

## ВЛИЯНИЕ ОСТРОЙ ОДНОСТОРОННЕЙ ТРАВМАТИЧЕСКОЙ ДЕНЕРВАЦИИ НА ПУРИНЕРГИЧЕСКУЮ СИГНАЛИЗАЦИЮ В ХОЛИНЕРГИЧЕСКОМ СИНАПСЕ

© 2021 г. А.Е. Хайруллин, Д.В. Ефимова, В.А. Маркосян, С.Н. Гришин,  
А.Ю. Теплов, А.У. Зиганшин

Казанский государственный медицинский университет, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49

E-mail: khajrulli@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.02.2021 г.

После доработки 26.02.2021 г.

Принята к публикации 03.03.2021 г.

Ранее нами было установлено изменение эффективности модулирующего действия АТФ под действием некоторых нефизиологических факторов в нервно-мышечных синапсах грызунов. Цель настоящего исследования – оценить эффект АТФ на синаптическую передачу изолированной *m. soleus* крысы после травматической денервации. Показано, что семисуточная денервация привела к увеличению силы сокращений *m. soleus*, вызванных электрической стимуляцией. Аппликация АТФ усиливает сокращения интактной камбаловидной мышцы, вызванные электрической стимуляцией, но не влияет на денервированную мышцу. На фоне неселективного антагониста Р2-рецепторов сурамина прекращалось действие АТФ. Мы предполагаем, что снижение модулирующей способности АТФ на денервированных мышцах, по всей видимости, вызвано снижением количества Р2-рецепторов на нервной терминали, возникающем в результате нарушения антероградного транспорта и проводящей способности нервного волокна.

Ключевые слова: денервация, АТФ, Р2-рецепторы, скелетные мышцы, синапс, сурамин.

DOI: 10.31857/S0006302921030169

Травмы, оперативные вмешательства и ряд других причин могут приводить к нарушению иннервации конечностей, что впоследствии ведет за собой стойкое нарушение функций мышц и постепенные морфологические изменения, проявляющиеся в виде рубцовых перерождений мышечных волокон с утратой способности к сокращению.

Известно, что после механического повреждения тканей из них во внеклеточное пространство высвобождается АТФ. Свои эффекты, например, в виде модуляции синаптической передачи, она способна оказывать через лиганд-управляемые ионные каналы (Р2X-рецепторы) и метаботропные Р2Y-рецепторы [1]. В настоящее время установлено, что молекула АТФ может активно регулировать эффективность нервно-мышечной передачи, регулируя квантовый и неквантовый выброс ацетилхолина [2].

Известно, что АТФ, как сигнальная молекула, может частично усугублять нейрональное повреждение, вызванное травмой или нарушением обмена веществ, но при этом в той же степени может выступать в качестве активатора нейропротективных процессов [3].

Посттравматическое высвобождение АТФ активирует Р2-рецепторы. Было показано усиление экспрессии Р2X7-рецепторов на соседних неповрежденных клетках и тканях [4]. По всей видимости, можно предположить, что Р2-сигнализация является специфическим участником в механизмах тканевых травм и их последствиях.

Связывание АТФ с Р2X7-рецептором вызывает в течение миллисекунд открытие канала, избирательного для небольших катионов, на несколько секунд приводит к открытию большой поры, которая позволяет проникнуть в клетку высокомолекулярным соединениям.

Дальнейшая реорганизация цитоскелета приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов (IL-1b) и активации каспазы-3 (триггера апоптоза), способствующего в целом осуществлению некротических и апоптотических эффектов: набухание клетки, разрушение мембраны, дальнейший лизис [5].

Установлено, что антагонисты Р2X7-рецепторов могут уменьшать воспаление и рубцевание, возникающее в ответ на повреждения нервов, а также способствовать функциональному восстановлению поврежденных тканей [3]. Считается,

что это происходит в результате активации нейротрофических факторов, которые способствуют процессам выживания и роста нервов. Они играют ключевую роль в развитии пластичности и в целом в регенерации структур как центральной, так и периферической нервной систем. Деятельность данных веществ осуществляется путем взаимодействия их со специальными рецепторами, расположенными на поверхности нейронов, шванновских клеток, эндотелиоцитов.

Цель настоящего исследования — оценить эффект АТФ на синаптическую передачу изолированной *m. soleus* крысы после травматической денервации.

## МЕТОДЫ

**Подготовительные процедуры.** Исследования проводили на белых лабораторных крысах-самцах породы Wistar массой 130–190 г, которых содержали в группах по пять особей с водой и кормом *ad libitum*.

Животных перед началом операции наркотизировали, вводя внутривенно раствор этиламид 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. 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 проводили выделение седалищного нерва, отделение его от сопровождающих кровеносных сосудов с последующей резекцией нерва (удаляли участок нерва размером 5 мм). Конечным этапом операции являлось зашивание раны лавсаном 3.0, обработка операционного поля раствором хлоргексидина и раствором бриллиантового зеленого.

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 этиламид натрия в дозе 40 мг/кг, обескровливали и выделяли *m. soleus* с культей седалищного нерва.

**Проведение экспериментов по регистрации параметров сокращения.** Выделенные мышцы фиксировали одним сухожильным концом к неподвижному штативу, второй конец прикрепляли лигатурой к датчику двигательной активности и погружали в небольшие резервуары объемом

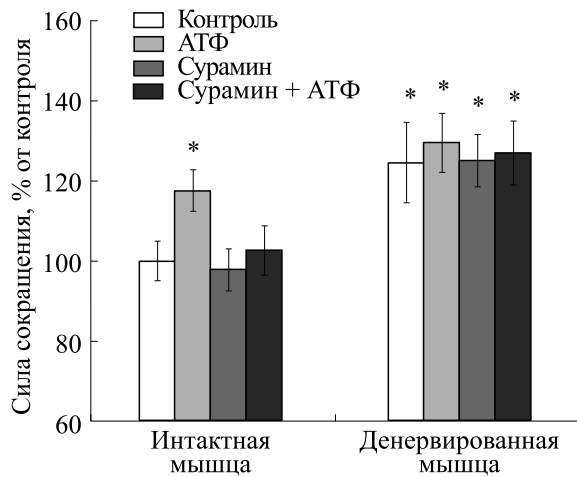
10 мл, наполненные раствором Кребса (состав в мМ): NaCl — 118.0, KCl — 4.75, CaCl<sub>2</sub> — 2.5, NaHCO<sub>3</sub> — 24.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 1.18, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O — 1.18, глюкоза — 11, pH 7.4. Заданное значение температуры ( $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ) поддерживали с помощью термостата. На мышцы изначально подавали нагрузку в 1 г, затем оставляли в покое на полчаса для адаптации к среде.

Электростимуляцию проводили с помощью «всасывающего» электрода (suction electrode). Культю нерва выделенной мышцы помещали в «всасывающий» электрод оригинальной конструкции. Для раздражения использовали электростимулятор Digitimer MultiStimul D330 (Великобритания). Мышцы стимулировали в течение 2 мин прямоугольными импульсами амплитудой 3 В и продолжительностью 0.5 мс при частоте 0.1 Гц. Силу сокращений мышц регистрировали с помощью датчика двигательной активности Linton FCG-01 (Великобритания), аналоговый сигнал преобразовывался системой сбора данных Viopack MP100MSW (США). Все полученные в течение двух минут ответы (12 сократительных ответов) усредняли и обрабатывали как один результат. Рассчитывали их в % относительно исходных результатов, полученных в начале эксперимента. Через полчаса после фиксирования нервно-мышечной ткани проводили контрольную стимуляцию мышц дважды с интервалом в пять минут, удостоверившись в стабильности сократительных ответов, начинали экспериментальные процедуры.

**Эффекты пуринергических агонистов и антагонистов.** В ванночку добавляли 100 мкМ АТФ и через 10 мин оценивали механические ответы мышцы. Затем мышцу промывали раствором Кребса и инкубировали с раствором сурамина в концентрации 100 мкМ в течение 20 мин с последующим добавлением 100 мкМ АТФ и вновь регистрировали механические ответы мышц. Для подтверждения синаптической природы эффектов АТФ в экспериментах нервно-мышечную ткань инкубировали с сурамином в концентрации 100 мкМ, через 20 мин регистрировали сократительные ответы мышц, возникающие в ответ на непрямую стимуляцию электрическим током.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Сокращения, вызванные электрической стимуляцией.** Усредненная по восьми экспериментам сила сокращения *m. soleus* интактных крыс составила  $2.48 \pm 0.31$  г ( $n = 8$ ), что было принято за 100%. Аппликация АТФ в концентрации 100 мкМ усиливала сокращения интактной камбаловидной мышцы, вызванные электрической стимуляцией, до  $117.6 \pm 5.2\%$  ( $n = 8$ ,  $p < 0.05$ ) от контроля (рис. 1). На фоне неселективного антагониста P2-



**Рис. 1.** Влияние денервации на силу сокращений *m. soleus* крысы, вызванных электрической стимуляцией, в отсутствие и в присутствии АТФ (100 мкМ) и сурамина (100 мкМ). Результаты представлены в виде  $M \pm m$  в % от исходных величин, принятых за 100%;  $n = 8$ ; \* –  $p < 0.05$  от контроля интактной мышцы.

рецепторов сурамина в концентрации 100 мкМ прекращалось действие АТФ.

Семисуточная денервация привела к увеличению силы сокращения мышцы до  $124.6 \pm 10.1\%$  ( $n = 8$ ,  $p < 0.05$ ) от интактного контроля (рис. 1). Инкубация денервированной ткани с АТФ в концентрации 100 мкМ никак не повлияла на сокращения камбаловидной мышцы, вызванные электрической стимуляцией. Введение в ванночку сурамина (100 мкМ) не изменило сократительной активности денервированной мышцы.

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 исследуемой мышцы.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Статья посвящена исследованию влияния денервации на сократимость скелетной мышцы, а также модулирующих эффектов АТФ на нервно-мышечную передачу при семисуточной денервации.

Широко известно, что моторная денервация приводит к уменьшению силы, подвижности мышцы и ее атрофии [6]. Семисуточный срок денервации был выбран нами исходя из того, что на более длительных сроках начинаются морфологические изменения в мышцах, подвергнутых денервации или иным расстройствам [7–11], которые будут маскировать изменения в синапсе.

Морфофункциональные изменения, возникающие после денервации, описаны в литературе. В частности, показано изменение активности сар-

коплазматической кальциевой АТФазы (SERCA) на длительных сроках денервации, приводящее к снижению сократимости мышц [10]. Кроме того, было показано изменение экспрессии митохондриального транскрипционного фактора А (Tfam), белка, который управляет транскрипцией и репликацией митохондриальной ДНК и регулируется во время состояния пониженного содержания органелл, вызванного неиспользованием мышц. Это приводит к снижению мышечной массы на 13 и 38% соответственно через трое и семеро суток после денервации [12]. Другие авторы указывают, что морфологические изменения в денервированных мышцах начинаются позже [7–10]. В одной из работ иммуногистохимически при помощи моноклональных антител к тяжелым цепям быстрого миозина показано, что денервация путем иссечения фрагмента седалищного нерва не изменяет относительное содержание быстрых мышечных волокон в медленной камбаловидной мышце крысы [13].

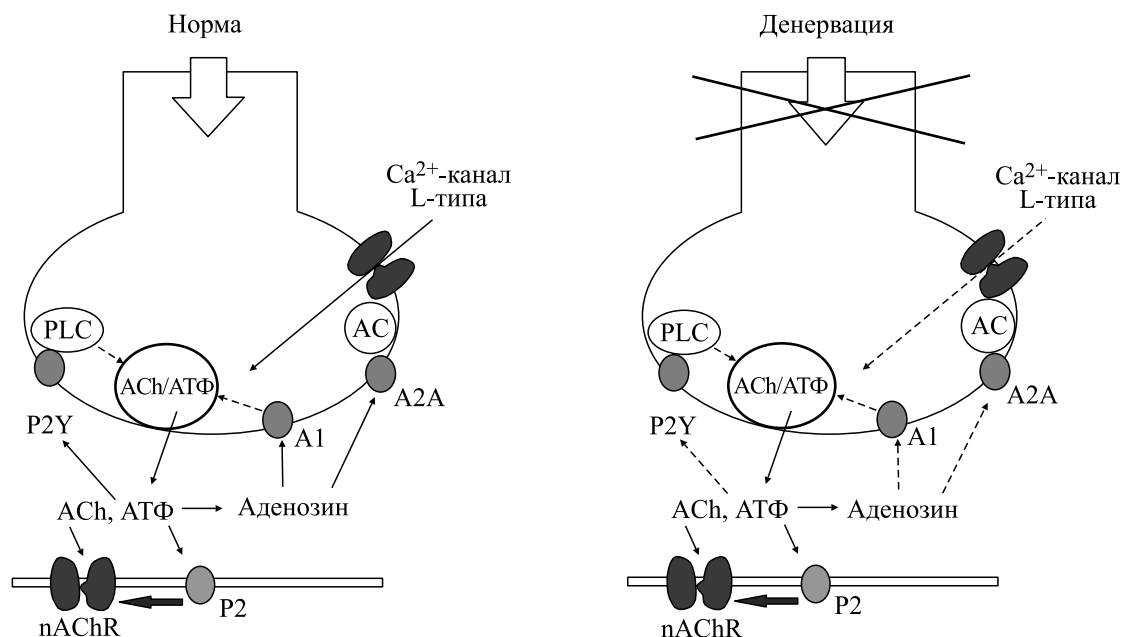
Казалось бы, все эти изменения должны приводить к угнетению мышечной активности. Тем не менее в наших экспериментах семисуточная денервация привела к увеличению силы сокращения.

Почему это могло произойти? Известно, что при перерезке нерва денервированная часть клеток мишеней может становиться более чувствительной к оставшемуся афферентному входу [14]. Подобное явление известно как «закон денервации». Денервационная суперчувствительность может вести к увеличению рефлекторной активности [15]. В наших экспериментах, конечно, речь идет не о рефлекторной активности, тем не менее, применяемый способ стимуляции электрическим полем генерализирован по своей сути и может затрагивать активированные денервацией суперчувствительные механизмы.

Кроме того, согласуется с нашими данными и объясняет усиление сократимости денервированных мышц в контроле работа, демонстрирующая снижение активности холинэстеразы после сочетанной химической денервации [16]. Вероятнее всего, этот эффект приводит к увеличению количества и времени жизни основного медиатора, ацетилхолина в синаптической щели.

В данной работе показано, что моторная денервация способна существенно изменять известный потенцирующий эффект экзогенного АТФ на нервно-мышечную передачу в условиях стимуляции внешним электрическим полем [17–20].

Ранее были опубликованы только данные о влиянии денервации на эффект АТФ на состояние постсинаптической мембраны мышечных волокон. [21] Исследования проводили на иннервированной и денервированной *m. EDL* мышцы.



**Рис. 2.** Предположительная схема пуринергической модуляции нервно-мышечной передачи в мышце *m. soleus*. АТФ и ее метаболит аденозин участвуют в отдельных механизмах отрицательной обратной связи: АТФ через P2Y-рецепторы и аденозин — через рецепторы аденозина A1 и A2A. Показана синаптическая везикула в нервном окончании, заполненная АТФ и ацетилхолином. Экзоцитоз содержимого везикул вызывает активацию пре- и постсинаптических P2-рецепторов АТФ. АСh — ацетилхолин, PLC — фосфолипаза С, АС — аденилатциклаза.

Показано, что после инкубации с АТФ сила сокращения интактной мышцы уменьшалась, а денервированной — повышалась до 120% (постсинаптическое звено).

Демонстрируемое нами снижение модулирующей способности АТФ на денервированных мышцах, по всей видимости, вызвано снижением количества P2-рецепторов на нервной терминали, возникающим в результате нарушения anterograde транспорта и проводящей способности нервного волокна (рис. 2).

Изучение механизмов синаптической пластичности в условиях деструкции проводящих путей может позволить подобраться чуть ближе к решению таких задач, как реабилитация пациентов с острыми травматическими повреждениями и хроническим сдавливанием нервов, а также нейродегенеративными, воспалительными, метаболическими и неопластическими нарушениями.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Проведенные эксперименты полностью соответствуют действующим национальным и международным нормам в области этики.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, C. H. V. Hoyle, and S. N. Grishin, *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6423 (2020).
2. С. Н. Гришин и А. У. Зиганшин, *Биол. мембраны* **30** (4), 243 (2013).
3. W. Peng, M. L. Cotrina, X. Han, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 12489 (2009).
4. P. Majumder, C. A. Trujillo, and C. G. Lopes, *Purinergic Signal.* **3** (4), 317 (2007).
5. J. G. Boyd and T. Gordon, *Mol. Neurobiol.* **27** (3), 277 (2003).
6. Е. В. Маркелова, *Физиология: методическое пособие для студентов институтов физической культуры* (МГУ им. адм. Г.И. Невельского, Владивосток, 2009).
7. H. J. Finol, D. M. Lewis, and R. Owens, *J. Physiol.* **319**, 81 (1981).
8. K. Küllmer, C. D. Reimers, P. Eysel, and U. Harland, *Ultraschall Med.* **17** (5), 225 (1996).
9. M. Midrio, *Eur. J. Appl. Physiol.* **98** (1), 1 (2006).
10. M. Komatsu, T. Nakada, H. Kawagishi, et al., *J. Muscle Res. Cell Motil.* **39** (5–6), 163 (2018).
11. E. V. Ponomareva, E. V. Kachaeva, E. G. Altaeva, et al., *Biophysics* **53** (6), 615 (2008).
12. L. D. Tryon, M. J. Crilly and D. A. Hood, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **309** (4), 228 (2015).
13. Р. Р. Исламов, Д. С. Гусева, Ю. А. Чельшев и В. В. Валиуллин, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **131** (4), 477 (2001).

14. W. B. Cannon and A. Rosenblueth, *The supersensitivity of denervated structures: a law of denervation* (Macmillan Co., N.Y., 1949).
15. M. Goldberger, *Trends Neurosci.* **3** (11), 288 (1980).
16. Т. Р. Ковригина и В. И. Филимонов, *Морфология* **146** (6), 54 (2014).
17. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, B. A. Ziganshin, et al., *Muscle and Nerve* **55** (3), 417 (2017).
18. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, A. Y. Teplov, et al., *Muscle and Nerve* **59** (4), 509 (2019).
19. A. E. Khairullin, A. Y. Teplov, S. N. Grishin, et al., *Biophysics* **64**, 812 (2019).
20. A. E. Khairullin, A. U. Ziganshin, and S. N. Grishin, *Biophysics* **65**, 858 (2020).
21. А. М. Фархутдинов, *Вестник РГМУ* **3** (42), 191 (2005).

## **Effect of Acute Unilateral Denervation Injury on Purinergic Signaling in the Cholinergic Synapse**

**A.E. Khairullin, D.V. Efimova, V.A. Markosyan, S.N. Grishin, A.Yu. Teplov, and A.U. Ziganshin**

*Kazan State Medical University, ul. Butlerova 49, Kazan, 420012 Russia*

Previously, we found a change in the efficiency of the modulating action of ATP under the influence of some non-physiological factors at neuromuscular synapses in rodents. The aim of this study was to evaluate the effect of ATP on synaptic transmission of isolated rat soleus muscles after denervation injury. It was shown that after 7 days of denervation, rats exhibited an increase in the strength of electrical stimulation-evoked contractions of the soleus muscles. Application of ATP increased the electrically evoked but not denervated contractions of the intact soleus muscle. In the presence of the non-selective P2-receptor antagonist suramin, ATP stopped its action. We speculate that a reduction in the ATP activity in a rat model of denervation is most likely caused by a decrease in the number of P2 receptors on the nerve terminal because of impairment of anterograde transport and a decline in nerve fiber conduction velocity.

*Keywords: denervation, ATP, P2-receptors, skeletal muscles, synapse, suramin*