражаются в длине С-концевого участка молекулы белка [195, 239, 258, 359].

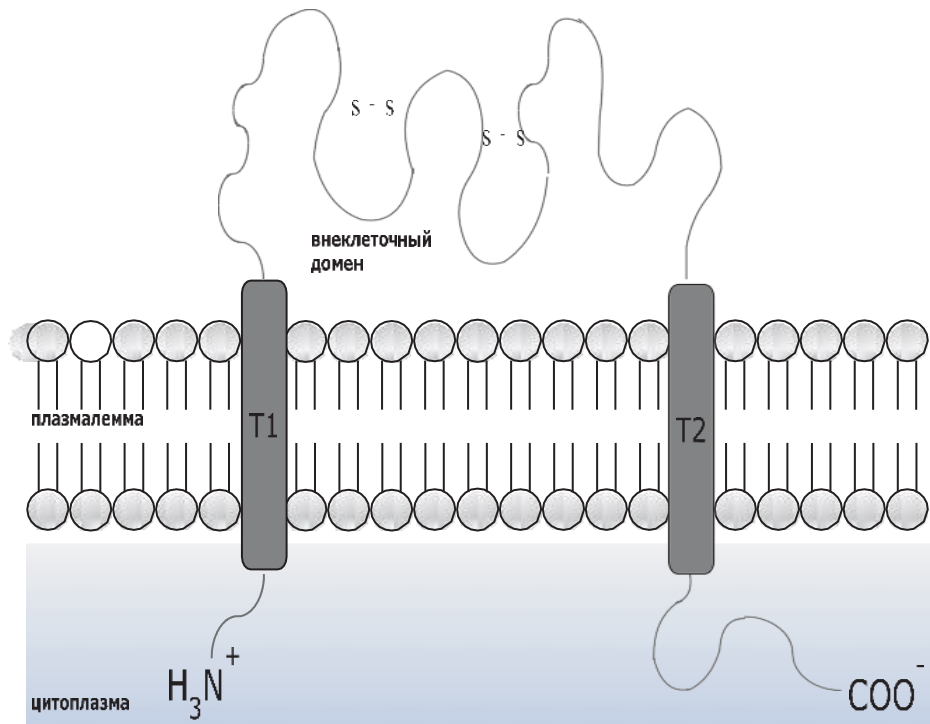


Рисунок 2 – Схематичная структура P2X-рецептора

Подтипы P2X-рецепторов различаются по десенситизации: у P2X1- и P2X3-рецепторов она происходит в течение десятка миллисекунд, P2X4 - с нескольких секунд, в остальных подтипах - еще дольше, либо не происходит (Таблица 2) [195, 239].

Таблица 2 - Фармакологическая характеристика подтипов P2X-рецепторов
(адаптировано из [25, 63])

Подтип	Локализация в тканях (клетках)	Агонисты		Антагонисты	
		Полные	Другие	Селективные (pIC) 50	Неселективные
P2X1	Гладкие мышцы, тромбоциты, мозжечок, задние корешки спинного мозга	α, β -meATP; BzATP; L-meATP	2-MeSATP = ATP	TNP-ATP (8,9); Ip 15 (8,5); NFO23 (7,7); NF449 (6,3)	Сурамин, PPADS
P2X2	Гладкие мышцы, ЦНС, хромоаффинные клетки, ретина, вегетативные и чувствительные ганглии	-	ATP \geq ATP γ S \geq 2-MeSATP \gg α, β -meATP	-	Сурамин, изо-PPADS, реактив синий 2
P2X3	Чувствительные нейроны, симпатические нейроны	α, β -meATP; BzATP	2-MeSATP \geq ATP \geq АФ А 4	TNP-ATP (8,9); AF353 (8); A317491 (7,5); RO3 (7,5)	PPADS
P2X4	ЦНС, семенники, толстый кишечник	-	ATP \gg α, β -meATP,	-	TNP-ATP
P2X5	Пролиферирующие клетки кожи, кишечника, мочевого пузыря, спинного мозга	-	ATP \gg α, β -meATP, ATP γ S	-	Сурамин, PPADS, бриллиантовый
P2X6	ЦНС, двигательные нейроны спинного	-	-	-	-
P2X7	Апоптотические клетки, например иммунной системы, кожи, поджелудочной железы	-	BzATP $>$ ATP \geq 2-MeSATP \gg α, β -meATP	-	KN62, кумасси бриллиантовый синий G

Существуют многочисленные варианты гомо- и гетеромультимеров данного семейства рецепторов [195]. При этом P2X6-рецепторы не функционируют как гомомультимер [109].

P2X-рецепторы повсеместно экспрессированы в нервных и мышечных клетках, а также клетках иммунной системы, крови, эпителия [49]. Известно множество процессов, где задействовано данное семейство рецепторов [171].

1.1.6 P2Y-рецепторы

P2Y-рецепторы являются типичными метаботропными рецепторами [6]. Имеется семь трансмембранных фрагментов, образующих по 3 петли внутриклеточно, а также внеклеточно (Рисунок 3). Подтипы различаются трансмембранными фрагментами [18]. Считается, что вторичным посредником подтипов P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ является инозитолтрифосфат, а у P2Y₁₂₋₁₄-рецепторов - аденилатциклаза [20, 348]. Для P2Y₁₁ - как фосфолипаза C, так и аденилатциклаза [201].

Изначально описано достаточно много подтипов данного семейства P2Y-рецепторов [6]. Позднее некоторые подтипы этих рецепторов исключались из классификации, так как оказались аналогами существующих, или у них не оказалось функциональной активности [348]. Из-за этого в настоящий момент у них наблюдаются пропуски в сквозной нумерации.

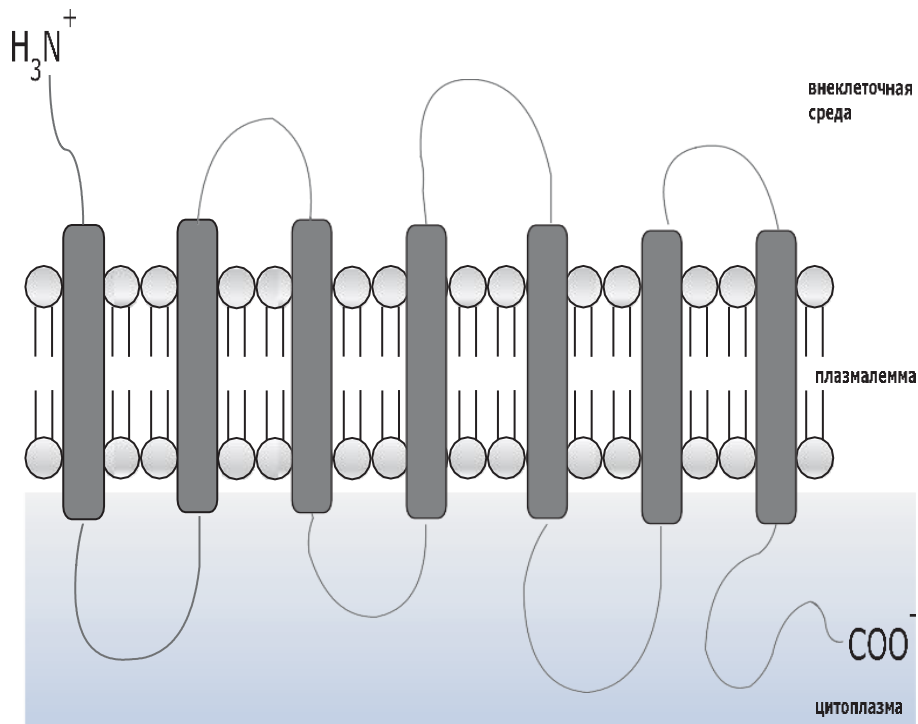


Рисунок 3 – Схематичная структура P2Y-рецептора

Различные подтипы P2Y-рецепторов человека имеют 21-48-процентное сходство [20]. Фармакологически выделяют четыре подгруппы данных рецепторов: 1) P2Y₁, P2Y₁₁, P2Y₁₂ и P2Y₁₃ с предпочтительными агонистами АТФ и АДФ; 2) P2Y₄ и P2Y₆ с УТФ и УДФ; 3) P2Y₂ и P2Y₄ - с одинаковой тропностью к пуринам и пиримидинам; 4) P2Y₁₄ - возбуждающиеся сахаристыми пиримидинами (Таблица 3) [6].

Таблица 3 – Фармакологическая характеристика подтипов P2Y-рецепторов (адаптировано из [25, 63])

Подтип рецептора	Локализация в тканях (клетках)	Агонисты		Антагонисты	
		Селективные (pIC)	Другие	Селективные (pIC)	Другие
P2Y ₁	Иммунные, эпителиальные и эндотелиальные клетки, почечные каналы, остеобласты, астроциты	2-thio-UTP (7,3); PSB1114 (6,9); Ar A (6,1); 4UTP-S (5,8); MRS2768 (5,7)	UTP = ATP	AR-C118925XX (6,0)	сурамин, реактив синий 2, AR-C126313
P2Y ₂	Эпителиальные и эндотелиальные клетки, тромбоциты, остеокласты	MRS2365 (9,4); ADPβS (7,3); 2-MeSADP	ADP > ATP	MRS2500 (8,8-9,1); MRS2279(7,9); (7,0-7,1); PIT (6,8)	-
P2Y ₄	Эндотелиальные клетки	UTP-S; MRS4062 (7,6)	UTP > ATP	ATP (6,2)	PPADS, реактив реактив синий 2
P2Y ₆	Некоторые эпителиальные клетки	MRS 2957; (7,9); 5-iodoUDP (7,8);	UDP >> UTP > ATP	MRS2578 (7,4)	-
P2Y ₁₁	Селезенка, кишечник	NNADP; NAD; AR-C67085 (8,5);	ATP > UTP	NF157 (7,4); NF340 (6,4-7,1)	сурамин, реактив синий 2
P2Y ₁₂	Тромбоциты, глиальные	2MeSADP (9,2)	ADP >> ATP	PSP0739 (7,6); ARL66096	клопидогрел, тиклопедин
P2Y ₁₃	Селезенка, головной мозг	-	ADP >> ATP	MRS2211 (6,0)	-
P2Y ₁₄	Плацента, жировая ткань, желудок, кишечник, определенные	MRS2690 (6,6-7,3)	УДФ-глюкоза = УДФ-галактоза	-	-

1.1.7 Роль пуриновых рецепторов в сокращении скелетных мышц

Мионевральный синапс - переходник возбуждения с мотонейрона на мышцу [138]. В норме каждое скелетное мышечное волокно иннервировано своим окончанием мотонейрона [128]. Несмотря на то, что в мионевральном синапсе возбуждение с нерва на мышцу передается исключительно медиатором ацетилхолином, в эмбриональных миоцитах изначально также экспрессируют рецепторы к глутамату, гаммааминомасляной кислоте (ГАМК) и глицину [42].

АТФ - котрансмиттер, сопровождающий ряд классических медиаторов (ацетилхолин, глицин, ГАМК, и глутамат [326]. Доказано, что АТФ выделяется в мионевральную щель в процессе экзоцитоза основного медиатора [320].

Долгое время считалось, что в синапсе у АТФ нет собственной сигнальной роли, он лишь предшественник синаптического модулятора аденозина [219, 284, 289]. И правда: аденозин влияет как на вызванную, так и на спонтанную активность. Так предполагалось, что непосредственно аденозин угнетает синаптические токи при ритмическом раздражении нерва [219, 284].

В последние десятилетия четко показано, что АТФ сам является модулятором синаптической передачи [140, 205, 229]. АТФ эффективно регулирует мионевральную передачу [31, 105, 148, 265, 297], модулируя экзоцитоз квантов нейротрансмиттера.

В синаптической щели двигательных единиц крысы 50 мкМ АТФ метаболизируется в аденозин в течение двух минут [312]. В мионевральном синапсе лягушки 10 мкМ АТФ на фоне дипиридамола (ингибитора захвата аденозина) разрушался до АДФ в течение пяти минут, до АМФ в течение пятнадцати - двадцати минут и до аденозина в течение двух часов [274].

Известно, что активация P2X7-рецепторов, локализованных на мембране нервной терминали мионевральных синапсов, стимулирует экзоцитоз нейромодуляторов [233, 269]. Правда, для активации этих рецепторов необходима концентрация, превышающая нормальную (>100 мкМ), достигаемая в случае ряда патологий, к примеру, ишемии [195, 269, 347].

Предполагается вклад P2X4-подтипа рецепторов, расположенных на мембранах T-тубул, в механизм электромеханической связи. Активация этих рецепторов приводит к входу в клетку кальция, что должно менять работу кальций-опосредованных механизмов.

До начала девяностых годов прошлого века имелись только единичные сообщения о возбуждающем влиянии АТФ в нейронах центральной нервной системы (ЦНС) [283]. Возбуждающая роль АТФ была доказана при исследовании в ресничном ганглии морской свинки [122, 309].

Афферентные нейроны крысы в хвостатом ядре тройничного нерва увеличивают частоту спонтанных ответов в присутствии АТФ [298]. То же происходит, но в ответ на аденозин, у норадренергических нейронов голубого пятна мозга крысы, содержащих аденозиновые рецепторы [234, 285, 307]. При этом АТФ не приводил к изменениям частоты, но при введении дополнительно в раствор антагонистов аденозиновых рецепторов учащалась спонтанная активность. Позже на этих же объектах было подтверждено, что активация P2-рецепторов обеспечивает входящий катионный ток [99, 308].

Были обнаружены в средней уздечке мозга крысы нечувствительные к холинолитикам вызванные и спонтанные токи, блокируемые сураминол и α, β -метилтен-АТФ [114]. АТФ нервных терминалей гиппокампа, усиливает постсинаптическое действие глутамата [237]. Эффект АТФ/глутамат, возможно, играет ведущую роль механизма долговременной потенциации и основанных на нем процессов обучения и памяти.

В конце прошлого тысячелетия было доказано, что АТФ непосредственно влияет на квантовый состав в мионевральном синапсе [2]. Предположено, что пресинаптическое ингибиторное действие АТФ в мионевральном синапсе фазной мышцы холонокровных опосредуются через P2Y-рецепторы нервной терминали. К настоящему времени опубликованы многочисленные свидетельства об этом [105, 155, 156, 218].

В литературе известны примеры их синфазного действия. Известно, что аденозиновые и P2-рецепторы образуют димеры (комплексы

гетероолигомерного вида), обладающие исключительными свойствами [368].

Доказательство независимых сигнальных механизмов исследуемых пуринов было получено при сочетанной аппликации АТФ и аденозина [148]. Даже когда аденозин был использован в насыщающей концентрации, добавление АТФ приводило к дополнительному снижению амплитуды.

Доказана также аддитивность не только пресинаптических пуриновых рецепторных систем в нервно-мышечном синапсе, но и разных внутриклеточных сигнальных систем, с которыми взаимодействуют через свои рецепторы АТФ и аденозин [105, 218].

1.2 Общая характеристика скелетных мышц

1.2.1 Классификация и типы мышечных волокон позвоночных

Научные исследования данной научной работы осуществлялись на фазных мышцах, в отличие от тонических, способных на быстрое сокращение, при этом не способных на длительное удержать достигнутое укорочение [5, 154].

Классификации фазных волокон скелетных мышц базируются на морфологических [78, 89], физиологических [4, 28, 287] и биохимических [243] особенностях.

Еще в начале профильных исследований стало ясно, что «белые» скелетные мышцы сокращаются быстрее, чем «красные» [98, 232]. Вместе с тем отмечалось, что в одной и той же мышце представлены как «белые», так и «красные» мышечные волокна [151]; гистологически однотипных, за малым исключением, не обнаружено.

Была показана связь между содержанием гемоглобина и цветом мышцы [71, 143, 224]. Найдено, что цвет коррелирует с особенностями васкуляризации [300], а также скоростью кровотока [164].

В красных мышечных волокнах миофибриллы разделены не так четко, как в белых, *Z*-линия широкая и извилистая, *M*-полоса плохо выражена, зона *H* едва

заметна [13]. И, конечно, в «красных» - большое число митохондрий, образующих скопления [9].

Отмечено, что белые волокна имеют большую по сравнению с красными площадь в поперечном разрезе. В «белых» волокнах миофибриллы более упорядочены, *Z*-линия спрямлена, *H*-полоса более хорошо выражена. Митохондрий, безусловно, меньше; их расположение равномерно [241].

Позже было предложено классифицировать типы волокон скелетных мышц по активности сукцинатдегидрогеназы [318], белковому комплексу мембраны митохондрий, участвующему в цикле Кребса. В результате идентифицированы следующие типы мышечных волокон: *A* - волокна низкой сукцинатдегидрогеназной активности, *C* - максимальной активности сукцинатдегидрогеназы и промежуточный тип - *B*. А далее оказалось, что переход от «белых» (*A*) к «красным» (*C*) имеет ряд перекрывающихся промежуточных состояний и маркирует изменения от анаэробного гликолиза к метаболизму, зависящему от кислорода [294].

Также существуют и альтернативные классификации: по активности других ферментов [243], скорости сокращения [113], концентрации определенных субстратов [357], а также комплексно [315], по выявлению белков промежуточных филаментов [92], изоформ фермента карбоангидразы [82], изоферментов креатинкиназы [243] и некоторых других. Применение всех этих подходов обнаружило значительную гетерогенность типов скелетных мышечных волокон.

И все же из всех способов идентификации типов скелетных мышечных волокон наиболее адекватной функциональным особенностям признают классификацию по активности миофибрилярной АТФазы миозина [153], поскольку каталитическая активность этого фермента прямо связана со скоростью сокращения [290]. Так как скорость сокращения мышечных волокон определяется в большей степени качественным составом миозина [28, 113], то по активности АТФазы с той или иной долей вероятности можно судить и о наборе миозинов в мышечных волокнах [153].

При выявлении АТФазной активности выделяют пять типов волокон, из которых 1-3 - «чистые» фазные волокна (причем волокна первого типа самые «быстрые», а третьего - самые «медленные»), четвертый тип - переходный, с сочетанными тоническими и фазными характеристиками, волокна пятого типа обладают «чистыми» тоническими свойствами [235, 295]. Другой вариант - разделение на четыре группы, при этом волокна четвертого и пятого типов объединены в одну *S*-группу (от англ. *slow*) [305]. В научных работах последних лет нумеруют, как правило, только три первых, фазных типа экстрафузальных мышечных волокон [311].

Другие исследования [44, 317] позволили среди быстрых мышечных волокон второго типа выделить подтипы ПА - быстросокращающиеся оксидативные; ПВ - быстросокращающиеся гликолитические и, наконец, тип ПС, включающий элементы обоих типов метаболизма. При этом, учитывая исследования с использованием антител к сократительным белкам, либо их фрагментам [66, 80], нельзя игнорировать данные о том, что активность АТФазы миозина не в 100 % случаях коррелирует с качественным составом миозина и поэтому не может считаться надежным маркером для типирования мышечных волокон [13].

Тем не менее, кажется, что именно качественный состав миозинов и определяет, какой быть мышце - быстрой или медленной [255, 287]. Использованный в данной работе длинный разгибатель пальцев относится к мышцам, содержащим большее количество быстрых волокон, камбаловидная же является медленной мышцей.

Функционирование двигательных единиц как быстрых, так и медленных мышц млекопитающих, в т.ч. крыс все-таки в целом схоже [22, 322]. Хотя и существует ряд морфологических различий: в медленных мышцах (например, *soleus*) обнаруживают меньшее количество терминальных вздутий [362], более обширные и выступающие первичные расщелины [126] и более слабые постсинаптические ответы на ацетилхолин [319], чем в быстрой мышце *EDL*. Во время тонической стимуляции в синапсе *m. soleus* поддерживается

высвобождение везикул лучше, чем у т. *EDL* [286], медленные более устойчивы к усталости, чем быстрые [200].

Что характерно, контрактильные свойства претерпевают поразительные изменения в медленных и быстрых мышцах после перекрестной реиннервации [77] или соответствующей прямой электрической мышечной стимуляции [129]. То есть, какая получится мышца - быстрая или медленная - зависит, в первую очередь, от особенностей синапса [250].

Так какие особенности синаптического механизма определяют то, какой будет мышца: быстрой или медленной? Это могло бы быть связано со временем нахождения ионного канала постсинаптического холинорецептора в открытом состоянии, но в синапсах быстрых и медленных мышц крысы этот параметр одинаков, различается же время пребывания молекул медиатора в синаптической щели [41]. Время пребывания может быть связано с активностью холинэстеразы и/или определяется величиной квантового состава медиатора [138].

1.3 Влияние внешних факторов на синаптическую модуляцию

1.3.1 Влияние температуры на синаптическую модуляцию

Исторически, исходя из представлений о центральной регуляции всего в организме, вопросы, связанные с перестройкой функционирования двигательных единиц при изменении температуры, пытались решить, исследуя эффекты на ЦНС. Первые же исследования влияния температурных условий окружающей среды на функционирование головного мозга показали, что существуют гипертермические изменения корковой возбудимости (первичное торможение при температуре 40 °С и выше, и даже полное исчезновение медленного отрицательного потенциала) у кошек [46].

Далее было выяснено, что в условиях гипертермии уменьшается кровоснабжение [161, 240] и изменяется скорость метаболических процессов в различных участках головного мозга человека [69]. Некоторые исследователи находят в этом систему предохранения от перегрева головного мозга во время

изнурительных физических нагрузок, при которых наблюдается гипертермия [67], другие отрицают наличие данного механизма [264].

Также были исследованы изменения характера электроэнцефалограммы (ЭЭГ) у человека при гипертермии в условиях физической нагрузки [161, 240, 328]. Был обнаружен ряд характерных видоизменений ЭЭГ при повышении центральной температуры свыше 39 °С, коррелирующих с увеличением нагрузки.

По сложившимся в результате всего этого представлениям, при всесторонних церебральных исследованиях не считается лишним принимать во внимание и состояние периферической нервно-мышечной системы [276, 277].

Что касается самой двигательной единицы, то она «начинается», как известно, с двигательного нерва. В клинике известен «феномен Утхоффа», который возникает вследствие негативного влияния повышенных температур на проводимость нервных волокон. Этот синдром более характерен для поврежденных или демиелинизированных нервов [222].

С другой стороны, проведение возбуждения по нерву замедляется при охлаждении, что с давних пор использовалось при операциях, для обезболивания Катц и Миледи в 1965 году нашли, что при охлаждении скорость проведения потенциала действия снижается именно по немиелинизированному участку мотонейрона [185, 186].

На немиелинизированном участке - терминали мотонейрона лягушки по мере увеличения температуры среды от 10 °С до 28 °С скорость проведения возбуждения возрастала, хотя разница между ее значениями в проксимальной и дистальной частях терминали оставалась постоянной [332].

Можно обобщить, что у всех позвоночных - теплокровных и холоднокровных - как гипо-, так и крайняя гипертермия вызывает снижение скорости проведения возбуждения мотонейронами, главным образом, по их немиелинизированному участку - терминали.

Химический мионевральный синапс, посредством которого, как известно, осуществляется передача возбуждения с окончания мотонейрона на концевую пластинку мышечного волокна позвоночных, достаточно хорошо изучен.

Различают некантовую, спонтанную и вызванную кантовые секрции ацетилхолина в синаптическую щель [138, 184]. Влияние температуры на эти процессы исследуют почти со времени открытия данных видов экзоцитоза нейротрансмиттера.

Молекулярной, некантовой секрции медиатора, открытой лишь в 1977 году [361], до сих пор не придают принципиального значения из-за отсутствия общепризнанного генерализированного действия. Действительно, не смотря на ее большой объем, некантовая секрция лишь деполяризует область концевой пластинки на несколько милливольт, что определяется по гиперполяризации в присутствии блокаторов постсинаптических рецепторов - «Н-эффекту» [11, 361]. Однако некантовая секрция крайне важна и является определяющей для функционирования синапса.

Температурная зависимость величины некантовой секрции в нервно-мышечных препаратах грызунов имеет сложный характер. Установлено, что в диапазоне от 10 °С до 35 °С размер некантовой секрции имеет два относительных максимума при 20 и 35 °С, а также минимумы при 25 °С и 10 °С (в последнем случае некантовая секрция вообще не проявляется) [11, 14, 360].

Что касается мионеврального синапса холоднокровных, то оценка его некантовой секрции затруднена ввиду малой величины регистрируемого Н-эффекта [11, 360].

Частота спонтанных, одноквантовых ответов в синапсах как холоднокровных, так и теплокровных экспоненциально увеличивается при повышении температуры [14, 333, 339, 346] без изменения амплитуды этих ответов [149]. Таким образом, два процесса высвобождения АХ - квантовый и некантовый обладают разной зависимостью от температуры, что указывает на наличие независимых механизмов [339, 360].

Показано, что изменение температуры существенно влияет на характер распределения истинных синаптических задержек одноквантовых ответов, зарегистрированных в ограниченном участке синаптического контакта [35, 95, 185], которые в свою очередь определяют временные параметры процесса

освобождения квантов медиатора.

Анализ опубликованных данных приводит к однозначному заключению о нарастании переднего фронта постсинаптических ответов при снижении температуры - как у холоднокровных, так и у теплокровных [95, 185, 228, 332]. Причем у вызванных ответов это нарастание на треть более выраженное, чем у спонтанных [332].

Это дополняет сведения о видимом уменьшении амплитуды многоквантовых постсинаптических ответов при снижении температуры, и объясняет, почему при сопоставлении площадей вызванных и спонтанных токов концевой пластинки не обнаружено достоверного уменьшения квантового состава [332].

Известно, что в мионевральной синаптической щели находится ацетилхолинэстераза, которая быстро расщепляет нейромедиатор ацетилхолин [36].

Показано, что при снижении температуры препарата диафрагмы крысы с 37 °С до 17 °С активность ацетилхолинэстеразы снизилась на 34 % [344]. Подобная же картина наблюдалась и в экспериментах с препаратом портняжной мышцы озерной лягушки, что дало основание исследователю назначить ацетилхолинэстеразу ответственной за увеличение при гипотермии временного хода токов концевой пластинки [196].

Для исследования состояния постсинаптических холинорецепторов применяются холиномиметики (в первую очередь медленно разрушающийся холиномиметический агент - карбахолин) и холинолитики. В экспериментах на препаратах «медленной» мышцы - *m. soleus* крысы, амплитуда миниатюрных потенциалов концевой пластинки не изменялась после аппликации карбахолина в концентрации 10^{-5} М при диапазоне температур от 18 °С до 38 °С. С другой стороны, при температурах 37 °С - 38 °С наблюдалось снижение частоты миниатюрных (что в комплексе свидетельствует о пресинаптической природе эффекта) в присутствии холиномиметика на 40% [236].

Возвращаясь к данным по неквантовой секреции ацетилхолина, надо

признать, что снижение под действием этой секреции уровня поляризации постсинаптической мембраны примерно на 5 мВ, выявляемое применением холинолитика, существенно влияет на функционирование постсинаптической мембраны - негативно на чувствительность ее холинорецепторов. Соответственно, отмеченные [11, 14, 360] максимумы некантовой секреции при 20 и 35°C, а также ее минимумы при 25 °С и 10 °С являются экстремумами температурной зависимости постсинаптических холинорецепторов.

Как уже говорилось, традиционно считается, что сила сокращения, а также скорость сокращения и расслабления фазных скелетных мышц как холоднокровных, так и теплокровных увеличиваются с повышением температуры [37, 214, 280, 302, 324]. Однако, обычно при этом оговаривается ситуация с так называемыми «медленными» мышцами, которые «ведут» себя особым образом [8, 37]. И тут внимание должно переключиться исключительно на теплокровных, так как у холоднокровных те скелетные мышцы, которые не относятся к тоническим [155], не обладают настолько выраженной гетерогенностью, чтобы их можно было с уверенностью разделять на типы. Действительно, те главные критерии, которые позволяют отделить «быстрые» от «медленных» мышц у теплокровных - активность сукцинатдегидрогеназы и миозиновой АТФ-азы у большинства фазных скелетных мышц пойкилотермов схожи между собой, но отличаются от параметров как «быстрых», так и «медленных» мышц гомойотермов [1, 302].

Итак, что касается теплокровных, имеются сведения о температурной зависимости силы и скорости сокращения их «быстрых» скелетных мышц, при этом данных о том же у «медленных» мышц очень мало [8]. Существует несколько работ о температурной зависимости сократительного аппарата «медленных» скелетных мышц с существенными отличиями в данных по мышцам одних и тех же животных [28, 29, 34, 203, 256]. Так, по одним источникам температурная зависимость «медленных» волокон мышц крысы значительно более выражена, чем «быстрых» [30, 37, 73, 136, 150, 157, 197, 329, 358], а по другим температурная чувствительность миозина «медленных» мышечных волокон крысы не отличается от «быстрых» [8, 330]. Поэтому однозначных

данных о температурной чувствительности сократимости «медленных» мышечных волокон нет.

В экспериментах на демембранных мышечных волокнах, для которых, соответственно, не актуальны температурные эффекты электромеханического сопряжения, играет роль лишь модуляция собственно механической функции, выяснено, что зависимость силы сокращения «медленных» и «быстрых» волокон от температуры сходна [8]. При увеличении температуры с 10 °С до 35 °С сила сокращения «медленных» волокон выросла в три раза, а «быстрых» - в три с половиной. Иначе обстоит дело со скоростью сокращения. Так, скорость сокращения «быстрых» волокон при увеличении температуры с 10 °С до 35 °С росла, а у «медленных» волокон этот параметр менялся незначительно [8].

Мионевральные препараты исторически являются самыми используемыми для разносторонних исследований. И, конечно, большинство модуляторов синаптической передачи были первоначально протестированы на нервно-мышечных препаратах позвоночных [39, 138, 184].

Известно, что снижение концентрации Ca^{2+} , обеспечивающего экзоцитоз квантов медиатора из нервной терминали [138], уменьшает силу сокращения скелетной мышцы со временем - в отличие от быстрого эффекта на кардиомиоциты [290]. И данное действие температурозависимо, что было показано при охлаждении до 15 °С препарата «быстрой» мышцы мыши (*m. EDL*) [363].

Также известно, что наиболее эффективным из нативных модуляторов синаптической передачи является котрансмиттер ацетилхолина - АТФ [60, 155]. Выделяясь вместе с основным медиатором, АТФ ингибирует дальнейший экзоцитоз из терминали мотонейрона по принципу отрицательной обратной связи через пресинаптические P₂-рецепторы. Метаболиты АТФ, в первую очередь аденозин (посредством аденозиновых рецепторов), также снижают квантовый состав [170].

P2-рецепторы, как ни одни другие трансмембранные рецепторы, являются термозависимыми [68, 204]. В 2002 году было описано температурозависимое действие АТФ на сократимость гладкой мускулатуры [331], а в 2005 году - скелетной [342]. Оказалось, что АТФ угнетала токи концевой пластинки, а также сокращения портняжной мышцы лягушки, вызванные стимуляцией электрическим полем при 17 °С почти в два раза эффективней, чем при 27 °С.

Вопрос об эффективности агонистов и антагонистов P2-рецепторов на нервно-мышечную передачу при различных температурах не до конца изучен, в частности, требует более глубокого изучения.

1.3.2 Влияние гипогравитации на синаптическую модуляцию

Гравитация сыграла существенную роль в эволюции функциональных систем наземных животных и человека, в частности, нервно-мышечная система [76, 102, 198, 304]. Хорошо известен ряд кардинальных изменений в ней, касающейся всех возможных ее характеристик [24, 124, 177, 215, 310].

Химический мионевральный синапс, посредством которого осуществляется передача возбуждения с окончания мотонейрона на постсинаптическую область мышечного волокна позвоночных, достаточно хорошо изучен. Различают неквантовую, спонтанную и вызванную квантовые секрции ацетилхолина в синаптическую щель [138, 184]. Причем имеется масса свидетельств, что каждый из перечисленных видов секрции АХ оказывает влияние на фенотипические свойства скелетных мышц [156, 206, 257, 355].

Ну, и, конечно, неоспоримо показано, что при микрогравитации (реальной и моделируемой) изменяются параметры мионевральной передачи [74, 75, 83, 101, 261].

Выявлен ущерб синаптическому представительству в синапсах различного типа скелетных мышц [310]. Дегенерирующие нервные терминалы содержали меньше нормальных синаптических везикул и были заполнены мембранными и филаментными фрагментами. Шванновские клетки окутывали дегенерирующие

нервные терминалы, при этом перисинаптическая область была зачастую лишена этих элементов. У крыс после двухнедельного космического полета было выявлено значительное снижение количества, либо полное отсутствие синаптических везикул в терминалах нервно-мышечных синапсов, а также наличие дегенеративных изменений и процессов спраунтинга [94].

Несомненно, при микрогравитации нарушаются механизмы регуляции и существования ацетилхолина в синаптической щели. Как известно, срок пребывания выделенного в процессе экзоцитоза ацетилхолина зависит от расщепляющего его фермента - ацетилхолинэстеразы. Так, ее активность возросла в медленной мышце крысы в 2½, в то время как в быстрой, изменения активности ацетилхолинэстеразы отсутствовали [158]. Эти данные указывают на возможность изменений в процессах, обеспечивающих синтез и деградацию ацетилхолинэстеразы, что может повлечь преобразования в работе синаптического аппарата при передаче возбуждения с нерва на мышечное волокно.

С другой стороны, показано, что моделируемая микрогравитация приводит к уменьшению активности фермента ацетилхолинэстеразы в нервно-мышечных соединениях крыс после трех недель эксперимента, что может быть обусловлено снижением функциональной активности мотонейронов [327].

Как известно, непосредственно влияет на процесс передачи возбуждения на сократительный аппарат мембранный потенциал покоя (МПП) [138]. Стационарный уровень МПП так же, как и мышечная масса, находится под нейротрофическим контролем со стороны двигательных нейронов [96, 217]. При моделировании воздействия невесомости методом антиортостатического вывешивания было выявлено снижение МПП в *m. soleus* крысы [97, 260].

Было установлено, что при кратковременном пребывании в условиях антиортостатического вывешивания снижение МПП обусловлено увеличением проводимости сарколеммы для Na^+ за счет увеличения экспрессии Na^+ - каналов. Через одну неделю опорной разгрузки плотность Na^+ - каналов на постсинаптической мышечной мембране увеличилась в два раза, а через три

недели - в три раза, достигнув, таким образом, более половины значения плотности каналов на мембране быстрой мышцы. Не имея достаточной компенсации посредством усиления работы Na^+ , K^+ -насоса, увеличение плотности натриевых каналов постсинаптической мышечной мембраны может сильно изменять сократительные свойства. В частности, увеличивать утомляемость мышечных волокон антигравитационных мышц. Эта причина может быть одной из составляющих компонентов, вносящих вклад в снижение двигательной способности и нарушение процесса поддержания позы у космонавтов после пребывания в космосе, или во время длительной иммобилизации [100]. Дальнейшие исследования продемонстрировали, что основным механизмом уменьшения МПП является утрата электрогенного компонента в результате изменения в количественном соотношении противотоков основных потенциал-образующих ионов, осуществляемых при участии работы Na^+ , K^+ -АТФазы мышечной мембраны. В частности, было установлено подавление электрогенного вклада убаин-чувствительной 2-изоформы Na^+ , K^+ -АТФазы, что является основной причиной деполяризации мембраны мышечных волокон после трех суток вывешивания, и, к тому же, может являться фактором накопления ионов кальция в миоплазме мышечных волокон, например, за счет активации части дигидропиридиновых (DHPR) потенциал-чувствительных Ca^{2+} - каналов L-типа [97, 199].

1.4 Влияние патологий опорно-двигательного аппарата на синаптическую модуляцию

1.4.1 Нарушения синаптической модуляции при травматических расстройствах

Обзор исследований, рассматривающих изменения в двигательных единицах вследствие действия различных повреждающих факторов, позволяет утверждать, что преобразования в количестве и балансе возбуждающих и

тормозных сигналов после травмы спинного мозга реорганизуют управление мотонейронами. Похоже, что изменения в ретроградной сигнализации наряду с событиями в проксимальном участке аксона информируют тело мотонейрона о дистально расположенном повреждении, чтобы активировать сложный клеточный ответ, который в конечном итоге направлен либо на регенерацию, либо, в некоторых случаях, на гибель клеток [263, 291].

Повреждения спинного мозга человека, происходящие обычно на шейном и грудном уровнях, приводят к прерыванию нисходящих путей к нижним двигательным нейронам [15] и к значительным функциональным и морфологическим нарушениям двигательных единиц, расположенных каудальнее места повреждения [47, 132]. В ряде исследований была показана посттравматическая выживаемость мотонейронов [40, 182], но структурные изменения их синаптических контактов с мышцами, вызванные глубокой потерей активности, до сих пор остаются малоизученными. Восстановление после травм спинного мозга требует не только восстановления связи между головным и спинным мозгом, но и стабилизации связей между двигательными нейронами и мышцами [132].

В ряде исследований было показано, что периферическая нервная система (ПНС) не остается интактной после травматического повреждения спинного мозга. С 60-х годов прошлого столетия методом клинической электромиографии (ЭМГ) зарегистрировано наличие спонтанных потенциалов (фибрилляции и положительные острые волны) после травмы спинного мозга у человека [117], что в дальнейшем более подробно было описано на животных моделях [251].

При моделировании экспериментальной травмы спинного мозга также наблюдались изменения морфофункционального состояния скелетных мышц, подобные постденервационным, к примеру, снижение мембранных потенциалов в покое, снижение мембранной резистентности, распространение ацетилхолиновых рецепторов (AChR) от области концевой пластинки, холинергическая гиперчувствительность и гиперкалиемия при введении сукцинилхолина [47].

Существует несколько гипотез о том, чем можно объяснить такие результаты, одной из возможных причин может быть нарушение функции нервно-мышечного синапса. Существуют данные об изменении аксонального транспорта нескольких видов веществ, участвующих в синаптической передаче у крыс с травмой спинного мозга на грудном уровне [343], снижение транспорта ацетилхолина и холин-ацетилтрансферазы, при увеличении переноса ацетилхолинэстеразы. А дальнейшие дополнительные исследования позволили утверждать, что существует прямая связь между ожидаемым снижением синаптической передачи при травме спинного мозга и уменьшением плотности AChR за счет уменьшения их рециркуляции и синтеза [165, 281].

К тому же, зарегистрированное уменьшение амплитуды сокращений мышц указывает на потерю аксонов, которая может происходить из-за гибели тел нервных клеток в спинном мозге и в ганглиях задних корешков или из-за того, что эти нейроны, лишённые синаптических входов и импульсной активности после травмы спинного мозга, не могут поддерживать жизнеспособный аксон [226].

В дополнение к опосредованию (модуляторному действию) нейротрансмиссии, АТФ была идентифицирована как мощный передатчик астроцитарной кальциевой сигнализации [32, 81]. Астроциты высвобождают АТФ регулируемым путем, что приводит к распространению межклеточных волн проникновения кальция в цитозоль [172]. Астроцитарная кальциевая сигнализация, по-видимому, является общим механизмом, с помощью которого астроциты реагируют на различные стимулы, включая синаптическую активность, воздействие медиатора и травматическое повреждение [133]. В свою очередь, сигналы астроцитарного кальция передаются соседним нейронам, тем самым модулируя их синаптическую силу [160]. Этот АТФ-зависимый процесс распространения кальциевых волн происходит не только в головном мозге, где он лучше всего изучен *in situ*, но также и в паренхиме спинного мозга [127, 231], где он может играть роль в распространении местного повреждения.

Известно, что вследствие повреждения тканей высвобождается большое количество молекул АТФ, непосредственно участвующих в механизмах развития

острого и хронического болевого синдрома, а также местного и генерализованного воспалительного процесса [193, 288]. При повреждении спинного мозга выброс АТФ увеличивается в перитравматических областях в течение более чем 6 часов [249].

Среди АТФ-чувствительных пуринергических рецепторов рецептор P2X7 (P2X7R) необычен тем, что может образовывать большие макромолекулярные поры при повторяющемся или длительном воздействии высоких концентраций АТФ [239]. Роль этого рецептора особенно важна при спинальной травме, поскольку он обильно экспрессируется нейронами спинного мозга [249], которые, в свою очередь, реагируют на АТФ чрезмерным возбуждением, за которым следует необратимое увеличение Ca^{2+} и, в конечном счете, гибель клеток.

Также известны провоспалительные эффекты активации P2X7R: высвобождение интерлейкинов (включая IL-113) [25], супероксида и активация каспазы [183], циклооксигеназу-2 и ФНО-а [173, 268].

1.4.2 Нарушения синаптической модуляции при боковом амиотрофическом склерозе

Боковой амиотрофический склероз (БАС) – прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся поражением мотонейронов спинного и головного мозга. Клиническими проявлениями заболевания являются прогрессирующая мышечная слабость, параличи и атрофия скелетной мускулатуры, что в конечном итоге приводит к летальному исходу. В настоящее время поражение нервно-мышечного синапса и скелетной мышцы признается одним из наиболее ранних и важнейших событий в патогенезе БАС [12, 45, 110]. Данные, полученные на животных моделях, свидетельствуют о том, что дисфункция нервно-мышечных синапсов в моделях БАС наблюдается уже на досимптомной стадии патологии [12, 111], при этом клеточно-молекулярные механизмы данного феномена недостаточно изучены.

АТФ является значимым физиологическим регулятором нервно-мышечной синаптической передачи и сократительной активности скелетных мышц, который выделяется из двигательных нервных окончаний совместно с ацетилхолином и имеет собственные пре- и постсинаптические эффекты. Имеются некоторые сведения о нарушении пуринергической регуляции при БАС. Выявлена повышенная экспрессия P2X7-рецепторов в микроглии/макрофагах спинного мозга пациентов с БАС [91]. У животных с моделью БАС было установлено повышение уровня P2X7-рецепторов в спинном мозге и седалищном нерве [271]. Есть данные, свидетельствующие об усилении провоспалительной P2-рецептор-опосредованной активации микроглии в SOD1-модели БАС [350].

1.4.3 Синаптическая модуляция при расстройствах аутистического спектра

По оценкам мониторинга аутизма и нарушений развития в США, на 2020 год один из 36 детей в возрасте 8 лет (примерно 4% мальчиков и 1% девочек) страдал расстройством аутистического спектра (РАС) [267]. Расстройство аутистического спектра (РАС) — это нарушение развития нервной системы, характеризующееся нарушениями социального взаимодействия, преобладанием стереотипных моделей поведения и сужением круга интересов [366]. Несмотря на растущую распространенность, РАС по-прежнему остается расстройством с плохо изученной патофизиологией и медленным поиском лекарств. До сих пор этиология РАС неизвестна, при этом некоторые авторы возникновения и прогрессирование РАС связывают с влиянием генетической предрасположенности и факторов окружающей среды [121]. Среди основных патофизиологических механизмов развития РАС можно выделить окислительный стресс, нейровоспаление, различные иммунные нарушения и митохондриальную дисфункцию [33, 144, 292, 345].

Значительный прогресс в представлении сложной патофизиологии РАС связывают с решающей ролью животных моделей [17]. Полезная модель, подтвержденная исчерпывающими исследованиями на животных путем

воздействия вальпроевой кислоты (ВПК) на грызунов, показывает поразительное сходство с поведением, анатомией, клеточными и молекулярными изменениями, наблюдаемыми у пациентов с аутизмом. Многочисленные анатомические исследования также доказали, что модель ВПК может хорошо воспроизводить дисплазию центральной нервной системы при РАС, предоставляя ценный инструмент для изучения основного механизма РАС [125].

Существуют исследования, доказывающие вовлеченность пуриnergического сигнального пути в развитие нервной системы, за счет влияния на такие механизмы как клеточная пролиферация, дифференцировка и формирование нейронно-глиальных клеточных взаимодействий, миграцию предшественников нейронов и рост нейритов [55], но связь между аномальным метаболизмом пуринов и этиологией РАС в настоящее время до конца неясна. Но согласно теории онтогенеза, дефекты ранних процессов развития способствуют возникновению различных психических заболеваний на более поздних этапах жизни [169, 282, 336]. Появились дополнительные доказательства того, что пурины, метаболизирующие пурины, эктоферменты и пуринорецепторы также участвуют в патофизиологических процессах развития нейронов [254] и психических расстройствах [72].

В зависимости от лиганда пуриnergические сигнальные рецепторы делятся на два основных класса: P1 (рецепторы аденозина) и P2 (рецепторы АТФ/АДФ и УТР/УДФ) [56]. Последний включает P2X и P2Y, которые опосредуют гиперактивацию глиальных клеток и начало воспалительных реакций в центральной нервной системе (ЦНС) [20, 163, 168]. Кроме того, было показано снижение экспрессии P2X7 рецепторов, играющих ключевую роль в патофизиологии нарушений ЦНС и опосредующих самые сильные признаки нейровоспаления, у детей с РАС [27, 352].

Нарушение функционирования пуриnergической сигнальной системы связывают с инициацией РАС, что в свою очередь позволяет рассматривать данную сигнальную систему в качестве потенциальной терапевтической мишени. Существуют данные о том, что лечение сураминол (20 мг/кг, внутривенно)

крыс с моделью РАС восстанавливает их коммуникативные способности и уменьшает тревожность, измеряемую при помощи приподнятого крестообразного лабиринта [116].

Лечение сураминол не влияет на индуцированную вальпроевой кислотой активацию P2X₄ и P2Y₂ рецепторов в гиппокампе и экспрессию рецептора P2X₄ в медиальной префронтальной коре, но нормализует повышенный уровень интерлейкина 6 (IL-6) [216].

Хотя РАС считается психическим расстройством, с ним связаны и другие расстройства функций внутренних органов и систем, так как коморбидность уже давно признана у детей с нарушениями развития такими как аутистическое расстройство, синдром дефицита внимания и гиперактивности [145, 364]. К таким особенностям относятся, в частности, сенсорные аномалии [349], сенсорно-моторные дефициты [259], проблемы с мелкой и грубой моторикой [270], нарушения в движении/моторных навыках [166], проблемы с равновесием [356], мышечная слабость [225] и гипотония [220].

Двигательные аномалии были признаны неотъемлемой частью расстройств аутистического спектра [145]. Причем наблюдения показывают, что аномалии движений при аутизме разнообразны и могут быть причиной нарушений в различных частях центральной нервной системы, в частности, лобную долю, мозжечок и базальные ганглии. Вовлечение нескольких структур вполне ожидаемо из-за сложного распределения двигательной системы на уровне спинного мозга, ствола мозга, мозжечка, подкорковых и корковых отделов нервной системы [194].

1.4.4 Нарушения синаптической модуляции при мышечных дистрофиях

Мышечные дистрофии — это большая группа наследственных заболеваний, которые характеризуются прогрессирующей слабостью и дегенерацией скелетных мышц, то есть потерей мышечной массы [107]. К наиболее распространенным миодистрофиям относятся мышечная дистрофия Дюшенна и дистрофия Беккера.

Также в эту группу входят миодистрофия Ландузи-Дежерина (плече-лопаточно-лицевая миопатия), дистрофия Эмери-Дрейфуса, мышечной дистрофия пояса конечностей типа 2В, миопатия Миоши и другие.

Практически для всех этих форм мышечной дистрофии так и не найдено эффективного лечения [107, 120, 242, 299, 314]. Характерно, что при дистрофии скелетной мышечной ткани отмечены патологические изменения и в предыдущем звене – синаптических образованиях [273].

Нервно-мышечный синапс позвоночных является наиболее хорошо изученным холинергическим синапсом. Ацетилхолин (АХ) является основным медиатором в нейромоторной единице соматической нервной системы. Тем не менее, эмбриональные клетки скелетных мышц позвоночных изначально экспрессируют рецепторы к пуринам, глутамату, ГАМК и глицину, равно как и к АХ. В процессе развития экспрессия рецепторов к АХ начинает превалировать [42]. Но при этом функционально значимой остается и пуриновая синаптическая модуляция [48, 63].

Ранее было доказано, что синаптическая АТФ-сигнализация играет существеннейшую роль в патологических процессах [223]. Так, было показано опосредованное P2-рецепторами изменение функционирования мышц при стрессе [135, 341], гипотермии [115, 188, 189, 340, 353], аллергии [247, 272], гипогравитационном двигательном синдроме [191], наконец, денервации [338].

Было обнаружено увеличение числа P2X7-рецепторов в дистрофических мышцах [119, 152, 248]. Это приводит к увеличению концентрации цитоплазматического Ca^{2+} и фосфорилированию сигнальных путей центральной MAP-киназы ERK и изменению чувствительности к NAD. Считается, что применение специфических антагонистов P2X7-рецепторов должно помочь в лечении дистрофий Дюшенна и Беккера.

Таким образом, изменение активности P2X-рецепторов может быть причиной нарушения цитозольного гомеостаза Ca^{2+} , обнаруженному при дистрофиях Дюшенна и Беккера [212].

Аномальная экспрессия рецепторов P2X характерна не только для мышечных заболеваний. Изменения в экспрессии отдельных P2X также были обнаружены при воспалительной и хронической боли, эпилепсии, депрессии и некоторых видах рака [55], что привело к экспериментальным терапевтическим подходам с использованием агонистов P2X [55, 180].

P2X7-, P2X2- и P2X5-рецепторы, в норме отсутствующие в здоровых клетках скелетных мышц, наблюдались в дистрофических мышцах модели mdx [275]. Это может свидетельствовать об ускоренной дифференцировке сателлитных клеток в дистрофических мышцах мышей.

Подводя итог, можно сказать, что нуклеотидные рецепторы P2X и P2Y в настоящее время находятся в центре внимания из-за их широкой экспрессии и значительной роли, которую они играют в различных физиологических процессах в разных клетках. Кроме того, многочисленные сообщения показали, что некоторые из этих пуриnergических рецепторов играют роль в патологии мышечных дистрофий.

Полное понимание причастности АТФ как сигнальной молекулы требует дальнейших исследований. Нельзя исключить, что её рецепторы являются потенциальной терапевтической мишенью для стимуляции регенерации скелетных мышц после травм или при лечении мышечной дистрофии.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на базе кафедры фармакологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России и НИЛ «Механобиология» ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», 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 4).

Таблица 4 – Описание экспериментальных серий в исследовании

№	Экспериментальные серии	Животное, число
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

Продолжение таблицы 4

№	Экспериментальные серии	Животное, число
11.	Модель белковой сенсибилизации	мыши, n=12
11.	Модель расстройств аутистического спектра	крысы, n=24
12.	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 проводились согласно протоколу ухода за животными и требованиям Директивы Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС.

2.1 Эксперименты на изолированных нервно-мышечных препаратах мышц крысы

Исследования проводились на мышечных препаратах белых лабораторных крыс-самцов массой 140-180 г, которые содержались в группах по 3-5 особей с водой и пищей *ad libitum*. Всего в этих исследованиях было использовано 108 крыс. Животных погружали в наркоз, вводя внутривенно этилэфур в дозе 40 мг/кг, обескровливали и выделяли на задних конечностях *m. soleus* (камбаловидную мышцу) и *m. EDL* (длинный разгибатель пальцев) и *m. diaphragma* (диафрагмальную мышцу). Выделенные мышцы фиксировали вертикально, присоединяя один конец к датчику механической активности, и погружали в ванночки объемом 10 мл, заполненные раствором Кребса следующего состава (в мМ): NaCl 118,0, KCl 4,75, CaCl₂ 2,5, NaHCO₃ 24,8, KH₂PO₄ 1,18, MgSO₄*7H₂O 1,18, глюкоза 11, pH=7,4, t=37±0,5 °C. Термостат поддерживал заданное значение температуры. Мышцы были натянуты начальной нагрузкой в 1 г, далее оставались в покое на 30 минут для привыкания к среде.

2.1.1 Одиночные и тетанические сокращения, вызванные электрической стимуляцией

Электростимуляцию проводили путем стимуляции культи нерва, которая помещалась в сакшн-электрод оригинальной конструкции. Для раздражения использовали стимулятор Digitimer MultiStim D330 (Великобритания). Сокращения мышц вызывались стимуляцией прямоугольными импульсами частотой 0,1 Гц, длиной 0,5 мс, амплитудой 10 В в течение 2 минут. Сила сокращений регистрировалась изометрическим датчиком механической активности Linton FSG-01 (Великобритания), аналоговый сигнал оцифровывался и обрабатывался системой сбора данных Biopack MP100WSW (США). Средняя величина всех сокращений, полученных в течение 2 мин. (12 ответов), обрабатывалась, как один результат. Сократительные ответы рассчитывались в % относительно исходных результатов, полученных в начале эксперимента.

Через 30 минут после фиксирования ткани проводили контрольную стимуляцию мышц дважды с интервалом в 5 минут, и, удостоверившись в стабильности сократительных ответов, начинали экспериментальные процедуры.

В ванночку с раствором Кребса добавляли один из агонистов (АТФ, аденозин) и оценивали сократительные ответы мышцы через 10 минут. Далее ткань инкубировали с одним из антагонистов: сурамином или 8-пара-сульфофенилтеофиллином (8-SPT) в течение 20 минут с последующим добавлением соответствующего агониста (АТФ или аденозина) и вновь регистрировали сократительные ответы.

Для регистрации «гладких» тетанических сокращений увеличивали частоту электрических импульсов до 15 Гц для *m. soleus* и до 20 Гц для *m. EDL* («частоты слияния» данных мышц). При этом одиночные мышечные сокращения соответствующих мышц никак не выделялись, то есть наблюдался гладкий тетанус. Средняя величина силы сокращения определялась как средняя по амплитуде точка фазы «плато», сила сокращения определялась в миллиграммах.

Все полученные данные рассчитывали в % относительно исходных результатов, полученных в начале эксперимента при 37 °С.

В контрольных экспериментах ткань инкубировалась с одним из антагонистов в течение 20 минут и проводилась регистрация ответов мышцы на стимуляцию электрическим полем. В каждой серии экспериментов оценивали эффекты выше указанных агонистов и антагонистов на фоне Н-холиноблокатора d-тубокурарина в концентрации 10 мкМ.

2.1.2 Сокращения, вызванные аппликацией карбахолина

Сократительные ответы вызывали добавлением в ванночку карбахолина в субмаксимальной концентрации. Предварительно были проведены эксперименты по выявлению концентрационной зависимости карбахолина на исследуемую ткань. Вычислена субмаксимальная концентрация карбахолина, которая обеспечивает 70% от максимально возможной силы сокращения. На основании проведения экспериментов полученные сократительные характеристики (сила сокращения, время сокращения и время полурасслабления), которые, являясь физиологическими характеристиками скелетной мышцы, позволяют осуществлять повторяемые при заданных условиях эксперименты.

Средняя величина амплитуды сокращения обрабатывалась как одно измерение. Временные характеристики сокращения определялись в секундах; сила сокращения в миллиграммах.

2.1.3 Оценка температурной зависимости сокращения скелетных мышц крысы

Влияние температуры на сократительную активность *m. soleus* и *m. EDL* оценивали в экспериментах с агонистами и антагонистами пуринорецепторов, инициированные как электрическим полем, так и аппликацией карбахолином, проводились при температуре 37 °С. Далее температура последовательно

снижалась до 34, 30, 26, 22, 18 и 14 °С. При каждой температуре подавали один из агонистов (АТФ, аденозин) и оценивали сократительные ответы мышцы через 10 минут аппликации. Далее ткань инкубировали с одним из антагонистов: сурамином или 8-SPT (8-пара-сульфофенилтеофиллин) в течение 20 минут с последующим добавлением соответствующего агониста (АТФ или аденозина). Температура раствора регулировалась водяным насосом TE-8A (Techne, Великобритания), быстрое снижение температуры жидкости в водяном насосе производили добавлением льда.

2.1.4 Эксперименты в условиях гиперкальциевой среды

В части экспериментов с агонистами и антагонистами сокращения, инициированные как электрической стимуляцией, так и добавлением карбахолина, регистрировали сначала в растворе Кребса, а потом в растворе с повышенным содержанием ионов кальция - 7,2 мМ.

2.1.5 Сокращения, вызванные высокочастотной электрической стимуляцией

Для регистрации тетанических сокращений увеличивали частоту электрических импульсов до 15 Гц для *m. soleus* и до 20 Гц для *m. EDL*. Средняя величина силы сокращения обрабатывалась как одно измерение, сила сокращения определялись в миллиграммах. Все полученные данные рассчитывали в % относительно исходных результатов, полученных в начале эксперимента при 37 °С.

2.1.6 Регистрация потенциалов концевой пластинки

Эксперименты производились на изолированном мионевральном препарате *m. diaphragma – n. phrenic* белых мышей (WT, 20 - 25 г весом). Изолированный препарат помещался в 5-и миллилитровую ванночку с перфузией раствором

Рингера для теплокровных (NaCl -150 мМ, KCl – 5 мМ, CaCl₂ – 2 мМ, MgCl₂ – 1 мМ, HEPES -5 мМ, глюкоза- 11 мМ, рН 7,3-7,4). Температура выдерживалась 20,0±0,3°С, её стабилизировали встроенными в дно ванночки элементами Пельтье.

Раздражали культу диафрагмального нерва импульсами прямоугольной формы сверхпороговой амплитуды длительностью 0,2 мс при частоте 0,5 Гц посредством «всасывающего» электрода. Отведение потенциала концевой пластинки (ПКП) осуществлялось заполненным физиологическим раствором внеклеточным микроэлектродом (диаметр кончика 2-3 мкм, сопротивление 1-3 МОм). Зарегистрированные ответы оцифровывали с интервалом дискретизации 3 мкс и анализировали с помощью оригинальной компьютерной программы. Регистрировали спонтанно возникающие миниатюрные потенциалы концевой пластинки (мПКП) в отсутствие стимуляции двигательного нерва и оценивали их среднюю частоту в контроле и после аппликации вещества. Количество освободившихся квантов (средний квантовый состав) до и после аппликации вещества определяли методом деления средней амплитуды вызванного ПКП на среднюю амплитуду мПКП (AEPP/AmEPP).

2.1.7 Изучение активности эктонуклеотидаз скелетных мышц крысы

Подготовительные процедуры. Исследования проводились на 15-ти лабораторных крысах-самцах и самках белой масти, массой 130-190 г, которые содержались в группах по 5 особей с водой и кормом *ad libitum*.

Животных перед началом манипуляций наркотизировали при помощи ингаляционной анестезии раствором эфира. После наступления наркотического сна производилась декапитация при помощи гильотины, обескровливание и последовательное выделение мышц, используемых при проведении исследований: *m. diaphragma*, *m. soleus*, *m. EDL*.

Активность фермента эктонуклеотидазы 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).

Перед получением материала готовили буферную жидкость следующего состава (мМ) — HEPES 10, NaCl 135, KCl 5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 2, глюкоза 10 (pH = 7,4). Материал укладывали в подготовленную ёмкость, далее иссекали все остальные ткани, оставляя фрагмент мышечной ткани с культей нерва весом 2 - 4 мг. Полученные кусочки ткани помещали в ячеистую пластину, заполненную 300 мкл буфера, нагретого до 37 °С либо 22 °С. Встряхивали в течение 10 минут для удаления поврежденных клеток и следов нуклеотидов. Далее буфер удаляли, оставляя фрагменты ткани в лунках. После этого в 1-ую и 3-ю вертикали добавляли по 300 мкл буфера, содержащего АТФ (300 мкМ). Как только 1-ая и 3-я вертикали заполнялись, начинали добавлять буферную жидкость во 2 вертикаль. По заполнении всех 9 лунок встряхивали пластину в течение 10 минут при 37 °С либо 22 °С. Далее для остановки реакции добавляли по 300 мкл 3 % хлорной кислоты. По завершении реакции инкубационную жидкость центрифугировали при 3000 оборотах в минуту в течение 5 минут, после этого надосадочную жидкость замораживали для последующего количественного определения АТФ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. После того, как инкубат помещали в центрифугу, фрагменты ткани взвешивались.

Эксперименты проводились на хроматографе производства Shimadzu (Япония), состоящий из спектрофотометрического детектора SPD-20А, дегазатора DGU-20А3, насоса LC-20AD и термостата СТО-20А, с использованием программного обеспечения LC Solution. Для разделения нуклеотидов использовали колонку Supelco с длиной 15 см и внутренним диаметром 4,6 мм. Мобильная фаза состояла из КН₂РО₄ 0,2 М и метанола 3% (pH = 6,0), скорость тока 1,5 мл/мин, длина волны 210 нм и объем образца 20 мкл.

При данных условиях нуклеотиды появлялись в следующем порядке: АТФ, АДФ и АМФ. Полное разделение нуклеотидов происходило в течение 5 минут.

Определяли концентрацию АТФ путем сравнения уровня напряжения (мВ) самой высокой точки с соответствующим уровнем напряжения (мВ) у контрольного образца. Для нахождения активности эктонуклеотидаз использовали формулу:

$$A = \frac{(v_{\text{АТФконтроль}} - v_{\text{АТФопыт}})}{t * N} \quad (1)$$

где А – активность фермента в МЕ, $v_{\text{АТФконтроль}}$ – количество АТФ в контроле, $v_{\text{АТФопыт}}$ – количество АТФ в опыте, t – время эксперимента в мин., N – вес ткани в мг.

Расчет температурного коэффициента Q_{10}

Из уравнения Вант-Гоффа температурный коэффициент универсально для любого диапазона температур вычисляется по формуле:

$$Q_{10} = \left(\frac{R_2}{R_1} \right)^{\left(\frac{10}{T_2 - T_1} \right)} \quad (2)$$

где R_n – сила сокращения при температуре T_n .

Мы в своих экспериментах для расчета Q_{10} использовали отношение активности эктонуклеотидаз при температурах 22 и 37 °С.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы SPSS Statistics. Проверку соответствия полученных данных 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 $p < 0,05$.

2.1.8 Иммуногистохимический метод оценки экспрессии P2-рецепторов

Подготовительные процедуры. Исследования проводились на 15-ти белых лабораторных крысах-самцах и самках, массой 130-190 г, которые содержались в группах по 3 особи с водой и кормом *ad libitum*.

Животных перед началом экспериментальных процедур наркотизировали, вводя внутривенно раствор этаминала натрия в дозировке 40 мг/кг. После наступления наркотического сна производилась декапитация при помощи гильотины, обескровливание и последовательное выделение мышц, используемых при проведении исследований: *m. soleus*, *m. EDL*, *m. diaphragma*.

Подготовка препаратов. Препараты готовились по принципу whole-mount [367]. При подготовке препаратов *m. diaphragma* вырезались участки диафрагмальной мышцы вдоль диафрагмального нерва размерами 5x5мм. При подготовке препаратов *m. soleus*, *m. EDL* под визуальным контролем при помощи бинокля скальпелем вырезались тонкие участки исследуемых мышц размерами 3x6мм рядом с ходом нерва.

Иммуногистохимическое окрашивание. Приготовленные препараты окрашивались в 2 этапа. На первом этапе препараты промывались в PBS (фосфатно-щелочной буфер) в течение 30 мин, затем в течение 30 мин инкубировались в 0,5% растворе Triton-X100 на PBS (PBST, pH 7,4). Далее препараты инкубировались в течение 20 минут в блокирующей сыворотке (5% раствор ослиной сыворотки и 1% раствор бычьего сывороточного антигена на PBST, pH 7,4). Затем для визуализации экспрессии пуриновых рецепторов препараты инкубировались в PBST 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) 12 часов при 4°C.

На втором этапе на следующий день препараты промывались в PBS в течение 30 минут, затем инкубировались в PBST с вторичными антителами (1:800, Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit, A21206, Life Technologies) и альфа-бунгаротоксином, конъюгированным с тетраметилпроламином, для визуализации

H-холинорецепторов (1:50, TMR-ABT t1175, Life Technologies, USA) в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте. После инкубации препараты повторно промывались в PBS в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте. Окрашенные препараты затем заключались в среду Shandon Immu-Mount на предметном стекле

Конфокальная микроскопия. Использовался конфокальный микроскоп Leica TCS SP5 MP (Leica, Germany), оснащенный аргоновым, гелий-неоновым и твердотельным лазерами, а также акустооптическим настраиваемый под длины волн фильтром. Использовались длины волн возбуждения 488 и 561 нм. Длины волн эмиссии – 519 и 577 нм. Изображения фиксировались программой LAS AF (Leica Application Suite), с разрешением изображений 2048 на 2048 пикселей, частотой лазера 100 Гц. Для получения корректных значений все анализируемые микрофотографии были сняты при одинаковых настройках микроскопа (pinhole, gain, offset, мощность лазера). Анализ изображений производился в программе Imagej Fiji.

2.1.9 Анализ двигательной активности животных

Объект исследования. В ходе экспериментов были обследованы не линейные лабораторные крысы-самцы, массой 160–240 граммов. Животные содержались при свободном доступе к пище и воде, а также естественном чередовании суточной освещённости.

Экспериментальные группы:

- 1) контрольная группа;
- 2) группа с воспроизведением модели аутизма.

Тест «Открытое поле». Установка «открытое поле» представляет собой белую квадратную арену. Пол разделён на 25 прямоугольников одинаковой площади для удобства визуальной регистрации горизонтальной двигательной активности животных на периферии, в 2/3 арены и её центра.

Методика «открытое поле» (ОП) позволяет изучить врожденные особенности ориентировочного и исследовательского поведения и сопротивляемость к стрессу [7]. С помощью данного метода оценивают ориентировочно-исследовательскую реакцию (ОИР) по количеству пройденных квадратов в арене, по количеству стоек на задних лапах (вертикальная двигательная активность, ВДА) при искусственном освещении.

Животное, которое помещено на незнакомую открытую площадку демонстрирует ориентировочно-исследовательские реакции, например, характерное замирание, которое необходимо для оценки степени риска [303].

Ход эксперимента. Животное помещали всеми 4-я лапами в центральный квадрат арены и с помощью видеосистемы фиксировали его передвижения в установке в течение 3 минут. После прохождения тестирования каждого животного, арену обрабатывали водой для удаления запаха.

Регистрировали следующие показатели:

1) горизонтальную двигательную активность (ГДА). Основным критерием ГДА является участие в перемещении животного всех четырех лап. За единицу перемещения считали один пересеченный квадрат всеми лапами. Регистрируют ГДА на периферии, в 2/3, и в центре арены;

2) вертикальную двигательную активность (ВДА). Представлена двумя видами стоек: задние лапы животного остаются на полу арены, а передние упираются в стенку поля (пристеночная стойка), если лапы остаются на весу (свободная стойка). Раздельно считали число открытых и пристеночных стоек;

Метод видеоанализа движения на платформе Vicon

Для оценки и сравнения походки крыс в контрольной группе с группой крыс ВМА был использован метод видеоанализа движения. Трехмерные данные были получены с использованием шести камер Vicon MX (Vicon Motion Systems, Оксфорд, Великобритания), размещённых на специальных креплениях полукругом. Для калибровки и синхронизации камер был использован калибровочный маркер Active Wand (Vicon Motion Systems, Оксфорд, Великобритания). Для получения стандартного видеоизображения была

использована видеокамера Sony. 10 пассивных светоотражающих маркеров были размещены на мышцах спины, крестцовой кости, коленных суставах, голеностопных суставах, как это было показано на Рисунке 4.

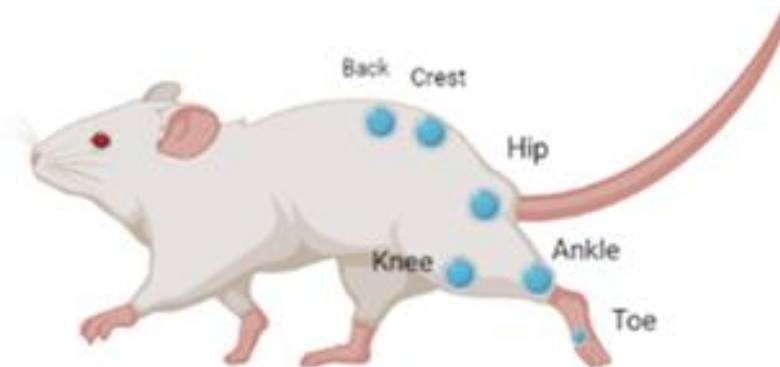


Рисунок 4 – Схема расположения маркеров для видеоанализа движения

Во время видеозахвата крысы начинали свободно двигаться в открытом поле при искусственном освещении. Использовали сплайн-интерполяцию для повторной выборки данных Vicon до 30 Гц перед анализом. Определяли фазы цикла походки с временными метками событий походки - отрыва стопы и возобновления контакта с поверхностью. Кинематический анализ был выполнен для полного цикла походки каждой испытуемой крысы.

Для обработки полученных данных использовали программное обеспечение Vicon Nexus 2,9 для ручной доработки 3D модели движения и удаления артефактов с записи.

Полученные Vicon Nexus 2,9 данные с помощью модуля ASCII конвертировались в текстовый формат, после чего обрабатывались с помощью программного обеспечения MATLAB, методика обсчета подробно описана в статье [227]. Для каждой группы получали кривые из усреднения 30 шагов по углам в фазах одного шага. Были получены данные в виде ангулограмм - кинематический профиль коленного сустава крыс, нормированных по фазе шага. С помощью ангулограмм высчитывались углы сгибания коленных суставов как разность показателя угла в начале фазы переноса, к показателю угла в начале фазы толчка. Были построены траектории перемещений стопы с целью

определения объема движения конечности и максимальной точки подъема стопы, а также длины шага.

2.1.10 Моделирование белковой сенсибилизации на мышах

Животных содержали в специальных боксах на обычном пищевом режиме, со свободным доступом к воде. Мыши сенсибилизированные овалбумином с гелем гидроксиалюминия внутривнутрибрюшинно, дважды. Вторая инъекция – через 14 дней после первой. В эксперимент животные забирались на 7-й день после второй сенсибилизирующей инъекции. В качестве контроля использовались несенсибилизированные мыши.

2.1.11 Моделирование расстройств аутистического спектра на крысах

Вальпроевая кислота в высоких дозах блокирует ферменты, участвующие в деацетилировании гистоновых белков, что влияет на экспрессию определенных генов и, соответственно, модифицирует их функционирование. При введении беременным самкам у потомства лабораторных животных развивается фетальный вальпроатный синдром, который по своим проявлениям сходен с РАС [167]. Для выработки у потомства фетального вальпроатного синдрома самкам крыс на 12–13 день беременности однократно подкожно в область холки вводят натриевую соль вальпроевой кислоты в дозе 500 мг/кг. Не было зафиксировано увеличение числа эмбриональных смертей, увеличение постимплантационных потерь, уменьшение размера помета и массы тела плода. Рожденных от такого воздействия крыс в возрасте 6 месяцев использовали для экспериментов. В качестве контроля использовали крыс этого же возраста, рожденных от крыс, не подвергавшихся лекарственному воздействию.

2.1.12 Моделирование денервации на крысах

Исследования проводились на белых лабораторных крысах-самцах породы Wistar массой 130-190 г, которые содержались в группах по 5 особей с водой и кормом *ad libitum*.

Животных перед началом операции наркотизировали, вводя внутривенно раствор этилового эфира натрия в дозе 40 мг/кг. После очистки операционного поля на задней левой конечности от шерсти, фиксировали оперируемую конечность для удобства дальнейших манипуляций. Выполняли косой разрез кожи боковой поверхности бедра, после чего последовательно вскрывали подкожно жировую клетчатку, поверхностную фасцию и широкую фасцию бедра. Тупым образом производили отодвигание в сторону волокон длинной головки двуглавой мышцы бедра для обнажения сосудисто-нервного пучка (седалищный нерв, артерия и вена, сопровождающие седалищный нерв). После этого производили выделение седалищного нерва, отделение его от сопровождающих кровеносных сосудов с последующей резекцией нерва (удаляли участок нерва, размером 5 мм). Конечным этапом операции являлось ушивание раны лавсаном 3.0, обработка операционного поля раствором хлоргексидина и раствором бриллиантового зеленого.

После проведения операции животных содержали 7 дней в одиночных клетках с водой и кормом *ad libitum*. После 7-дневного восстановления животных предварительно наркотизировали, вводя внутривенно раствор этилового эфира натрия в дозе 40 мг/кг, обескровливали и выделяли *m. soleus* с культей седалищного нерва.

2.1.13 Моделирование контузионной травмы и гиподинамии на крысах

В качестве объекта исследования использовали структуры опорно-двигательного аппарата тазовых конечностей, имеющие принципиальное значение в организации двигательной активности (морфо-функционально

различные: камбаловидная мышца, длинный разгибатель большого пальца ноги и диафрагма – соответствующие нервно-мышечные синапсы - соответствующие спинальные двигательные центры).

Не менее чем за неделю до начала и во время экспериментов каждую крысу размещали в отдельной специализированной клетке при комнатной температуре 23 °С, с циклом свет/темнота: 12 ч/12 ч, с доступом к воде и пище *ad libitum*. Все экспериментальные воздействия осуществляли в одинаковое время суток.

В зависимости от решаемых исследовательских задач животные были разделены на следующие экспериментальные группы: группу с контузионной травмой спинного мозга (как модель ограничения центростремительной и центробежной сигнализации, сопровождающаяся ограничением функционального использования двигательного аппарата); группу с воздействием моделируемой гипогравитации (как модель ограничения действия осевой нагрузки и силы реакции опоры при сохранении нервных влияний и возможности сократительной активности мышцы). Идентичность каждой крысы в каждой экспериментальной группе оставалась закодированной до конца эксперимента и анализа данных.

Контузионную травму спинного мозга осуществляли по модифицированной методике А. R. Allen (1911). Под комбинированной внутримышечной анальгезией с использованием золетила («Zoletil 50» «Virbac», Франция), 25 мг/кг и ксилавета инъекционного (XylaVET, «Pharmamagist Ltd», Венгрия) 0,5 мл/кг в асептических условиях осуществляли препарирование 7-8 грудных позвонков (Рисунок 5). Проводили ламинэктомию, после чего позвоночный канал оголяется, становится доступным для осмотра и манипуляций в нем, а твердая оболочка спинного мозга остается интактной. Затем 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 операции всем животным вводили антибактериальный препарат энрофлон (0,1 мл, п/к), животных помещали в индивидуальные клетки, однократно подкожно вводили 5 мл 0,9 % раствора хлорида натрия. В течение первых суток осуществляли дополнительный обогрев. В послеоперационном периоде у

животных с нарушением мочеиспускания механически опорожняли мочевого пузыря дважды в день до восстановления его функции.

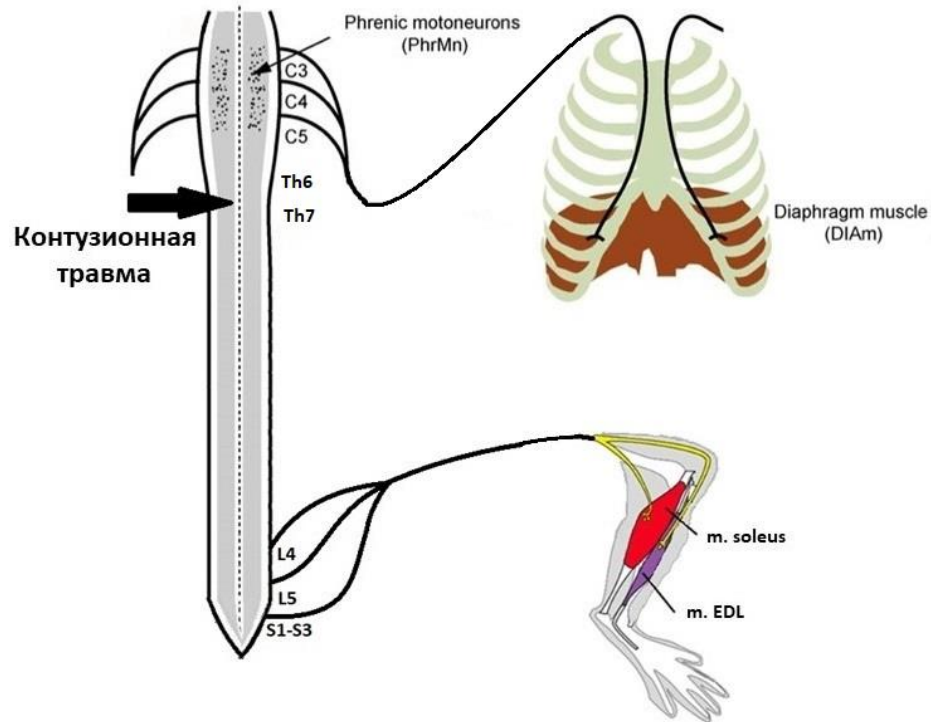


Рисунок 5 – Схема нанесения контузионной травмы

Для дополнительного контроля экспериментов на модели контузионной травмой спинного мозга и исключения данных, которые могут быть получены при ограничении движений нижних конечностей, было принято решение провести дополнительные исследования в условиях моделируемой гипогравитации.

Для имитации гипогравитации была использована модель антиортостатического вывешивания задних конечностей крыс. В такой 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.

После проведения операции животных содержали в течение семи суток в одиночных клетках с водой и кормом *ad libitum*. После семисуточного восстановления животных предварительно наркотизировали, вводя внутривенно раствор этиминала натрия в дозе 40 мг/кг, обескровливали и

выделяли *m. soleus*, *m. extensor digitorum longus*, *m. diaphragma* с культями нервов.

2.1.14 Моделирование спинализации на крысах

Объектом исследования выступали камбаловидная мышца и длинный разгибатель большого пальца ног и диафрагма с соответствующими нервно-мышечными синапсами интактных крыс и животных после перенесенной спинализации.

За неделю до начала и во время экспериментов каждую крысу размещали в отдельной клетке при комнатной температуре 22 °С, с циклом свет/темнота: 12 ч/12 ч, с доступом к воде и пище *ad libitum*. Все манипуляции осуществляли в одинаковое время суток. Крыс разделили на две группы по 12 особей: в группу «норма» вошли интактные животные, в группу «спинализация» животные, подвергшиеся перерезке спинного мозга.

Операцию производили в асептических условиях под комбинированной внутримышечной анальгезией с использованием золетила («Zoletil 50» «Virbac», Франция) 25 мг/кг и ксилавета (XylaVET, «Pharmamagist Ltd», Венгрия) 0,5 мл/кг. После препарирования Th6 – Th7 позвонков производили ламинэктомию для оголения позвоночного канала с последующей перерезкой спинного мозга на данном уровне (Рисунок 6).

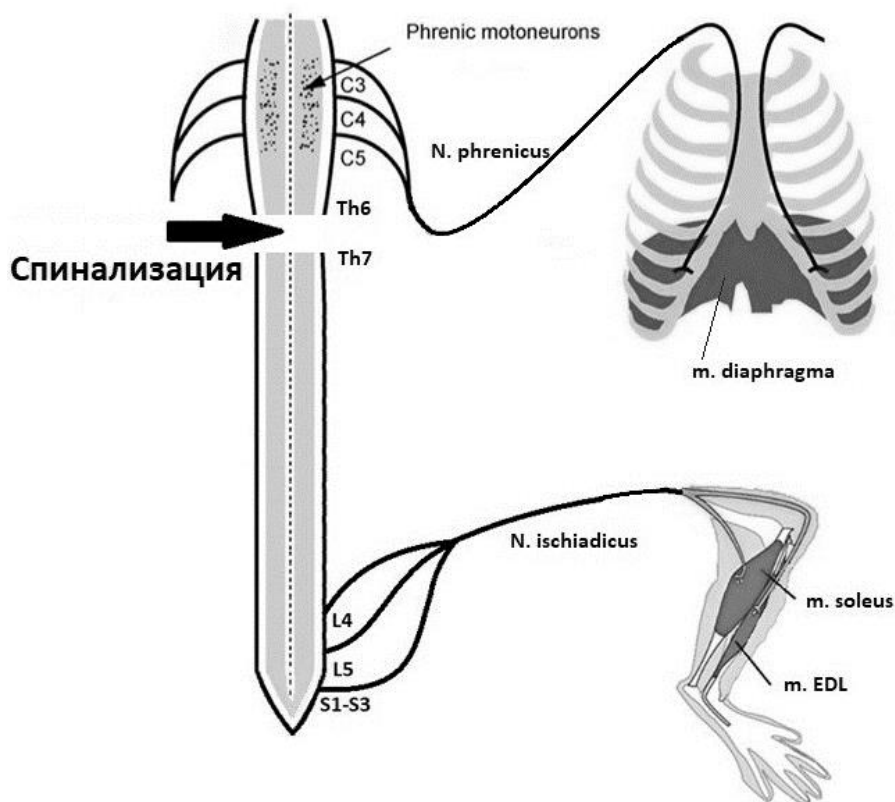


Рисунок 6 – Схема спинализации на уровне Th6–Th7

2.1.15 Моделирование бокового амиотрофического склероза на мышцах

Объектом исследования выступали камбаловидная мышца (*m. soleus*), диафрагма (*m. diaphragma*) и длинный разгибатель большого пальца ног (*m. EDL*) с соответствующими культями нервов мышей дикого типа ($n = 10$) и трансгенных животных ($n = 10$), экспрессирующие мутантный ген FUS(1-359).

2.2 Используемые вещества

Натриевая соль аденозин 5'-трифосфорной кислоты, аденозин, тубокурарин, ДПСРХ, N-этилмалеимид и сурамин были получены от компании Sigma Chemical Company Ltd. (Великобритания). 8-(*p*-сульфофенил) теofilлин (8-SPT), Rp-cAMPS, хелеритрин и нитрендипин поставлялись Research Biochemicals

International (США). Золетин (Zoletil 50) был получен от компании Virbac, Франция. Ксилавета (XylaVET) была получена от компании «Pharmamagist Ltd» (Венгрия). Антитела Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit, A21206 и альфа-бунгаротоксин конъюгированный с тетраметилпроламином, TMR-ABT t1175, были получены от компании Life Technologies (США). Антитела rabbit polyclonal anti-P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6, P2X7, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄ были получены от компании Affinity Biosciences (КНР).

2.3 Анализ данных

Статистическая обработка данных производилась в программе Origin Lab.

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

Данные для иммуногистохимических экспериментов представлены как среднее \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 $p < 0,05$.

2.4 Соблюдение этических норм и стандартов

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Организацию и проведение работы осуществляли в соответствии с международными и российскими нормативно-правовыми

документами: Приказом Минздрава РФ №199н от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. По охране животных, используемых в научных целях. Протокол исследования на животных был одобрен локальным этическим комитетом Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Влияние агонистов и антагонистов пуринергической сигнализации на потенциалы концевой пластинки

В начальных сериях экспериментов оценивалось влияние пуринов на амплитудно-временные параметры постсинаптических ответов: вызванных и миниатюрных потенциалов концевой пластинки (Рисунок 7).

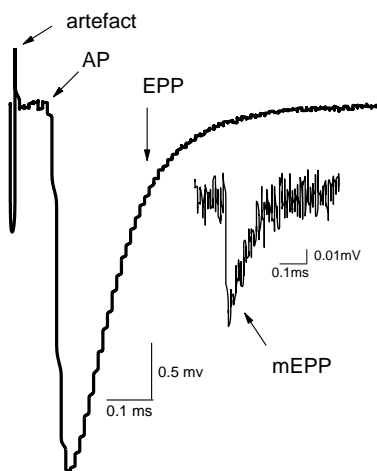


Рисунок 7 – Многоквантовый ПКП и спонтанный мПКП в контрольных условиях

Аденозин (1-100 мкМ) концентрационно-зависимо угнетал амплитуду потенциалов концевой пластинки (Таблица 5) диафрагмы мыши. Так, если в концентрации 1 мкМ данный пурин лишь немного снижал величину ПКП, то при концентрации 100 мкМ снижение амплитуды достигает уже двух третей.

Что касается АТФ, то она, наоборот, концентрационно-зависимо потенцирует амплитуду ПКП. Так, уже в концентрации 1 мкМ АТФ наблюдается небольшой подъем величины ПКП, а на фоне 100 мкМ АТФ потенциация достигает уже четверти от исходной величины (в контроле, перед подачей пурина).

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 претерпевало достоверных изменений ($p > 0,05$).

Таблица 5 – Эффекты аденозина и АТФ на потенциалы концевой пластинки диафрагмы мышечей. Результаты представлены в процентах от контроля, принятого за 100%

Концентрация, М	Амплитуда ТКП (% от контроля)	
	Аденозин	АТФ
10^{-4}	$71,1 \pm 4,7^*$; n = 7	$123,8 \pm 4,4^*$; n = 7
10^{-5}	$91,9 \pm 3,2^*$; n = 7	$107,2 \pm 4,1$; n = 7
10^{-6}	$99,4 \pm 2,8$; n = 7	$102,6 \pm 3,9$; n = 7

Примечание – * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Итак, аденозин концентрационно-зависимо снижал, а АТФ – повышал амплитуду ПКП. Каков же механизм наблюдаемых эффектов пуринов?

Для ответа на поставленный вопрос в следующих сериях экспериментов оценивались эффекты пуринов на фоне антагонистов аденозиновых и P2-рецепторов (Таблица 6).

Таблица 6 – Эффекты аденозина и АТФ на потенциалы концевой пластинки диафрагмы мышечей на фоне антагонистов аденозиновых и P2-рецепторов. Результаты представлены в процентах от контроля, принятого за 100%

Вещество Мышца	Аденозин 100 мкМ	8-SPT 100 мкМ + Аденозин	АТФ 100 мкМ	Сурамин 100 мкМ + АТФ
<i>m. diaphragm</i>	$71,1 \pm 4,7^*$; n = 7	$94,8 \pm 5,4$; n = 7	$123,8 \pm 4,4^*$; n = 7	$102,6 \pm 6,3$; n = 7

Примечание – * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Что характерно, наблюдаемые эффекты каждого из пуринов исчезали в присутствии антагониста соответствующего ему рецептора. Напротив, антагонист аденозиновых рецепторов не влиял на выраженность эффектов АТФ, что доказывает (вместе с разноплановостью вектора действия), что действие АТФ самостоятелно, и в нем нет вклада получавшегося из него аденозина.

В следующей серии экспериментов исследовалось влияние пуринов на характеристики спонтанных одноквантовых ответов диафрагмы мышцы.

Оказалось, что аденозин во всех концентрациях не менял амплитуды и длительности одноквантовых ответов. АТФ (1-100 мкМ) также не влиял на амплитудно-временные характеристики спонтанных ответов.

Эти данные свидетельствуют, что в норме АТФ и аденозин влияют на амплитуду постсинаптических ответов только через пресинаптические механизмы.

3.2 Влияние пуринов на параметры сокращения камбаловидной мышцы и *m.EDL* 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 $70,3 \pm 6,4$ % ($n = 16$; $p < 0,05$). Неселективный антагонист P1-рецепторов, 8-SPT почти до конца устранял ингибиторное действие аденозина на контрактильную активность *m. soleus* ($94,5 \pm 6,0$ %; $n = 9$).

АТФ (100 мкМ) вызывала достоверное угнетение силы сокращения длинного разгибателя пальцев, однако оно было в полтора раза менее выраженным, чем в случае *m. soleus*. Так, на фоне АТФ сила сокращения *m. EDL*

была $86,2 \pm 3,9 \%$ ($n = 18$), что достоверно ($p < 0,05$) отличается как от исходной силы сокращений, так и от выраженности действия этого пурина на сокращение *m. soleus* (Рисунок 8).

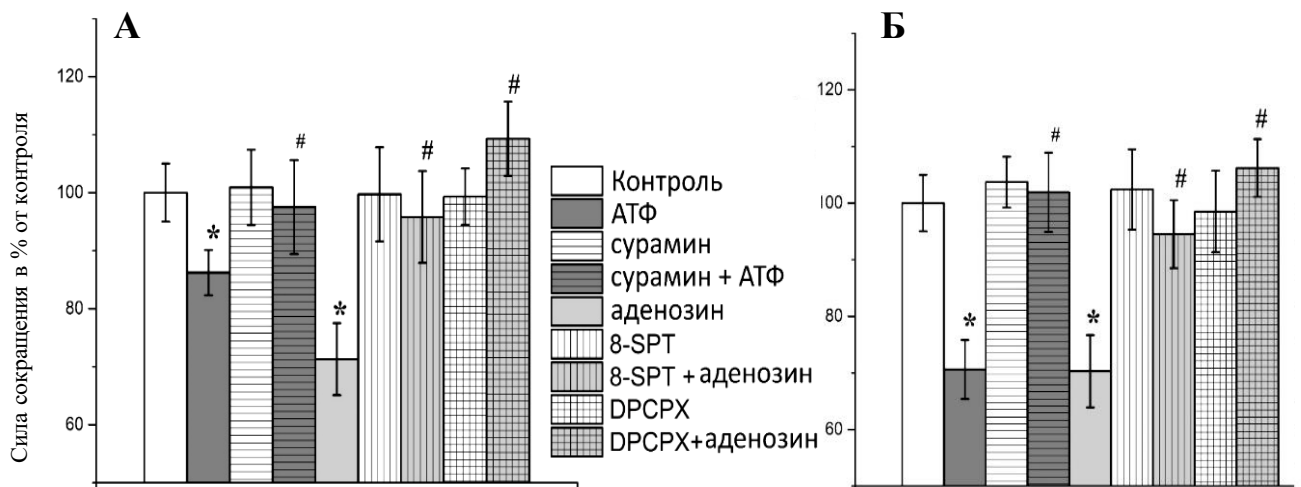


Рисунок 8 – Сила сокращений *m. soleus* и *m. EDL*, вызванных электрической стимуляцией в контроле и при добавлении в среду АТФ (100 мкМ), сурамина (100 мкМ), аденозина (100 мкМ), 8-SPT (100 мкМ), DPCPX (0,1 мкМ) или их комбинации. $n = 8-16$. Примечание – *m. soleus* (А), *m. EDL* (Б); * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # - $p < 0,05$ по сравнению с действием агониста

Устранение ингибиторного эффекта АТФ происходило на фоне антагониста её рецепторов сурамина (100 мкМ). В этом случае АТФ ингибировала силу сокращений лишь до $97,5 \pm 8,1 \%$ ($n = 11$; $p > 0,05$) от значений до подачи данного пурина, что принято за 100 %.

Аденозин показал равноэффективное действие. Так, на его фоне (100 мкМ) сила сокращения длинного разгибателя пальцев составила $71,3 \pm 6,2 \%$ ($n = 16$; $p < 0,05$). Антагонист P1-рецепторов 8-SPT практически до конца устранял эффект данного пурина на сокращения *m. soleus* ($95,8 \pm 7,9 \%$; $n = 9$). На фоне же сурамина аденозин оказывал своё обычное ингибиторное действие.

В присутствии селективного антагониста A1 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-тубокурарин, блокатор N-холинорецепторов, в концентрации 10 мкМ в ванночки и провели стимуляцию. d-тубокурарин устранял все сократительные реакции *m. soleus* и *m. EDL* крыс, вызванные ЭС со стандартными параметрами (см. Методы). Увеличение напряжения с 10 В до 100 В приводило к сокращениям *m. soleus* и *m. EDL* крыс, которые не ингибировались d-тубокурарином. Присутствие использованных в нашем исследовании агонистов или антагонистов не влияло на эти сокращения.

Эти эксперименты подтвердили, что используемые параметры ЭС индуцировали только процессы, опосредованные нервами, поскольку d-тубокурарин, 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-тубокурарином и не подвергалась влиянию АТФ или аденозина.

3.3 Выявление внутриклеточных эффекторов, участвующих в эффектах АТФ и аденозина

Известно, что P1-рецепторы, P2Y-рецепторы, одно из двух семейств рецепторов АТФ – метаботропные, действующие при активации определенным подтип G-белка. Соответственно, в дальнейшем оценивали эффект N-этилмалеимида, блокатора G-белка [306] на ингибиторное действие аденозина, что определило бы опосредование эффектов аденозина подтипом G-белка, чувствительном к N-этилмалеимиду.

N-этилмалеимид (10 мкМ) незначительно потенцировал силу сокращения. Так, после 20 мин его действия сила сокращения составила $105,2 \pm 4,3 \%$ ($n = 8$; $p > 0,05$) и $103,7 \pm 5,3 \%$ ($n = 8$; $p > 0,05$) от контроля, соответственно у *m. EDL* и камбаловидной мышцы. И N-этилмалеимид отменял ингибиторный эффект аденозина на силу сокращения. На фоне N-этилмалеимида под аденозином сила сокращения составила $103,4 \pm 7,7 \%$ ($n = 8$; $p > 0,05$) у *m. EDL* и $104,6 \pm 6,2 \%$ ($n = 8$; $p > 0,05$) у камбаловидной мышцы от значений до подачи пурина (Рисунок 9). На фоне N-этилмалеимида устранялось и ингибиторное действие АТФ на сократимость *m. EDL* и камбаловидной мышцы (у «быстрой» мышцы до $102,7 \pm 8,0 \%$, у «медленной» - $99,2 \pm 7,1 \%$ ($n = 8$; $p < 0,05$)).

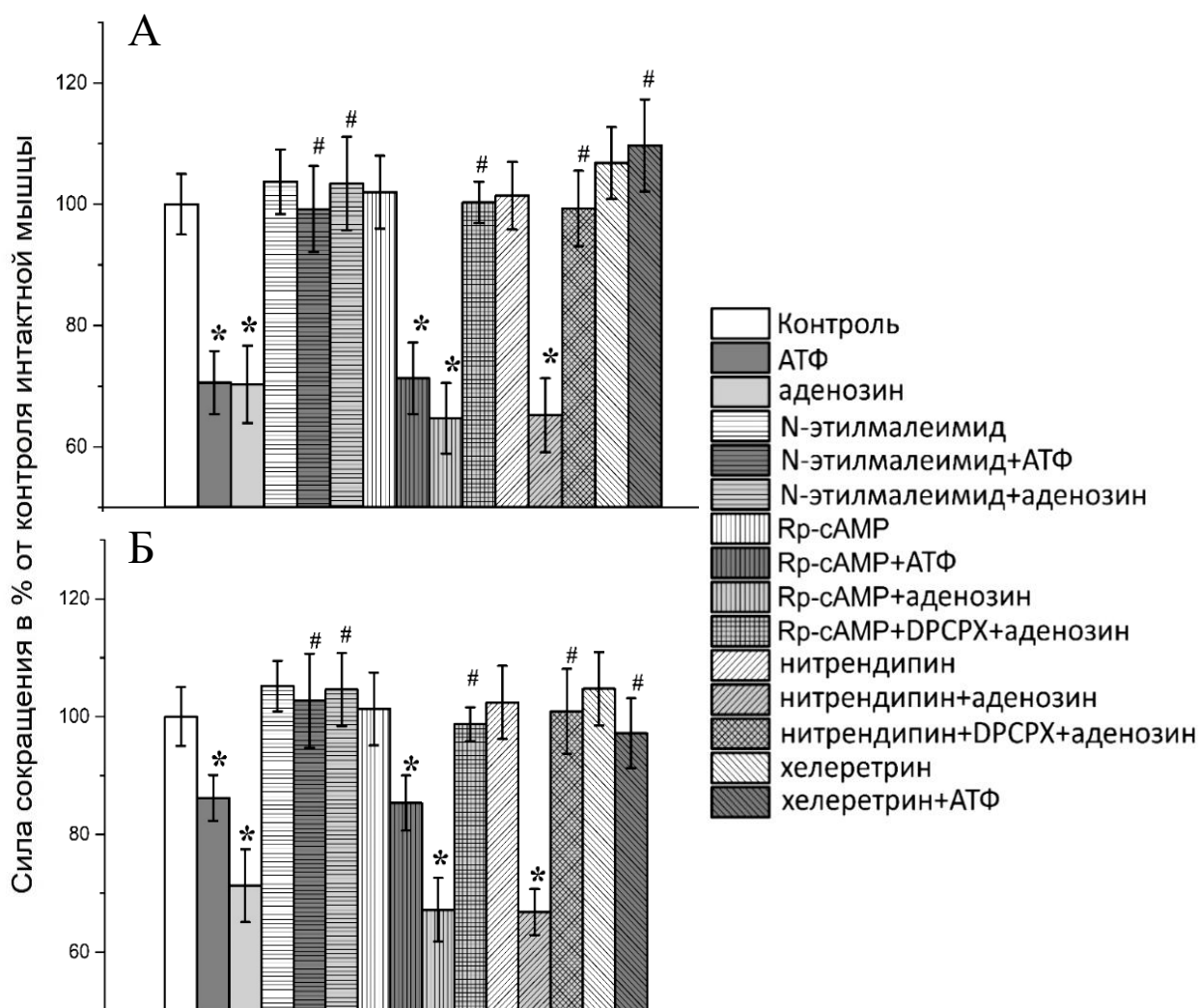


Рисунок 9 – Сила сокращений *m. soleus* и *m. EDL*, вызванных электрической стимуляцией в контроле и при добавлении АТФ (А, 100 мкМ), аденозина (Б, 100 мкМ), N-этилмалеимида (10 мкМ), Rp-цАМФ (50 мкМ), DPCPX (0,1 мкМ),

нитрендипина (5 мкМ), хелеритрина (5 мкМ) или их сочетание с агонистом. $n = 8$ - 16. Примечание – *m. soleus* (А), *m. EDL* (Б); * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # - $p < 0,05$ по сравнению с действующим веществом

Тем утверждается задействование сигнальными путями изучаемых пуринов G-белка, чувствительного к N-этилмалеимиду. Определено участие именно P2Y-рецепторов в угнетающем эффекте АТФ, потому как именно это семейство P2-рецепторов метаботропное, G-белок-опосредованное.

С G-белка активирующий импульс передается на белки-ферменты, образующие те или иные вторичные посредники. Что касается ферментов, это соответствующие циклазы и фосфолипазы.

Депрессорный эффект 100 мкМ аденозина на силу сокращения камбаловидной мышцы и *m. EDL* крысы усиливался на фоне действующей концентрации блокатора протеинкиназы А – аденозин-3',5'-цикломонофосфориата (Rp-cAMP). Так, при предварительном выдерживании препарата в течение 15 мин в растворе, содержащем 50 мкМ Rp-cAMP, аденозин в концентрации 100 мкМ снизил силу сокращения камбаловидной мышцы 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 в присутствии антагониста A_1 рецепторов DPCPX. Поэтому в следующей серии экспериментов тестировали действие аденозина на сочетанном фоне DPCPX и Rp-cAMP. 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* - $98,7 \pm 2,9$ % ($n = 8$; $p < 0,05$).

Известно, что не A_1 - и не A_3 - рецепторы аденозина могут реализовывать свой потенцирующий эффект посредством активации L-типа кальциевых каналов. Поэтому в следующей серии экспериментов проверяли потенцирующий эффект аденозина на фоне DPCPX при блокаторе 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 $66,8 \pm 3,9$ % ($n = 8$; $p < 0,05$).

0,05). На фоне нитрендипина уже отсутствовала потенциация от аппликации аденозина на фоне DPCPX у обеих мышц.

Далее выясняли, не реализуется ли модуляционный эффект АТФ аденилатциклазным внутриклеточным метаболическим путем. На фоне Rp-cAMP не было обнаружено достоверного изменения ингибиторных эффектов АТФ на препаратах обеих исследуемых мышц. Таким образом, специфический ингибитор протеинкиназы *A* Rp-cAMP не снимал угнетающее действие АТФ. Это предполагает, что в модулирующем действии АТФ не участвует протеинкиназа *A*.

Активация P2Y-рецепторов может задействовать $G_{i/o}$ тип ГТФ-белка и, далее PC-фосфолипазу *C* [221]. Соответственно, далее задались оценкой возможной вовлеченности PC-фосфолипазы *C* в эффекты АТФ. Как известно, фосфолипаза *C* гидролизует фосфолипиды, что приводит к производству вторичных посредников – инозитолтрифосфата и диацилглицерола [279]. Диацилглицерол - активатор протеинкиназы *C*. Блокатор протеинкиназы *C* хелеритрин в эффективной концентрации 5 мкМ [159] немного потенцировал сокращения обеих исследуемых мышц (у *m. soleus* до $106,8 \pm 5,9$ % ($n = 7$; $p > 0,05$), а у *m. EDL* - $104,7 \pm 6,2$ % ($n = 7$; $p > 0,05$) от контроля).

И, оказалось, что на фоне хелеритрина АТФ почти никак не подействовал на силу сокращения *m. EDL* ($97,2 \pm 5,9$ % ($n = 8$; $p > 0,05$)) и, даже, незначительно повышала сократимость *m. soleus* крысы до $109,7 \pm 7,6$ % ($n = 8$; $p > 0,05$). В данном случае, вероятно извращение эффекта АТФ связано с постсинаптическим потенцирующим эффектом АТФ который был описан ранее [16].

То, что ингибитор протеинкиназы *C* устранял угнетающий эффект АТФ, говорит о задействовании в сигнальном пути P2Y-рецепторов протеинкиназы *C*.

3.4 Гиперкальциевая модель выявления постсинаптических эффектов

При увеличении концентрации внеклеточного кальция до 7,2 мМ сила сокращения «медленной» и «быстрой» двигательных единиц достоверно не

изменилась. Так при 37 °С амплитуда сокращений составила $102 \pm 8,2\%$ ($n = 11$; $p > 0,05$) для *m. soleus* и $104 \pm 3,9\%$ ($n = 11$; $p > 0,05$) для *m. EDL* относительно сокращений при нормальном содержании кальция.

АТФ в концентрации 100 мкМ при 37 °С никак достоверно не модифицировала силу сокращения камбаловидной мышцы ($95,8 \pm 5,1\%$ от исходных значений до подачи агента, $n = 11$; $p > 0,05$).

При понижении температуры омывающего камбаловидную мышцу раствора эффект экзогенной АТФ в концентрации 100 мкМ проявлялся в экспоненциальном повышении силы сокращения вплоть до полуторного увеличения при 14 °С. Так, при этой температуре на 10-ой минуте действия 100 мкМ АТФ сила сокращения камбаловидной мышцы составила $214,6 \pm 5,7\%$ ($n = 12$; $p < 0,05$; Рисунок 10) от значения этого параметра до подачи АТФ при 37 °С.

Неселективный антагонист Р2-рецепторов сурамин в концентрации 100 мкМ отменял не только потенцирующий эффект экзогенной АТФ, но и гипотермия-ассоциированные изменения сократимости *m. soleus*.

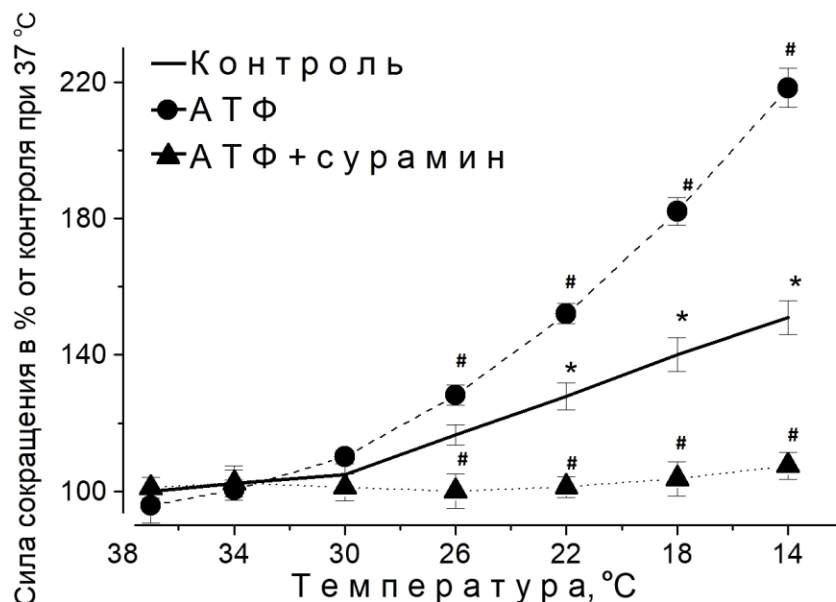


Рисунок 10 – Эффекты АТФ при повышенной концентрации Ca^{2+} (7,2 мМ) на силу вызванных электрическим током сокращений *m. soleus* в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ, при различных температурных

режимах. $n = 8 \div 14$. Примечание – * - $p < 0,05$ от эффекта при 37°C , # - $p < 0,05$ от контроля

При увеличении концентрации внеклеточного кальция до $7,2\text{ мМ}$ АТФ в концентрации 100 мкМ при 37°C угнетала силу сокращения мышцы длинного разгибателя пальцев ($85,2 \pm 5,6\%$ от исходных значений до подачи АТФ, $n = 11$; $p > 0,05$).

При понижении температуры омывающего исследуемую мышцу раствора эффект экзогенной АТФ в концентрации 100 мкМ проявлялось усиление ингибиторного эффекта. Так, при этой температуре на 10-ой минуте действия 100 мкМ АТФ сила сокращения составила $43,1 \pm 4,6\%$ ($n = 12$; $p < 0,05$; Рисунок 11) от значения этого параметра до подачи АТФ.

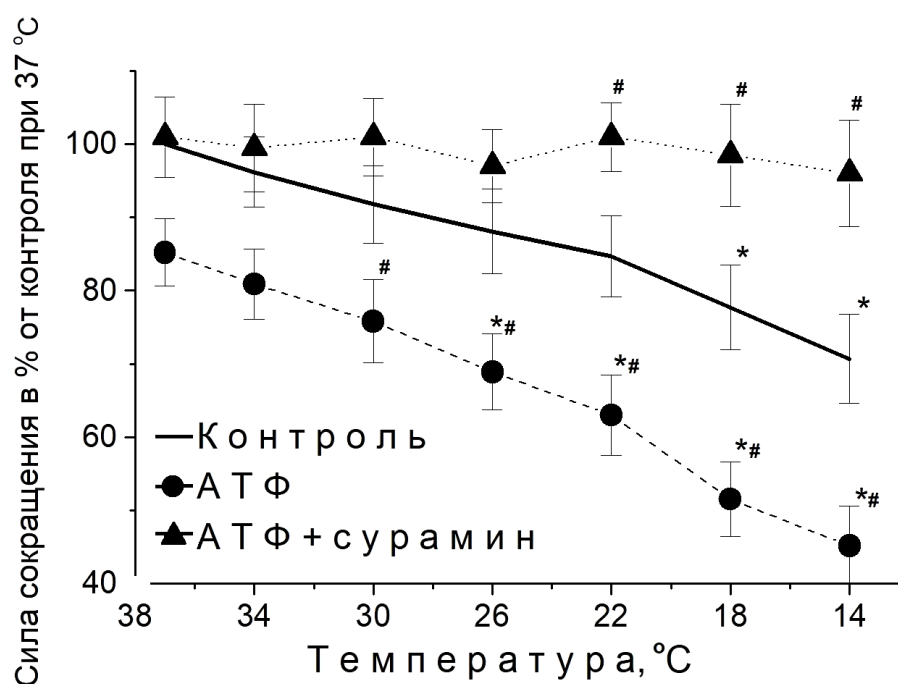


Рисунок 11 – Эффекты АТФ при повышенной концентрации Ca^{2+} ($7,2\text{ мМ}$) на силу вызванных электрическим током сокращений *m. EDL* в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ ., при различных температурных режимах. $n = 8 \div 14$. Примечание – * - $p < 0,05$ от эффекта при 37°C , # - $p < 0,05$ от контроля

Сурамин в инкубационной среде (100 мкМ) предупреждал не только влияние АТФ на мышцу, но и частично ингибиторный эффект гипотермии на сокращения *m. EDL*.

Высвобождение нейромедиатора из нервных окончаний позвоночных модулируется пуринами: действуя через пуриновые рецепторы, они изменяют квантовый состав [21, 105, 137, 218]. Но, общеизвестно, что при этом, как квантовый состав, так и кинетика секреции нейротрансмиттера напрямую зависят от уровня $[Ca^{2+}]_i$ в пресинаптических окончаниях [64, 185].

Нами было показано в периневральном отведении, что именно АТФ, а не его метаболит аденозин (как считалось ранее) ингибирует кальциевый вход в терминаль мотонейрона [21, 105, 218]. АТФ оказывает пресинаптическое ингибиторное действие на квантовый состав как через активацию фосфолипазы A_2 , так и посредством синтеза пероксида водорода [105]. В наших экспериментах последовательные продукты активации фосфолипазы A_2 арахидоновая кислота и простагландин E_2 так же, как и АТФ, на одну шестую снижали амплитуду кальциевой составляющей.

В представленной же работе показана возможность выявления постсинаптических эффектов АТФ в условиях непрямой электростимуляции на фоне гиперкальциевой среды. Дана дифференцированная оценка степени участия АТФ-зависимых механизмов в различных отделах мионеврального соединения. Используемая экспериментальная модель позволяет выявлять преимущественно постсинаптические эффекты пуринов, которые становятся более выражены в условиях гипотермии [189].

Существуют данные, что гипотермия угнетает кальциевый ток через L-тип каналов [134]. Известно, что повышение концентрации внеклеточного кальция приводит к ряду пресинаптических эффектов, в том числе и к устранению пресинаптического ингибиторного действия АТФ [60, 105]. С другой стороны, не обнаружено какого-либо значительного действия Ca^{2+} на постсинаптические холинорецепторы [262].

В наших экспериментах при повышенном содержании внеклеточного

кальция при обычной электростимуляции воспроизводился потенцирующий эффект АТФ, который можно наблюдать при базовом перфузирующем растворе только при карбахолин-вызванных сократительных ответах [115]. Это косвенно подтверждает постсинаптический характер действия данного пурина. Как известно, АТФ, кроме выполнения в организме роли макроэрга является комедиатором синаптической передачи [21].

Если при нормотермии АТФ не оказывает значимого эффекта на силу сокращения «медленной» мышцы, то гипотермия приводила к значительному приросту к силе сокращения и потенцирующему действию АТФ

Различие динамики показателей, характеризующих постсинаптическое звено демонстрирует комплексную картину участия пуринов в адаптации мионеврального соединения к гипотермии.

3.5 Иммуногистохимическое определение подтипов P2-рецепторов

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 7).

Таблица 7 – Результаты иммуногистохимического анализа нервно-мышечных синапсов *m. soleus*, *m. EDL* и *m. diaphragma* крысы на наличие и локализацию P2-рецепторов

	Ионотропные P2X						
	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7
<i>m. soleus</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>m. EDL</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>m. diaphragma</i>	+	+	-	-	-	-	-

Продолжение таблицы 7

	Метаботропные P2Y							
	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 (Рисунок 12) и P2X2 показали высокую экспрессию в исследуемых образцах ткани (Рисунок 13).

Среди семейства P2Y-рецепторов экспрессия наблюдалась в срезах, окрашенных антителами к подтипу P2Y₁₃ (Рисунок 14).

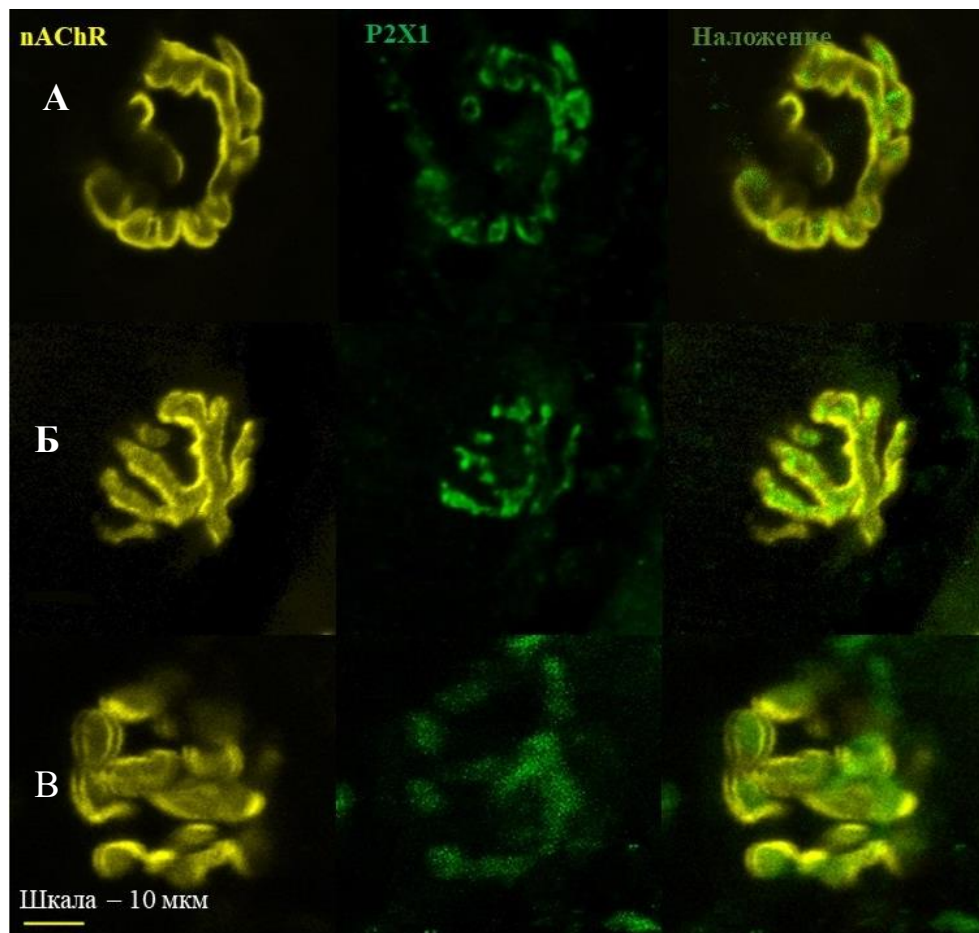


Рисунок 12 – Микрофотографии гистологических препаратов нервно-мышечных препаратов *m. soleus*, *m. EDL* и *m. diaphragma* крысы. Иммунофлюоресцентный анализ с антителами к N-холинорецепторам (желтый цвет), P2X1-подтипам

рецепторов (зеленый цвет) и их наложение. Примечание – *m. soleus* (А), *m. EDL* (Б), *m. diaphragma* (В)

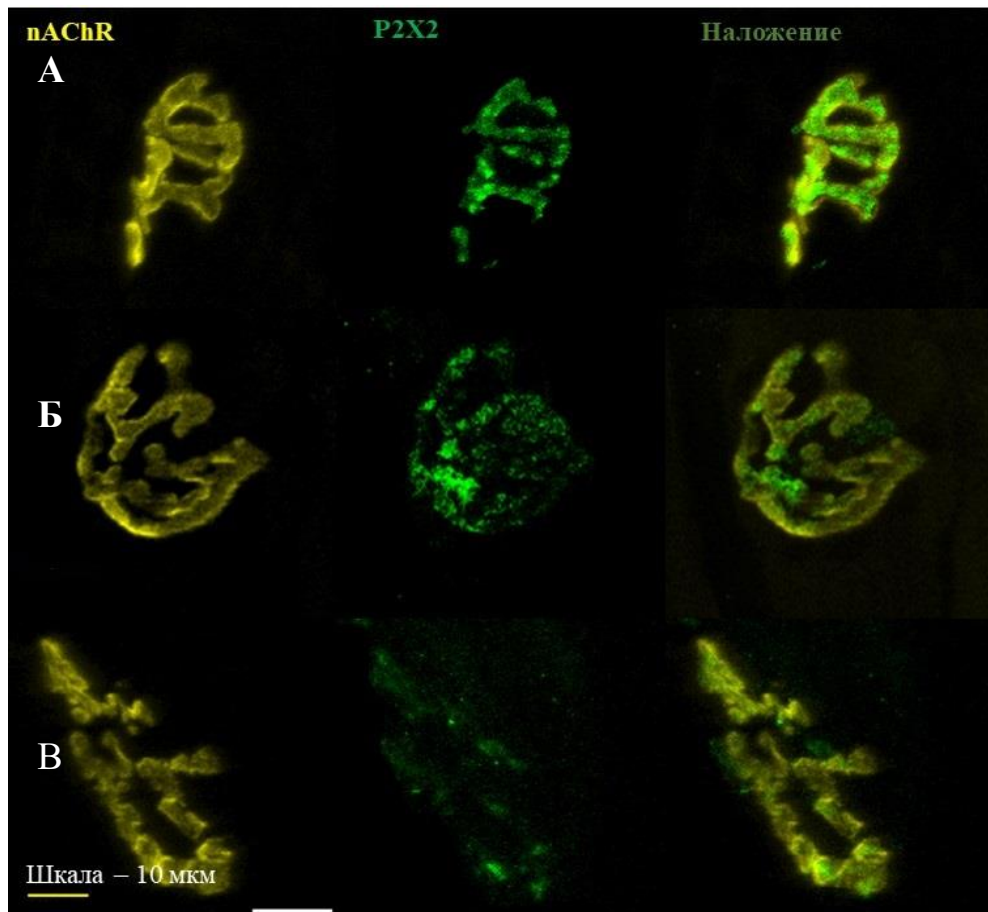


Рисунок 13 – Микрофотографии гистологических препаратов нервно-мышечных препаратов *m. soleus*, *m. EDL* и *m. diaphragma* крысы. Иммунофлюоресцентный анализ с антителами к N-холинорецепторам (желтый цвет), P2X2-подтипам рецепторов (зеленый цвет) и их наложение. Примечание – *m. soleus* (А), *m. EDL* (Б), *m. diaphragma* (В)

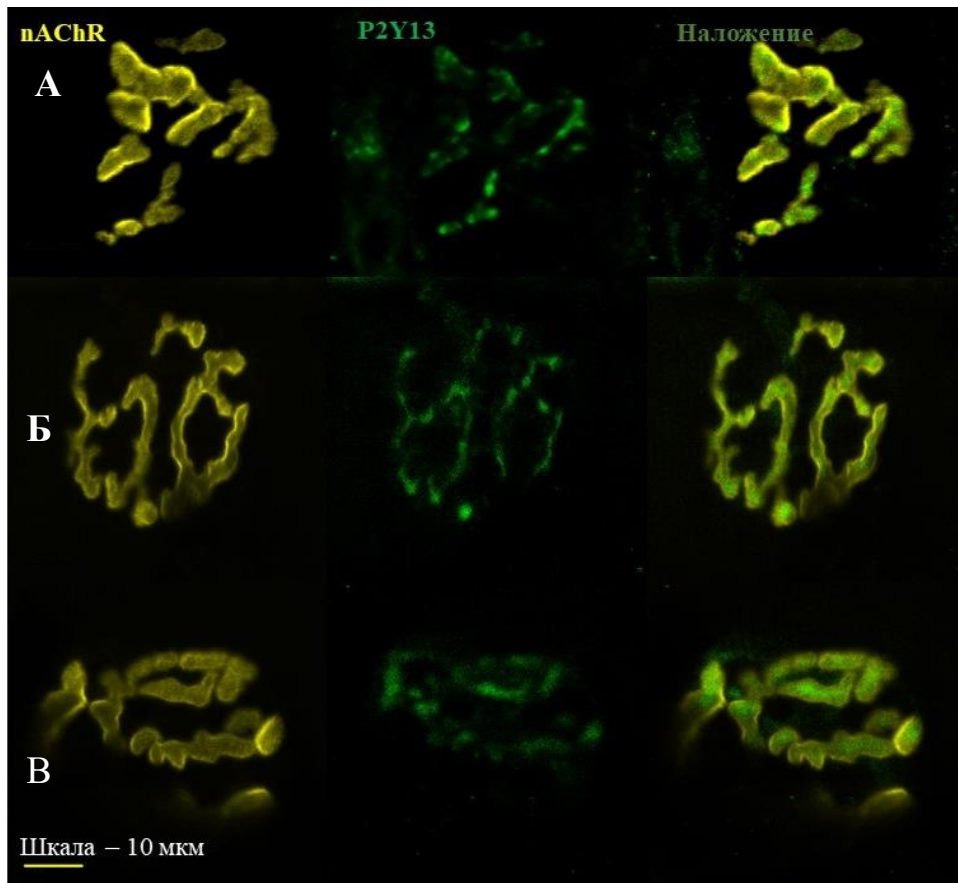


Рисунок 14 – Микрофотографии гистологических препаратов нервно-мышечных препаратов *m. soleus*, *m. EDL* и *m. diaphragma* крысы. Иммунофлюоресцентный анализ с антителами к N-холинорецепторам (желтый цвет), P2Y₁₃-подтипам рецепторов (зеленый цвет) и их наложение. Примечание – *m. soleus* (А), *m. EDL* (Б), *m. diaphragma* (В)

Внутриклеточная концентрация АТФ в скелетных мышцах высока (5-7 мМ), поскольку основная функция мышцы - сокращение требует энергии, доставляемой в виде АТФ. В физиологических условиях основная часть АТФ находится внутриклеточно, при этом высвобождаются лишь небольшие количества [367]. Такой внеклеточный АТФ становится сигнальной молекулой, стимулирующей специфические пуриновые рецепторы.

Активация пуриновых рецепторов приводит к увеличению внутриклеточного Ca²⁺, поступающего через ионные каналы (P2X), либо высвобождаемого из внутриклеточных запасов (P2Y) [367], это приводит к высвобождению множества

факторов, включая пурины, цитокины и факторы роста, которые влияют на развитие и функцию нервных глиальных клеток [211].

Роль путей, опосредованных пуринергическими рецепторами P2, в физиологических и патологических процессах все еще выясняется. Активация пуринорецепторов в здоровых мышцах опосредует выполнение различных функций, например, передача сигналов, опосредованная пуринергическими рецепторами, влияет на пролиферацию и дифференцировку мышц в процессе развития [104] и в постнатальном периоде. В настоящее время пуринергические рецепторы являются объектом внимания из-за их вовлеченности в механизмы развития патологических состояний, к примеру, нейродегенеративных расстройств центральной и периферической нервной системы, аутоиммунных заболеваний, воспаления и онкологических заболеваний [320].

P2Y₁₂ и P2Y₁₃ рецепторы играют ингибирующую роль в высвобождении квантового АХ из нервных окончаний нервно-мышечных синапсов амфибий и млекопитающих соответственно [278]. Активация P2Y рецепторов может приводить к уменьшению входа ионов кальция в нервное окончание лягушки через потенциал-чувствительные кальциевые каналы L-типа, что в свою очередь может быть ингибирующим компонентом действия АТФ на квантовый выброс нейромедиатора в синапсах холоднокровных животных [148].

3.6 Влияние температуры на временные параметры одиночных сократительных ответов *m. soleus* и *m. EDL*, вызванных электрической стимуляцией

При температуре 37°C усредненные по 18 экспериментам параметры сокращения *m. soleus* имели следующие характеристики: сила сокращения 2,61 ± 0,07 г, время сокращения 0,081 ± 0,008 с, время полурасслабления 0,092 ± 0,007 с. При снижении температуры отмечался прирост как силы сокращения, так и времени полурасслабления *m. soleus*. Так, при 14 °C время полурасслабления *m. soleus* достигало 0,120 ± 0,009 с. (n = 8; p < 0,05; Рисунок 15А).

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 понижении температуры до 14°С время полурасслабления *m. EDL* достоверно не изменяется, достигая $0,071 \pm 0,006$ с ($n = 8$; $p < 0,05$; Рисунок 15Б).

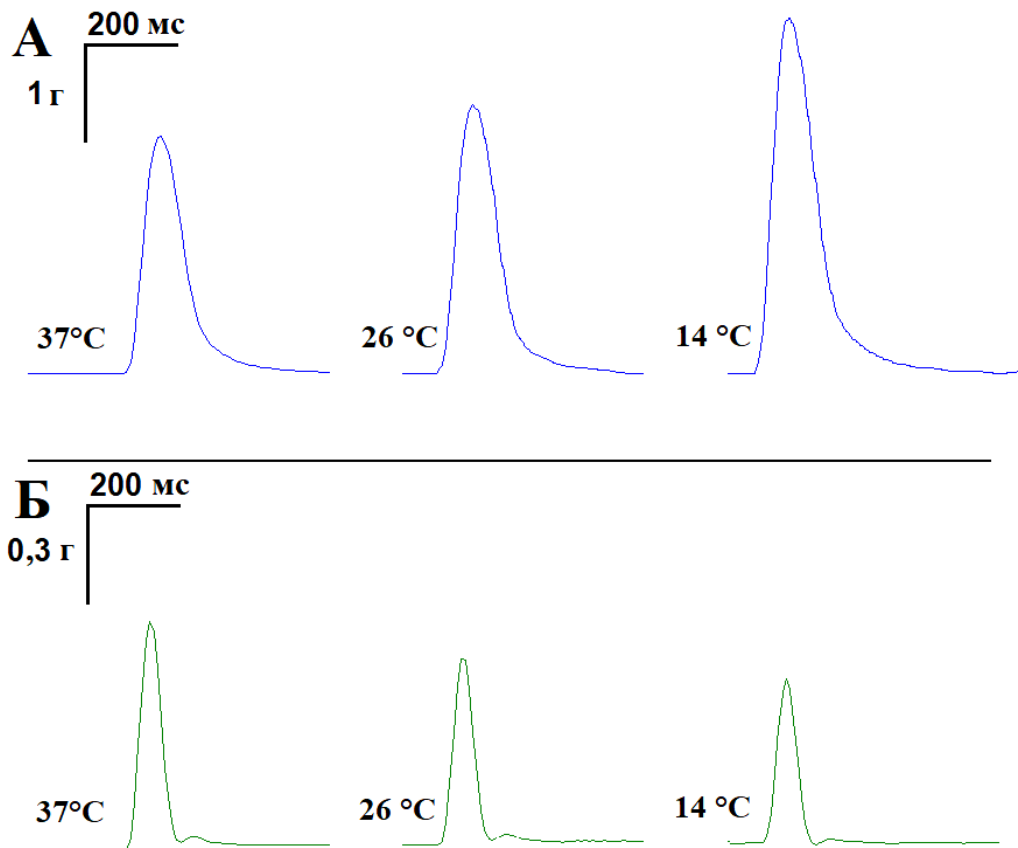


Рисунок 15 – Вид одиночных сократительных ответов *m. soleus* и *m. EDL*, вызванных электрической стимуляцией при различных температурах.

Примечание: *m. soleus* (А), *m. EDL* (Б)

3.7 Влияние АТФ и сурамина на временные параметры одиночных сократительных ответов *m. soleus* и *m. EDL*, вызванных электрической стимуляцией в норме и при гипотермии

АТФ в концентрации 100 мкМ при 37 °С никак достоверно не модифицировала временные параметры электро-вызванных сокращений *m. soleus* $105,2 \pm 4,9\%$ от исходных значений ($n = 18$; $p > 0,05$; Рисунок 16А), и $102,7 \pm 6,1\%$ ($n = 18$; $p > 0,05$; Рисунок 16В) для *m. EDL*.

При понижении температуры омывающего *m. soleus* раствора эффект экзогенной АТФ в концентрации 100 мкМ проявлялся в повышении времени полурасслабления при 14 °С. Так, при этой температуре на 10-ой минуте действия 100 мкМ АТФ оно составило $147,9 \pm 5,1\%$ ($n = 18$; $p < 0,05$; Рисунок 16А) от усредненного значения этого параметра до подачи АТФ. Действие АТФ на *m. EDL* с понижением температуры до 14 °С составило $109,9 \pm 4,7\%$ ($n = 18$; $p > 0,05$; Рисунок 16Б).

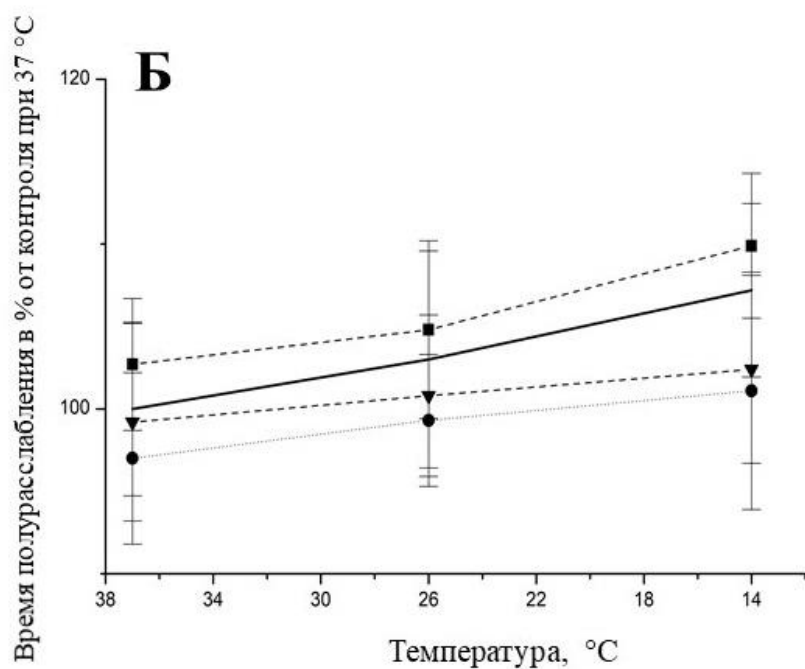
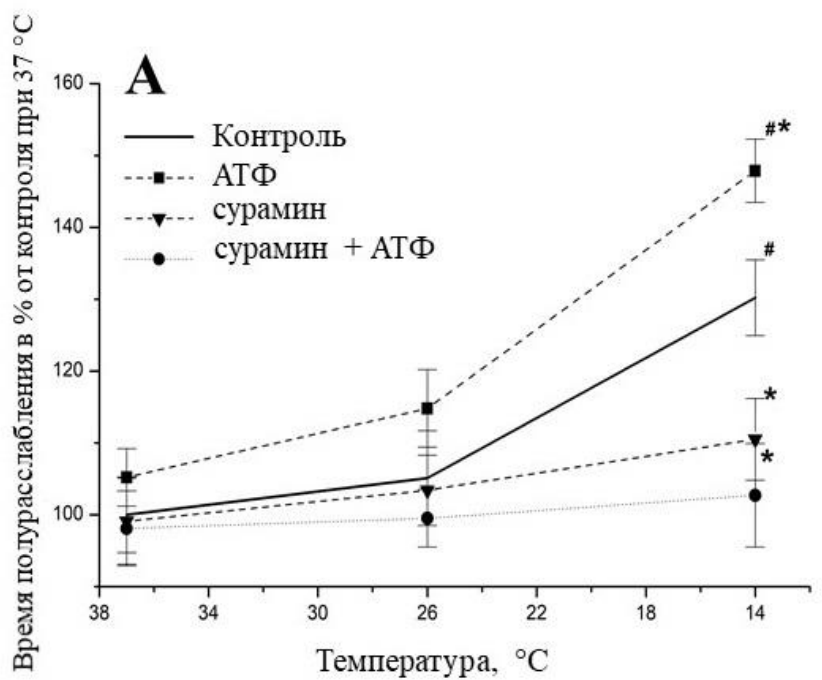


Рисунок 16 – Эффект АТФ на силу сокращения *m. soleus* и *m. EDL* в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах (n = 18). Примечание – *m. soleus* (А) и *m. EDL* (Б); # - $p < 0,05$ от эффекта при 37 °C, * - $p < 0,05$ от контроля)

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 16).

3.8 Влияние АТФ на тетанические сократительные ответы *m. soleus* и *m. EDL*, вызванные электрической стимуляцией в норме и при гипотермии

Для регистрации «гладких» тетанических сокращений увеличивали частоту электрических импульсов до 12,5 Гц для *m. soleus* и до 17,5 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 17 показаны, в том числе, и зубчатые тетанусы, которые регистрировались на более низких частотах, что обосновывает выбранные рабочие частоты стимуляции.

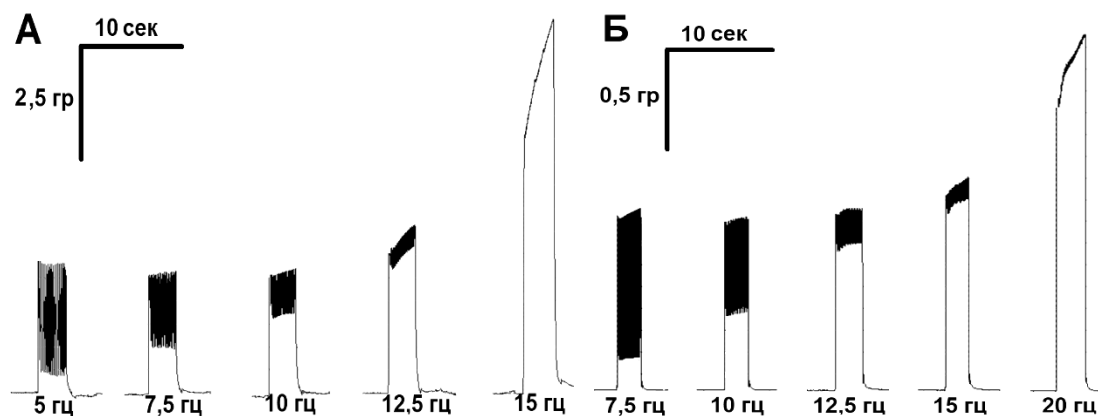


Рисунок 17 – Вид тетанусов *m. soleus* и *m. EDL* при различных частотах стимуляции. Примечание – *m. soleus* (А) и *m. EDL* (Б)

Оказалось, что АТФ и сурамин в концентрации 100 мкМ, в целом, при реперных 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. Эти данные сведены в таблицу 8.

Таблица 8 – Эффект АТФ на силу «гладкого» тетанического сокращения *m. soleus* (А) и *m. EDL* (Б) в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах (n = 8)

А	37 °С	26 °С	14 °С
Контроль, %	100 %	112 ± 7,1 %	153 ± 5,9 %*
На фоне АТФ, % от контроля	69 ± 8,0 % [#]	82 ± 7,7% [#]	157 ± 9,5 %*
АТФ на фоне сурамина, % от контроля	103 ± 5,7 %	95 ± 6,4 %	107 ± 6,8 % [#]

Б	37 °С	26 °С	14 °С
Контроль М ± m, %	100 %	79 ± 5,8 %	64 ± 7,2 %*
На фоне АТФ, % от контроля	86 ± 5,5 % [#]	58 ± 7,9 % [#]	43 ± 6,2 %**
АТФ на фоне сурамина, % от контроля	98 ± 7,1 %	97 ± 8,5 %	94 ± 9,1 % [#]

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

Кроме того, было обнаружено снижение частоты слияния тетанических мышечных сокращений при понижении температуры на *m. soleus*, но не на *m.*

EDL (Таблица 9). АТФ и сурамин в концентрации 100 мкМ модулировали частоту слияния тетанических сокращений на *m. soleus*, понижая и повышая её, соответственно, при гипотермии. Но на *m. EDL* эти эффекты не проявлялись.

Таблица 9 – Влияние температуры на частоту слияния тетанических мышечных сокращений в контроле и при аппликации АТФ и сурамина в концентрации 100 мкМ (n = 12)

Контроль											
<i>m. soleus</i>						<i>m. EDL</i>					
	2,5 Hz	5,0 Hz	7,5 Hz	10 Hz	12,5 Hz		7,5 Hz	10 Hz	12,5 Hz	15 Hz	17,5 Hz
37 °C	-	-	-	-	+	37 °C	-	-	-	-	+
26 °C	-	-	-	+	+	26 °C	-	-	-	-	+
14 °C	-	-	+	+	+	14 °C	-	-	-	+	+
На фоне АТФ (100 мкМ)											
<i>m. soleus</i>						<i>m. EDL</i>					
	2,5 Hz	5,0 Hz	7,5 Hz	10 Hz	12,5 Hz		7,5 Hz	10 Hz	12,5 Hz	15 Hz	17,5 Hz
37 °C	-	-	-	-	+	37 °C	-	-	-	-	+
26 °C	-	-	+	+	+	26 °C	-	-	-	-	+
14 °C	-	+	+	+	+	14 °C	-	-	-	+	+

Продолжение таблицы 9

На фоне сурамина (100 мкМ)											
<i>m. soleus</i>						<i>m. EDL</i>					
	2,5 Hz	5,0 Hz	7,5 Hz	10 Hz	12,5 Hz		7,5 Hz	10 Hz	12,5 Hz	15 Hz	17,5 Hz
37 °C	-	-	-	-	+	37 °C	-	-	-	-	+
26 °C	-	-	-	+	+	26 °C	-	-	-	-	+
14 °C	-	-	-	+	+	14 °C	-	-	-	+	+
АТФ (100 мкМ) на фоне сурамина											
<i>m. soleus</i>						<i>m. EDL</i>					
	2,5 Hz	5,0 Hz	7,5 Hz	10 Hz	12,5 Hz		7,5 Hz	10 Hz	12,5 Hz	15 Hz	17,5 Hz
37 °C	-	-	-	-	+	37 °C	-	-	-	-	+
26 °C	-	-	-	+	+	26 °C	-	-	-	-	+
14 °C	-	-	+	+	+	14 °C	-	-	-	+	+

3.9 Влияние температуры на временные параметры одиночных сократительных ответов *m. soleus* и *m. EDL*, вызванных карбахолином

Субмаксимальная концентрация карбахолина, вызывающая сокращения камбаловидной мышцы, составила 8×10^{-4} М, для длинного разгибателя пальцев крысы - 2×10^{-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 °C) 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 и $187,2 \pm 9,9$ мг, время сокращения $8,24 \pm 0,43$ с, время полурасслабления $11,09 \pm 0,68$ с. При снижении температуры отмечался прирост времени полурасслабления *m. soleus*, при 14°C оно составило $20,31 \pm 0,82$ с ($n = 10$; $p < 0,05$; Рисунок 18А). Время полурасслабления *m. EDL* достоверно не менялось с понижением температуры и составило $12,08 \pm 0,71$ с при 14°C ($n = 10$; $p < 0,05$; Рисунок 18Б).

На фоне неселективного антагониста P2-рецепторов сурамина в концентрации $100\ \mu\text{M}$ не происходило уменьшение времени полурасслабления в условиях сниженной температуры.

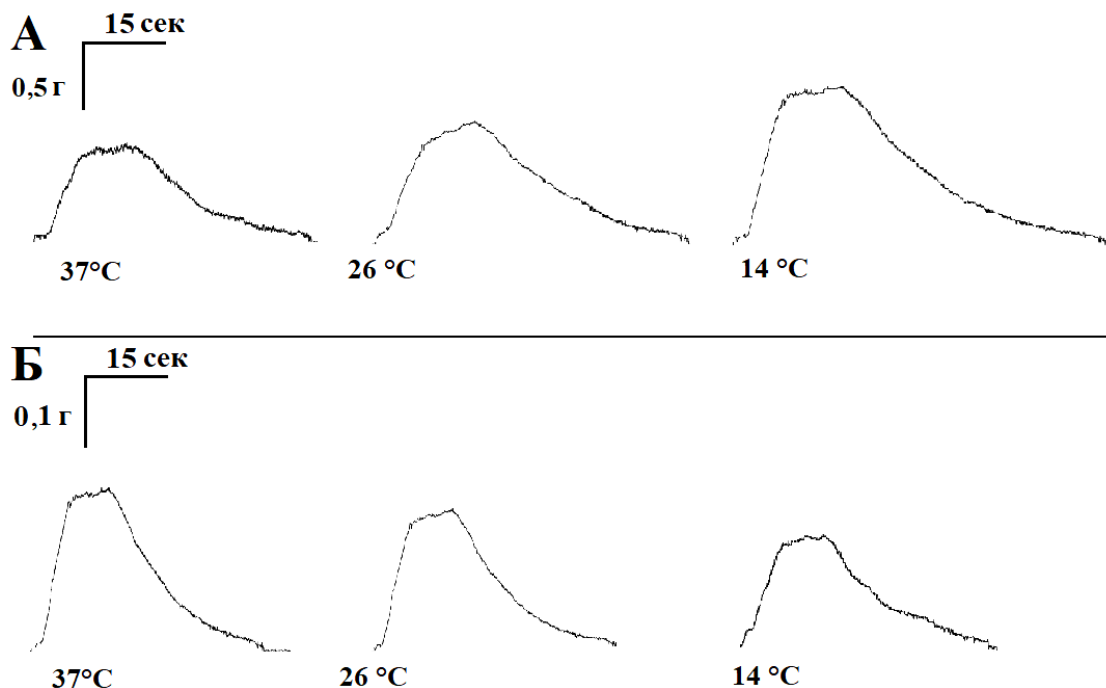


Рисунок 18 – Вид одиночных сократительных ответов *m. soleus* (А) и *m. EDL* (Б), вызванных стимуляцией карбахолом при различных температурах.

Примечание – *m. soleus* (А) и *m. EDL* (Б)

3.10 Влияние АТФ и сурамина на временные параметры одиночных сократительных ответов *m. soleus* и *m. EDL*, вызванных карбахолом в норме и при гипотермии

АТФ в концентрации 100 мкМ при 37 °С никак достоверно не модифицировала временные параметры карбахолин-вызванных сокращений *m. soleus* $106,1 \pm 5,5\%$ от исходных значений ($n = 15$; $p > 0,05$; Рисунок 19А), и $103,8 \pm 5,3\%$ ($n = 15$; $p > 0,05$; Рисунок 19Б) для *m. EDL*.

При понижении температуры омывающего *m. soleus* раствора эффект экзогенной АТФ в концентрации 100 мкМ проявлялся в повышении времени полурасслабления при 14 °С. Так, при этой температуре на 10-ой минуте действия 100 мкМ АТФ оно составило $153,9 \pm 6,4\%$ ($n = 9$; $p < 0,05$, Рисунок 19А) от усредненного значения этого параметра до подачи АТФ. Действие АТФ на *m. EDL* с понижением температуры до 14 °С составило $113,5 \pm 5,3 \%$ ($n = 9$; $p > 0,05$, Рисунок 19Б).

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 19А, Б).

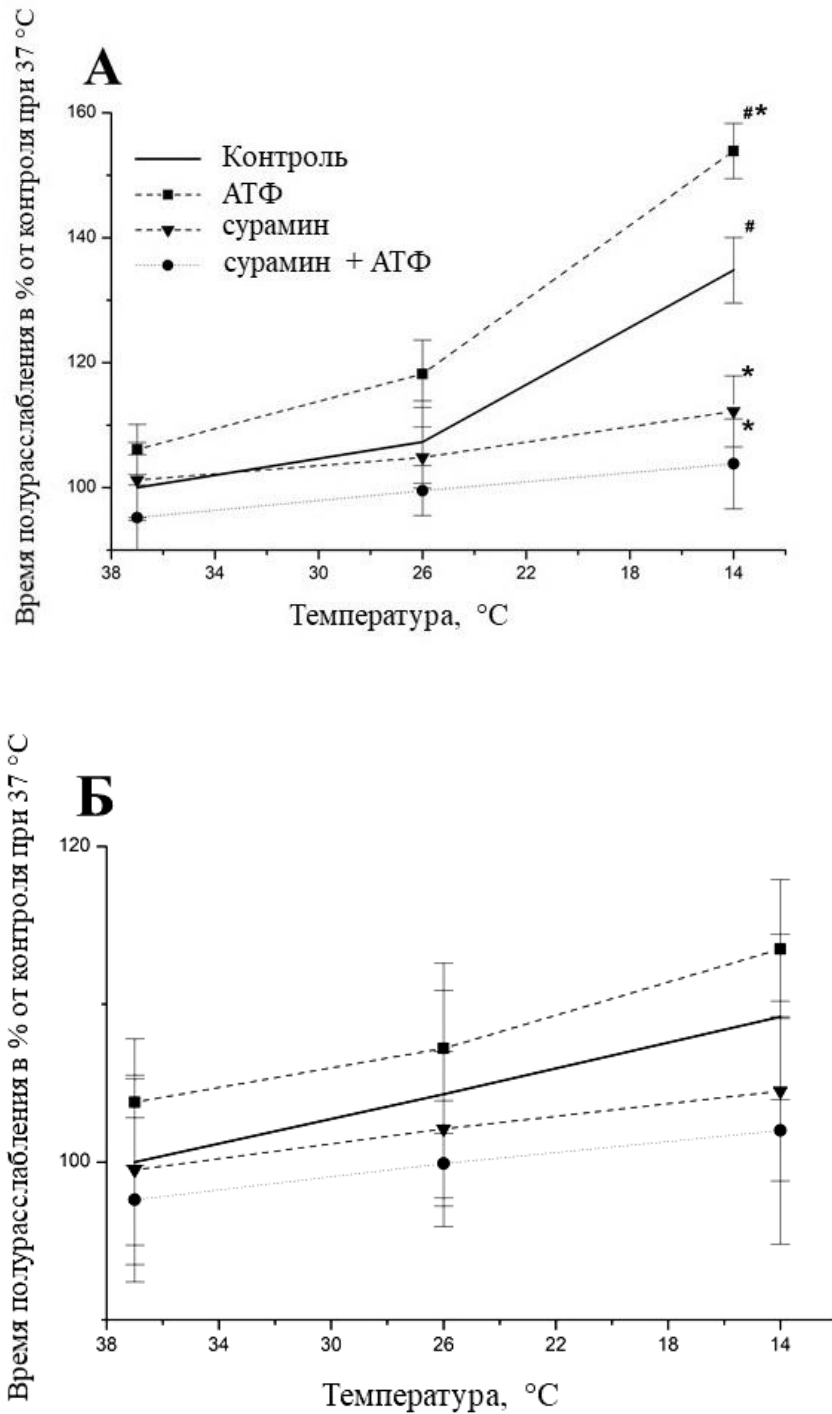


Рисунок 19 – Эффект АТФ на силу сокращения *m. soleus* и *m. EDL* вызванных карбахолином, в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах. $n = 9\div 15$. Примечание: Примечание – *m. soleus* (А) и *m. EDL* (Б); # - $p < 0,05$ от эффекта при 37 °С, * - $p < 0,05$ от контроля

3.11 Роль эктонуклеотидаз в синаптической передаче. Термолабильность 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 10).

Таблица 10 – Активность эктонуклеотидаз в международных единицах

	37 °С	22 °С
<i>m. diaphragm</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, $p < 0,05$.

3.12 Оценка температурной зависимости P2-опосредованных эффектов и эктонуклеотидазной активности

В данном случае температурный коэффициент Q_{10} – это величина, равная отношению эффективности биохимических реакций, сопряженных с механической активностью мышц при повышенной на 10°С температурой окружающей среды к первоначальному значению эффективности.

Температурный коэффициент Q_{10} для эктонуклеотидаз для камбаловидной мышцы составил $3,774 \pm 0,490$, для длинного разгибателя пальцев $4,014 \pm 0,521$, и $2,246 \pm 0,291$ для диафрагмы.

Путем регуляции уровня АТФ и его производных в межклеточном пространстве эктонуклеотидазы контролируют активность различных подтипов

пуринорецепторов и тем самым участвуют в регуляции сократимости мышц (Рисунок 20).

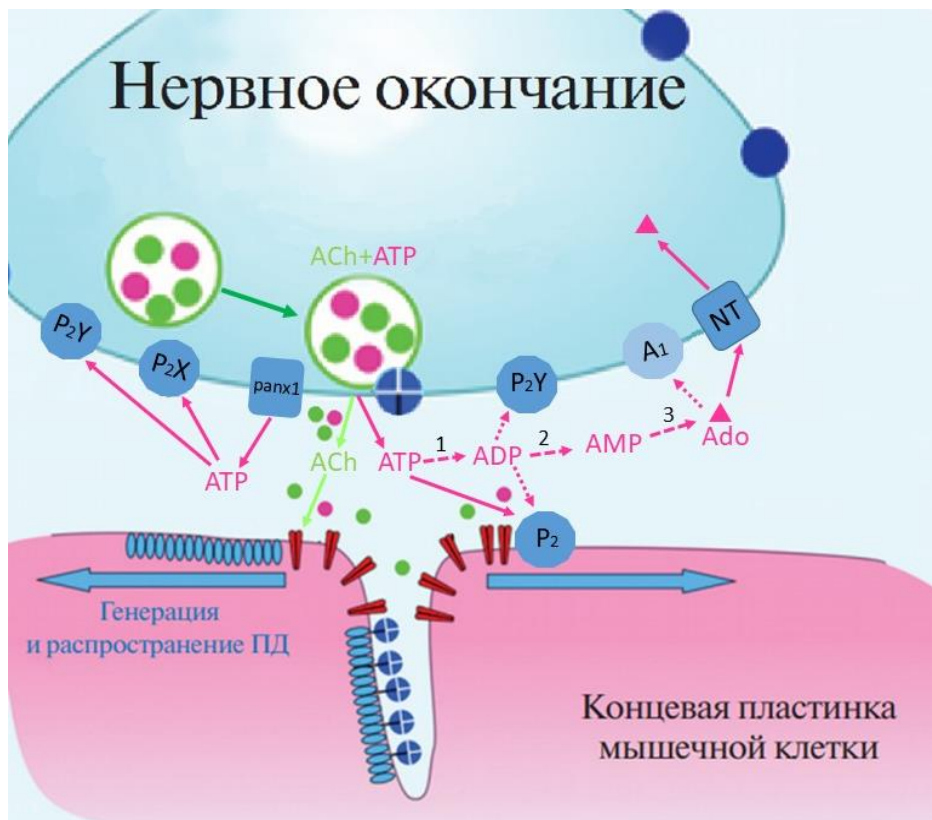


Рисунок 20 – Нервно-мышечный синапс: A1, A2 рецепторы – аденозиновые рецепторы; P2 рецептор – пуриновый рецептор; АТФ – аденозинтрифосфат; АДФ – аденозиндифосфат; АМФ – аденозинмонофосфат; Ado – аденозин; АСh – ацетилхолин; 1 – экто-АТФазы (CD39) и экто-аденилаткиназа (ADK); 2 – экто-АТФазы (CD39); 3 – экто-5'-нуклеотидаза (CD73); ПД – потенциал действия

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

«Быстрая» мышца в условиях электростимуляции снижала силу своего сокращения при белковой сенсibilизации (БС). Если у несенсibilизированной мышцы она была $302,4 \pm 15,7$ мг ($n = 14$), то в опытной серии - $278,5 \pm 19,3$ мг ($n = 10$).

Влияние экзогенной АТФ (100 мкМ) на *m. EDL* обеих групп животных

демонстрировало следующую динамику силы сокращения. У несенсибилизированных мышей этот показатель возрастал до $357,4 \pm 14,8$ мг, то есть на 18,2 % ($n = 14$; $p < 0,05$). У сенсibilизированных животных - до $410,3 \pm 15,7$ мг, то есть на 47,3% относительно контроля ($n = 10$; $p < 0,05$; Рисунок 21). Более выраженное увеличение силы сокращения «быстрой» мышцы у второй группы животных (18,2 % против 47,3 %; $p < 0,05$) свидетельствует об участии пуринергических механизмов пресинаптических образований в процессах адаптации. Инкубация мышцы с сурамином (100 мкМ) полностью предупреждала влияние АТФ на силу сокращений.

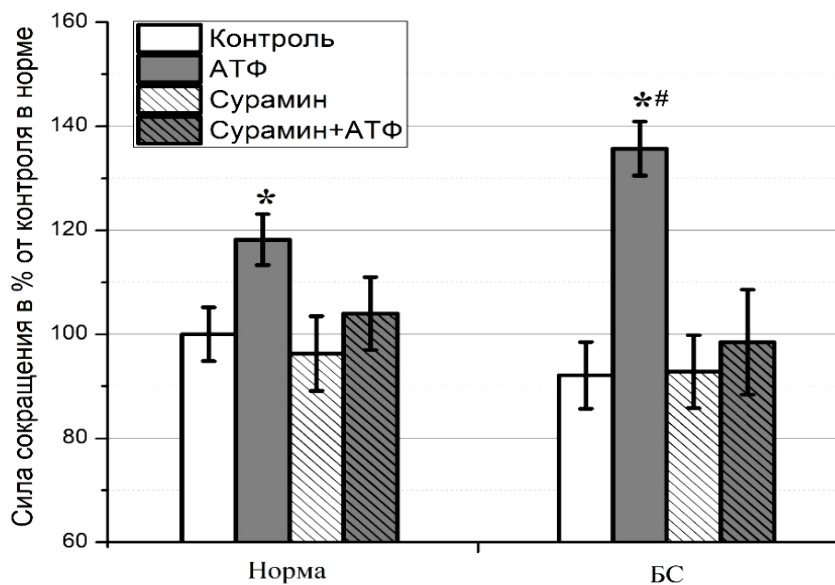


Рисунок 21 – Сила сокращений *m. EDL* мышцы, вызванных электрической стимуляцией, интактных (Норма) ($n = 14$) и сенсibilизированных (БС) ($n = 10$) животных, в отсутствии и присутствии АТФ (100 мкМ) и сурамина (100 мкМ). Примечание – результаты представлены в виде $M \pm m$ в % от исходных величин, принятых за 100%. * - $p < 0,05$ от контроля в норме. # - $p < 0,05$ относительно эффектов в норме

«Медленная» мышца в условиях электростимуляции увеличивала силу своего сокращения при БС. Если у несенсибилизированной 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 несенсибилизированных мышцей показатель силы сокращения возрастал до $471,1 \pm 16$ мг ($n = 14$; $p < 0,05$). У сенсибилизированных животных до $568,7 \pm 25,5$ мг ($n = 10$; $p > 0,05$; Рисунок 22). Различия в АТФ-опосредованном потенцировании силы сокращений до 14,5 % в норме и до 8,6 % при сенсибилизации не носят статистически достоверного характера. Инкубация мышцы с сурамином (100 мкМ) полностью предупреждала влияние АТФ на силу сокращений.

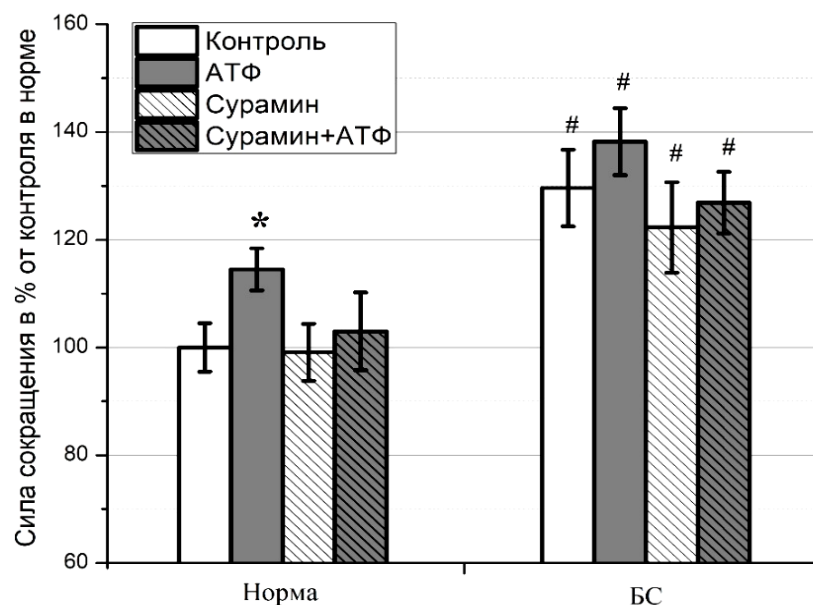


Рисунок 22 – Сила сокращений *m. soleus* мышцы, вызванных электрической стимуляцией, интактных (Норма) ($n = 14$) и сенсибилизированных (БС) ($n = 10$) животных, в отсутствии и присутствии АТФ (100 мкМ) и сурамина (100 мкМ). Результаты представлены в виде $M \pm m$ в % от исходных величин, принятых за 100%. Примечание – * - $p < 0,05$ от контроля в норме. # - $p < 0,05$ относительно эффектов в норме

То есть, у *m. EDL* в процессе сенсibilизации подключаются пуриnergические механизмы адаптации в пресинаптическом звене сигнализации. В противоположность, у *m. soleus* в сходных структурах эти механизмы задействованы незначительно, либо вовсе не вовлекаются.

Электростимуляция полоски *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 (БС) – 538 ± 27 мг ($n = 10$). Влияние экзогенного АТФ на мышцы обеих групп показало следующую динамику. У несенсibilизированных мышцей сила сокращения повышалась до 623 ± 23 мг, т.е. до $115,1 \pm 4,2$ % ($n = 14$). В условиях БС - до $703,5 \pm 31,4$ мг, т.е. до $129,8 \pm 5,8$ % ($n = 10$). Более выраженное потенцирование сокращения дыхательной мышцы после влияния АТФ у второй группы в сравнении с первой ($115,1$ % против $129,8$ %; $p < 0,05$) (Рисунок 21) свидетельствует об участии пуриnergических механизмов пресинаптических образований в адаптации *m. diaphragma* к БС. Инкубация мышцы с сураминоm (100 мкM) полностью предупреждала влияние АТФ на силу сокращений.

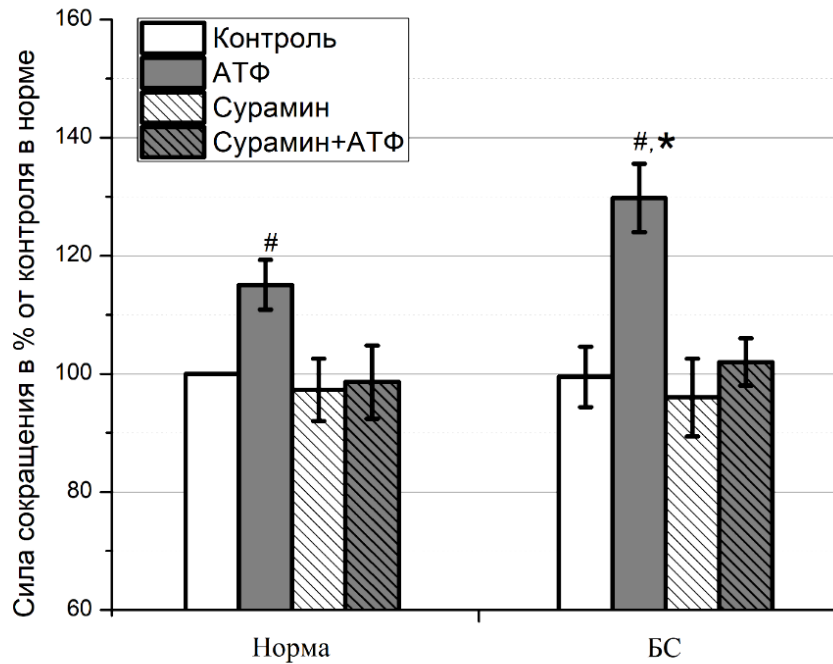


Рисунок 23 – Сила сокращений *m. diaphragma* мышцы, вызванных электрической стимуляцией, интактных (Норма) (n=14) и сенсibilизированных (БС) (n = 10) животных, в отсутствии и присутствии АТФ (100 мкМ) и сурамина (100 мкМ). Примечание – результаты представлены в виде $M \pm m$ в % от исходных величин, принятых за 100 %. # - $p < 0,05$ от контроля в норме. * - $p < 0,05$ от эффекта АТФ в норме

3.14 Влияние АТФ и сурамина на сокращения *m. soleus* и *m. EDL* крысы, вызванных электрической стимуляцией, при денервации

Семидневная денервация привела к увеличению силы сокращения *m. soleus* до $124,6 \pm 10,1\%$ (n = 8; $p < 0,05$) и снижению сократительной способности *m. EDL* до $84,5 \pm 7,1\%$ (n = 8; $p < 0,05$) от интактного контроля (Рисунок 24). Инкубация денервированной ткани с АТФ в концентрации 100 мкМ никак не повлияла на сокращения исследуемых мышц, вызванные электрической стимуляцией. Введение в ванночку сурамина (100 мкМ) не изменило сократительной активности денервированных мышц.

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.

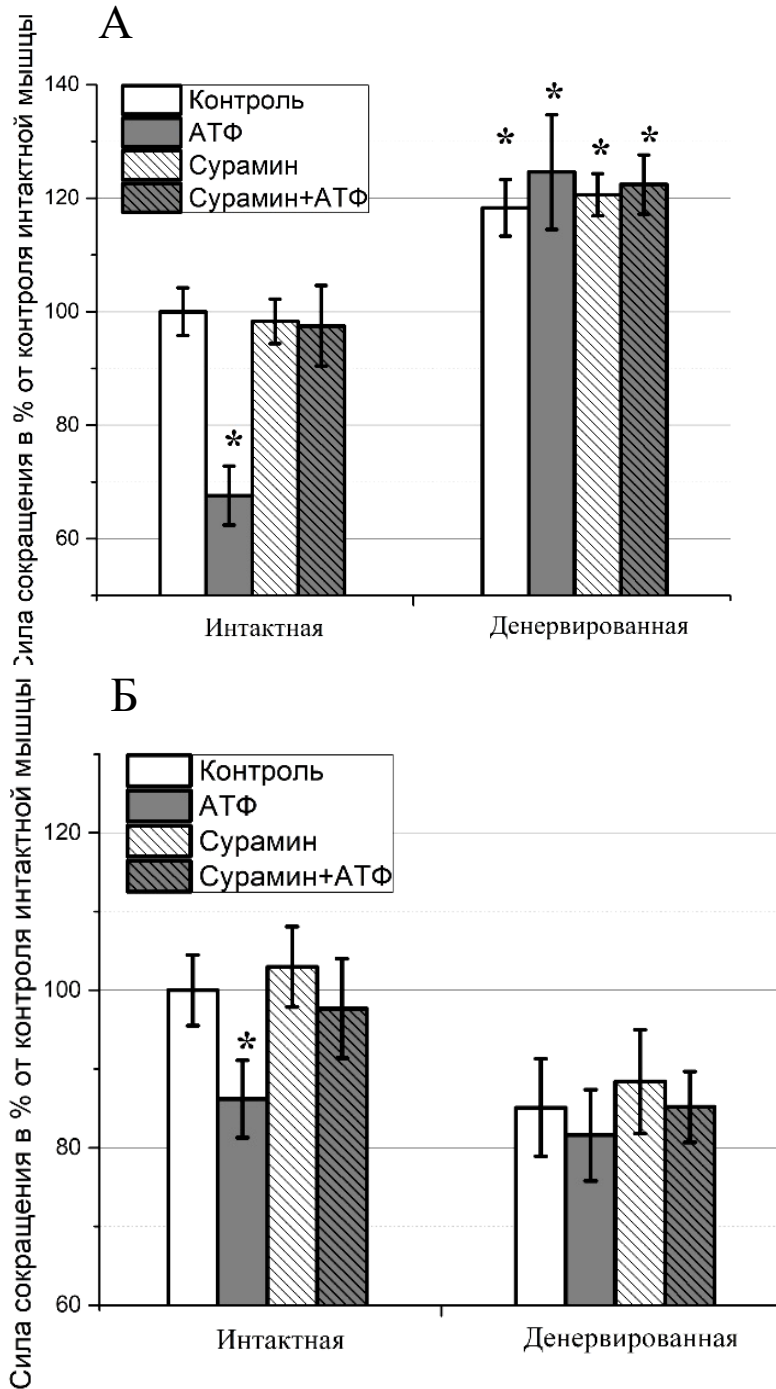


Рисунок 24 – Влияние денервации на силу сокращений *m. soleus* и *m. EDL* крысы, вызванных электрической стимуляцией, в отсутствие и в присутствии АТФ (100

мкМ) и сурамина (100 мкМ). Примечание – *m. soleus* (А), *m. EDL* (Б); $n = 8$, * – $p < 0,05$ от контроля интактной мышцы

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

В экспериментах на интактных мышцах карбахол 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 доли секунды ($n = 12$). У денервированных мышц *m. soleus* и *m. EDL* сила сокращения, индуцированного 50 мкМ карбаолом, увеличивалась до 255 ± 9 мг и 74 ± 8 мг соответственно ($p < 0,05$; $n = 12$) без изменения параметров ЛП. Вероятнее всего, увеличение силы сокращения связан с сенсibiliзацией постсинаптических холинорецепторов, спровоцированной усилением неквантовой секреции АХ. Это согласуется с нашими 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 25) показало, что первое добавление АТФ вызывало 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.

На данный момент не существует 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 ионов кальция, что восстанавливает Ca²⁺-регуляцию до состояния, близкого к нативному.

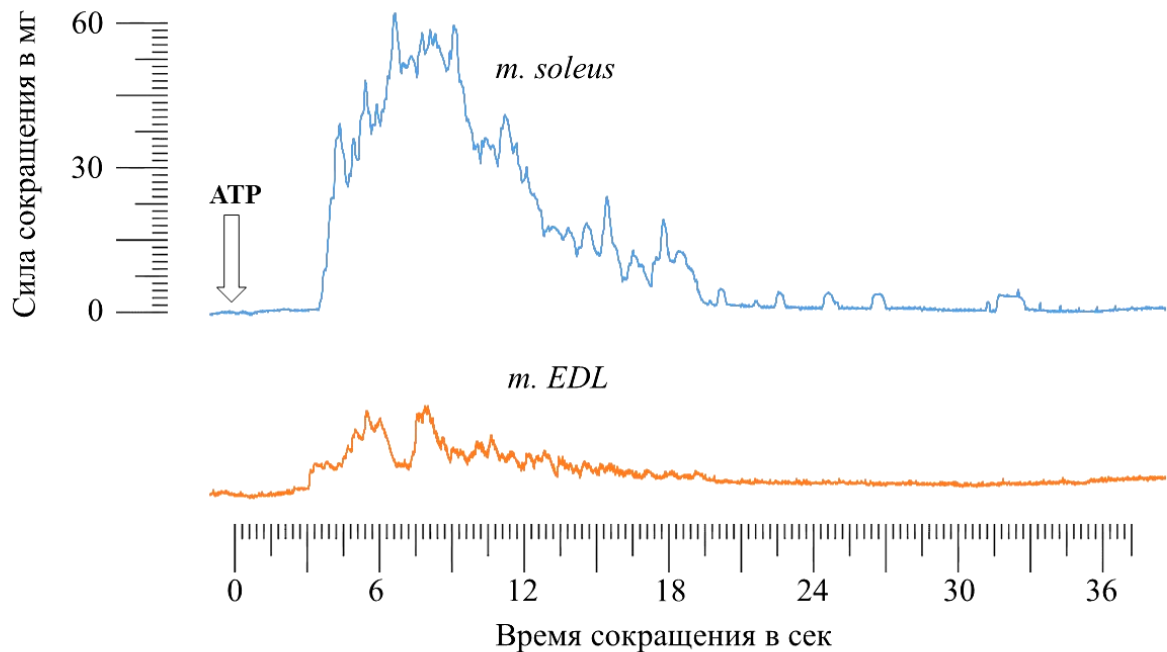


Рисунок 25 – Репрезентативные кривые сокращения *m. soleus* и *m. EDL* в ответ на аппликацию 100 мкМ АТФ

На фоне неселективного антагониста P2-рецепторов сурамина прекращалось действие АТФ. В доступной литературе нет сведений о способности денервированных мышц мыши отвечать на АТФ, вероятнее всего факт сокращения денервированных *m. soleus* и *m. EDL* мышцы в ответ на АТФ выявлен впервые.

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

7-ми дневная ортостатическая разгрузка и контузионная травма спинного мозга оказывали облегчающее влияние на сократимость *m. soleus* крыс; так, сила сокращения при этих патологиях 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 26).

АТФ в концентрации 100 мкМ обратимо ингибировала амплитуду вызванных стимуляцией электрическим полем сокращений интактной камбаловидной мышцы - до $67,6 \pm 5,2$ % ($n = 10$; $p < 0,05$; Рисунок 26). 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.

Неселективный антагонист P2-рецепторов сурамин в концентрации 100 мкМ никаких достоверных эффектов не проявил. При этом, на его фоне почти полностью угнеталось действие экзогенной АТФ (100 мкМ).

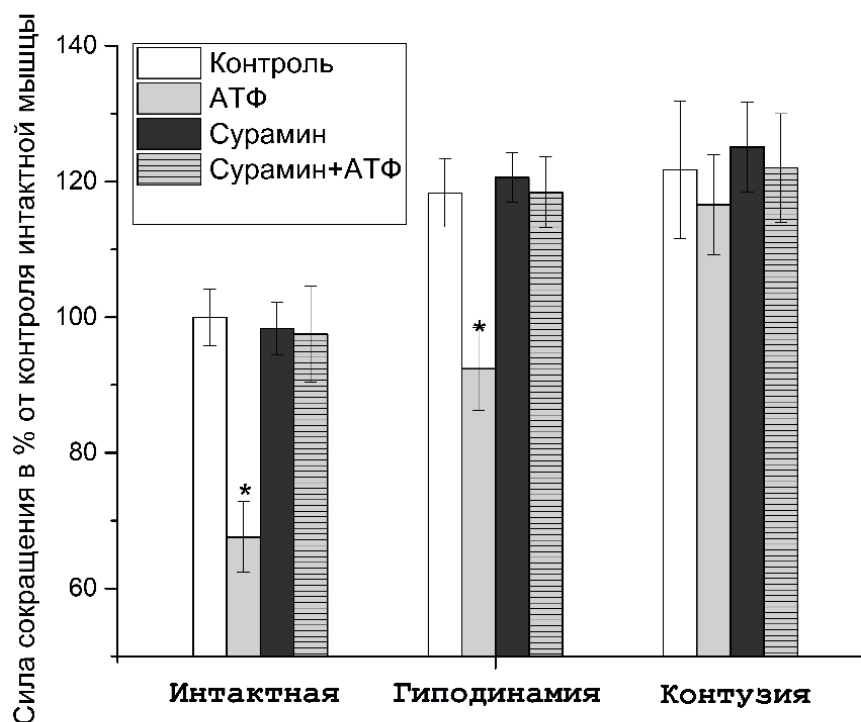


Рисунок 26 – Зависимость силы сокращений *m. soleus* крыс, вызванных электрической стимуляцией, от экспериментальных условий в контроле и добавлении в среду АТФ (100 мкМ), сурамина (100 мкМ) или их сочетание.

Примечание – $n = 8 \div 10$; * - $p < 0,05$ от контрольных значений

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 %. Ортостатическая разгрузка 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 $116,2 \pm 6,1$ % ($n = 7$; $p < 0,05$; Рисунок 27) на диафрагме крыс, подвергшихся антиортостатическому вывешиванию. На фоне контузии наблюдалось стойкое снижение модулирующей способности АТФ до статистически незначимых $106,9 \pm 7,3$ % ($n = 8$; $p > 0,05$; Рисунок 27).

Сурамин в концентрации 100 мкМ никаких достоверных эффектов не проявил. При этом, на его фоне почти полностью угнеталось действие экзогенной АТФ (100мкМ).

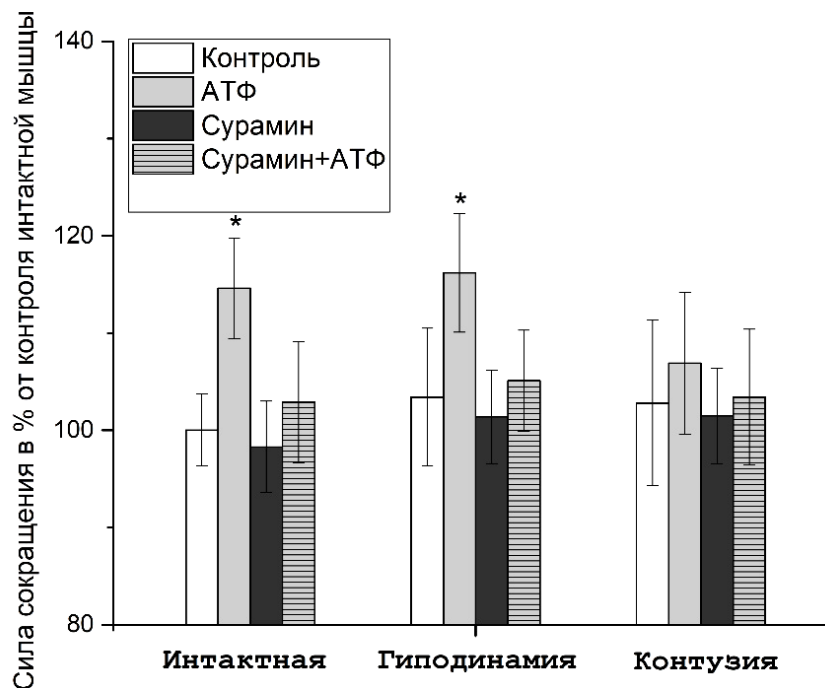


Рисунок 27 – Зависимость силы сокращений *m. diaphragma* крыс, вызванных электрической стимуляцией, от экспериментальных условий в контроле и добавлении в среду АТФ (100 мкМ), сурамина (100 мкМ) или их сочетание.

Примечание – $n = 7 \div 12$. * - $p < 0,05$ от контрольных значений

Сила сокращения *m. EDL* интактных крыс составила $0,75 \pm 0,039$ г ($n = 10$), что было принято за 100 %. Гипогравитационная разгрузка усиливала сократимость исследуемой мышцы, так, сила сокращения составила $121,1 \pm 7,1$ ($n = 9$; $p < 0,05$) от исходных значений на интактной мышце (Рисунок 28). В противоположность этому контузионная травма спинного мозга сказывается снижением силы сокращения до $86,6 \pm 7,2$ % ($n = 10$; $p < 0,05$; Рисунок 28) от контроля на интактной мышце.

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 $108,6 \pm 2,9 \%$ ($n = 9$; $p < 0,05$; Рисунок 28) на *m. EDL* крыс подвергшихся антиортостатическому вывешиванию. На фоне контузии не наблюдалось значимой АТФ-индуцированной модуляции.

Сурамин в концентрации 100 мкМ никаких достоверных эффектов не проявил. При этом, на его фоне почти полностью угнеталось действие экзогенной АТФ (100 мкМ).

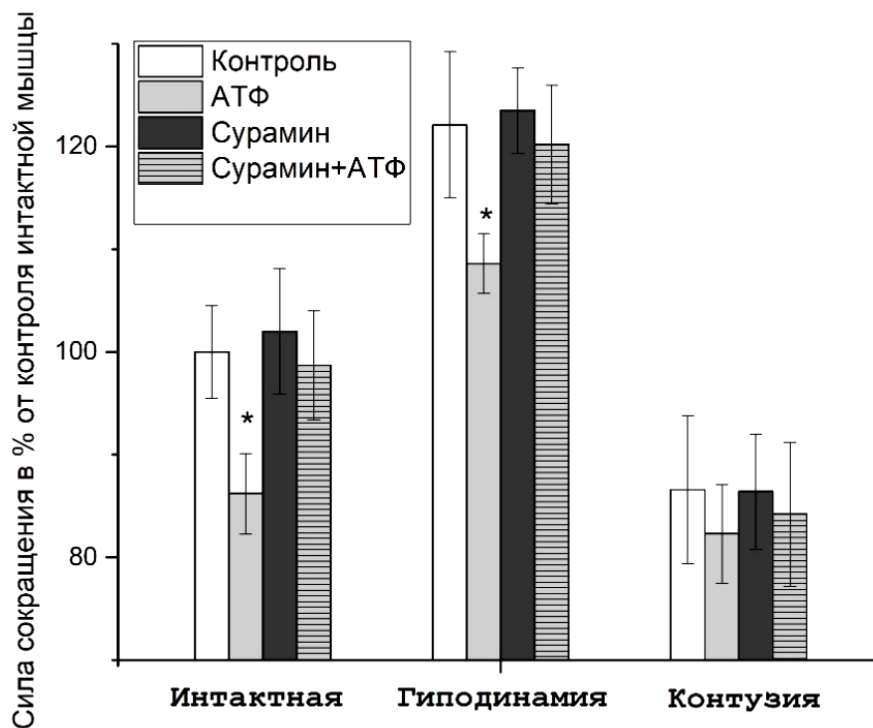


Рисунок 28 – Зависимость силы сокращений *m. EDL* крыс, вызванных электрической стимуляцией, от экспериментальных условий в контроле и добавлении в среду АТФ (100 мкМ), сурамина (100 мкМ) или их сочетание.

Примечание – $n = 9 \div 10$; * - $p < 0,05$ от контрольных значений

3.16 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 ($p < 0,05$) и модификацию временных параметров (Рисунок 29, Таблица 11). 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.

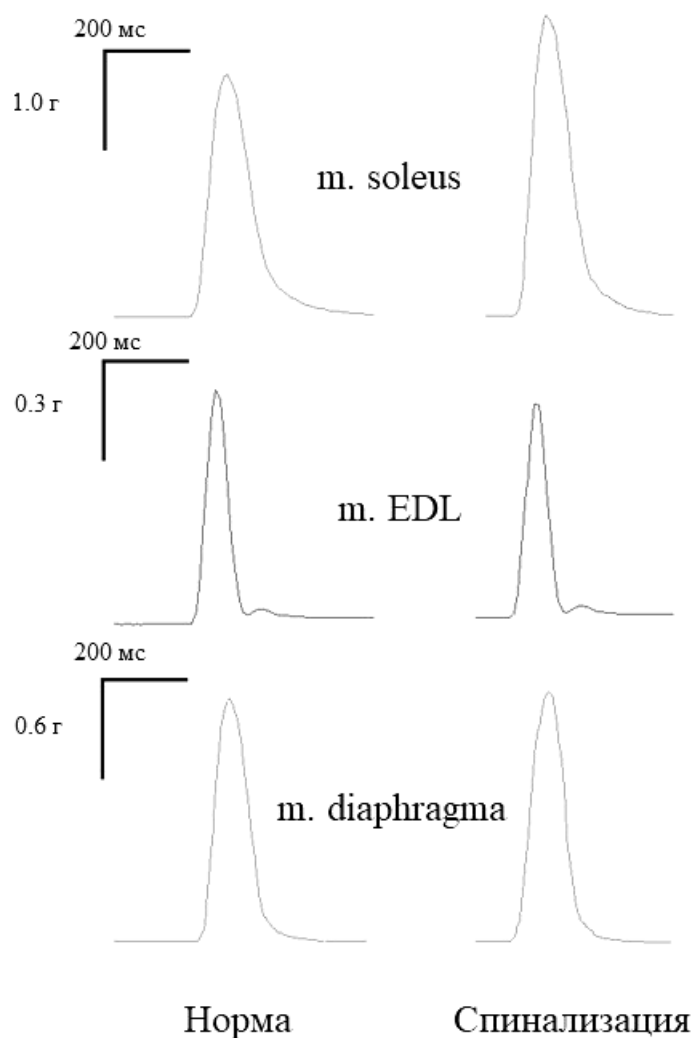


Рисунок 29 – Вид одиночных сократительных ответов *m. soleus*, *m. EDL* и *m. diaphragma* вызванных электрической стимуляцией в норме и после спинализации (представлены отдельные репрезентативные треки)

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 (Таблица 11).

Сурамин в концентрации 100 мкМ никаких достоверных эффектов не проявил. При этом, на его фоне почти полностью угнеталось действие экзогенной АТФ (100 мкМ) на всех исследуемых объектах (Таблица 11).

Полученные результаты показывают, что после травмы спинного мозга происходит значительное ухудшение функции периферической нервной системы. Изменение в синаптическом звене передачи сигнала свидетельствует в пользу дегенерационных изменений в аксонах после поражения верхнего уровня спинного мозга.

Таблица 11 – Зависимость сократительных параметров исследованных мышц крыс, вызванных электрической стимуляцией, от экспериментальных условий. n=10÷12

Экспериментальные условия	Параметр	Контроль	АТФ (100 мкМ)	Сурамин (100 мкМ)	Сурамин+АТФ (100 мкМ)
<i>m. soleus</i>					
Норма (n=10)	СС	100,0±4,2	67,6±5,2*	104,3±3,9	98,5±7,1
	BC	0,081±0,004	0,083±0,006	0,080±0,004	0,079±0,005
	ВП/2	0,092±0,007	0,105±0,011	0,090±0,006	0,093±0,010
Спинализация (n=10)	СС	119,8±5,1 [#]	114,0±6,1	120,2±4,3 [#]	121,8±6,4 [#]
	BC	0,073±0,005	0,076±0,007	0,071±0,006	0,074±0,004
	ВП/2	0,101±0,009	0,116±0,010	0,098±0,008	0,105±0,010

Продолжение таблицы 11

Экспериментальные условия	Параметр	Контроль	АТФ (100 мкМ)	Сурамин (100 мкМ)	Сурамин+АТФ (100 мкМ)
<i>m. EDL</i>					
Норма (n=10)	СС	100,0±4,5	86,2±3,9*	102,0±6,1	98,7±5,3
	BC	0,057±0,003	0,056±0,005	0,059±0,004	0,058±0,006
	ВП/2	0,067±0,005	0,069±0,004	0,065±0,007	0,068±0,005
Спинализация (n=10)	СС	88,7±3,8 [#]	83,1±5,4	85,9±4,8 [#]	83,1±6,7 [#]
	BC	0,068±0,005	0,069±0,006	0,068±0,006	0,067±0,005
	ВП/2	0,071±0,006	0,073±0,007	0,070±0,005	0,073±0,004
<i>m. diaphragm</i>					
Норма (n=12)	СС	100,0±3,7	114,6±5,2*	98,3±4,7	102,9±6,2
	BC	0,065±0,004	0,066±0,003	0,064±0,006	0,064±0,004
	ВП/2	0,075±0,006	0,075±0,005	0,074±0,006	0,076±0,004
Спинализация (n=12)	СС	103,2±4,1	112,7±3,9*	102,0±4,9	103,8±7,5
	BC	0,071±0,005	0,070±0,003	0,069±0,004	0,072±0,004
	ВП/2	0,074±0,003	0,076±0,006	0,074±0,005	0,075±0,006

Примечание – * - $p < 0,05$ от контрольных значений, # - $p < 0,05$ от нормы. СС – сила сокращения в % от контроля, принятого за 100 %, BC – время сокращения в секундах, ВП/2 – время полурасслабления в секундах.

3.17 Влияние АТФ и сурамина на сокращения скелетных мышц мыши на модели бокового на модели расстройств аутистического спектра

Анализ ориентировочно-исследовательской активности в тесте «Открытое поле» показал, что у животных группы ВМА горизонтальная двигательная

активность (ГДА) была снижена по сравнению с контрольной группой (Рисунок 30).

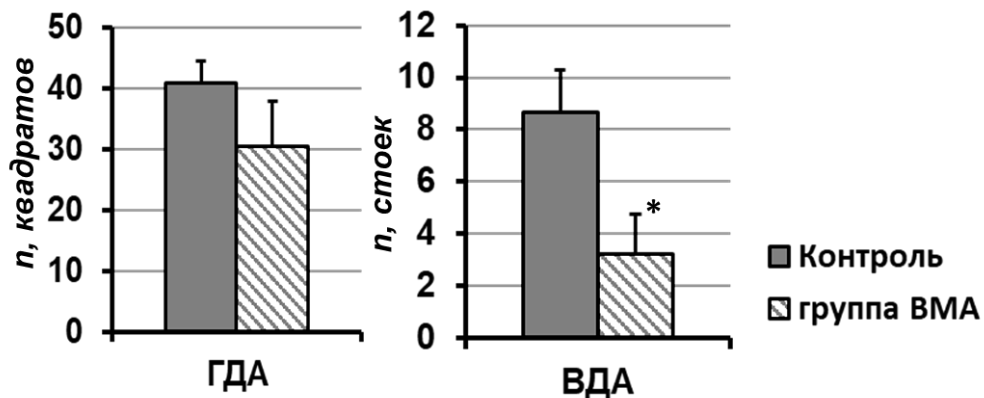


Рисунок 30 – Показатели горизонтальной (ГДА) и вертикальной (ВДА) двигательной активности животных контрольной группы и группы с воспроизведением модели аутизма (ВМА) в тесте «Открытое поле»; Примечание – данные представлены в виде среднего, планки погрешностей – в виде стандартного отклонения. * - $p < 0,05$ достоверность отличий по сравнению с контрольной группой

Количество пройденных квадратов составляло $30,5 \pm 7,5$ а в контрольной группе $41 \pm 3,6$. После выхода из центральной зоны поля возвращение в него не наблюдалось, что свидетельствует о более высокой тревожности животных этой группы. Вертикальная двигательная активность (ВДА), отражающая как двигательные, так и исследовательские реакции была ниже у животных группы ВМА и составляла $3,2 \pm 1,6$ вертикальных стоек ($p < 0,05$; Рисунок 30). У группы ВМА прослеживалась тенденция к пониженной двигательной активности, а также повышенной тревожности.

Были построены ангулограммы суставов задней конечности по записям видеофиксации движения, которые приведены на Рисунках 31а, 31б. По ангулограммам видно увеличение угла в фазу толчка у крыс группы ВМА по сравнению с контрольной группой.

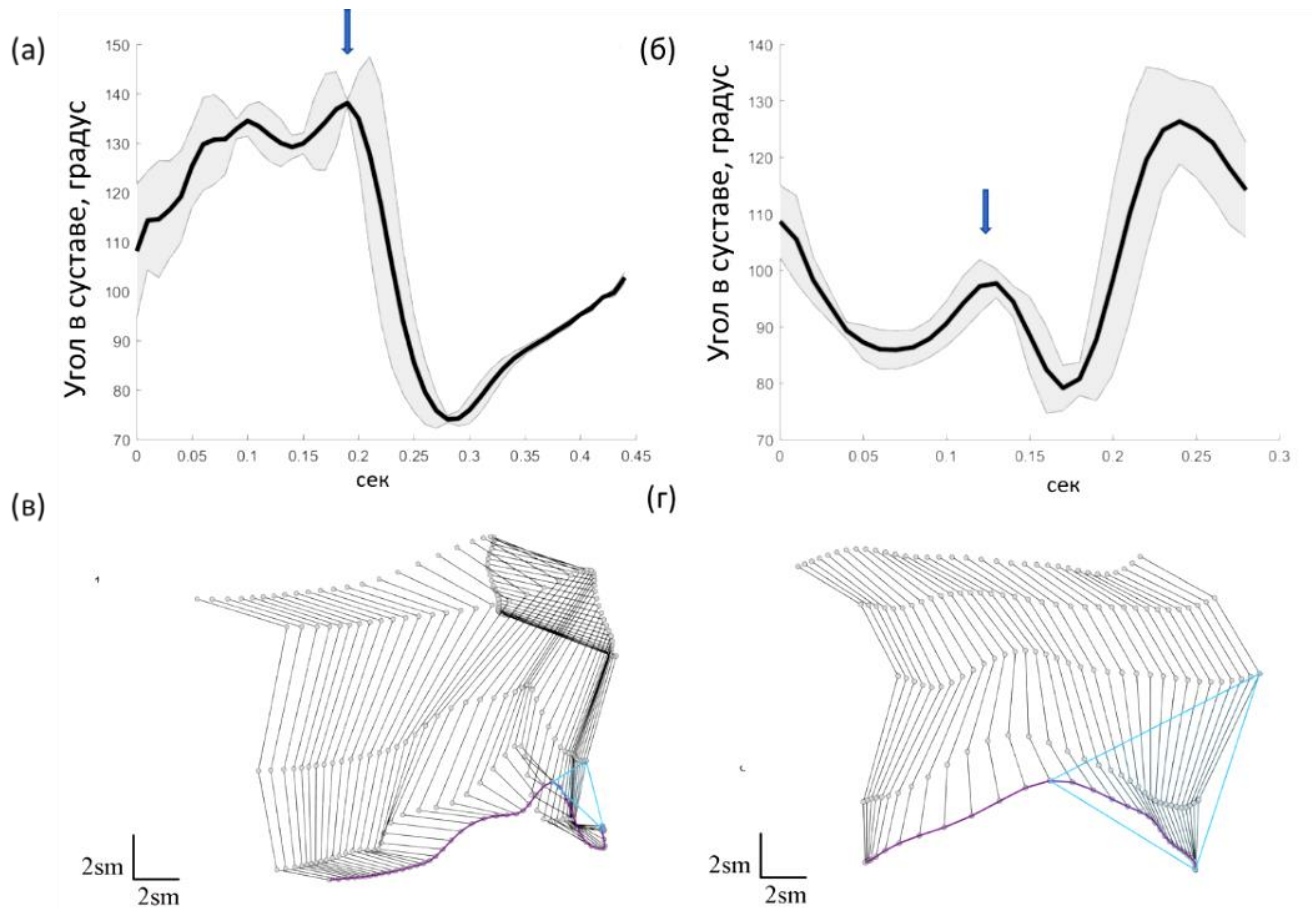


Рисунок 31 – Ангулограмма коленного сустава крыс группы с воспроизведением модели аутизма (ВМА) (а) и контрольной группы (б). Репрезентативное изображение положения задней конечности крыс на протяжении фазы шага у крыс в группе ВМА (в) и контрольной группы (г). Фиолетовой линией представлена траектория движения стопы, голубым треугольником показан объем движений задней конечности. Стрелками показан момент окончания фазы толчка

В первой трети цикла при окончании фазы толчка, при инициации движения наблюдались неадекватные движения у животных группы ВМА: крыса сжимала заднюю лапу, после чего следовал низкоамплитудный толчок (Рисунки 31в, 31г). Фаза переноса тела была короче во времени в группе ВМА. Такое движение может говорить о характерной тревожности данной группы, и пониженной двигательной функции. Однако изменения объёма движения в коленном и тазобедренном суставах были статистически не достоверны (Рисунок 32).

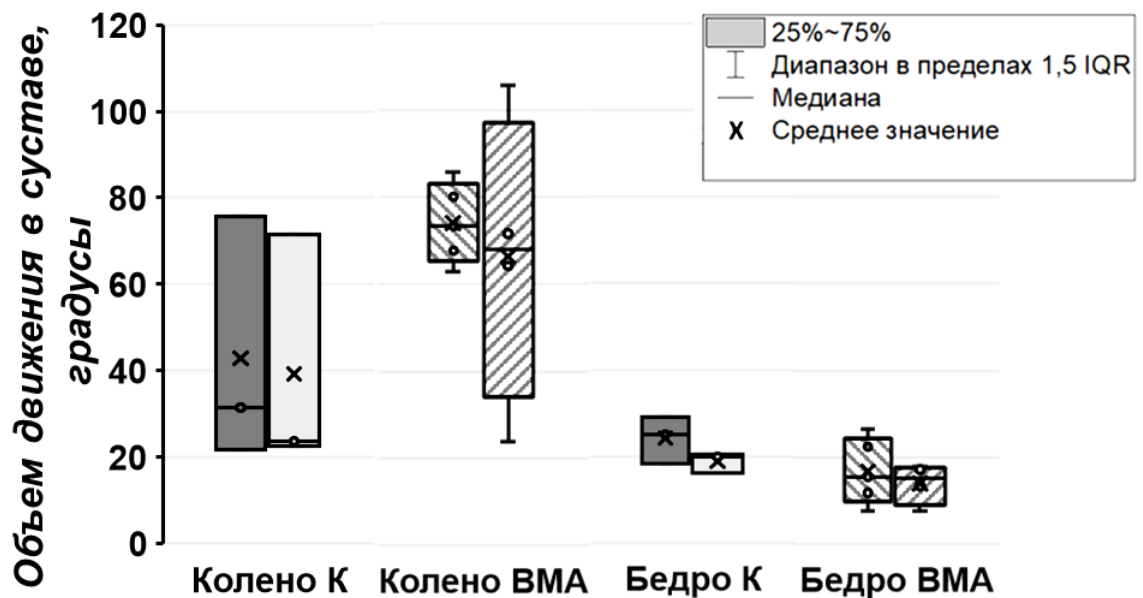


Рисунок 32 – Объём движения в суставах: коленном (колени) и тазобедренном (бедро) слева, справа в контрольной группе (К) и группы с воспроизведением модели аутизма (ВМА), данные представлены в виде медианы, разброс в группах – в виде интерквартильного размаха

У крысы группы ВМА было значительное снижение длины шага и увеличение длительности шага по сравнению с контрольной группой: 131 ± 38 мм ($p < 0,05$) и $0,63$ с ($p < 0,05$), соответственно. Высота подъёма ноги в обеих группах была одинаковой (Рисунок 33).

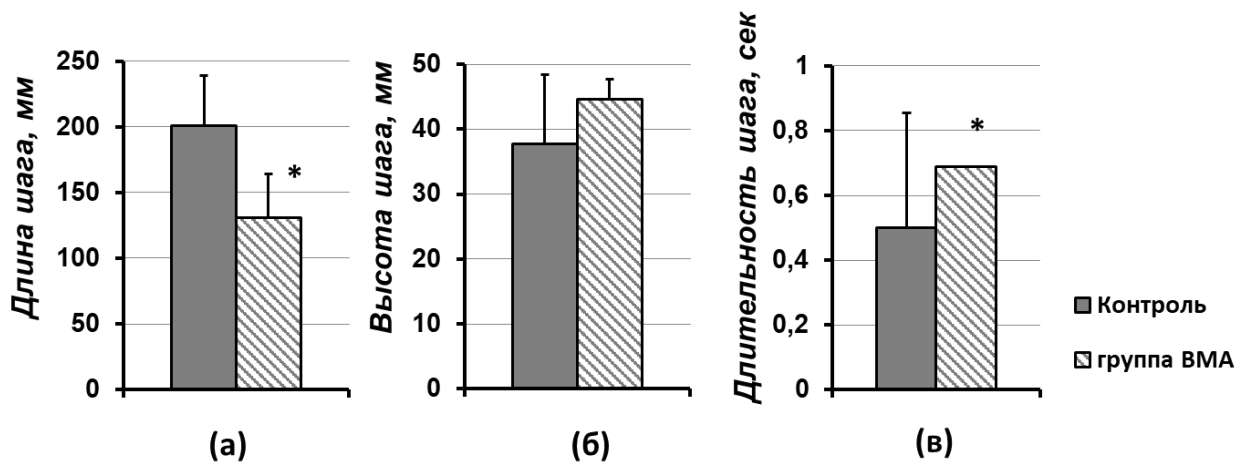


Рисунок 33 – Характеристики шага при выполнении движения в открытом поле определяемых с помощью системы видеозахвата движения (Vicon) у крыс двух групп контроль и группы с воспроизведением модели аутизма (ВМА).

Примечание: (а) длина шага, мм, (б) высота шага, мм и (в) длительность шага.

Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения. Примечание –

* - $p < 0,05$ статистически значимое различие между группами

Существуют доказательства [190, 325], подтверждающие вовлеченность синаптической компоненты периферических отделов нервной системы на различных моделях расстройств. Ключевым звеном пластичности в нервно-мышечном переходе является пуриnergическая трансдукция [223]. Поэтому было решено сравнить механическую активность мышц голени у крыс из контрольной группы и с моделью ВМА в условиях пуриnergической модуляции.

Полученные данные демонстрируют отсутствие значимых изменений в параметрах сокращений исследуемых мышц (Таблица 12). АТФ сохраняла значимую модулирующую способность, различий между сравниваемыми группами выявлено не было.

Таблица 12 – Зависимость сократительных параметров исследованных мышц крыс, вызванных электрической стимуляцией, от экспериментальных условий

Экспериментальные условия	Параметр	Фоновый уровень	АТФ (100 мкМ)	Сурамин (100 мкМ)	Сурамин+АТФ (100 мкМ)
<i>m. soleus</i>					
Контроль (n=12)	СС	100,0±3,8	73,1±6,4*	102,7±4,4	96,4±6,5
	ВС	0,083±0,005	0,082±0,004	0,081±0,005	0,080±0,003
	ВП/2	0,090±0,006	0,104±0,010	0,092±0,004	0,094±0,011
ВМА (n=12)	СС	98,6±5,1	74,8±5,9*	103,2±6,3	98,7±5,3
	ВС	0,081±0,004	0,079±0,006	0,080±0,004	0,078±0,006
	ВП/2	0,091±0,011	0,110±0,013	0,093±0,009	0,095±0,009
<i>m. EDL</i>					
Контроль (n=12)	СС	100,0±4,8	85,9±3,7*	101,9±4,6	99,2±4,5
	ВС	0,055±0,006	0,058±0,007	0,060±0,007	0,059±0,005
	ВП/2	0,068±0,004	0,070±0,006	0,066±0,005	0,069±0,004
ВМА (n=12)	СС	98,5±3,6	84,2±7,1*	97,9±6,3	96,1±5,2
	ВС	0,059±0,006	0,060±0,005	0,061±0,005	0,061±0,004
	ВП/2	0,070±0,005	0,072±0,008	0,071±0,007	0,070±0,005

Примечание – * - $p < 0,05$ от фонового уровня, # - $p < 0,05$ от контроля. СС – сила сокращения в % от контроля, принятого за 100 %, ВС – время сокращения в секундах, ВП/2 – время полурасслабления в секундах.

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

Усредненная по 10 экспериментам сила сокращения камбаловидной мышцы здоровых мышей составила $0,467 \pm 0,04$ г, время сокращения $0,12 \pm 0,02$ с и время полурасслабления $0,243 \pm 0,015$ сек. У мышей с моделью БАС наблюдали 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 (Рисунок 34).

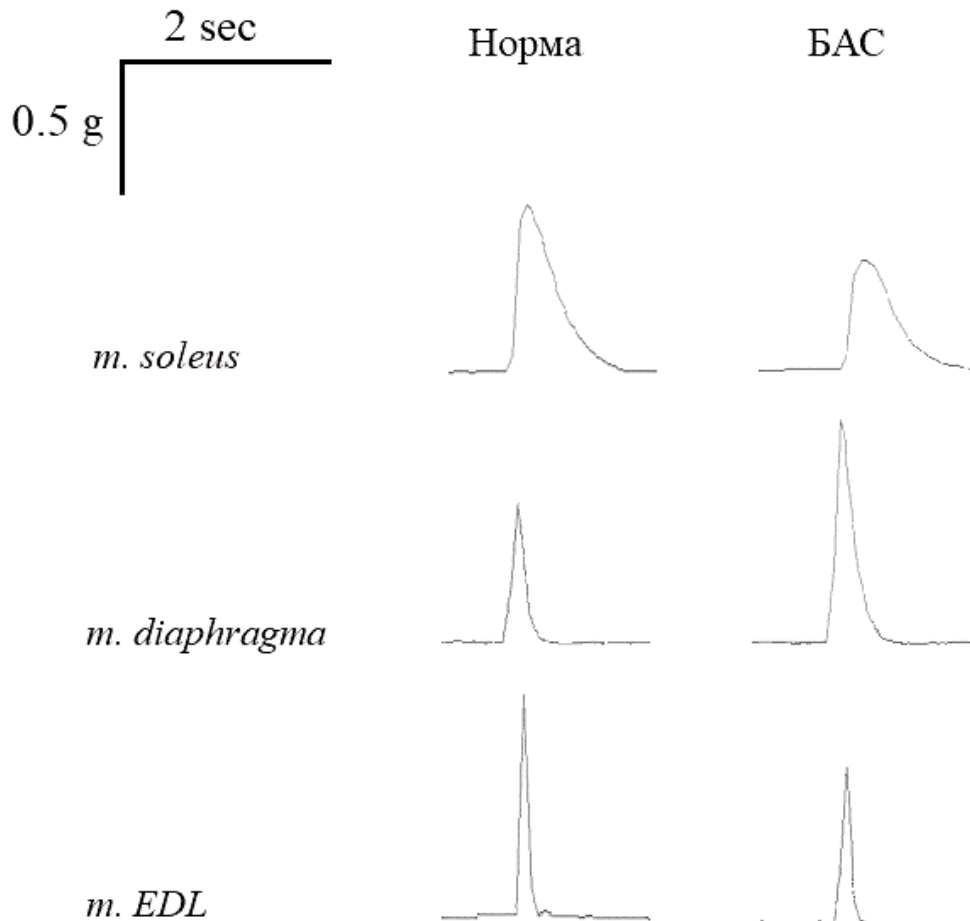


Рисунок 34 – Вид одиночных сократительных ответов *m. soleus*, *m. diaphragma* и *m. EDL* вызванных электрической стимуляцией в норме и при БАС (представлены отдельные репрезентативные треки)

АТФ в концентрации 100 мкМ обратимо потенцировала амплитуду вызванных стимуляцией электрическим полем сокращений интактной камбаловидной мышцы - до $118,7 \pm 3,9$ % ($n = 10$; $p < 0,05$; Рисунок 35). Однако не были получены достоверные данные на животных из группы БАС.

Неселективный антагонист P2-рецепторов сурамин в концентрации 100 мкМ никаких достоверных эффектов не проявил. При этом, на его фоне почти полностью угнеталось действие экзогенной АТФ (100 мкМ).

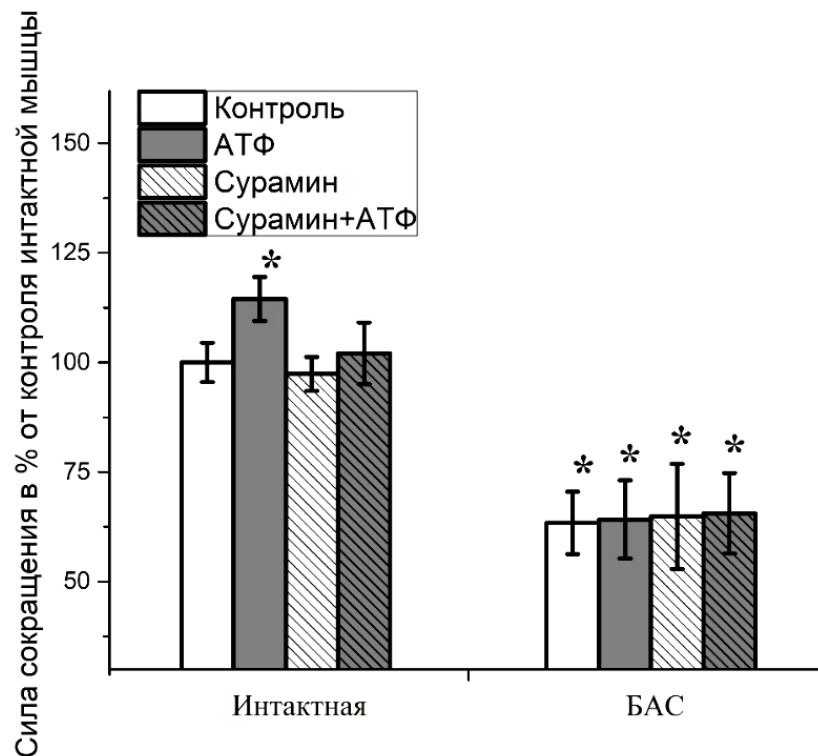


Рисунок 35 – Зависимость силы сокращений *m. soleus* мышцей, вызванных электрической стимуляцией, от экспериментальных условий в контроле и добавлении в среду АТФ (100 мкМ), сурамина (100 мкМ) или их сочетание.

Примечание – n=10. * - p < 0,05 от контрольных значений

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 $0,05 \pm 0,006$ сек. В отличие от других мышцей 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 $0,092 \pm 0,009$ с (n = 10; p < 0,05) по сравнению с интактными животными (Рисунок 34).

Апликация 100 мкМ АТФ на *m. diaphragma* обратимо усиливала контрактильную способность интактной мышцы до $118,7 \pm 3,9$ % ($n = 10$; $p < 0,05$; Рисунок 35). На животных с моделью БАС наблюдалось отсутствие модулирующей способности АТФ (Рисунок 36).

Сурамин в концентрации 100 мкМ никаких достоверных эффектов не проявил. При этом, на его фоне почти полностью угнеталось действие экзогенной АТФ (100мкМ).

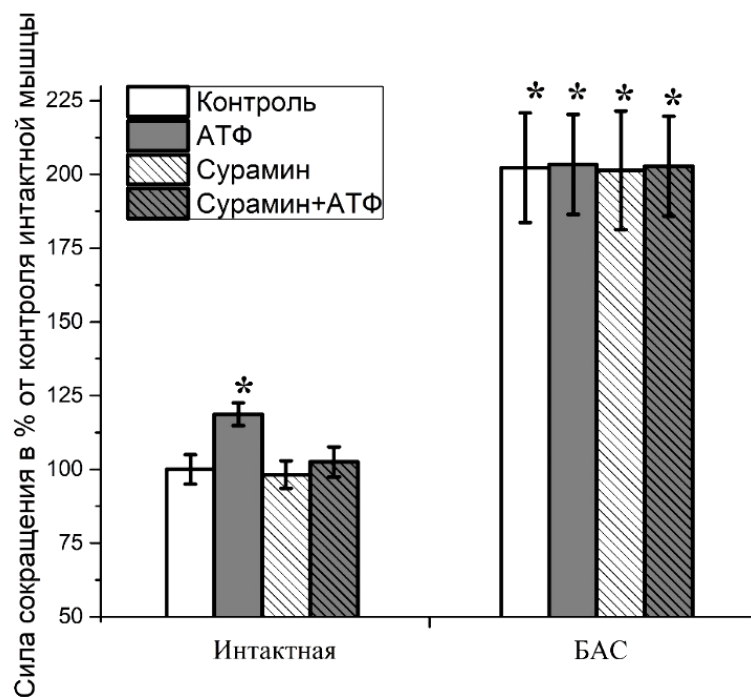


Рисунок 36 – Зависимость силы сокращений *m. diaphragma* мышцы, вызванных электрической стимуляцией, от экспериментальных условий в контроле и добавлении в среду АТФ (100 мкМ), сурамина (100 мкМ) или их сочетание.

Примечание – $n=10$. * - $p < 0,05$ от контрольных значений

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 $0,035 \pm 0,005$ сек. 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 (Рисунок 35).

Апликация 100 мкМ АТФ на *m. EDL* мышцы обратимо потенцировала контрактильную способность интактной мышцы до $115,2 \pm 4,3$ % ($n = 10$; $p < 0,05$, Рисунок 37). На фоне БАС не наблюдалось значимой АТФ-индуцированной модуляции.

Сурамин в концентрации 100 мкМ никаких достоверных эффектов не проявил. При этом, на его фоне почти полностью угнеталось действие экзогенной АТФ (100 мкМ).

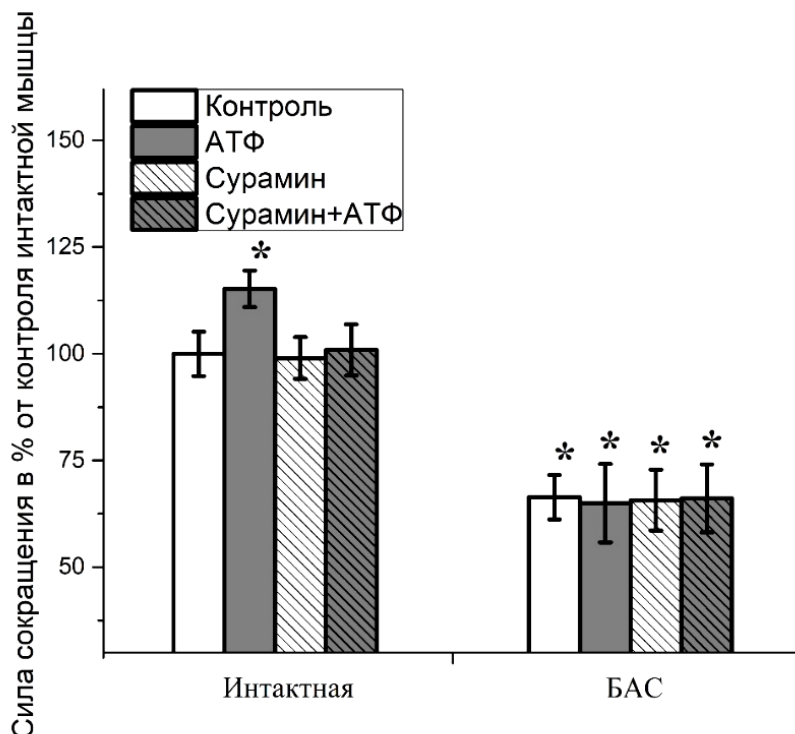


Рисунок 37 – Зависимость силы сокращений *m. EDL* мышцей, вызванных электрической стимуляцией, от экспериментальных условий в контроле и добавлении в среду АТФ (100 мкМ), сурамина (100 мкМ) или их сочетание. Примечание – $n = 10$. * - $p < 0,05$ от контрольных значений

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, нейромодуляция адениновыми нуклеотидами происходит либо напрямую, через активацию ионотропных P2X / метаботропных P2Y-рецепторов либо косвенно, после их внеклеточного распада до аденозина и последующей активации рецепторов P1, которые включают четыре различных подтипа (A₁, A_{2A}, A_{2B} и A₃) [316]. Нервные окончания, волокна скелетных мышц и шванновские клетки экспрессируют различные подтипы перечисленных рецепторов пуринов [181, 230, 253]. Тем не менее, физиологическая значимость АТФ и её метаболитов в модуляции нервно-мышечной передачи далеко не общепризнана главным образом потому, что исследования проводились в рамках различных экспериментальных условий на разных препаратах разнообразных животных. Бывало, что даже не предпринималось попыток отделить P2- от P1-опосредованных эффектов [274].

Мы попытались выявить собственные механизмы модуляционных эффектов как АТФ, так и аденозина в синапсах быстрых и медленных мышц голени крысы. Вначале были проведены эксперименты с аппликацией экзогенного АТФ. В экспериментах было установлено, что АТФ угнетает сократительную активность медленной камбаловидной мышцы крысы и, чуть менее, быстрого типа мышцы - длинного разгибателя пальцев. Эти два типа мышц имеют определенные различия. Например, установлено, что они имеют разные изоформы кальциевого насоса саркоплазматического ретикулума [320], и что количество Ca²⁺ в саркоплазматическом ретикулуме медленных мышц больше, нежели в быстрых [139]. Механизм угнетающего действия АТФ может быть связан со снижением выброса Ca²⁺ из саркоплазматического ретикулума, как было ранее показано для АДФ в медленных волокнах камбаловидной мышцы крысы [210]. Сурамин, неселективный блокатор P2Y рецепторов устранял данное действие АТФ. Таким образом, можно предположить, что АТФ проявляет свой угнетающий эффект на сокращения фазных мышц крысы, влияя на P2Y рецепторы. Ранее было показано участие пресинаптических P2Y рецепторов в ингибирующем влиянии АТФ на

нервно-мышечную передачу в портняжной мышце лягушки [105]. Еще одним подтверждением данного предположения является то, что α, β -те-АТФ, преимущественно действующий на P2X рецепторы, в предыдущих наших экспериментах не оказал никакого влияния на сокращения ни быстрой, ни медленной фазных скелетных мышц крысы [223].

Было показано, что угнетающий квантовый выход в синапсах амфибий эффект АТФ опосредуют связанные с P2Y₁₂-рецепторами чувствительные к коклюшному токсину G_{i/o}-белки [155, 223]. В представленных в данной работе данных экспериментов N-этилмалеимид, антагонист G-белков, предотвращает модулирующее действие используемых пуринов, еще раз подтверждая, в том числе, задействование в ингибиторном эффекте АТФ именно метаболитных рецепторов.

Активация метаболитных P2Y рецепторов может задействовать обширный механизм, который, на примере нервно-мышечного перехода амфибий, включает продукцию активных форм кислорода (H₂O₂) и простагландина E₂, снижающего поступления Ca²⁺ в окончания двигательных нервов лягушки [155, 223]. Но первоначально активирующий импульс с P2Y-рецептора должен передаваться через G-белок на первичное звено внутриклеточных вторичных посредников – фосфолипазу или циклазу. В следующей серии экспериментов проверяли выраженность эффекта АТФ на фоне хелеритрина, блокатора протеинкиназы C, специфичной для внутриклеточной метаболической ветви фосфолипазы C. Оказалось, что хелеритрин устраняет ингибиторное действие АТФ на препарате как быстрой, так и медленной мышц. На теплокровных участие внутриклеточного фосфолипаза C – метаболического пути ранее была показана на лишь на препаратах диафрагмы [223, 247].

Конечный метаболит АТФ, аденозин, как было сказано, может осуществлять свое действие через A₁, A_{2A}, A_{2B} или A₃ рецепторы. У грызунов A₁R и A_{2A}R проявляют высокое сродство к аденозину, тогда как A_{2B}R и A₃R являются рецепторами с низким сродством [316]. A₁ и A₃ рецепторы связаны с G_{i/o} - белком, в то время как A_{2A} и A_{2B} предпочтительно связаны с G_s - белком. Таким образом,

активация A_{2A} и A_{2B} обычно приводит к стимуляции аденилатциклазы, что приводит к увеличению внутриклеточного 3'-5'-циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) и последующей активации протеинкиназы A (РКА). И наоборот, активация A_1 и A_3 приводят к подавлению активности аденилатциклазы, таким образом снижая уровень цАМФ и активацию РКА [174]. Что примечательно, эти рецепторы могут также связываться с неканоническими путями, регулируя, таким образом, внутриклеточные концентрации Ca^{2+} и/или K^+ посредством активации механизмов, связанных с G_q -белком; другие включают прямое вмешательство с ионными токами через плазматическую мембрану через $\beta\gamma$ субъединицы G -белков [178, 301].

В экспериментах применяли N -этилмалеимид - ингибитор $G_{i/o}$, который полностью устранил ингибиторное действие аденозина. Это может означать, что ингибиторный эффект опосредуется активацией A_1 либо A_3 рецептора. Продолжив анализ далее, выяснили, что на фоне антагониста A_1 рецепторов ДРСРХ аппликация аденозина вызывала потенцирующее действие.

Ранее было продемонстрировано электрофизиологическими и нейрхимическими методами, что A_1 -ингибирующие и A_2 -возбуждающие рецепторы сосуществуют на окончаниях диафрагмального нерва крысы для тонкой настройки регуляции экзоцитоза АХ [87]. Экспериментальные данные нашей группы показали, что и в не дыхательной скелетной мышце активирует как A_1 , так и A_{2A} – так как на фоне ДРСРХ проявилась потенцирующее последствие именно активации A_{2A} рецепторов! Эта специфика, которая обычно наблюдается в диафрагмальных и центральных синапсах [23, 108, 112, 130], может быть связано с близостью экто-5'-нуклеотидазы/CD73 и A_{2A} , что способствует активации этого подтипа рецепторов после образования аденозина при распаде АМФ [23, 112].

Опосредованное A_{2A} облегчение высвобождения АХ из двигательных нервных окончаний, как полагают, в основном вызваны обычно «спокойные» высокопроизводительные кальциевые каналы L -типа ($Cav1$), которые обеспечивают приток Ca^{2+} . При превалировании работы кальциевых каналов P/Q -

типа (Cav2,1) каналы L-типа десенсibilизированы, например, во время высокочастотного возбуждения нейронов [86, 246, 334]. И в наших экспериментах на фоне блокаторов кальциевых каналов L-типа облегчающий эффект аденозина пропал.

Механизм последующей активации A_{2A} двигательного окончания зависит от образования цАМФ аценилатциклазой [84, 85], что приводит к стимуляции активности РКА и последующему Ca^{2+} - притоку через L-тип кальциевых каналов [245, 351]. Что характерно, в представленных в данной статье результатах экспериментов на фоне ингибитора ПКА не переставал наблюдаться облегчающее действие аденозина.

Интересно, что в мионевральном переходе лягушки активация A_1 ингибирует высвобождение АХ через Ca^{2+} -независимый механизм, что предполагает прямое вмешательство в белки, участвующие в везикулярном экзоцитозе [155, 223]. Снижение функции A_{2A} -рецепторов, по-видимому, является отличительной чертой старения и некоторых нервно-мышечных расстройств [316].

Подытоживая, стоит отметить, что продемонстрированные в данной работе два пуриnergических пути модуляции вызванного экзоцитоза медиатора дополняют друг друга (Рисунок 38). Ведь ингибиторное действие АТФ в синаптической щели чаще наблюдается при низких частоты нейронной стимуляции (≤ 1 Гц) [316]. И значит, что именно аденозин, активируя как пресинаптические ингибирующие A_1 , так и облегчающие A_{2A} рецепторы в зависимости от парадигмы ситуации, берет на себя основное подстраивающее действие [88, 244].

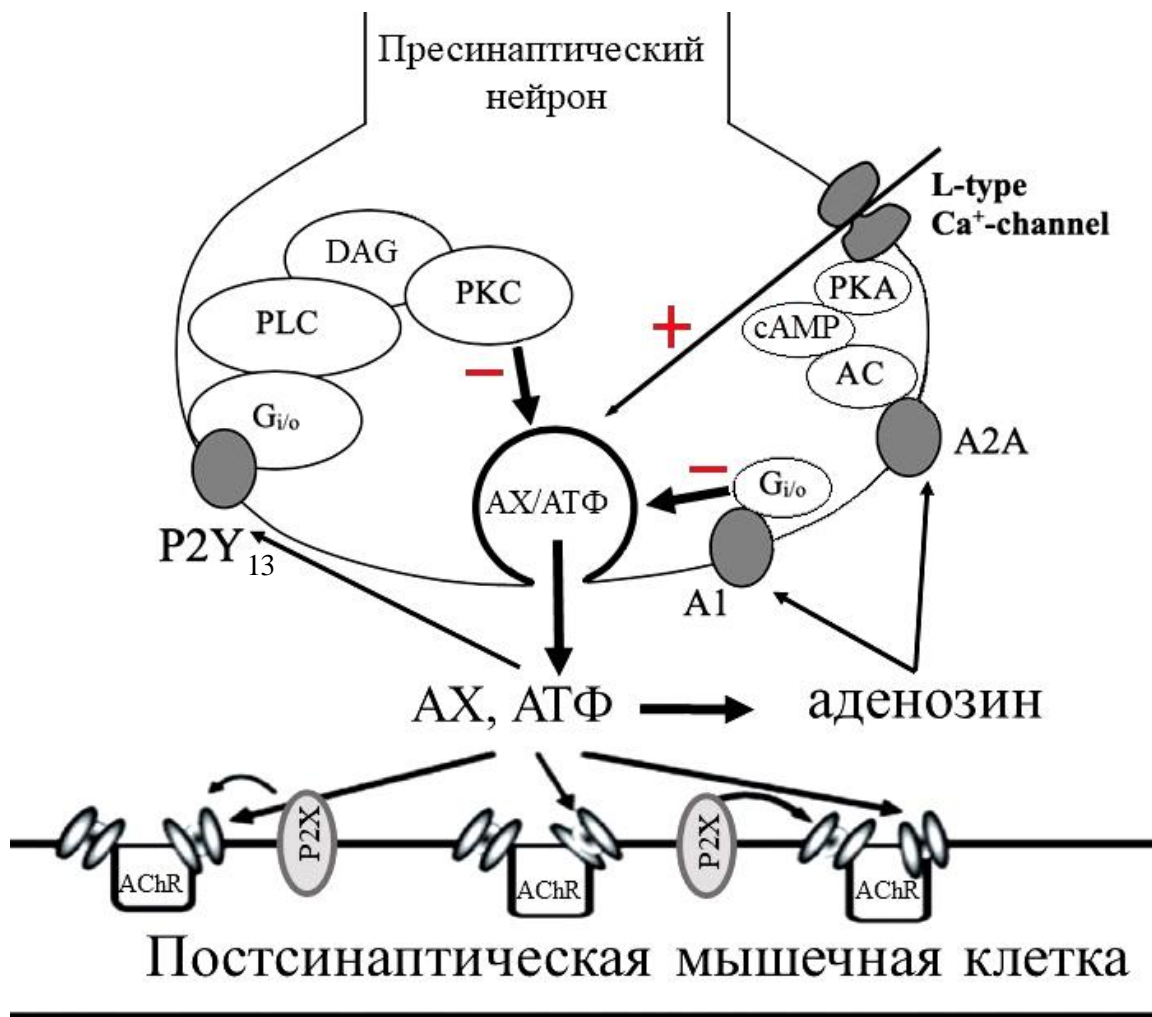


Рисунок 38 – Предполагаемая схема пуринергической регуляции мионевральной передачи скелетных мышц теплокровных и направленность действия использованных в исследовании фармакологических агентов. Показано окончание мотонейрона. Представлен синаптический пузырьк – везикула, заполненная, помимо медиатора ACh (ацетилхолина), АТФ. Показаны экзоцитоз содержимого везикул, гидролиз АТФ до аденозина в синаптической щели; активация аденозином A₁ – и A_{2A} – рецепторов, а АТФ – P2Y – рецепторов, и регуляция ими экзоцитоза по принципу обратной связи посредством пресинаптических внутриклеточных механизмов. Обозначения: РКС – протеинкиназа С, DAG – диацилглицерол, PLC – фосфолипаза С, РКА – протеинкиназа А, сАМР – 3'-5'-циклический аденозинмонофосфат, АС – аденилатциклаза

Давно известно, что изменение температуры резко влияет на характер мышечной активности конечностей. Одна из самых ранних доступных научных работ по этому вопросу [106] начинается со следующей фразы: "Хорошо известно, что сократительный акт менее продолжителен по времени при повышенной температуре, чем при более низкой, однако, по-прежнему остаются неясными влияние температуры на механику сократимости мышцы". Практически в таком же положении этот вопрос остается и на настоящий момент [131, 296]. При этом, если стимулировать непосредственно саму мышцу, то изменение температуры уже не оказывает такого влияния. То есть причина обсуждаемого явления - синаптическая.

Считалось, что изменения в мышцах при низкой температуре возникают по причине снижения активности ферментных систем [90, 209] или процессов энергопродукции [43, 213]. В противовес этому, высказывается мнение, что температурная чувствительность метаболических процессов в двигательных единицах не может оправдать столь драматические изменения в характере сокращения всего мышечного органа при изменении температуры [365].

К настоящему моменту становится предельно ясным, что столь драматические изменения в сократительных ответах при гипотермии не могут быть опосредованы изменением активности основного модулятора синаптической передачи – АТФ. Совершив ряд собственных экспериментов, можно предложить возможное решение поставленного вопроса.

Ответы, опосредуемые P2-рецепторами, являются термозависимыми [68, 204]. В 2002 году было описано температурозависимое действие АТФ на сократимость гладкой мускулатуры [331], а в 2005 году – скелетной [342]. Было установлено, что АТФ угнетала токи концевой пластинки и сокращение портняжной мышцы лягушки, вызванные стимуляцией электрическим полем, при 17 °С почти в два раза эффективней, чем при 27 °С.

Далее в сравнительных экспериментах при гипотермии были исследованы пре- и постсинаптические эффекты АТФ на амплитудные параметры одиночных сократительных ответов быстрых и медленных мышц теплокровных [115, 340,

354]. В экспериментах на мышцах голени крысы выяснилось, что АТФ обладает негативными пресинаптическим модуляционным эффектом в нервно-мышечном переходе быстрой и медленной мышц и постсинаптическим у быстрой. Что касается постсинаптического эффекта на медленной мышце *m. soleus*, то там регистрировалось облегчающее действие АТФ на амплитуду сократительного ответа [115]. Что характерно, этот эффект максимально был выражен при гипотермии (14 °С).

В представленных экспериментах при снижении температуры происходило увеличение времени полурасслабления медленной мышцы (*m. soleus*), но не быстрой *m. EDL*. Для выявления механизма была использована методика карбахолин-вызванного сокращения, при использовании которой наблюдалось схожие эффекты, что говорит о постсинаптической природе расширения сократительного ответа медленной мышцы под влиянием АТФ.

Несмотря на то, что снижение температуры значительно уменьшает выброс АХ в мионевральном синапсе, на препаратах диафрагмы крысы было показано, что сокращения смешанной мышцы поддерживается и облегчается угнетением ферментативного распада медиатора и гиперчувствительностью постсинаптических холинорецепторов [344]. Аналогично, и в наших предыдущих экспериментах на препаратах медленной мускулатуры амплитуда сокращений камбаловидной мышцы крысы повышалась при гипотермии, независимо от того, вызвано ли это было прямой (карбахолин) или непрямой (электростимуляция) активацией постсинаптических рецепторов [115]. Предположительно, эти эффекты наблюдаются в основном за счет увеличения чувствительности никотиновых рецепторов под действием гипотермии. Снижение активности фермента, разрушающего медиатор, вероятно, менее важно здесь, так как карбахолин менее активно гидролизруется холинэстеразой.

Установлено, что никотиновый рецептор содержит центры связывания АТФ [65, 148]. Установлено также, что АТФ увеличивает время открытого состояния и частоту открытий АХ-активируемых ионных каналов в эмбриональных мышцах

[140, 141]. Есть свидетельства, что и в зрелых мышцах АТФ также может проявлять потенцирующий эффект [208, 223].

Также ранее было установлено, что при ингибировании ацетилхолинэстеразы замедляется спад одиночного тока концевой пластинки, что свидетельствует о постсинаптической природе потенцирующего эффекта. Экзогенная АТФ действует на спад токов аналогично экзогенному АХ, также способному вызвать замедление спада синаптических сигналов [208].

Для регистрации «гладких» тетанических сокращений увеличивали частоту электрических импульсов до 12,5 Гц для *m. soleus* и до 17,5 Гц для *m. EDL*. Оказалось, что АТФ при реперных температурах (37, 26 и 14 °С) проявлял эффекты на временные параметры тетанических сокращений. Наблюдалось снижение частоты слияния медленной мышцы, но не быстрой в присутствии АТФ. Для подтверждения постсинаптической природы наблюдаемого явления в медленной мышце проводили эксперименты в условиях повышенного кальция (7,5 мМ), при котором, как показано [218], нивелируются пресинаптические эффекты АТФ.

Передний фронт гладких тетанусов обеих мышц, зафиксированных в условиях *in vitro*, был «классической» формы: имел постоянный прирост к силе в районе фазы «плато» [252]. С другой стороны, в сериях с гладкими тетанусами обеих используемых мышц были получены эффекты пуриновых агентов, схожие с наблюдаемыми в экспериментах с одиночными мышечными сокращениями. Это полностью позволяет соотнести между собой результаты ключевых серий экспериментов на электровызванных одиночных мышечных сокращениях и карбахолин-вызванных «паттернах», схожих по природе с тетанусами [252].

Мы предполагаем, что сильный облегчающий постсинаптический эффект, который проявляет АТФ, скрывая более слабый пресинаптический, с уменьшением температуры позволяет осуществлять базовые локомоции даже животным, подвергнутым глубокому охлаждению. Имеются недавно опубликованные данные об осуществлении животными даже в состоянии

гибернации выраженных движений именно камбаловидной мышцей, сравнимых с теми, что наблюдаются у активных особей [313].

В представленных здесь результатах экспериментов 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. Сурамин устранял эффект как самого АТФ, так и, частично, гипотермии. Трипаноцидный препарат сурамин имеет широкий спектр фармакологических эффектов [323], включая неселективную блокаду P2-рецепторов [321] и угнетение нескольких семейств экто-нуклеотидаз, разрушающих АТФ [38, 70]. В наших экспериментах он не только противодействовал эффектам АТФ на сократительные параметры мышц крысы, но и предотвращал гипотермия-зависимые изменения сократимости - независимо от вида стимуляции. Это может означать, что так же, как и в других органах [297], в скелетных мышцах теплокровных существует естественный механизм, с помощью которого P2-рецепторы опосредуют температурные изменения, которые становятся более заметными при низких температурах и которые почти полностью угнетаются сурамином.

Так почему постсинаптический эффект АТФ на расширение сократительного ответа проявляется именно в синапсе медленной мышцы? Известно, что площадь синаптического образования в два раза больше в камбаловидной мышце, чем в длинном разгибателе пальцев [126].

Также известна возможность взаимных смещений ионных каналов, свободно «плавающих» в липидной фазе хемовозбудимой клеточной мембраны, обусловленных амперовским взаимодействием протекающих через них токов [202]. Несмотря на то, что эти силы крайне слабые, по данным моделирования при отсутствии теплового движения и долговременной синаптической активности они могли бы приводить к изменению пространственного взаиморасположения ионных каналов. амперовские силы при гипотермии могут инициировать кластеризацию ацетилхолинактивируемых рецепторно-канальных комплексов в областях постсинаптической мембраны, расположенных напротив активных зон

пресинаптической мембраны, иначе говоря, напротив мест выделения квантов медиатора. И такое при большей площади синапса у медленной мышцы именно в ней и предпочтительно возникает.

На основании изложенных данных можно предположить, что температурочувствительные тонические эффекты эндогенной АТФ на силу и время полурасслабления сокращений лежат в основе феноменологии изменения мышечных ответов при снижении температуры.

Нами выявлены подтипы рецепторов АТФ, задействованных в синаптической модуляции. В быстрых и медленных скелетных мышцах крыс выявлены $P2Y_{13}$ (пресинаптические) и $P2X_1$, $P2X_2$ (постсинаптические) подтипы $P2$ -рецепторов, другие подтипы $P2X$ и $P2Y$ не обнаружены. Как уже было указано, пресинаптические модуляционные эффекты пуринов опосредованы активацией рецепторов пуринов, G-белка, систем внутриклеточных вторичных посредников и кальциевых каналов. Постсинаптическое действие же АТФ связано с изменением времени жизни открытых ионных каналов холинорецептора. Максимально этот эффект выражен при денервации. В этих условиях впервые в мире зарегистрирована способность АТФ вызывать сокращение мышц.

Пуринергическая модуляция синаптической передачи, в целом, усиливается при ряде патологических состояний, сопровождающихся снижением функции двигательных единиц. Пресинаптическое действие АТФ опосредует патофизиологию ряда нейропатологий, травм спинного мозга и нейродегенеративных заболеваний. Постсинаптический эффект АТФ опосредует гипогравитационный двигательный синдром. Гипотермия, микрогравитация сопровождаются изменениями пуринергической модуляции, приложенной к постсинаптическому полюсу, а при моделировании травм, боковом амиотрофическом склерозе - к пресинаптическому.

Так, при моделировании травм спинного мозга, спинализации и денервации наблюдалось снижение модулирующей способности АТФ. При моделировании белковой сенсibilизации наблюдалось усиление модулирующей способности АТФ. Блокада $P2$ -рецепторов сураминол отменяет усиленный эффект АТФ. При

моделировании же аутистического расстройства эффекты АТФ на сократительную активность быстрой, медленной и смешанной мышц не изменяются, тогда как при моделировании бокового амиотрофического склероза эффекты АТФ по увеличению силы сокращений всех трёх видов мышц не проявлялись при общем выраженном снижении силы сокращений быстрой и медленной мышц и увеличении – смешанной мышцы. На всех трёх изученных типах мышц эффекты сурамина и АТФ не различались при моделировании бокового амиотрофического склероза.

Пуриновая сигнализация, участвующая во всех вышеупомянутых эффектах, требует дальнейших всесторонних исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

До настоящей работы не был так всесторонне изучен исключительно пресинаптический модуляционный эффект аденозина и так дополняющее его как пре-, так и постсинаптическое действие АТФ в нервно-мышечном синапсе.

АТФ, будучи хорошо известным универсальным макроэргическим соединением, играет важнейшую роль сигнальной молекулы, т.к. в совокупности со своим конечным метаболитом аденозином модулирует вызванный экзоцитоз содержимого синаптических везикул через рецепторы нервной терминали P2 и P1, соответственно. В настоящей работе с использованием механомиографического метода были проанализированы пресинаптические механизмы трансдукции АТФ и аденозина в нервно-мышечном синапсе крысы. N-этилмалеимид, антагонист G-белков, предотвращает модулирующее действие как АТФ, так и аденозина. Действие АТФ отменяется специфическим ингибитором PLC - хелеритрином, тогда как ингибиторное действие аденозина потенцируется блокаторами протеинкиназы A (Rp-cAMPS) и Ca²⁺-каналов L-типа (нитрендипином). Полученные данные свидетельствуют о передаче активирующего импульса со связанных с G-белком рецепторов АТФ на фосфолипазу C в терминалях мотонейронов крыс. Пресинаптический эффект аденозина складывается из двух механизмов: отрицательного и потенцирующего действия. На фоне антагониста A1 рецепторов DPCPX аппликация аденозина вызывала потенцирующее действие. Оказалось, что оно связано с активацией A_{2A} рецепторов, протеинкиназы A и открытием кальциевых каналов L-типа. Комбинированный механизм модулирующего действия АТФ и аденозина обеспечивает тонкую настройку синапса на изменяющиеся условия.

Нами показано, что снижение температуры приводит к усилению синаптических модуляционных эффектов АТФ, но не её конечного производного - аденозина. При снижении температуры происходило увеличение времени полурасслабления медленной мышцы (*m. soleus*), но не быстрой (*m. EDL*). Для выявления механизма была использована методика карбахолин-вызванного

сокращения, при использовании которой наблюдалось схожие эффекты, что говорит о постсинаптической природе расширения контрактильного ответа *m. soleus* на фоне АТФ (Приложения А – П). Чтобы зарегистрировать «гладкие» тетанусы, увеличивали частоту электростимуляции. При понижении температуры наблюдалось снижение частоты слияния медленной мышцы, но не быстрой в присутствии АТФ, а сурамин устранял эффект как самого АТФ, так и, частично, гипотермии. Для подтверждения постсинаптической природы наблюдаемого явления в медленной мышце проводили эксперименты в условиях повышенного кальция, при котором, как показано, нивелируются пресинаптические эффекты АТФ. Получается, что в известном факте изменения формы мышечных ответов при гипотермии, собственно, лежит температурочувствительное тоническое действие эндогенной АТФ на силу и время полурасслабления контрактильных актов. Так же, как было показано в данной работе, при понижении температуры снижается активности экто-нуклеотидаз.

Нами выявлены подтипы рецепторов АТФ, задействованных в синаптической модуляции. В быстрых и медленных скелетных мышцах крыс выявлены $P2Y_{13}$ (пресинаптические) и $P2X_1$, $P2X_2$ (постсинаптические) подтипы $P2$ -рецепторов, другие подтипы $P2X$ и $P2Y$ не обнаружены. Как уже было указано, пресинаптические модуляционные эффекты пуринов опосредованы активацией рецепторов пуринов, G-белка, систем внутриклеточных вторичных посредников и кальциевых каналов. Постсинаптическое действие же АТФ связано с изменением времени жизни открытых ионных каналов холинорецептора. Максимально этот эффект выражен при денервации. В этих условиях впервые в мире зарегистрирована способность АТФ вызывать сокращение мышц.

Пуринергическая модуляция синаптической передачи, в целом, усиливается при ряде патологических состояний, сопровождающихся снижением функции двигательных единиц. Пресинаптическое действие АТФ опосредует патофизиологию ряда нейропатологий, травм спинного мозга и нейродегенеративных заболеваний. Постсинаптический эффект АТФ опосредует гипогравитационный двигательный синдром. Гипотермия, микрогравитация

сопровождаются изменениями пуринергической модуляции, приложенной к постсинаптическому полюсу, а при моделировании травм, боковом амиотрофическом склерозе - к пресинаптическому.

Так, при моделировании травм спинного мозга, спинализации и денервации наблюдалось снижение модулирующей способности АТФ. При моделировании белковой сенсibilизации наблюдалось усиление модулирующей способности АТФ. Блокада P2-рецепторов сураминол отменяет усиленный эффект АТФ. При моделировании же аутистического расстройства эффекты АТФ на сократительную активность быстрой, медленной и смешанной мышц не изменяются, тогда как при моделировании бокового амиотрофического склероза эффекты АТФ по увеличению силы сокращений всех трёх видов мышц не проявлялись при общем выраженном снижении силы сокращений быстрой и медленной мышц и увеличении – смешанной мышцы. На всех трёх изученных типах мышц эффекты сурамина и АТФ не различались при моделировании бокового амиотрофического склероза.

В нервно-мышечном синапсе медленной и быстрой скелетной мышцы крыс разнонаправленные эффекты аденозина реализуются посредством активации одновременно двух подтипов пресинаптических аденозиновых рецепторов: A_1 (ингибирующий) и A_{2A} (потенцирующий), без постсинаптических эффектов. Стимуляция A_{2A} рецепторов аденозином вызывает открытие кальциевых каналов L-типа через аденилатциклазу, модулирующие эффекты АТФ реализуются посредством активации протеинкиназы C через пресинаптические пуринорецепторы. В отличие от исключительно пресинаптических эффектов аденозина, эффекты АТФ как пре-, так и постсинаптического приложения. Её пресинаптические эффекты преобладают над постсинаптическими, маскируя их. Постсинаптические эффекты АТФ, реализуемые посредством активации пуринорецепторов, можно выявить при моделировании гипотермии. И, безусловно, дальнейшее тщательное изучение пуриновой сигнализации, которая играет ключевую роль во всех вышеупомянутых процессах, представляется необходимым.

ВЫВОДЫ

1. В нервно-мышечном синапсе медленной и быстрой скелетных мышц крыс АТФ влияет на P2-рецепторы, находящиеся как в пре-, так и в постсинаптической зоне. Пресинаптические эффекты АТФ опосредуются активацией протеинкиназы С, тогда как постсинаптические эффекты связаны с изменением чувствительности никотиновых холинорецепторов. В физиологических условиях пресинаптические эффекты АТФ преобладают над постсинаптическими, маскируя их. Инкубация мышц с неселективным антагонистом P2-рецепторов сурамином (100 мкМ) полностью предупреждает влияние АТФ на силу сокращений.

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 A_{2A} (стимулирующий). Стимуляция A_{2A} 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 metabotropic 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волков, Е. М. Влияние тироксина на свойства скелетных мышечных волокон лягушки / Е. М. Волков, В. В. Валиуллин // Физиол. Журнал СССР. – 1985. – Т. 71, № 9. – С. 1082–1087.
2. Гиниатуллин, Р. А. Модулирующая роль АТФ в нервно-мышечном синапсе / Р. А. Гиниатуллин, Е. М. Соколова // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 1998, № 10. – С. 1132–1138.
3. Гришин, С. Н. Роль пуринов в нервно-мышечной передаче / С. Н. Гришин, А. У. Зиганшин // Биол. мембр. – 2013. – Т. 30, № 4. – С. 243–252.
4. Давиденко, Д. Н. Проблема резервов адаптации организма спортсменов / Д. Н. Давиденко // Ученые записки университета им. П.Ф. Лесгафта. – 2005. – № 18. – С. 15–24.
5. Жуков, Е. К. Очерки по нервно-мышечной физиологии / Е. К. Жуков. – Ленинград: Наука, 1969. – 288 с.
6. Зиганшин, А. У. P2-рецепторы: перспективная мишень для будущих лекарств / А. У. Зиганшин, Л. Е. Зиганшина. – Москва: Геотар-Медиа, 2009. – 136 с.
7. Козловский, В. Л. Структура двигательного поведения лабораторных животных – новые возможности методики «открытого поля» / В. Л. Козловский, О. Г. Кенунен // Физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 1992. – Т. 78, № 1. – С. 120–123.
8. Кочубей, П. В. Сравнение силы и скорости укорочения волокон быстрых и медленных скелетных мышц кролика при разных температурах / П. В. Кочубей, С. Ю. Бершицкий // Биофизика. – 2014. – Т. 59, № 5. – С. 967–972.
9. Мавринская, Л. Ф. Экстрафузальные мышечные волокна, их типы и биологическая характеристика / Л. Ф. Мавринская, Н. П. Резвяков // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1978. – № 11. – С. 23–40.
10. Маломуж, А. И. Неквантовая секреция ацетилхолина из двигательных нервных окончаний: молекулярный механизм, физиологическая роль, регуляция /

А. И. Маломуж, Е. Е. Никольский // *Нейрофизиология*. – 2007. – Т. 39, № 4/5. – С. 352–363.

11. Маломуж, А. И. Неквантовое освобождение медиатора: миф или реальность? / А. И. Маломуж, Е. Е. Никольский // *Успехи физиол. наук*. – 2010. – Т. 41, № 2. – С. 27–43.

12. Мухамедьяров, М. А. Ранние дисфункции при боковом амиотрофическом склерозе: патогенетические механизмы и роль в инициации заболевания / М. А. Мухамедьяров, А. Н. Хабибрахманов, А. Л. Зефирова // *Биологические мембраны*. – 2020. – Т. 37, № 4. – С. 264–270.

13. Нейротрофический контроль синтеза миозинов медленной мышцы морской свинки / В. В. Валиуллин, Р. Р. Исламов, М. Е. Валиуллина, Г. И. Полетаев // *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. – 1991. – Т. 111, № 2. – С. 201–203.

14. Никольский, Е. Е. Температурная зависимость процессов спонтанного квантового и неквантового освобождения медиатора из двигательных нервных окончаний мышцы / Е. Е. Никольский, В. А. Воронин // *Нейрофизиология*. – 1986. – Т. 18. – С. 361.

15. A demographic profile of new traumatic spinal cord injuries: change and stability over 30 years / A. B. Jackson, M. Dijkers, M. J. Devivo, R. B. Poczatek // *Arch. Phys. Med. Rehabil.* – 2004. – Vol. 85, № 11. – P. 1740–1748.

16. 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.

17. A Novel and Reliable Rat Model of Autism / Z. Qi, M. Lyu, L. Yang [et al.] // *Front Psychiatry*. – 2021. – Vol. 12. – P. 549810.

18. Abbracchio, M. P. Purinergic and pyrimidinergic signalling II Cardiovascular, Respiratory, Immune, Metabolic and Gastrointestinal Tract Function / M. P. Abbracchio, M. Williams // Springer Berlin Heidelberg – 2001. – Vol. 151, № 1. – P. 289–304.

19. Abbracchio, M. P. Purinoceptors: are there families of P2X- and P2Y-

purinoceptors? / M. P. Abbracchio, G. Burnstock // *Pharmacol Ther.* – 1994. – Vol. 64, № 3. – P. 445–475.

20. Abbracchio, M. P. Roles of P2 receptors in glial cells: Focus on astrocytes / M. P. Abbracchio, S. Ceruti // *Purinergic Signal.* – 2006 – Vol. 2. – P. 595–604.

21. Action of ATP on Ca²⁺-transient in different parts of the frog motor nerve ending / E. Khaziev, A. Golovyahina, E. Bukharaeva [et al.] // *BioNanoScience.* – 2017. – Vol. 7. – P. 254–257.

22. Activity-Dependent Plasticity of Transmitter Release from Nerve Terminals in Rat Fast and Slow Muscles / B. Reid, V. N. Martinov, A. Njå [et al.] // *Journal of Neuroscience.* – 2003. – Vol. 23, № 28. – P. 164–166.

23. Adenosine A2A receptor and ecto-5'-nucleotidase/CD73 are upregulated in hippocampal astrocytes of human patients with mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) / A. R. Barros-Barbosa, F. Ferreira, Â. Oliveira [et al.] // *Purinergic Signal.* – 2016. – Vol. 12. – P. 719–734.

24. Afferent and peripheral control of muscle fiber properties during gravitational unloading / B. S. Shenkman, K. S. Litvinova, T. L. Nemirovskaya [et al.] // *J. Gravit. Physiol.* – 2004. – Vol. 11, № 2. – P. 111–114.

25. Alexander, S. P The concise guide to pharmacology 2013/14: ligand-gated ion channels / S. P. Alexander, H. E. Benson, E. Faccenda [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2013b. – Vol. 170, № 8. – P. 1582–1606.

26. Altered cytokine production in mice lacking P2X7 receptors / M. Solle, J. Labasi, D. G. Perregaux [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, № 1. – P. 125–132.

27. Antipurinergic therapy corrects the autism-like features in the poly (IC) mouse model / R. K. Naviaux, Z. Zolkipli, L. Wang [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – P. 57380.

28. Asmussen, G. Maximal shortening velocities, isomyosins and fibre types in soleus muscle of mice, rats and guinea-pigs / G. Asmussen, G. Maréchal // *J. Physiol.* – 1989. – Vol. 416. – P. 245–254.

29. Asmussen, G. The force-velocity relation of the rabbit inferior oblique muscle; influence of temperature / G. Asmussen, G. Beckers-Bleukx // *Maréchal Pflugers Arch.* – 1994. – Vol. 426, № 6. – P. 542–547.
30. At physiological temperatures the ATPase rates of shortening soleus and psoas myofibrils are similar / R. Candau, B. Iorga, F. Travers [et al.] // *Biophys J.* – 2003. – Vol. 85, № 5. – P. 3132–3141.
31. ATP but not adenosine inhibits nonquantal acetyl– choline release at the mouse neuromuscular junction / A. V. Galkin, R. A. Giniatullin, M. R. Mukhtarov [et al.] // *Eur. J. Neurosci.* – 2001. – Vol. 13, № 11. – P. 2047–2053.
32. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves / P. B. Guthrie, J. Knappenberger, M. Segal [et al.] // *J. Neurosci.* – 1999. – Vol. 19, № 2. – P. 520–528.
33. Autism Spectrum Disorders: A Recent Update on Targeting Inflammatory Pathways with Natural Anti-Inflammatory Agents / R. Singh, A. Kisku, H. Kungumaraj [et al.] // *Biomedicines.* – 2023. – Vol. 11, № 1. – P. 115.
34. Barclay, C. J. Energetics of fast– and slow–twitch muscles of the mouse / C. J. Barclay, J. K. Constable, C. L. Gibbs // *J. Physiol.* – 1993. – Vol. 472. – P. 61–80.
35. Barrett, E. F. The kinetics of transmitter release at the frog neuromuscular junction / E. F. Barrett, C. F. Stevens // *J. Physiol.* – 1972. – Vol. 227, № 3. – P. 691–708.
36. Barnett, R. J. The fine structural localization of acetylcholinesterase at the myoneural junction / R. J. Barnett // *J. Cell. Biol.* – 1962. – Vol. 12. – P. 247–262.
37. Bennett, A. F. Thermal dependence of muscle function / A. F. Bennett // *Am. J. Physiol.* – 1984. – Vol. 247, № 2. – P. 217–229.
38. Biochemical characterization of an ecto-ATP diphosphohydrolase activity in *Candida parapsilosis* and its possible role in adenosine acquisition and pathogenesis / T. Kiffer-Moreira, M. E. Fernandes Sampaio, D. S. Alviano [et al.] // *FEMS Yeast. Res.* – 2010. – Vol. 10. – P. 735–746.
39. Biochemical plasticity of synaptic transmission: a critical review of Dale's Principle / H. C. Sabelli, A. D. Mosnaim, A. J. Vazquez [et al.] // *Biological Psychiatry.* – 1976. – Vol. 11, № 4. – P. 481–524.

40. Bjugn, R. Spinal cord transection-no loss of distal ventral horn neurons. Modern stereological techniques reveal no transneuronal changes in the ventral horns of the mouse lumbar spinal cord after thoracic cord transection / R. Bjugn, J. R. Nyengaard, J. H. Rosland // *Exp Neurol.* – 1997. – Vol. 148, № 1. – P. 179–186.
41. Blockade of glutamate- and cholinergic ion channels by amantadane derivatives / L. G. Magazanik, S. M. Antonov, N. Ya. Lukomskaya [et al.] // *Neurosci. Behav. Physiol.* – 1996. – Vol. 26, № 1. – P. 13–22.
42. Borodinsky, L. N. Activity-dependent neurotransmitter-receptor matching at the neuromuscular junction / L. N. Borodinsky, N. C. Spitzer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol. 104, № 1. – P. 335–340.
43. Boutilier, R. G. Adaptive plasticity of skeletal muscle energetics in hibernating frogs: mitochondrial proton leak during metabolic depression / R. G. Boutilier, J. St-Pierre // *J. Exp Biol.* – 2002. – Vol. 205, № 15. – P. 2287–2296.
44. Brooke, M. H. Muscle fiber types: how many and what kind? / M. H. Brooke, K. K. Kaiser // *Arch. Neurol.* – 1970. – Vol. 23, № 4. – P. 369–379.
45. Brown, R. H. Jr. Amyotrophic lateral sclerosis / R. H. Jr. Brown, A. Al-Chalabi // *N. Engl. J. Med.* – 2017. – Vol. 377, № 16. – P. 162–172.
46. Bulochnik, E. D. Effect of hyperthermia induced by a high ambient temperature on the direct cortical response / E. D. Bulochnik, M. P. Ziablov // *Biull. Eksp. Biol. Med.* – 1977. – Vol. 84. – P. 657–660.
47. Burns, A. S. Abnormal spontaneous potentials in distal muscles in animal models of spinal cord injury / A. S. Burns, M. A. Lemay, A. Tessler // *Muscle Nerve.* – 2005. – Vol. 31, № 1. – P. 46–51.
48. Burnstock, G. Adenosine Triphosphate (ATP) / G. Burnstock // In: *Encyclopedia of neuroscience.* – Boston: Elsevier, 2009. – P. 105–113.
49. Burnstock, G. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems / G. Burnstock, G. E. Knight // *Int. Rev. Cytol.* – 2004. – Vol. 240. – P. 301–304.
50. Burnstock, G. Current status of P2X-receptors: distribution and pathophysiological roles / G. Burnstock // *Proc. West Pharmacol. Soc.* – 1999. – Vol. 42.

– P. 119–121.

51. Burnstock, G. Distribution and roles of purinoceptor subtypes / G. Burnstock // *Nucleos. Nucleot.* – 1991. – Vol. 10. – P. 917–930.

52. Burnstock, G. Is there a basis for distinguishing two types of P₂-purinoceptor? / G. Burnstock, C. Kennedy // *Gen. Pharmacol.* – 1985. – Vol. 16, № 5. – P. 433–440.

53. Burnstock, G. Numbering of cloned P₂-purinoceptors / G. Burnstock, B. F. King // *Drug Rev. Res.* – 1996. – Vol. 38. – P. 67–71.

54. Burnstock, G. P₂ purinoceptors: historical perspective and classification / G. Burnstock // *Ciba Found. Symp.* – 1996. – Vol. 198. – P. 1–28.

55. Burnstock, G. P₂X receptors in health and disease / G. Burnstock, C. Kennedy // *Adv. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 61. – P. 333–372.

56. Burnstock, G. Purine and pyrimidine receptors / G. Burnstock // *Cell Mol Life Sci.* – 2007. – Vol. 64, № 12. – P. 1471–1483.

57. Burnstock, G. Purine-mediated signalling in pain and visceral perception / G. Burnstock // *Trends Pharmacol Sci.* – 2001. – Vol. 22, № 4. – P. 182–188.

58. Burnstock, G. Purinergic nerves / G. Burnstock // *Pharmacol Rev.* – 1972. – Vol. 24, № 3. – P. 509–581.

59. Burnstock, G. Purinergic receptors / G. Burnstock // *J. Theor. Biol.* – 1976. – Vol. 62, № 2. – P. 491–503.

60. Burnstock, G. Purinergic signalling in the musculoskeletal system / G. Burnstock, T. R. Arnett, I. R. Orriss // *Purinergic Signal.* – 2013. – Vol. 9, № 4. – P. 541–572.

61. Burnstock, G. Purinergic signalling: It's unpopular beginning, it's acceptance and it's exciting future / G. Burnstock // *Bioessays.* – 2012. – Vol. 34. – P. 218–225.

62. Burnstock, G. Purinergic signalling: pathophysiology and therapeutic potential / G. Burnstock // *Keio J. Med.* – 2013. – Vol. 62, № 3. – P. 63–73.

63. Burnstock, G. Purines and Purinoceptors: Molecular Biology Overview / G. Burnstock // In: Encyclopedia of neuroscience. – Boston: Elsevier, 2009. – P. 1253–1262.
64. Calcium dependence of uni-quantal release latencies and quantal content at mouse neuromuscular junction / D. Samigullin, E. A. Bukharaeva, E. E. Nikolsky, F. Vyskočil // *Physiol. Res.* – 2005. – Vol. 54, № 1. – P. 129–132.
65. Carlson, B. J. Specific binding of ATP to extracellular sites on Torpedo acetylcholine receptor / B. J. Carlson, M. A. Raftery // *Biochem.* – 1993. – Vol. 32. – P. 7329–7333.
66. Ceccarelli, C. Fast and slow myosins as specific markers of muscle: an immunocytochemical study / C. Ceccarelli, V. Eusebi, G. Bussolati // *Basic. Appl. Histochem.* – 1986. – Vol. 30, № 2. – P. 139–146.
67. Cerebral oxygenation is reduced during hyperthermic exercise in humans / P. Rasmussen, L. Nybo, S. Volianitis // *Acta Physiologica.* – 2010. – Vol. 199, № 1. – P. 63–70.
68. Changes in purinergic signalling in developing and ageing rat tail artery: Importance for temperature control / A. Wallace, G. E. Knight, T. Cowen, G. Burnstock // *Neuropharmacology.* – 2006. – Vol. 50, № 2. – P. 191–208.
69. Changes in regional cerebral metabolism during systemic hyperthermia in humans / S. A. Nunneley, C. C. Martin, J. W. Slauson [et al.] // *Journal of Applied Physiology* – 2002. – Vol. 92, № 2. – P. 846–851.
70. Characterization of ATP and ADP hydrolysis activity in rat gastric mucosa / L. Savegnago, C. W. Nogueira, R. Fachineto, J. B. T. Rocha // *Cell Biology International.* – 2005. – Vol. 29, № 7. – P. 559–566.
71. Characterization of striated muscle fiber types by Ca²⁺-ATP-ase and myoglobin immunohistochemistry of the sarcoplasmic reticulum / T. Krenács, E. Molnár, E. Dobó, L. Dux // *Morphol. Igazságügyi. Orv. Sz.* – 1989. – Vol. 29, № 2. – P. 106–118.

72. Cieslak, M. The roles of purinergic signaling in psychiatric disorders / M. Cieslak, J. Czarnecka, K. Roszek // *Acta Biochimica Polonica*. – 2016. – Vol. 63, №1. – P. 1–9.
73. Clafin, D. R. The force-velocity relationship at high shortening velocities in the soleus muscle of the rat / D. R. Clafin, J. A. Faulkner // *J. Physiol.* – 1989. – Vol. 411. – P. 627–637.
74. Clark, B. C. Adaptations in human neuromuscular function following prolonged unweighting: II. Neurological properties and motor imagery efficacy / B. C. Clark // *J. Appl. Physiol.* – 2006. – Vol. 101. – № 1. – P. 264–272.
75. Clark, B. C. Adaptations in human neuromuscular function following prolonged unweighting: I. Skeletal muscle contractile properties and applied ischemia efficacy / B. C. Clark // *J. Appl. Physiol.* – 2006. – Vol. 101. – № 1. – P. 256–263.
76. Clement, G. Fundamentals of space medicine / G. Clement // *Musculoskeletal system in space*. – Dordrecht (Netherlands): Kluwer Academic Publishers, 2006. – P. 173–204.
77. Close, R. Dynamic properties of fast and slow skeletal muscles of the rat after nerve cross-union / R. Close // *J. Physiol. (Lond)*. – 1969. – Vol. 204. – P. 331–346.
78. Close, R. I. Dynamic properties of mammalian skeletal muscles / R. I. Close // *Physiol. Rev.* – 1972. – Vol. 52, № 1. – P. 129–197.
79. Collis, M. G. Adenosine receptor subtypes / M. G. Collis // *Trends Pharmacol Sci.* – 1993. – Vol. 14, № 10. – P. 360–366.
80. Comparative study of myosins present in the lateral muscle of some fish: species variations in myosin isoforms and their distribution in red, pink and white muscle / A. Rowlerson, P. A. Scapolo, F. Mascarello [et al.] // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 1985. – Vol. 6, № 5. – P. 601–640.
81. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release / M. L. Cotrina, J. H. Lin, A. Alves-Rodrigues [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1988. – Vol. 95, № 26. – P. 15735–15740.
82. Consecutive expression of carbonic anhydrase isoenzymes during development of rat liver and skeletal muscle differentiation antibody / A. L. Laurila, E.

K. Parvinen, J. W. Slot, H. K. Väänänen // *J. Histochem. Cytochem.* – 1989. – Vol. 37, № 9. – P. 1375–1382.

83. Cook, S. B. Neuromuscular function following muscular unloading and blood flow restricted exercise / S. B. Cook // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 2014. – Vol. 114, № 7. – P. 1357–1365.

84. Correia-de-Sá, P. Facilitation of [3H]-ACh release by forskolin depends on A2-adenosine receptor activation / P. Correia-de-Sá, J. A. Ribeiro // *Neurosci. Lett.* – 1993. – Vol. 151. – P. 21–24.

85. Correia-de-Sá, P. Evidence that the presynaptic A2a-adenosine receptor of the rat motor nerve endings is positively coupled to adenylate cyclase / P. Correia-de-Sá, J. A. Ribeiro // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* – 1994. – Vol. 350. – P. 514–522.

86. Correia-de-Sá, P. A(2A) adenosine receptor facilitation of neuromuscular transmission: influence of stimulus paradigm on calcium mobilization / P. Correia-de-Sá, M. A. Timóteo, J. A. Ribeiro // *J. Neurochem.* – 2000. – Vol. 74. – P. 2462–2469.

87. Correia-de-Sá, P. Inhibitory and excitatory effects of adenosine receptor agonists on evoked transmitter release from phrenic nerve ending of the rat / P. Correia-de-Sá, A. M. Sebastião, J. A. Ribeiro // *Br. J. Pharmacol.* – 1991. – Vol. 103. – P. 1614–1620.

88. Correia-de-Sá, P. Presynaptic A1 inhibitory/A2A facilitatory adenosine receptor activation balance depends on motor nerve stimulation paradigm at the rat hemidiaphragm / P. Correia-de-Sá, M. A. Timóteo, J. A. Ribeiro // *J. Neurophysiol.* – 1996. – Vol. 76. – P. 3910–3919.

89. Counter, S. A. A histochemical characterization of muscle fiber types in the avian M. stapedius / S. A. Counter, E. Hellstrand, E. Borg // *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* – 1987. – Vol. 86, № 1. – P. 185–187.

90. Cowan, K. J. Freeze-thaw effects on metabolic enzymes in wood frog organs / K. J. Cowan, K. B. Storey // *Cryobiology.* – 2001. – Vol. 43, № 1. – P. 32–45.

91. COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis

spinal cord / Y. Yiangou, P. Facer, P. Durrenberger [et al.] // *BMC Neurol.* – 2006. – Vol. 6. – P. 12.

92. Cross reactive identification of types 1 and 2C fibers in human skeletal muscles with monoclonal anti-neurofilament (200 kd) antibody / T. Nakamura, H. Kawahara, H. Miyashita [et al.] // *Histochemistry.* – 1987. – Vol. 87, № 1. – P. 39–45.

93. Cusack, N. J. P2-receptor: subclassification and structure-activity relationships / N. J. Cusack // *Drug Development Research.* – 1993. – Vol. 28. – P. 244–252.

94. D'Amelio, F. Effects of microgravity on muscle and cerebral cortex: a suggested interaction / F. D'Amelio // *Adv. Space Res.* – 1998. – Vol. 22, № 2. – P. 235–244.

95. Datyner, N. B. Phasic secretion of acetylcholine at a mammalian neuromuscular junction / N. B. Datyner, P.W. Gage // *J. Physiol.* – 1980. – Vol. 303. – P. 299–314.

96. Davis, H. L. Trophic action of nerve extract on denervated skeletal muscle in vivo: dose dependency, species specificity, and timing of treatment / H. L. Davis // *Exp Neurol.* – 1983. – Vol. 80, № 2. – P. 383–394.

97. Decrease in the electrogenic contribution of Na, K-ATPase and resting membrane potential as a possible mechanism of calcium ion accumulation in filaments of the rat musculus soleus subjected to the short-term gravity unloading / I. I. Krivoi, V. V. Kravtsova, E. G. Altaeva [et al.] // *Biophysic.* – 2008. – Vol. 53, № 6. – P. 586.

98. Denny-Brown, D. The histological features of striped muscle in relation to its functional activity / D. Denny-Brown // *Proc. Roy. Soc. B.* – 1929. – Vol. 104. – P. 371–411.

99. Depolarization of rat locus coeruleus neurons by adenosine 5'-triphosphate / L. Harms, E. P. Finta, M. Tshopl, P. Illes // *J. Neurosci.* – 1992. – Vol. 48. – P. 941–952.

100. Desaphy, J. F. Skeletal muscle disuse induces fibre type-dependent enhancement of Na⁺ channel expression / J. F. Desaphy // *Brain.* – 2001. – Vol. 124. – P. 1100.

101. Deschenes, M. R. Neural factors account for strength decrements observed after short-term muscle unloading / M. R. Deschenes // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2002. – Vol. 282, № 2. – P. 578–583.
102. Di Prampero, P. E. Muscles in space / P. E. Di Prampero // *A world without gravity: research in space for health and industrial processes* / B. Fitton, B. Battrick editors. – Paris (France): European Space Agency, 2001. – P. 69–82.
103. Diadenosine polyphosphate receptors. from rat and guinea-pig brain to human nervous system / J. Pintor, M. Díaz-Hernández, J. Gualix [et al.] // *Pharmacology & Therapeutics.* – 2000. – Vol. 87, № 2–3. – P. 103–115.
104. Differentiation of adipose-derived stem cells into Schwann cell phenotype induces expression of P2X receptors that control cell death / A. Faroni, S. Rothwell, A. Grolla [et al.] // *Cell Death & Disease.* – 2013. – Vol. 4, № 7. – P. 743.
105. Distinct receptors and different transduction mechanisms for ATP and adenosine at the frog motor nerve endings / E. Sokolova, S. Grishin, A. Shakirzyanova [et al.] // *The European Journal of Neuroscience.* – 2003. – Vol. 18, № 5. – P. 1254–1264.
106. Doi, Y. Studies on muscular contraction: I. The influence of temperature on the mechanical performance of skeletal and heart muscle / Y. Doi // *J. Physiol.* – 1920. – Vol. 54, № 4. – P. 218–226.
107. Drug development progress in duchenne muscular dystrophy / J. Deng, J. Zhang, K. Shi, Z. Liu // *Front Pharmacol.* – 2022 – Vol. 13. – P. 950651.
108. Dual effects of adenosine on acetylcholine release from myenteric motoneurons are mediated by junctional facilitatory A2A and extrajunctional inhibitory A1 receptors / M. Duarte-Araújo, C. Nascimento, M. A. Timóteo [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 141. – P. 925–934.
109. Dubyak, G. R. Go it alone no more – P2X7 joins the society of heteromeric ATP-gated receptor channels / G. R. Dubyak // *Mol. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 72, № 6. – P. 1402–1405.

110. Dupuis, L. Neuromuscular junction destruction during amyotrophic lateral sclerosis: insights from transgenic models / L. Dupuis, J. P. Loeffler // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 9, № 3. – P. 341–346.
111. Early Alterations in Structural and Functional Properties in the Neuromuscular Junctions of Mutant FUS Mice / M. A. Mukhamedyarov, A. N. Khabibrakhmanov, V. F. Khuzakhmetov [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24, № 10. – P. 9022.
112. Ecto-5'-nucleotidase (CD73)- mediated formation of adenosine is critical for the striatal adenosine A2A receptor functions / E. Augusto, M. Matos, J. Sévigny [et al.] // *J. Neurosci.* – 2013. – Vol. 33. – P. 11390–11399.
113. Edman, K. A. Double-hyperbolic force-velocity relation in frog muscle fibres / K. A. Edman // *J. Physiol.* – 1988. – Vol. 404. – P. 301–321.
114. Edwards, F. A. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system / F. A. Edwards, A. J. Gibb, D. Colquhoun // *Nature.* – 1992. – Vol. 359. – P. 144–147.
115. Effects of ATP and adenosine on contraction amplitude of rat soleus muscle at different temperatures / A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, V. V. Zobov [et al.] // *Muscle & Nerve.* – 2017. – Vol. 55, № 3. – P. 417–423.
116. Effects of single-dose antipurinergic therapy on behavioral and molecular alterations in the valproic acid-induced animal model of autism / M. M. Hirsch, I. Deckmann, J. Santos-Terra [et al.] // *Neuropharmacology.* – 2020. – Vol. 167. – P. 107930.
117. Electrodiagnostic changes of the lower limbs in subjects with chronic complete cervical spinal cord injury / S. Kirshblum, S. Lim, S. Garstang, S. Millis // *Arch. Phys. Med. Rehabil.* – 2001. – Vol. 82, № 5. – P. 604–607.
118. Emery-Dreifuss muscular dystrophy / S. A. Heller, R. Shih, R. Kalra, P.B. Kang // *Muscle Nerve.* – 2020. – Vol. 61, № 4. – P. 436–448.
119. Enhanced expression of the P2X4 receptor in Duchenne muscular dystrophy correlates with macrophage invasion / D. Yeung, R. Kharidia, S. C. Brown, D. C. Górecki // *Neurobiol. Dis.* – 2004. – Vol. 15. – P. 212–220

120. Erkut, E. CRISPR Therapeutics for Duchenne Muscular Dystrophy / E. Erkut, T. Yokota // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 3. – P. 1832.
121. Etiology of autism spectrum disorders and autistic traits over time / M. J. Taylor, M. A. Rosenqvist, H. Larsson [et al.] // *JAMA Psychiatry.* – 2020. – Vol. 77. – P. 936–943.
122. Evans, R. J. ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons / R. J. Evans, V. Derkach, A. Surprenant // *Nature.* – 1992. – Vol. 357. – P. 503–505.
123. Evidence for the functional expression and pharmacological characterization of adenine receptors in native cells and tissues / S. Gorzalka, S. Vittori, R. Volpini [et al.] // *Mol. Pharmacology.* – 2005. – Vol. 67, № 3. – P. 955–964.
124. Exercise in space: human skeletal muscle after 6 months aboard the international space station / T. Trappe, D. Costill, P. Gallagher [et al.] // *J. Appl. Physiol.* – 2009. – Vol. 106. – P. 1159–1168.
125. Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism / D. F. Mabunga, E. L. Gonzales, J. W. Kim [et al.] // *Experimental neurobiology.* – 2015. – Vol. 24, № 4. – P. 285–300.
126. Fahim, M. A. Topographic comparison of neuromuscular junctions in mouse slow and fast twitch muscles / M. A. Fahim, J. A. Holley, N. Robbins // *Neuroscience.* – 1984. – Vol. 13. – P. 227–235.
127. Fam, S. R. P2Y(1) purinoceptor-mediated Ca^{2+} signaling and Ca^{2+} wave propagation in dorsal spinal cord astrocytes / S. R. Fam, C. J. Gallagher, M. W. Salter // *J. Neurosci.* – 2000. – Vol. 20, № 8. – P. 2800–2808.
128. Farabee, M. J. Muscular and skeletal systems / M. J. Farabee // *Biology.* – 2001. – Vol. 2. – P. 127–135.
129. Fast to slow transformation of denervated and electrically stimulated rat muscle / A. Windisch, K. Gundersen, M. J. Szabolcs [et al.] // *The Journal of Physiology.* – 1998. – Vol. 510, № 2. – P. 623–632.
130. Feed–forward inhibition of CD73 and upregulation of adenosine deaminase contribute to the loss of adenosine neuromodulation in postinflammatory ileitis / C.

Vieira, M. T. Magalhães-Cardoso, F. Ferreirinha [et al.] // *Mediat. Infamm.* –2014. – P. 254640.

131. Ferretti G. Cold and muscle performance / G. Ferretti // *Int. J. Sports Med* – 1992. – Vol. 13, № 1. – P. 185–187.

132. Fibrillation potentials following spinal cord injury: Improvement with neurotrophins and exercise / A. S. Burns, V. S. Boyce, A. Tessler, M. A. Lemay // *Muscle Nerve.* – 2007. – Vol. 35, № 5. – P. 607–613.

133. Fields, R. D. New insights into neuron-glia communication / R. D. Fields, B. Stevens-Graham // *Science.* – 2002. – Vol. 298, № 5593. – P. 556–562.

134. Findsen, A. Reduced L-type Ca²⁺ current and compromised excitability induce loss of skeletal muscle function during acute cooling in locust / A. Findsen, J. Overgaard, T. H. Pedersen // *J. exp. Biol.* – 2016. – Vol. 219. – P. 2340–2348.

135. 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, № 8. – P. 1198–1202.

136. Force-velocity properties of human skeletal muscle fibres: myosin heavy chain isoform and temperature dependence / R. Bottinelli, M. Canepari, M. A. Pellegrino, C. Reggiani // *J. Physiol.* – 1996. – Vol. 495, № 2. – P. 573–586.

137. Frogs: Genetic Diversity, Neural Development and Ecological Implications / A. N. Tsentsevitsky, D. V. Samigullin, L. F. Nurullin [et al.]. – New York: Nova Science Publishers, Inc., 2014. – P. 179–194.

138. From neuron to brain / J. G. Nicholls, A. R. Martin, B. G. Wallace, P. A. Fuchs. – Sinauer Associates, Inc., 2001. – 580 p.

139. Fryer, M. W. Total and sarcoplasmic reticulum calcium contents of skinned fibres from rat skeletal muscle / M. W. Fryer, D. G. Stephenson // *J. Physiol.* – 1996. – Vol. 493, № 2. – P. 357–370.

140. Fu, W. M. Potentiation by ATP of the postsynaptic acetylcholine response at developing neuromuscular synapses in *Xenopus* cell cultures / W. M. Fu // *J. Physiol.* – 1994. – Vol. 477, № 3. – P. 449–458.

141. Fu, W. M. Regulatory role of ATP at developing neuromuscular junctions / W. M. Fu // *Prog. Neurobiol.* – 1995. – Vol. 47, № 1. – P. 31–44.
142. Gachet, C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications / C. Gachet // *Thromb. Haemost.* – 2008. – Vol. 99, № 3. – P. 466–472.
143. Gauthier, M. P. Crypts of Lieberkühn nucleoli of rats in vivo and in chicken fibroblasts cultivated in vitro. Modifications of the size of the nucleoli during the normal cell cycle or cycle disturbed by an alkylating agent / M. P. Gauthier // *Arch Biol (Liege)*. – 1969. – Vol. 80, № 2. – P. 121–138.
144. Genomic Strategies for Understanding the Pathophysiology of Autism Spectrum Disorder / M. Doi, M. Li, N. Usui, S. Shimada // *Frontiers in molecular neuroscience*. – 2022. – Vol. 15. – P. 930941.
145. Ghaziuddin, M. Clumsiness in autism and Asperger syndrome: A further report / M. Ghaziuddin, E. Butler // *J. Intellect. Disabil. Res.* – 1988. – Vol. 42. – P. 43–48.
146. Gillberg, C. Autism in immigrants: children born in Sweden to mothers born in Uganda / C. Gillberg, H. Schaumann, I. C. Gillberg // *J. Intellect. Disabil. Res.* – 1995. – Vol. 39, № 2. – P. 141–144.
147. Giniatullin, A. The involvement of p2y12 receptors, nadph oxidase, and lipid rafts in the action of extracellular atp on synaptic transmission at the frog neuromuscular junction / A. Giniatullin, A. Petrov, R. Giniatullin // *Neuroscience*. – 2015. – Vol. 285. – P. 324–332.
148. Giniatullin, R. A. ATP and adenosine inhibit transmitter release at the frog neuromuscular junction through distinct presynaptic receptors / R. A. Giniatullin, E. M. Sokolova // *Br. J. Pharmacol.* – 1998. – Vol. 124, № 4. – P. 839–844.
149. Glavinović, M. I. Voltage clamping of unparalysed cut rat diaphragm for study of transmitter release / M. I. Glavinović // *J. Physiol.* – 1979. – Vol. 290, № 2. – P. 467–480.
150. Goldman, Y. E. Transient tension changes initiated by laser temperature jumps in rabbit psoas muscle fibres / Y. E. Goldman, J. A. McCray, K. W. Ranatunga // *J. Physiol.* – 1987. – Vol. 392. – P. 71–95.

151. Gordon G. Slow and rapid components in a flexor muscle / G. Gordon, C. G. Phillips // *Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.* – 1953. – Vol. 38, № 1. – P. 35–45.
152. Górecki, D. C. P2X7 purinoceptor as a therapeutic target in muscular dystrophies / D. C. Górecki // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2019. – Vol. 47. – P. 40-45.
153. Gorza, L. Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATP-ase and anti-myosin monoclonal antibodies / L. Gorza // *J. Histo- chem. Cytochem.* – 1990. – Vol. 38, № 2. – P. 257–265.
154. Granit, R. The functional role of the muscle spindles – facts and hypotheses / R. Granit // *Brain.* – 1975. – Vol. 98, № 4. – P. 531–556.
155. Grishin, S. N. Modulatory role of purines in neuromuscular transmission / S. N. Grishin, A. U. Ziganshin // *Biochem. (Mosc.)*. – 2013. – Vol. 7, № 3. – P. 183–191.
156. Grishin, S. N. Synaptic organization of tonic motor units in vertebrates. / S. N. Grishin, A. U. Ziganshin // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology.* – 2015. – Vol. 9, № 1. – P. 13–20.
157. Gulati, J. Force-velocity characteristics for calcium-activated mammalian slow-twitch and fast-twitch skeletal fibers from the guinea pig / J. Gulati // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1976. – Vol. 73, № 12. – P. 4693–4697.
158. Gupta, R. C. Changes in the cholinergic system of rat sciatic nerve and skeletal muscle following suspension-induced disuse / R. C. Gupta // *Exp Neurol.* – 1985. – Vol. 89, № 3. – P. 622–633.
159. Han, R. The effect of chelerythrine on depolarization-induced force responses in skinned fast skeletal muscle fibres of the rat / R. Han, A. J. Bakker // *Br. J. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 138, № 3. – P. 417–426.
160. Haydon, P. G. Glia: listening and talking to the synapse / P. G. Haydon // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2001. – Vol. 2, № 3. – P. 185–193.
161. Heat induced fatigue and changes of the EEG is not related to reduced perfusion of the brain during prolonged exercise in humans / P. Rasmussen, H. Stie, L. Nybo, B. Nielsen // *Journal of Thermal Biology.* – 2004. – Vol. 29, № 7. – P. 731–737.

162. Hoyle, C. H. Pharmacological activity of adenine dinucleotides in the periphery: possible receptor classes and transmitter function / C. H. Hoyle // *Gen. Pharmacol.* – 1990. – Vol. 21, № 6. – P. 827–831.

163. Huang, L. Role of P2 receptors in normal brain development and in neurodevelopmental psychiatric disorders / L. Huang, L. Otkocsi, B. Sperlagh // *Brain Res. Bull.* – 2019. – Vol. 151. – P. 55–64.

164. Hudlická, O. Resting and postcontraction blood flow in slow and fast muscles of the chick during development / O. Hudlická // *Microvasc. Res.* – 1969. – Vol. 1, № 4. – P. 390–402.

165. Identification of nicotinic acetylcholine receptor recycling and its role in maintaining receptor density at the neuromuscular junction in vivo / E. Bruneau, D. Sutter, R. I. Hume, M. Akaaboune // *J. Neurosci.* – 2005. – Vol. 25, № 43. – P. 9949–9959.

166. Impairment in movement skills of children with autistic spectrum disorders / D. Green, T. Charman, A. Pickles [et al.] // *Developmental Medicine & Child Neurology.* – 2009. – Vol. 51. – P. 311–316.

167. Improvement of a mouse model of valproic acid-induced autism / W. Zheng, Y. Hu, D. Chen [et al.] // *Nan. Fang. Yi. Ke. Da. Xue. Xue. Bao.* – 2019. – Vol. 39, № 6. – P. 718–723.

168. Inoue, K. Purinergic systems in microglia / K. Inoue // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2008. – Vol. 65. – P. 3074–3080.

169. Interaction between DISC1 and CHL1 in regulation of neurite outgrowth / J. Ren, T. Zhao, Y. Xu, H. Ye // *Brain Res.* – 2016. – Vol. 1648, Pt. A. – P. 290–297.

170. Interaction of hydrocortisone with ATP and adenosine on nerve-mediated contractions of frog skeletal muscle / A. U. Ziganshin, R. R. Kamaliev, S. N. Grishin [et al.] // *European Journal of Pharmacology.* – 2009. – Vol. 607, № 1. – 3. – P. 54–59.

171. Interaction of P2 purinergic receptors with cellular macromolecules / L. Koles, Z. Gerevich, J. F. Oliveira [et al.] // *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 377. – P. 1–33.

172. Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP / G. Arcuino, J. H. C. Lin, T. Takano [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2002. – Vol. 99, № 15. – P. 9840–9845.

173. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity / T. A. Samad, K. A. Moore, A. Sapirstein [et al.] // *Nature.* – 2001. – Vol. 410, № 6827. – P. 471–475.

174. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors - an update / B. B. Fredholm, A. P. Ijzerman, K. A. Jacobson [et al.] // *Pharmacol. Rev.* – 2011. – Vol. 63. – P. 1–34.

175. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy / M. P. Abbracchio, G. Burnstock, J. M. Boeynaems [et al.] // *Pharmacol. Rev.* – 2006. – Vol. 58, № 3. – P. 281–341.

176. International Union of Pharmacology. XXV Nomenclature and classification of adenosine receptors / B. B. Fredholm, A. P. Ijzerman, K. A. Jacobson [et al.] // *Pharmacol. Rev.* – 2001. – Vol. 53, № 4. – P. 527–552.

177. Isoform composition and gene expression of thick and thin filament proteins in striated muscles of mice after 30-day space flight / A. Ulanova, Y. Gritsyna, I. Vikhlyantsev [et al.] // *Biomed. Res. Int.* – 2015. – № 2015. – P. 104735.

178. Jacobson K. A. Adenosine receptors as therapeutic targets / K. A. Jacobson, Z. G. Gao // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2006. – Vol. 5. – P. 247–264.

179. Jacobson, K. A. Molecular structure of P2Y receptors: Mutagenesis, modeling, and chemical probes / K. A. Jacobson, M. P. Jayasekara, S. Costanzi // *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp.* – 2012. – Vol. 1, № 6. – P. 68–72.

180. Jiang, L.-H. P2X receptor-mediated ATP purinergic signaling in health and disease / L.-H. Jiang // *Cell Health Cytoskel.* – 2012. – Vol. 4. – P. 83–101.

181. Jimsheleishvili, S. Physiology, neuromuscular transmission / S. Jimsheleishvili, K. Marwaha, A. I. Sherman // *StatPearls* [Internet]. – Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541133/> (accessed 12.11.2024).

182. Kaelan, C. An investigation of possible transynaptic neuronal degeneration in human spinal cord injury / C. Kaelan, P. F. Jacobsen, B. A. Kakulas // *J. Neurol. Sci.* – 1988. – Vol. 86, № 2–3. – P. 231–237.
183. Kahlenberg, J. Mechanisms of caspase–1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release / J. Kahlenberg, G. W. Dubyak // *Am J Physiol.* – 2004. – Vol. 286, № 5. – P. 1100–1108.
184. Katz, B. Neural transmitter release: from quantal secretion to exocytosis and beyond / B. Katz // *J. Neurocytol.* – 2003. – Vol. 32, № 5–8. – P. 437–446.
185. Katz, B. Propagation of electric activity in motor nerve terminals / B. Katz, R. Miledi // *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 1965a. – Vol. 161. – P. 453–482.
186. Katz, B. The effect of temperature on the synaptic delay at the neuromuscular junction / B. Katz, R. Miledi // *J. Physiol.* – 1965b. – Vol. 181, № 3. – P. 656–670.
187. Kennedy, C. How should P2X-purinoreceptors be classified pharmacologically? / C. Kennedy, P. Leff // *Trends. Pharmacol. Sci.* – 1995. – Vol. 16, № 5. – P. 168–174.
188. Khairullin, A. E. Effect of hypothermia on purinergic synaptic modulation in the rat diaphragm / A. E. Khairullin, A. U. Ziganshin, S. N. Grishin // *Biophysics.* – 2020. – Vol. 65, № 5. – P. 1003–1008.
189. Khairullin, A. E. Motor units at various temperatures / A. E. Khairullin, A. U. Ziganshin, S. N. Grishin // *Biochemistry, Supplement Series A: Membrane and Cell Biology.* – 2017. – Vol. 11, № 1. – P. 1–7.
190. 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.* – 2023b. – Vol. 24, № 2. – P. 1587.
191. Khairullin, A. E. Synaptic aspects of hypogravity motor syndrome / A. E. Khairullin, S. N. Grishin, A. A. Ereemeev // *Biophysics.* – 2019b. – Vol. 64, № 5. – P. 828–835.

192. 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, № 5. – P. 858–862.
193. Khakh, B. S. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease / B. S. Khakh, R. A. North // *Nature*. – 2006. – Vol. 442, № 7102. – P. 527–532.
194. Kingsley, R. E. Motor systems / R. E. Kingsley // *Concise Text of Neuroscience*. – Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. – P. 209–336.
195. Koles, L. Purine ionotropic (P2X) receptors / L. Koles, S. Furst, P. Illes // *Curr. Pharm. Des.* – 2007. – Vol. 13, № 23. – P. 2368–2384.
196. Kordas, M. An attempt at an analysis of the factors determining the time course of the end-plate current. II. Temperature / M. Kordas // *J. Physiol.* – 1972. – Vol. 224, № 2. – P. 333–348.
197. Kössler, F. Contractile properties of fast and slow twitch muscles of the rat at temperatures between 6 and 42 degrees C / F. Kössler, G. Kuchler // *Biomed. Biochim. Acta.* – 1987. – Vol. 46, № 11. – P. 815–822.
198. Kozlovskaya, I. B. Gravity and the tonic postural motor system / I. B. Kozlovskaya // *Aviakosm. Biol. Ekol. Med.* – 2017. – Vol. 51. – № 3. – P. 5–21.
199. Kravtsova, V. V. Isoform-specific Na, K-ATPase alterations precede disuse-induced atrophy of rat soleus muscle / V. V. Kravtsova // *Biomed. Res. Int.* – 2015. – № 2015. – P. 170–172.
200. Kugelberg, E. Transmission and contraction fatigue of rat motor units in relation to succinate dehydrogenase activity of motor unit fibres / E. Kugelberg, B. Lindgren // *J. Physiol.* – 1979. – Vol. 288. – P. 285–300.
201. Kügelgen, I. Molecular pharmacology of P2Y-receptors / I. Kügelgen, A. Wetter // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. – 2000. – Vol. 362, № 4–5. – P. 310–323.
202. Larionov, I. Can the ampere forces be a factor of the ion channels' lateral mobility? / I. Larionov, A. L. Larionov, E. E. Nikolsky // *Mathematical modeling. Biologicheskije Membrany*. – 2018. – Vol. 35. – P. 3–15.

203. Leijendekker, W. J. Metabolic recovery of mouse extensor digitorumlongus and soleus muscle / W. J. Leijendekker, G. Elzinga // *Pflugers Arch.* – 1990. – Vol. 416, № 1–2. – P. 22–27.
204. Levels of gap junction proteins in coronary arterioles and aorta of hamsters exposed to the cold and during hibernation and arousal / P. Saitongdee, D. L. Becker, P. Milner [et al.] // *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society.* – 2004. – Vol. 52, № 5. – P. 603–615.
205. Liou, J. C. Additive effect of ADP and CGRP in modulation of the acetylcholine receptor channel in *Xenopus* embryonic myocytes / J. C. Liou, W. M. Fu // *Br. J. Pharmacol.* – 1995. – Vol. 115, № 4. – P. 563–568.
206. Lömo, T. Trophic control of skeletal muscle membrane properties / T. Lömo // *CRC Press. Boca Raton.* – 1988. – P. 61–79.
207. Lu, B. Regulation of postsynaptic responses by calcitonin gene related peptide and ATP at developing neuromuscular junction's / B. Lu, W. M. Fu // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 1995. – Vol. 73, № 7. – P. 1050–1056.
208. Lu, Z. Adenosine 5'-triphosphate increases acetyltholine channel-opening frequency in rat skeletal muscle / Z. Lu, D. O. Smith // *J. Physiol.* – 1991. – Vol. 436. – P. 45–56.
209. MacDonald J. A. Protein phosphatase type-1 from skeletal muscle of the freeze-tolerant wood frog / J. A. MacDonald, K. B. Storey // *Comp. Biochem Physiol. B. Biochem Mol. Biol.* – 2002. – Vol. 131, № 1. – P. 27–36.
210. Macdonald, W. A. Effect of ADP on slow-twitch muscle fibres of the rat: implications for muscle fatigue / W. A. Macdonald, D. G. Stephenson // *J. Physiol.* – 2006. – Vol. 573, № 1. – P. 187–198.
211. MacIntosh, B. R. Skeletal muscle fatigue-regulation of excitation-contraction coupling to avoid metabolic catastrophe / B. R. MacIntosh, R. J. Holash, J. M. Renaud // *J. Cell Sci.* – 2012. – Vol. 125, № 9. – P. 2105–2114.
212. Mallouk, N. Elevated subsarcolemmal Ca²⁺ in mdx mouse skeletal muscle fibers detected with Ca²⁺-activated K⁺ channels / N. Mallouk, V. Jacquemond, B. Allard // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97. – P. 4950–4955

213. Mantovani, M. Energy transfer during stress relaxation of contracting frog muscle fibres / M. Mantovani, N. C. Heglund, G. A. Cavagna // *J. Physiol.* – 2001. – Vol. 537, № 3. – P. 923–939.
214. Marsh, R. L. Jumping ability of anurans / R. L. Marsh // In: *Comparative vertebrate exercise physiology* / J. H. Jones (ed.). – San Diego: Academic Press, 1994. – P. 51–111.
215. Martin, T. P. Influence of spaceflight on rat skeletal muscle / T. P. Martin, V. R. Edgerton, R. E. Grindeland // *J. Appl. Physiol.* – 1985. – Vol. 65. – P. 2318–2325.
216. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6 / S. E. P. Smith, J. Li, K. Garbett [et al.] // *J. Neurosci.* – 2007. – Vol. 27. – № 40. – P. 10695–10702.
217. McArdle, J. J. A study of the reinnervation of fast and slow mammalian muscles / J. J. McArdle // *J. Gen. Physiol.* – 1973. – Vol. 61. – P. 1–23.
218. Mechanisms of ATP action on motor nerve terminals at the frog neuromuscular junction / S. Grishin, A. Shakirzyanova, A. Giniatullin [et al.] // *Eur. J. Neurosci.* – 2005. – Vol. 21. – P. 1271–1279.
219. Meriney, S. D. Endogenous adenosine modulates stimulation– induced depression at the frog neuromuscular junction / S. D. Meriney, A. D. Grinnell // *J. Physiol.* – 1991. – Vol. 443. – P. 441–455.
220. Ming, X. Prevalence of motor impairment in autism spectrum disorders / X. Ming, M. Brimacombe, G. C. Wagner // *Brain & Development.* – 2007. – Vol. 29. – P. 565–570.
221. Mitogenic signaling by ATP/P2Y purinergic receptors in astrocytes: involvement of a calcium–independent protein kinase C, extracellular signal-regulated protein kinase pathway distinct from the phosphatidylinositol-specific phospholipase C/calcium pathway / J. T. Neary, Y. Kang, Y. Bu [et al.] // *J. Neurosci.* – 1999. – Vol. 19, № 11. – P. 4211–4220.
222. Modeling Uhthoff's phenomenon in MS patients with internuclearophthalmoparesis. / S. L. Davis, T. C. Frohman, C. G. Crandall [et al.] // *Neurology.* – 2008. – Vol. 70, № 2. – P. 1098–1106.

223. Modulatory roles of ATP and adenosine in cholinergic neuromuscular transmission / A. U. Ziganshin, C. H. V. Hoyle, A. E. Khairullin, S. N. Grishin // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21, № 17. – P. 1–15.

224. Morita, S. Histochemical localization of myoglobin in skeletal muscle of rabbit, pig and ox / S. Morita, R. G. Cassens, E. J. Briskey // *J. Histochem. Cytochem.* – 1970. – Vol. 18, № 5. – P. 364–366.

225. Motor performance and anatomic magnetic resonance imaging (MRI) of the basal ganglia in autism / A. Y. Hardan, M. Kilpatrick, M. S. Keshavan, N. J. Minshew // *Journal of Child Neurology*. – 2003. – Vol. 18. – P. 317–324.

226. Motor unit number estimation of the tibialis anterior muscle in spinal cord injury / G. X. Xiong, J. W. Zhang, Y. Hong [et al.] // *Spinal Cord*. – 2008. – Vol. 46, № 10. – P. 696–702.

227. Movement estimation methods based on the motion capture system. / V. Smirnova, E. Yaikova, M. Baltin [et al.] // *Fourth International Conference Neurotechnologies and Neurointerfaces (CNN)*. – Kaliningrad, 2022. – P. 158–161.

228. Moyer, M. Effect of temperature on endplate potential rundown and recovery in rat diaphragm / M. Moyer, E. van Lunteren // *J. Neurophysiol.* – 2001. – Vol. 85, № 5. – P. 2070–2075.

229. Mozrzymas, J. W. ATP activates junctional and extrajunctional acetylcholine receptor channels in isolated adult rat muscle fibres / J. W. Mozrzymas, F. Ruzzier // *Neurosci. Lett.* – 1992. – Vol. 139, № 2. – P. 217–220.

230. Mukund, K. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease / K. Mukund, S. Subramaniam // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* – 2020. – Vol. 12. – P. 1462.

231. Nedergaard, M. New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain / M. Nedergaard, B. Ransom, S. Goldman // *Trends Neurosci.* – 2003. – Vol. 26, № 10. – P. 523–530.

232. Needham, D. M. The Hydrogen-ion Concentration and the Oxidation-reduction Potential of the Cell Interior / D. M. Needham // *Proc. Roy. Soc. London, Series B*. – 1925. – Vol. 5, № 98. – P. 259.

233. Neuronal P2X₂-receptors are targeted to pre-synaptic terminals in the central and peripheral nervous systems / S. A. Deuchars, L. Atkinson, R. E. Brooke [et al.] // *J. Neurosci.* – 2001. – Vol. 21, № 18. – P. 7143–7152.
234. Illes P. Neuropeptide Y potentiates via Y2-receptors the inhibitory effect of noradrenaline in rat locus coeruleus neurones / P. Illes, E. P. Finta, K. Nieber // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacology.* – 1993. – Vol. 348, № 5. – P. 546–548.
235. Nguyen, L. T. An electrophoretic study of myosin heavy chain expression in skeletal muscles of the toad *Bufo marinus* / L. T. Nguyen, G. M. Stephenson // *J. Muscle Res. Cell Motil.* – 1999. – Vol. 20, № 7. – P. 687–695.
236. Nikolsky, E. E. Temperature dependence of carbachol-induced modulation of miniature end-plate potential frequency in rats / E. E. Nikolsky, E. G. Strunsky, F. Vyskocil // *Brain Research.* – 1991. – Vol. 560, № 1–2. – P. 354–356.
237. NMDA-regulated ectoprotein kinase in hippocampal neurons: role in LTP / W. Chen, M. V. Hogan, A. Wieraszko [et al.] // *Soc. Neurosci. Abstr.* – 1994. – Vol. 20. – P. 263.
238. Nomenclature and classification of purinoceptors / B. B. Fredholm, M. P. Abbracchio, G. Burnstock [et al.] // *Pharmacol. Rev.* – 1994. – Vol. 46, № 2. – P. 143–156.
239. North, R. A. Molecular physiology of P2X₂ receptors / R. A. North // *Physiological Reviews.* – 2002. – Vol. 82, № 4. – P. 1013–1067.
240. Nybo, L. Middle cerebral artery blood velocity is reduced with hyperthermia during prolonged exercise in humans / L. Nybo, B. Nielsen // *The Journal of Physiology.* – 2001. – Vol. 534, № 1. – P. 279–286.
241. Ogata, T. An electron microscopic study on the red, white and intermediate muscle fibers of mouse / T. Ogata // *Acta Medicinæ Okayama.* – 1964. – Vol. 18. – P. 271–280.
242. Ohlendieck, K. Complexity of skeletal muscle degeneration: multi-systems pathophysiology and organ crosstalk in dystrophinopathy / K. Ohlendieck, D. Swandulla // *Pflugers Arch.* – 2021. – Vol. 473, № 12. – P. 1813–1839.

243. Okadaic acid, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases, activates cdc2/H1 kinase and transiently induces a premature mitosis-like state in BHK21 cells / K. Yamashita, H. Yasuda, J. Pines [et al.] // *The EMBO journal*. – 1990. – Vol. 9, № 13. – P. 4331–4338.
244. Oliveira, L. Modulation by adenosine of both muscarinic M1-facilitation and M2-inhibition of [3H]-acetylcholine release from the rat motor nerve terminals / L. Oliveira, M. A. Timóteo, P. Correia-de-Sá // *Eur. J. Neurosci.* – 2002. – Vol. 15. – P. 1728–1736.
245. Oliveira, L. Protein kinase A and Cav1 (L-type) channels are common targets to facilitatory adenosine A2A and muscarinic M1 receptors on rat motoneurons / L. Oliveira, P. Correia-de-Sá // *Neurosignals.* – 2005. – Vol. 14. – P. 262–272.
246. Oliveira, L. Tetanic depression is overcome by tonic adenosine A2A receptor facilitation of L-type Ca²⁺ influx into rat motor nerve terminals / L. Oliveira, M. A. Timóteo, P. Correia-de-Sá // *J. Physiol.* – 2004. – Vol. 560. – P. 157–168.
247. Ovalbumin-induced sensitization affects non-quantal acetylcholine release from motor nerve terminals and alters contractility of skeletal muscles in mice / A. Y. Teplov, S. N. Grishin, M. A. Mukhamedyarov [et al.] // *Experimental Physiology.* – 2009. – Vol. 94, № 2. – P. 264–268.
248. P2X7 purinoceptor alterations in dystrophic mdx mouse muscles: Relationship to pathology and potential target for treatment / C. Young, W. Brutkowski, C.-F. Lien [et al.] // *J. Cell. Mol. Med.* – 2012. – Vol. 16. – P. 1026–1037
249. P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury / X. Wang, G. Arcuino, T. Takano [et al.] // *Nature Med.* – 2004. – Vol. 10, № 8. – P. 821–827.
250. P2Y₁₃ receptors mediate presynaptic inhibition of acetylcholine release induced by adenine nucleotides at the mouse neuromuscular junction / J. F. Guarracino, A. R. Cinalli, V. Fernández [et al.] // *Neuroscience.* – 2016. – Vol. 326. – P. 31–44.
251. Paralysis elicited by spinal cord injury evokes selective disassembly of neuromuscular synapses with and without terminal sprouting in ankle flexors of the

adult rat / A. S. Burns, S. Jawaid, H. Zhong [et al.] // *J. Comp Neurol* – 2007. – Vol. 500, № 1. – P. 116–133.

252. Parameters of single and summated contractions of skeletal muscles in vivo and in vitro / R. A. Eshpay, A. E. Khairullin, R. G. Karimova [et al.] // *Genes and Cells*. – 2015. – Vol. 10, № 4. – P. 123–126.

253. Pasnoor, M. Approach to Muscle and Neuromuscular Junction Disorders / M. Pasnoor, M. M. Dimachkie // *Continuum (Minneap. Minn.)*. – 2019. – Vol. 25. – P. 1536–1563.

254. Pathophysiological role of purines and pyrimidines in neurodevelopment: unveiling new pharmacological approaches to congenital brain diseases / M. Fumagalli, D. Lecca, M. P. Abbracchio, S. Ceruti // *Front. Pharmacol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 941.

255. Pereira, A. G. Function and position determine relative proportions of different fiber types in limb muscles of the lizard *Tropidurus psammonastes* / A. G. Pereira, V. Abdala, T. Kohlsdorf // *Zoology*. – 2015. – Vol. 118, № 1. – P. 27–33.

256. Petrofsky, J. S. The influence of temperature on the isometric characteristics of fast and slow muscle in the cat / J. S. Petrofsky, A. R. Lind // *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*. – 1981. – Vol. 389, № 2. – P. 149–154.

257. Pette, D. Neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibers / D. Pette // *Muscle Nerve*. – 1985. – Vol. 8, № 8. – P. 676–689.

258. Pharmacology of P2X channels / J. R. Gever, D. A. Cockayne, M. P. Dillon [et al.] // *Pflugers Arch.* – 2006. – Vol. 452, № 5. – P. 513–537.

259. Piek, J. P. Sensory-motor deficits in children with developmental coordination disorder, attention deficit hyperactivity disorder and autistic disorder / J. P. Piek, M. J. Dyck // *Hum. Mov. Sci.* – 2004. – № 3–4. – P. 475–488.

260. Pierno, S. Changes of chloride ion channel conductance of slow-to-fast fibre type transition during unloading-induced muscle disuse / S. Pierno // *Brain*. – 2002. – Vol. 125. – P. 1510–1521.

261. Ploutz-Snyder, L. L. Effect of unweighting on skeletal muscle use during exercise / L. L. Ploutz-Snyder // *J. Appl Physiol.* – 1995. – Vol. 79, № 1. – P. 168–175.

262. Poage, R. E. Presynaptic calcium influx, neurotransmitter release, and neuromuscular disease / R. E. Poage, S. D. Meriney // *Physiology & Behavior*. – 2002. – Vol. 77, № 4–5. – P. 507–512.

263. Pollin, M. M. The effect of age on motor neurone death following axotomy in the mouse / M. M. Pollin, S. McHanwell, C.R. Slater // *Development*. – 1991. – Vol. 112, № 1. – P. 83–89.

264. Prefrontal cortex oxygenation is preserved and does not contribute to impaired neuromuscular activation during passive hyperthermia / S. A. Morrison, G. G. Sleivert, J. P. Neary, S. S. Cheung // *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* – 2009. – Vol. 34. – P. 66–74.

265. Presynaptic inhibition of spontaneous acetylcholine release mediated by P2Y-receptors at the mouse neuromuscular junction / S. De Lorenzo, M. Veggetti, S. Muchnik, A. Losavio // *Neuroscience*. – 2006. – Vol. 142, № 1. – P. 71–85.

266. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years – Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2020 / M. J. Maenner, Z. Warren, A. R. Williams [et al.] // *MMWR. Surveillance summaries*. – 2023. – Vol. 72, № 2. – P. 1–14.

267. Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years-autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2018 / M. J. Maenner, K. A. Shaw, A. V. Bakian // *MMWR. Surveillance Summaries*. – 2021. – Vol. 70, № 11. – P. 1–16.

268. Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia / T. Suzuki, I. Hide, K. Ido [et al.] // *J. Neurosci.* – 2004. – Vol. 24, № 1. – P. 1–7.

269. Properties of presynaptic P2X7-like receptors at the neuromuscular junction / T. S. Moores, B. Hasdemir, L. Vega-Riveroll [et al.] // *Brain. Res.* – 2005. – Vol. 1034, № 1–2. – P. 40–50.

270. Provost, B. Levels of gross and fine motor development in young children with autism spectrum disorder / B. Provost, S. Heimerl, B. R. Lopez // *Physical & Occupational Therapy in Pediatrics*. – 2007. – Vol. 27. – P. 21–36.

271. Purinergic contribution to amyotrophic lateral sclerosis / C. Volonté, S. Apolloni, C. Parisi, S. Amadio // *Neuropharmacol.* – 2016. – Vol. 104. – P. 180–193.
272. Purinergic mechanisms in the adaptation of 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.
273. Purinergic receptors in skeletal muscles in health and in muscular dystrophy / E. Krasowska, J. Róg, A. Sinadinos [et al.] // *Postepy Biochem.* – 2014. – Vol. 60, № 4. – P. 483–489.
274. Purinergic regulation of acetylcholine release / J. A. Ribeiro, R. A. Cunha, P. Correia-de-Sá, A. M. Sebastião // *Progress in Brain Research.* – 1996. – Vol. 109. – P. 231–241.
275. Purinoceptor expression in regenerating skeletal muscle in the mdx mouse model of muscular dystrophy and in satellite cell cultures / M. Ryten, S. Y. Yang, P. M. Dunn [et al.] // *FASEB J.* – 2004. – Vol. 18. – P. 1404–1406
276. Racinais, S. Hyperthermia impairs short-term memory and peripheral motor drive transmission / S. Racinais, N. Gaoua, J. Grantham // *J. Physiol.* – 2008. – Vol. 586, № 19. – P. 4751–4762.
277. Racinais, S. Temperature and neuromuscular function / S. Racinais, J. Oksa // *Scand. J. Med. Sci. Sports.* – 2010. – Vol. 20, № 3. – P. 1–18.
278. Rafahi, M. Tools and drugs for uracil nucleotide-activated P2Y receptors / M. Rafahi, C. Muller // *Pharmacology & Therapeutics.* – 2018. – Vol. 190. – P. 24–80.
279. Ralevic, V. Receptors for purines and pyrimidines / V. Ralevic, G. Burnstock // *Pharmacological Reviews.* – 1998. – Vol. 50, № 3. – P. 413–492.
280. Rall, J. A. Influence of temperature on mechanics and energetics of muscle contraction / J. A. Rall, R. C. Woledge // *The American Journal of Physiology.* – 1990. – Vol. 259, № 2 Pt 2. – P. 197–203.
281. Rapid and reversible effects of activity on acetylcholine receptor density at the neuromuscular junction in vivo / M. Akaaboune, S. M. Culican, S. G. Turney, J. W. Lichtman // *Science.* – 1999 – Vol. 286, № 5439 – P. 503–507.

282. Rapid detection of neuro- developmental phenotypes in human neural precursor cells (NPCs) / M. Williams, S. Prem, X. Zhou [et al.] // *J. Vis. Exp.* – 2018. – Vol. 133. – P. 56628.

283. Rapid extracellular pH transients related to synaptic transmission in rat hippocampal slices / O. A. Krishtal, Y. V. Osipchuk, T. N. Shelest, S. V. Smirnov // *Brain. Res.* – 1987. – Vol. 436. – P. 352–356.

284. Redman, R. S. ATP released together with acetylcholine as the mediator of neuromuscular depression at frog motor nerve endings / R. S. Redman, E. M. Silinsky // *The Journal of Physiology.* – 1994. – Vol. 477, № 1. – P. 117–127.

285. Regenold, J. T. Inhibitory adenosine A₁-receptors on rat locus coeruleus neurones. An intracellular electrophysiological study / J. T. Regenold, P. Illes // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* – 1990. – Vol. 341, № 3. – P. 225–231.

286. Reid, B. Synaptic vesicle dynamics in rat fast and slow motor nerve terminals / B. Reid, C. R. Slater, G. S. Bewick // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience.* – 1999. – Vol. 19, № 7. – P. 2511–2521.

287. Reiser, P. J. Effects of immobilization on the isometric contractile properties of embryonic avian skeletal muscle / P. J. Reiser, B. T. Stokes, P. J. Walters // *Experimental Neurology.* – 1988. – Vol. 99, № 1. – P. 59–72.

288. Release of ATP in the central nervous system during systemic inflammation: Real-time measurement in the hypothalamus of conscious rabbits / A. V. Gourine, N. Dale, E. Llaudet [et al.] // *J. Physiol.* – 2007. – Vol. 585, № 1. – P. 305–316.

289. Ribeiro, J. A. On the role, inactivation and origin of endogenous adenosine at the frog neuromuscular junction. / J. A. Ribeiro, A. M. Sebastião // *The Journal of Physiology.* – 1987. – Vol. 384. – P. 571–585.

290. Rich, T. L. Effects of calcium-free perfusion on excitation-contraction coupling in heart and skeletal muscle / T. L. Rich, G. A. Langer // *Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism.* – 1976. – Vol. 9. – P. 95–100.

291. Rishal, I. Axon-soma communication in neuronal injury. *Nature Reviews / I. Rishal, M. Fainzilber // Neuroscience*. – 2014. – Vol. 15, № 1. – P. 32–42.
292. RNA sequencing of identical twins discordant for autism reveals blood-based signatures implicating immune and transcriptional dysregulation / A. Saffari, M. Arno, E. Nasser [et al.] // *Mol. Autism*. – 2019. – Vol. 10. – P. 38.
293. Role of protein kinase C in the effect of ATP on contractile function of the isolated strip from mouse diaphragm / A. Yu. Teplov, S. N. Grishin, A. L. Zefirov, A. U. Ziganshin // *Bulletin of Exp. Biol. and Med.* – 2006. – Vol. 141, № 4. – P. 407–409.
294. Romanul, F. C. distribution of capillaries in relation to oxidative metabolism of skeletal muscle fibres / F. C. Romanul // *Nature*. – 1964. – Vol. 201. – P. 307–308.
295. Rowlerson, A. M. Histochemical and immunohistochemical properties of skeletal muscle fibres from / A. M. Rowlerson, N. C. Spurway // *The Histochemical Journal*. – 1988. – Vol. 20, № 12. – P. 657–673.
296. Rutkove, S. B. Nerve, muscle, and neuromuscular junction electrophysiology at high temperature / S. B. Rutkove, M. J. Kothari, J. M. Shefner // *Muscle Nerve*. – 1997. – Vol. 20, № 4. – P. 431–436.
297. Salgado, A. I. Facilitation by P(2) receptor activation of acetylcholine release from rat motor nerve terminals: interaction with presynaptic nicotinic receptors / A. I. Salgado, R. A. Cunha, J. A. Ribeiro // *Brain Research*. – 2000. – Vol. 877, № 2. – P. 245–250.
298. Salt T. E. Excitation of single sensory neurones in the rat caudal trigeminal nucleus by iontophoretically applied adenosine 5'-triphosphate / T. E. Salt, R. G. Hill // *Neuroscience Letters*. – 1983. – Vol. 35, № 1. – P. 53–57.
299. Schätzl, T. Facioscapulohumeral muscular dystrophy: genetics, gene activation and downstream signalling with regard to recent therapeutic approaches: an update / T. Schätzl, L. Kaiser, H. Deigner // *Orphanet. J. Rare. Dis.* – 2021. – Vol. 16. – P. 129.
300. Schmalbruch, H. «Red» muscle fibres / H. Schmalbruch // *Z Zellforsch Mikrosk. Anat.* – 1971. – Vol. 119, № 1. – P. 120–146.

301. Sebastião, A. M. Downstream Pathways of Adenosine / A. M. Sebastião, S. Cristóvão-Ferreira, J. A. Ribeiro // *Adenosine: A Key Link between Metabolism and Brain Activity* / Susan Masino, Detlev Boison editors. – Springer, 2013. – P. 131–156.
302. Seebacher, F. Plasticity of muscle function in a thermoregulating ectotherm (*Crocodylus porosus*): biomechanics and metabolism / F. Seebacher, R. S. James // *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 2008. – Vol. 294, № 3. – P. 1024–1032.
303. Sex- and Age-dependent Effects of Orexin 1 Receptor Blockade on Open-Field Behavior and Neuronal Activity / S. R. Blume, H. Nam, S. Luz [et al.] // *Neuroscience*. – 2018. – Vol. 381. – P. 11–21.
304. Shackelford, L. C. Musculoskeletal response to space flight / L. C. Shackelford // In: *Principles of clinical medicine for space flight* / M. R. Barratt, S. L. Pool editors. – New York: Springer Science and Business Media, 2008. – P. 293–306.
305. Shall, M. S. Extraocular motor units: type classification and motoneuron stimulation frequency-muscle unit force relationships / M. S. Shall, S. J. Goldberg // *Brain Research*. – 1992. – Vol. 587, № 2. – P. 291–300.
306. Shapiro, M. S. Modulation of Ca²⁺ channels by PTX-sensitive G-proteins is blocked by N-ethylmaleimide in rat sympathetic neurons / M. S. Shapiro, L. P. Wollmuth, B. Hille // *J. Neurosci.* – 1994. – Vol. 14, № 11. – P. 7109–7116.
307. Shefner, S. A. Adenosine inhibits locus coeruleus neurons: an intracellular study in a rat brain slice preparation / S. A. Shefner, T. H. Chiu // *Brain Research*. – 1986. – Vol. 366, № 1–2. – P. 364–368.
308. Shen, K. Z. Excitation of rat locus coeruleus neurons by adenosine 5'-triphosphate: ionic mechanism and receptor characterization / K. Z. Shen, R. A. North // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. – 1993. – Vol. 13, № 3. – P. 894–899.
309. Silinsky, E. M. ATP mediates excitatory synaptic transmission in mammalian neurones / E. M. Silinsky, V. Gerzanich, S. M. Vanner // *British Journal of Pharmacology*. – 1992. – Vol. 106, № 4. – P. 762–763.
310. Skeletal muscle fiber, nerve, and blood vessel breakdown in space-flown

rats / D. A. Riley, E. I. Ilyina-Kakueva, S. Ellis [et al.] // *FASEB J.* – 1990. – Vol. 4, № 1. – P. 84–91.

311. Slow and fast fatigable frog muscle fibres: electrophysiological and histochemical characteristics / M. Vydevska-Chichova, K. Mileva, R. Todorova [et al.] // *General Physiology and Biophysics.* – 2005. – Vol. 24, № 4. – P. 381–396.

312. Smith, D. O. Sources of adenosine released during neuromuscular transmission in the rat / D. O. Smith // *The Journal of Physiology.* – 1991. – Vol. 432. – P. 343–354.

313. Soleus muscle stability in wild hibernating black bears / D. A. Riley, J. M. Van Dyke, V. Vogel [et al.] // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2018. – Vol. 315, № 2. – P. 369–379.

314. Soltanzadeh, P. Myotonic Dystrophies: A Genetic Overview / P. Soltanzadeh // *Genes (Basel).* – 2022. – Vol. 13, № 2. – P. 367.

315. Some properties of different skeletal muscle fiber types: comparison of reference bases / T. B. Kelso, D. R. Hodgson, A. R. Visscher, P. D. Gollnick // *J. Appl. Physiol.* – 1987. – Vol. 62, № 4. – P. 1436–1441.

316. Sousa-Soares, C. Purinergic Tuning of the Tripartite Neuromuscular Synapse / C. Sousa-Soares, J. B. Noronha-Matos, P. Correia-de-Sá // *Mol. Neurobiol.* – 2023. – Vol. 60, № 7. – P. 4084–4104.

317. Staron, R. S. Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in rabbit muscle fibers / R. S. Staron, D. Pette // *Histochemistry.* – 1986. – Vol. 86, № 1. – P. 19–23.

318. Stein, J. M. Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat / J. M. Stein, H. A. Padykula // *The American Journal of Anatomy.* – 1962. – Vol. 110. – P. 103–123.

319. Sterz, R. Postjunctional characteristics of the endplates in mammalian fast and slow muscles / R. Sterz, M. Pagala, K. Peper // *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology.* – 1983. – Vol. 398, № 1. – P. 48–54.

320. Stimulation-dependent release, breakdown, and action of endogenous ATP in mouse hemidiaphragm preparation: the possible role of ATP in neuromuscular

transmission / E. S. Vizi, K. Nitahara, K. Sato, B. Sperlách // *Journal of the Autonomic Nervous System*. – 2000. – Vol. 81, № 1–3. – P. 278–284.

321. Structure-activity relationships of suramin and pyridoxal-5'-phosphate derivatives as P2 receptor antagonists. / G. Lambrecht, K. Braun, M. Damer [et al.] // *Curr. Pharm. Des.* – 2002. – Vol. 8. – P. 2371–2399.

322. Suramin reverses non-depolarizing neuromuscular blockade in rat diaphragm / R. H. Henning, A. Nelemans, A. H. Scaf [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 1992. – Vol. 216. – P. 73–79.

323. Suramin: clinical uses and structure–activity relationships / R. P. McGeary, A. J. Bennett, Q. B. Tran [et al.] // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 8. – P. 1384–1394.

324. Syme D. A. Functional Properties of Skeletal Muscle (Chapter) / D. A. Syme // *In Fish Biomechanics*. – Academic Press, 2005. – P. 179–240.

325. 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*. – 2023a. – Vol. 68, № 1. – P. 137–145.

326. Synaptic P2X receptors / S. J. Robertson, S. J. Ennion, R. J. Evans, F. A. Edwards // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2001. – Vol. 11, № 3. – P. 378–386.

327. Tang, B. Acetylcholinesterase activity in soleus muscle intrafusal and extrafusal fibres in tail suspended rats / B. Tang // *Space Med. Med. Eng.* – 2002. – Vol. 15, № 5. – P. 317–321.

328. Targeted temperature management at 33 degrees C versus 36 degrees C after cardiac arrest / N. Nielsen, J. Wetterslev, T. Cronberg [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – Vol. 369. – P. 2197–2206.

329. Temperature dependence of isometric contractions of cat fast and slow skeletal muscles / A. J. Buller, C. J. Kean, K. W. Ranatunga, J. M. Smith // *J. Physiol.* – 1984. – Vol. 355. – P. 25–31.

330. Temperature dependence of speed of actin filaments propelled by slow and fast skeletal myosin isoforms / R. Rossi, M. Maffei, R. Bottinelli, M. Canepari // *Journal of Applied Physiology* – 2005. – Vol. 99, № 6. – P. 2239–2245.

331. Temperature dependency of P2 receptor-mediated responses / A. U. Ziganshin, A. V. Rychkov, L. E. Ziganshina, G. Burnstock // *European Journal of Pharmacology*. – 2002. – Vol. 456, № 1–3. – P. 107–114.

332. Temperature effect on proximal to distal gradient of quantal release of acetylcholine at frog endplate / D. Samigullin, E. Bukharaeva, E. Nikolsky, F. Vyskocil // *Neurochemical Research*. – 2003. – Vol. 28, № 3–4. – P. 507–514.

333. Temperature-sensitive aspects of evoked and spontaneous transmitter release at the frog neuromuscular junction / E. F. Barrett, J. N. Barrett, D. Botz [et al.] // *J. Physiol.* – 1978. – Vol. 279. – P. 253–273.

334. Tetanic failure due to decreased endogenous adenosine A2A tonus operating neuronal Cav1 (L-type) influx in myasthenia gravis / J. B. Noronha–Matos, T. Morais, D. Trigo [et al.] // *J. Neurochem.* – 2011. – Vol. 117. – P. 797–811.

335. The A3 adenosine receptor: history and perspectives / P. A. Borea, K. Varani, F. Vincenzi [et al.] // *Pharmacol Rev.* – 2015. – Vol. 67, № 1. – P. 74–102.

336. The ASD living Biology: from cell proliferation to clinical phenotype / E. Courchesne, T. Prampar, V. H. Gazestani [et al.] // *Mol. Psychiatry*. – 2019. – Vol. 24, № 1. – P. 88–107.

337. The concise guide to pharmacology 2013/14: G protein-coupled receptors / S. P. Alexander, H. E. Benson, E. Faccenda [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2013a. – Vol. 170, № 8. – P. 1459–1581.

338. 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.] // *Biophysic.* – 2021. – Vol. 66, № 3. – P. 483–486.

339. The effect of non-quantal acetylcholine release on quantal miniature currents at mouse diaphragm / R. A. Giniatullin, R. N. Khazipov, T. I. Oranska [et al.] // *J. Physiol.* – 1993. – Vol. 466. – P. 105–114.

340. 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 Nerve*. – 2019. – Vol 59, № 4. – P. 509–516.

341. The Influence of glucocorticoids and catecholamines on the neuromuscular transmission / S. N. Grishin, A. I. Gabdrakhmanov, A. E. Khairullin, A. U. Ziganshin // *Biochemistry. Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. – 2017. – Vol. 11, № 4. – P. 253–260.

342. The influence of hypothermia on P2 receptor-mediated responses of frog skeletal muscle / A. U. Ziganshin, R. R. Kamaliev, S. N. Grishin [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2005. – Vol. 509, № 2–3. – P. 187–193.

343. The influence of supraspinal impulse activity on the intra-axonal transport of acetylcholine, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in rat motor neurons / A. Dahlstrom, P. O. Heiwall, S. Booj, A. G. Dahllof // *Acta. Physiol. Scand.* – 1978. – Vol. 103, № 3. – P. 308–319.

344. The influence of temperature on neuromuscular performance / F. F. Foldes, S. Kuze, E. S. Vizi, A. Deery // *J. Neural. Transm.* – 1978. – Vol. 43, № 1. – P. 27–45.

345. The mitochondrial dysfunction hypothesis in autism spectrum disorders: Current status and future perspectives / L. Citrigno, M. Muglia, A. Quattieri [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21. – P. 5785.

346. The nature and origin of calcium-insensitive miniature end-plate potentials at rodent neuromuscular junctions / M. T. Lupa, N. Tabti, S. Thesleff [et al.] // *J. Physiol.* – 1986. – Vol. 381. – P. 607–618.

347. The P2X₂-receptor: a key player in IL-1 processing and release / D. Ferrari, C. Pizzirani, E. Adinolfi [et al.] // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 176, № 7. – P. 3877–3883.

348. The P2Y₂-receptors. The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification / B. F. King, G. Burnstock, J. L. Boyer [et al.]; V. D. Girdlestone, ed. eds. – London: IUPHAR Media, 2001. – P. 306–320.

349. The pattern of sensory processing abnormalities in autism / J. K. Kern, M. H. Trivedi, C. R. Garver [et al.] // *Autism*. – 2006. – Vol. 10. – P. 480–494.

350. The proinflammatory action of microglial P2 receptors is enhanced in SOD1 models for amyotrophic lateral sclerosis / N. D'Ambrosi, P. Finocchi, S. Apolloni [et al.] // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 183, № 7. – P. 4648–4656.

351. The role of adenosine receptors and L-type calcium channels in the regulation of the mediator secretion in mouse motor synapses / E. O. Tarasova, A. S. Miteva, A. E. Gaidukov, O. P. Balezina // *Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell. Biol.* – 2015. – Vol. 9. – P. 318–328.

352. The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation / M. F. Lister, J. Sharkey, D. A. Sawatzky [et al.] // *J. Inflamm.* – 2007. – Vol. 4. – P. 5.

353. 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.* – 2019a. – Vol. 64. – № 5. – P. 812–817.

354. 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. – P. 812–817.

355. Thesleff, S. Functional aspects of quantal and non-quantal release of acetylcholine at the neuromuscular junction / S. Thesleff // *Prog. Brain Res.* – 1990. – Vol. 84. – P. 93–99.

356. Under development of the postural control system in autism / N. J. Minshew, K. Sung, B. L. Jones, J. M. Furman // *Neurology.* – 2004. – Vol. 63. – P. 2056–2061.

357. Van der Laarse, W. J. Relationship between myoglobin and succinate dehydrogenase in mouse soleus and plantaris muscle fibres / W. J. Van der Laarse, S. Maslam, P. C. Diegenbach // *The Histochemical Journal.* – 1985. – Vol. 17, № 1. – P. 1–11.

358. Variation in the determinants of power of chemically skinned type I rat soleus muscle fibres / S. F. Gilliver, D. A. Jones, J. Rittweger, H. Degens // *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* – 2011. – Vol. 197, № 4. – P. 311–319.

359. Vial, C. Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels / C. Vial, J. A. Roberts, R. J. Evans // *Trends in Pharmacological Sciences.* – 2004. – Vol. 25, № 9. – P. 487–493.

360. Vyskočil, F. Non-quantal acetylcholine release at the neuromuscular junction / F. Vyskočil, A. I. Malomouzh, E. E. Nikolsky // *Physiological Research*. – 2009. – Vol. 58, № 6. – P. 763–784.
361. Vyskocil, F. Non-quantal release of transmitter at mouse neuromuscular junction and its dependence on the activity of Na⁺-K⁺ ATP-ase / F. Vyskocil, P. Illés // *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*. – 1977. – Vol. 370, № 3. – P. 295–297.
362. Waerhaug, O. Postnatal development of rat motor nerve terminals / O. Waerhaug // *Anatomy and Embryology*. – 1992. – Vol. 185, № 2. – P. 115–123.
363. Warren, G. L. Temperature dependency of force loss and Ca(2+) homeostasis in mouse EDL muscle after eccentric contractions / G. L. Warren, C. P. Ingalls, R. B. Armstrong // *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 2002. – Vol. 282, № 4. – P. 1122–1132.
364. Watson, L. R. Toddlers with autism: Developmental perspectives / L. R. Watson, G. T. Baranek, P. C. DiLavore // *Infants and Young Children*. – 2003. — Vol. 16, № 3. – P. 201–214.
365. What limits the velocity of fast-skeletal muscle contraction in mammals? / M. Nyitrai, R. Rossi, N. Adamek [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 2006. – Vol. 355, № 3. – P. 432–442.
366. Widiger, T. A. The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition alternative model of personality disorder / T. A. Widiger, A. Hines // *Personality disorders*. – 2022. – Vol. 13, № 4. – P. 347–355.
367. Wu, H. Morphological analysis of neuromuscular junctions by immunofluorescent staining of whole-mount mouse diaphragms / H. Wu, L. Mei // *Methods Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 1018. – P. 277–285.
368. Yoshioka, K. Heteromeric association creates a P2Y-like adenosine receptor / K. Yoshioka, O. Saitoh, H. Nakata // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2001. – Vol. 98, № 13. – P. 7617–7622.

369. Zezula, J. The A_{2A}-adenosine receptor: a GPCR with unique features? / J. Zezula, M. Freissmuth // *British Journal of Pharmacology*. – 2008. – Vol. 153, № 1. – P. 184–190.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Рисунок 1 – Классификация пуринорецепторов.....	18
Таблица 1 – Фармакологическая характеристика подтипов аденозиновых рецепторов.....	19
Рисунок 2 – Схематичная структура P2X-рецептора.....	21
Таблица 2 – Фармакологическая характеристика подтипов P2X-рецепторов.....	22
Рисунок 3 – Схематичная структура P2Y-рецептора.....	24
Таблица 3 – Фармакологическая характеристика подтипов P2Y-рецепторов.....	25
Таблица 4 – Описание экспериментальных серий в исследовании....	48
Рисунок 4 – Схема расположения маркеров для видеоанализа движения	59
Рисунок 5 – Схема нанесения контузионной травмы.....	63
Рисунок 6 – Схема спинализации на уровне Th6–Th7.....	65
Рисунок 7 – Многоквантовый ПКП и спонтанный мПКП в контрольных условиях.....	68
Таблица 5 – Эффекты аденозина и АГФ на потенциалы концевой пластинки диафрагмы мышей.....	69
Таблица 6 – Эффекты аденозина и АГФ на потенциалы концевой пластинки диафрагмы мышей на фоне антагонистов аденозиновых и P2-рецепторов.....	69
Рисунок 8 – Сила сокращений <i>m. soleus</i> и <i>m. EDL</i> , вызванных электрической стимуляцией в контроле и при добавлении в среду АГФ (100 мкм), сурамина (100 мкм), аденозина (100 мкм), 8-SPT (100 мкм), ДРСРХ (0,1 мкм) или их комбинации.....	71
Рисунок 9 – Сила сокращений <i>m. soleus</i> и <i>m. EDL</i> , вызванных электрической стимуляцией в контроле и при добавлении АГФ (А, 100 мкм), аденозина (Б, 100 мкм), N-этилмалеимида (10 мкм), Rp-цАМФ (50 мкм), ДРСРХ (0,1 мкм), нитрендипина (5 мкм), хелеритрина (5 мкм) или	

их сочетание с агонистом.....	73
Рисунок 10 – Эффекты АТФ при повышенной концентрации Ca^{2+} (7,2 мМ) на силу вызванных электрическим током сокращений <i>m. soleus</i> в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах.....	76
Рисунок 11 – Эффекты АТФ при повышенной концентрации Ca^{2+} (7,2 мМ) на силу вызванных электрическим током сокращений <i>m. EDL</i> в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ., при различных температурных режимах.....	77
Таблица 7 – Результаты иммуногистохимического анализа нервно-мышечных синапсов <i>m. soleus</i> , <i>m. EDL</i> и <i>m. diaphragma</i> крысы на наличие и локализацию P2-рецепторов.....	79
Рисунок 12 – Микрофотографии гистологических препаратов нервно-мышечных препаратов <i>m. soleus</i> , <i>m. EDL</i> и <i>m. diaphragma</i> крысы. Иммунофлюоресцентный анализ с антителами к N-холинорецепторам (желтый цвет), P2X1-подтипам рецепторов (зеленый цвет) и их наложение.....	80
Рисунок 13 – Микрофотографии гистологических препаратов нервно-мышечных препаратов <i>m. soleus</i> , <i>m. EDL</i> и <i>m. diaphragma</i> крысы. Иммунофлюоресцентный анализ с антителами к N-холинорецепторам (желтый цвет), P2X2-подтипам рецепторов (зеленый цвет) и их наложение.....	81
Рисунок 14 – Микрофотографии гистологических препаратов нервно-мышечных препаратов <i>m. soleus</i> , <i>m. EDL</i> и <i>m. diaphragma</i> крысы. Иммунофлюоресцентный анализ с антителами к N-холинорецепторам (желтый цвет), P2Y13-подтипам рецепторов (зеленый цвет) и их наложение.....	82
Рисунок 15 – Вид одиночных сократительных ответов <i>m. soleus</i> и <i>m. EDL</i> , вызванных электрической стимуляцией при различных температурах	84
Рисунок 16 – Эффект АТФ на силу сокращения <i>m. soleus</i> и <i>m. EDL</i> в	

контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах.....	86
Рисунок 17 – Вид тетанусов <i>m. soleus</i> и <i>m. EDL</i> при различных частотах стимуляции.....	87
Таблица 8 – Эффект АТФ на силу «гладкого» тетанического сокращения <i>m. soleus</i> и <i>m. EDL</i> в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах....	88
Таблица 9 – Влияние температуры на частоту слияния тетанических мышечных сокращений в контроле и при аппликации АТФ и сурамина в концентрации 100 мкМ.....	89
Рисунок 18 – Вид одиночных сократительных ответов <i>m. soleus</i> и <i>m. EDL</i> , вызванных стимуляцией карбахолином при различных температурах	91
Рисунок 19 – Эффект АТФ на силу сокращения <i>m. soleus</i> и <i>m. EDL</i> вызванных карбахолином, в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах....	93
Таблица 10 – Активность эктонуклеотидаз в международных единицах.....	94
Рисунок 20 – Нервно-мышечный синапс: А1, А2 рецепторы – аденозиновые рецепторы; Р2 рецептор – пуриновый рецептор; АТФ – аденозинтрифосфат; АДФ – аденозиндифосфат; АМФ – аденозинмонофосфат; Адо – аденозин; АСh – ацетилхолин; 1 – экто-АТФазы (CD39) и экто-аденилаткиназа (ADK); 2 – экто-АТФазы (CD39); 3 – экто-5'-нуклеотидаза (CD73); ПД – потенциал действия.....	95
Рисунок 21 – Сила сокращений <i>m. EDL</i> мышцы, вызванных электрической стимуляцией, интактных (Норма) (n = 14) и сенсibilизированных (БС) (n = 10) животных, в отсутствии и присутствии АТФ (100 мкМ) и сурамина (100 мкМ).....	96
Рисунок 22 – Сила сокращений <i>m. soleus</i> мышцы, вызванных электрической стимуляцией, интактных (Норма) (n = 14) и сенсibilизированных (БС) (n = 10) животных, в отсутствии и	

присутствии АТФ (100 мкМ) и сурамина (100 мкМ).....	97
Рисунок 23 – Сила сокращений <i>m. diaphragma</i> мышцы, вызванных электрической стимуляцией, интактных (Норма) (n=14) и сенсibilизированных (БС) (n = 10) животных, в отсутствие и присутствии АТФ (100 мкМ) и сурамина (100 мкМ).....	99
Рисунок 24 – Влияние денервации на силу сокращений <i>m. soleus</i> и <i>m. EDL</i> крысы, вызванных электрической стимуляцией, в отсутствие и в присутствии АТФ (100 мкМ) и сурамина (100 мкМ).....	100
Рисунок 25 – Репрезентативные кривые сокращения <i>m. soleus</i> и <i>m. EDL</i> в ответ на аппликацию 100 мкМ АТФ.....	102
Рисунок 26 – Зависимость силы сокращений <i>m. soleus</i> крыс, вызванных электрической стимуляцией, от экспериментальных условий в контроле и добавлении в среду АТФ (100 мкМ), сурамина (100 мкМ) или их сочетание.....	104
Рисунок 27 – Зависимость силы сокращений <i>m. diaphragma</i> крыс, вызванных электрической стимуляцией, от экспериментальных условий в контроле и добавлении в среду АТФ (100 мкМ), сурамина (100 мкМ) или их сочетание.....	105
Рисунок 28 – Зависимость силы сокращений <i>m. EDL</i> крыс, вызванных электрической стимуляцией, от экспериментальных условий в контроле и добавлении в среду АТФ (100 мкМ), сурамина (100 мкМ) или их сочетание.....	106
Рисунок 29 – Вид одиночных сократительных ответов <i>m. soleus</i> , <i>m. EDL</i> и <i>m. diaphragma</i> вызванных электрической стимуляцией в норме и после спинализации (представлены отдельные репрезентативные треки)...	107
Таблица 11 – Зависимость сократительных параметров исследованных мышц крыс, вызванных электрической стимуляцией, от экспериментальных условий.....	108
Рисунок 30 – Показатели горизонтальной (ГДА) и вертикальной (ВДА) двигательной активности животных контрольной группы и группы с	

воспроизведением модели аутизма (ВМА) в тесте «Открытое поле»	110
Рисунок 31 – Ангулограмма коленного сустава крыс группы с воспроизведением модели аутизма (ВМА) (а) и контрольной группы (б). Репрезентативное изображение положения задней конечности крыс на протяженности фазы шага у крыс в группе ВМА (в) и контрольной группы (г). Фиолетовой линией представлена траектория движения стопы, голубым треугольником показан объем движений задней конечности. Стрелками показан момент окончания фазы толчка.....	111
Рисунок 32 – Объём движения в суставах: коленном (колени) и тазобедренном (бедро) слева, справа в контрольной группе (К) и группы с воспроизведением модели аутизма (ВМА), данные представлены в виде медианы, разброс в группах – в виде интерквартильного размаха....	112
Рисунок 33 – Характеристики шага при выполнении движения в открытом поле определяемых с помощью системы видеозахвата движения (Vicon) у крыс двух групп контроль и группы с воспроизведением модели аутизма (ВМА).....	113
Таблица 12 – Зависимость сократительных параметров исследованных мышц крыс, вызванных электрической стимуляцией, от экспериментальных условий.....	114
Рисунок 34 – Вид одиночных сократительных ответов <i>m. soleus</i> , <i>m. diaphragma</i> и <i>m. EDL</i> вызванных электрической стимуляцией в норме и при БАС (представлены отдельные репрезентативные треки).....	115
Рисунок 35 – Зависимость силы сокращений <i>m. soleus</i> мышцей, вызванных электрической стимуляцией, от экспериментальных условий в контроле и добавлении в среду АТФ (100 мкМ), сурамина (100 мкМ) или их сочетание.....	116
Рисунок 36 – Зависимость силы сокращений <i>m. diaphragma</i> мышцы, вызванных электрической стимуляцией, от экспериментальных условий в контроле и добавлении в среду АТФ (100 мкМ), сурамина (100 мкМ) или их сочетание.....	117

Рисунок 37 – Зависимость силы сокращений *m. EDL* мышцей, вызванных электрической стимуляцией, от экспериментальных условий в контроле и добавлении в среду АТФ (100 мкМ), сурамина (100 мкМ) или их сочетание.....

118

Рисунок 38 – Предполагаемая схема пуринергической регуляции мионевральной передачи скелетных мышц теплокровных и направленность действия использованных в исследовании фармакологических агентов. Показано окончание мотонейрона. Представлен синаптический пузырек – везикула, заполненная, помимо медиатора АСh (ацетилхолина), АТФ. Показаны экзоцитоз содержимого везикул, гидролиз АТФ до аденозина в синаптической щели; активация аденозином A_1 – и A_{2A} – рецепторов, а АТФ – $P2U$ – рецепторов, и регуляция ими экзоцитоза по принципу обратной связи посредством пресинаптических внутриклеточных механизмов.....

123

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2-Cl-IB-MECA 2-chloro-*N*⁶-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-*N*-met- hyluronamide

8-SPT – 8-(*p*-сульфофенил) теofilлин

АДФ – аденозин-5'-дифосфат

АМФ – аденозин-5'-монофосфат

АТФ – аденозин-5'-трифосфат

АХ – ацетилхолин

БАС – боковой амиотрофический склероз

БС – белковой сенсibilизации

ВДА – вертикальная двигательная активность

ВМА – вальпроатная модель аутизма

ВП/2 – время полурасслабления

ВПК – вальпроевая кислота

ВС – время сокращения

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГАМК – гамма аминомасляная кислота

ГДА – горизонтальная двигательная активность

КХ – карбохолин

ЛП – латентный период

мПКП – миниатюрные потенциалы концевой пластинки

МПП – мембранный потенциал покоя

ОИР – ориентировочно-исследовательская реакция

ОП – открытое поле

ПКП – потенциалы концевой пластинки

ПНС – периферическая нервная система

РАС – расстройства аутистического спектра

СС – сила сокращения

СЭП – стимуляция электрическим полем

ЦНС – центральная нервная система

ЭС – электростимуляция

ЭЭГ – электроэнцефалограмма

АС – аденилатциклаза

AChR – Н-холинорецептор

cAMP – 3'-5'-циклический аденозинмонофосфат

ССРА - 2-chloro-*N*⁶-cyclopentyl-adenosine;

CGS21680 - 2-[*p*-(2-carbonyl-ethyl)-phenylethylamino]-5'-*N*-ethylcarboxamidoadenosine

CPA - *N*⁶-cyclopentyladenosine

DAG – диацилглицерол

DPCPX - 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine

d-ТБК – d-тубокурарином

IB-МЕСА - *N*⁶-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-*N*-methyluronamide

IL6 – интерлейкин 6

m. EDL – musculus extensor digitorum longus (длинный разгибатель пальцев)

MRS1191 -3-ethyl-5-benzyl-2-methyl-4-phenylethynyl-6-phenyl- 1,4-(α)-dihydropyridine-3,5 dicarboxylate

MRS1220 - 9-chloro-2-(2-furanyl)-5-[(phenylacetyl)amino] [1,2,4]-triazolo[1,5-*c*]quinazoline

MRS1523 - 2,3-diethyl-4,5-dipropyl-6-phenylpyridine-3-thio- carboxylate-5-carboxylate

MRS1754 - N-(4-сyano-phenyl)-2-[4-(2,6-dioxo-1,3-dipropyl- 2,3,4,5,6,7-hexahydro-1H-purin-8-yl)-phenoxy]acetamide

PBS – фосфатно-щелочной буфер

PKA – протеинкиназа А

PKC – протеинкиназа С

PLA2 – фосфолипаза А2

PLC – фосфолипаза С

Rp-cAMP – аденозин-3',5'-цикломонофосфоротиоата

SCH58261 – 5-amino-2-(2-furyl)-7-phenylethyl-pyrazolo[4,3-*e*]- 1,2,4-triazolo[1,5-

c]pyrimidine

VUF8504 – 4-methoxy-*N*-[2-(2-pyridinyl)quinazoline-4-yl]benzamide

ZM241385 – 4-(2-[7-amino-2-[2-furyl]-[1,2,4]triazolo[2,3-*a*]{1,3,5}triazin-5-ylamino]ethyl)-phenol

Приложение А
(обязательное)

Зависимость тонуса изолированной *m. soleus* крыс от температуры в контроле и при добавлении в среду инкубации сурамина или 8-SPT в концентрации 100 мкМ.

В % от контроля при 37 °С

Температура	контроль М± m, %	На фоне сурамина М± m, %	На фоне 8-spt М± m, %
14 °С	146,1±5,1%	140,2±4,1%	148,6±6,2%
18 °С	138,4±5,0%	132,5±6,2%	142,1±4,2%
22 °С	124,3±3,8%	120,6±4,9%	125,3±4,0%
26 °С	113,8±4,4%	118,2±3,8%	117,1±5,1%
30 °С	108,0±4,9%	105,7±5,1%	112,5±6,8%
34 °С	103,2±4,1%	105,9±5,5%	101,2±5,7%
37 °С	100,0%	98,2±4,7%	100,9±5,4%

Приложение Б
(обязательное)

Изменение амплитуды сокращений *m. soleus* крыс, вызванных электрической стимуляцией, от температуры в контроле и при аппликации сурамина и 8-SPT в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах. В % от контроля
при 37 °С

Температура	контроль М± m, %	На фоне сурамина М± m, %	На фоне 8-spt М± m, %
14 °С	154,9±4,6%	105,0±8,1%	150,9±5,2%
18 °С	145,0±3,9%	103,0±5,5%	140,0±5,4%
22 °С	129,7±3,1%	106,0±7,2%	127,7±4,8%
26 °С	114,5±3,5%	104,0±6,6%	116,5±3,9%
30 °С	106,8±3,9%	97,0±4,2%	104,8±5,2%
34 °С	100,3±4,2%	100,9±7,0%	102,3±5,0%
37 °С	100,0%	100,2±3,5%	101,0±2,8%

Приложение В
(обязательное)

Эффект АТФ на силу вызванных электрическим полем сокращения *m. soleus* в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах. В % от контроля при 37 °С

Температура	контроль М± m, %	На фоне АТФ М± m, %	АТФ на фоне сурамина М± m, %
14 °С	154,9±4,6%	157,9±4,3%	107,1±4,5%
18 °С	145,0±3,9%	137,0±5,2%	105,5±5,5%
22 °С	129,7±3,1%	109,0±4,2%	101,8±3,8%
26 °С	114,5±3,5%	89,1±5,3%	100,4±4,0%
30 °С	106,8±3,9%	77,2±5,2%	104,1±6,1%
34 °С	100,3±4,2%	67,4±3,3%	97,9±8,2%
37 °С	100,0%	66,0±3,9%	100,7±5,8%

Приложение Г
(обязательное)

Влияние аденозина на амплитуду сокращений *m. soleus* крыс, вызванных электрической стимуляцией, от температуры в контроле и при аппликации 8-SPT в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах. В % от контроля при 37 °С

Температура	контроль М± м, %	На фоне аденозина М± м, %	Аденозин на фоне 8-spt М± м, %
14 °С	154,9±4,6%	104,2±3,9%	136,3±3,9%
18 °С	145,0±3,9%	94,8±6,0%	129,0±5,0%
22 °С	129,7±3,1%	97,0±4,6%	133,4±6,1%
26 °С	114,5±3,5%	88,6±5,0%	112,8±5,1%
30 °С	106,8±3,9%	73,9±5,9%	96,1±6,5%
34 °С	100,3±4,2%	66,0±3,2%	89,0±7,2%
37 °С	100,0%	67,1±5,8%	90,2±8,1%

Приложение Д
(обязательное)

Эффекты АТФ при повышенной концентрации Ca^{2+} (7,2 мМ) на силу вызванных электрическим полем сокращений *m. soleus* в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ., при различных температурных режимах. В % от контроля при 37 °С

Температура	контроль $M \pm m$, %	На фоне АТФ $M \pm m$, %	АТФ на фоне сурамина $M \pm m$, %
14 °С	150,9±5,8%	218,2±5,7%	107,4±4,7%
18 °С	140,0±5,7%	182,0±4,2%	103,6±5,2%
22 °С	127,7±4,4%	152,0±3,1%	101,2±3,7%
26 °С	116,5±3,6%	128,1±3,0%	99,9±5,3%
30 °С	104,8±5,7%	110,1±2,9%	101,1±4,4%
34 °С	102,3±5,2%	100,3±3,4%	102,3±4,6%
37 °С	100,0%	95,8±5,1%	101,1±3,7%

Приложение Е
(обязательное)

Изменение амплитуды сокращений *m. soleus* крыс, вызванных карбахолоном, от температуры в контроле и при аппликации сурамина и 8-SPT в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах. В % от контроля при 37 °С

Температура	контроль М± m, %	На фоне сурамина М± m, %	На фоне 8-spt М± m, %
14 °С	148,1±7,4%	102,1±4,1%	144,1±8,0%
18 °С	139,5±8,6%	104,4±5,2%	136,1±7,1%
22 °С	132,0±4,9%	102,3±3,5%	131,0±5,7%
26 °С	123,4±4,7%	100,1±2,8%	121,9±6,9%
30 °С	111,1±4,8%	97,7±4,2%	113,2±3,1%
34 °С	101,2±7,4%	96,5±5,1%	101,5±2,4%
37 °С	100,0%	100,9±3,5%	100,0±3,1%

Приложение Ж
(обязательное)

Эффект АТФ на силу сокращения *m. soleus*, вызванных карбахолином, в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах. В % от контроля при 37 °С

Температура	контроль М±m, %	На фоне АТФ М±m, %	АТФ на фоне сурамина М±m, %
14 °С	148,1±7,4%	222,5±4,4%	102,0±4,6%
18 °С	139,5±8,6%	192,5±3,4%	104,0±5,2%
22 °С	132,0±4,9%	163,8±3,2%	102,0±3,5%
26 °С	123,4±4,7%	144,4±4,6%	100,1±2,8%
30 °С	111,1±4,8%	122,2±3,8%	97,0±4,7%
34 °С	101,2±7,4%	103,2±3,9%	96,0±5,2%
37 °С	100,0%	101,3±3,5%	100,2±4,8%

Приложение 3
(обязательное)

Эффект аденозина на силу сокращения в *m. soleus*, вызванных карбахолоном, в контроле и при аппликации 8-SPT в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах. В % от контроля при 37 °С

Температура	контроль М±m, %	На фоне аденозина М±m, %	Аденозин на фоне 8-spt М±m, %
14 °С	148,1±7,4%	145,0±5,5%	142,1±8,0%
18 °С	139,5±8,6%	139,0±7,3%	136,1±7,3%
22 °С	132,0±4,9%	128,0±6,2%	130,0±5,7%
26 °С	123,4±4,7%	119,5±6,7%	118,9±6,9%
30 °С	111,1±4,8%	115,8±5,8%	110,2±3,1%
34 °С	101,2±7,4%	102,5±6,4%	101,5±2,4%
37 °С	100,0%	100,2±5,3%	100,7±3,1%

Приложение И
(обязательное)

Зависимость тонуса изолированной *m. EDL* крыс от температуры в контроле и при добавлении в среду инкубации сурамина или 8-SPT в концентрации 100 мкМ. В % от контроля при 37 °С

Температура	контроль $M \pm m$, %	На фоне сурамина $M \pm m$, %	На фоне 8-spt $M \pm m$, %
14 °С	57,1 \pm 4,2%	102,2 \pm 5,2%	58,7 \pm 4,2%
18 °С	60,6 \pm 4,0%	105,1 \pm 3,9%	62,5 \pm 3,3%
22 °С	70,7 \pm 4,3%	104,6 \pm 5,5%	74,6 \pm 5,2%
26 °С	78,3 \pm 6,4%	97,7 \pm 4,4%	80,1 \pm 5,7%
30 °С	89,4 \pm 5,8%	103,2 \pm 4,6%	93,0 \pm 4,6%
34 °С	94,5 \pm 3,9%	102,1 \pm 3,8%	90,6 \pm 4,6%
37 °С	100,0%	99,1 \pm 4,1%	100,1 \pm 5,0%

Приложение К
(обязательное)

Изменение амплитуды сокращений *m. EDL* крыс, вызванных электрической стимуляцией, от температуры в контроле и при аппликации сурамина и 8-SPT в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах. В % от контроля при 37 °С

Температура	контроль $M \pm m$, %	На фоне сурамина $M \pm m$, %	На фоне 8-spt $M \pm m$, %
14 °С	65,7±6,5%	102,2±7,1%	63,2±4,6%
18 °С	72,3±5,2%	105,1±6,6%	71,9±3,9%
22 °С	76,3±5,2%	104,6±5,8%	77,3±3,1%
26 °С	78,9±6,5%	97,7±7,1%	82,5±3,5%
30 °С	89,4±6,5%	103,2±6,6%	84,6±3,9%
34 °С	98,6±3,9%	102,1±5,7%	97,8±4,2%
37 °С	100,0%	99,0±4,6%	100,7±3,1%

Приложение Л
(обязательное)

Эффект АТФ на силу вызванных электрическим полем сокращения *m. EDL крысы* в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах. В % от контроля при 37 °С

Температура	контроль М±m, %	На фоне АТФ М±m, %	АТФ на фоне сурамина М±m, %
14 °С	65,7±6,5%	36,1±5,1%	99,2±4,1%
18 °С	72,3±5,2%	44,7±3,1%	97,5±3,3%
22 °С	76,3±5,2%	53,5±3,9%	97,9±4,4%
26 °С	78,9±6,5%	59,9±4,6%	98,8±3,5%
30 °С	89,4±6,5%	71,6±5,4%	101,4±4,2%
34 °С	98,6±3,9%	82,2±4,3%	100,2±3,9%
37 °С	100,0%	84,2±3,7%	102,9±3,2%

Приложение М
(обязательное)

Эффект аденозина на силу вызванных электрическим полем сокращения *m. EDL* крысы в контроле и при аппликации 8-SPT в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах. В % от контроля при 37 °С

Температура	контроль $M \pm m$, %	На фоне аденозина $M \pm m$, %	Аденозин на фоне 8-spt $M \pm m$, %
14 °С	65,7±6,5%	46,6±5,3%	58,4±4,3%
18 °С	72,3±5,2%	50,3±5,1%	66,1±5,1%
22 °С	76,3±5,2%	53,7±3,8%	69,2±3,8%
26 °С	78,9±6,5%	53,5±6,0%	70,2±5,0%
30 °С	89,4±6,5%	64,1±5,3%	82,7±4,3%
34 °С	98,6±3,9%	72,1±5,6%	87,1±4,0%
37 °С	100,0%	70,1±4,9%	91,1±3,9%

Приложение Н
(обязательное)

Эффекты АТФ при повышенной концентрации Ca^{2+} (7,2 мМ) на силу вызванных электрическим полем сокращений *m. EDL* в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ., при различных температурных режимах. В % от контроля при 37 °С

Температура	контроль $M \pm m$, %	На фоне АТФ $M \pm m$, %	АТФ на фоне сурамина $M \pm m$, %
14 °С	70,7±6,1%	45,1±5,5%	96,4±7,3%
18 °С	77,7±5,8%	51,5±5,1%	98,5±7,0%
22 °С	84,7±5,5%	62,9±5,5%	101,1±4,7%
26 °С	88,1±5,8%	68,9±5,2%	97,3±5,0%
30 °С	91,8±5,3%	75,8±5,7%	101,0±5,3%
34 °С	96,2±4,8%	80,9±4,8%	99,5±6,0%
37 °С	100,0%	85,2±4,6%	101,7±5,5%

Приложение О
(обязательное)

Изменение амплитуды сокращений *m. EDL* крыс, вызванных карбахолином, от температуры в контроле и при аппликации сурамина и 8-SPT в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах. В % от контроля при 37 °С

Температура	контроль $M \pm m$, %	На фоне сурамина $M \pm m$, %	На фоне 8-spt $M \pm m$, %
14 °С	70,0±4,1%	98,1±5,3%	72,2±5,0%
18 °С	77,5±4,5%	98,8±5,5%	77,1±4,7%
22 °С	85,2±5,4%	99,5±5,7%	82,0±4,5%
26 °С	88,5±4,7%	100,4±5,3%	86,5±4,2%
30 °С	92,0±4,5%	101,4±4,9%	91,0±4,0%
34 °С	96,1±4,4%	98,9±5,4%	94,7±3,9%
37 °С	100,0%	96,5±6,0%	98,5±3,4%

Приложение II
(обязательное)

Эффект АТФ на силу сокращения *m. EDL крысы* вызванных карбахолином, в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах. В % от контроля при 37 °С

Температура	Контроль $M \pm m$, %	На фоне АТФ $M \pm m$, %	АТФ на фоне сурамина $M \pm m$, %
14 °С	70,0±4,1%	46,0±5,3%	96,0±7,3%
18 °С	77,5±4,5%	55,5±5,0%	98,5±7,2%
22 °С	85,2±5,4%	64,9±4,5%	101,3±4,7%
26 °С	88,5±4,7%	71,9±4,6%	100,2±5,0%
30 °С	92,0±4,5%	78,8±4,7%	101,1±5,3%
34 °С	96,1±4,4%	83,9±4,6%	99,5±5,0%
37 °С	100,0%	89,0±4,4%	98,0±4,5%

Приложение Р
(обязательное)

Эффект аденозина на силу сокращения *m. EDL* крысы вызванных карбахолином, в контроле и при аппликации 8-SPT в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах. В % от контроля при 37 °С

Температура	контроль М±m, %	На фоне аденозина М±m, %	Аденозин на фоне 8-spt М±m, %
14 °С	70,0±4,1%	66,0±5,3%	68,7±3,4%
18 °С	77,5±4,5%	75,5±5,1%	77,5±4,2%
22 °С	85,2±5,4%	84,9±4,4%	87,3±2,8%
26 °С	88,5±4,7%	89,4±5,1%	90,2±5,1%
30 °С	92,0±4,5%	93,8±5,4%	93,1±4,5%
34 °С	96,1±4,4%	96,4±4,7%	96,4±5,2%
37 °С	100,0%	99,2±4,1%	99,0±2,9%