

УДК 57.021,612.816

АТР ВЫЗЫВАЕТ СОКРАЩЕНИЕ ДЕНЕРВИРОВАННЫХ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

© 2023 г. А. Е. Хайруллин^{a, b, *}, А. Ю. Теплов^a, С. Н. Гришин^a, А. У. Зиганшин^a

^aКазанский государственный медицинский университет, Казань, 420012 Россия

^bКазанский федеральный университет, Казань, 420008 Россия

*e-mail: khajrulli@ya.ru

Поступила в редакцию 03.03.2023 г.

После доработки 18.04.2023 г.

Принята к публикации 19.04.2023 г.

Исследована способность гуморальных агонистов (и их стойких аналогов) вызывать сокращения денервированной *m. soleus* и *m. EDL* мышцы. Ранее нами было установлено изменение эффективности модулирующего эффекта АТР под действием некоторых нефизиологических факторов в нервно-мышечных синапсах грызунов. Цель настоящего исследования – оценить эффект АТР на сократимость изолированных скелетных мышц после травматической денервации. Показано, что 28-дневная денервация приводит к увеличению силы сокращений *m. soleus* и *m. EDL*, вызванных аналогом ацетилхолина. Аппликация АТР вызывает сокращение денервированных мышц, но не интактных. На фоне неселективного антагониста Р2-рецепторов сурамина действие АТР прекращалось. Мы предполагаем, что активация постсинаптических Р2Х-рецепторов денервированных мышц способна вызывать их сокращение. По всей видимости, этот эффект вызван усилением экспрессии постсинаптических рецепторов в ответ на нарушение нейротрофического контроля и проводящей способности нервного волокна.

Ключевые слова: АТР, сокращение, пуриновые рецепторы, Р2-рецепторы, денервация, скелетные мышцы, нервно-мышечный синапс

DOI: 10.31857/S0233475523060063, **EDN:** FMWQRI

ВВЕДЕНИЕ

Проблема денервационных изменений в скелетной мускулатуре привлекает исследователей более столетия, и в последнее время внимание к этой проблеме только возрастает. Скелетная мышца управляется мотонейронами и имеет ярко выраженную специализацию в этом отношении, так что при прекращении связи с ЦНС наблюдается быстрое угасание основных функций мышцы. Однако в последние десятилетия обнаружилась ключевая роль молекул АТР в координации нервно-мышечной передачи.

Роль пуринергических рецепторов в мышечных клетках исследовалась около 30 лет и к настоящему времени достаточно полно выяснена [1–7]. Однако многие аспекты вызванной АТР стимуляции скелетной мускулатуры, особенно при патологических состояниях, все еще нуждаются в уточнении.

Чувствительные к стимуляции внеклеточной АТР специфические пуринергические рецепторы участвуют в дифференцировке мышечных клеток во время эмбриогенеза, постнатального форми-

рования мышц и регенерации [1]. Интенсивность клеточного ответа на внеклеточную АТР зависит как от экспрессии конкретного рецептора на поверхности клетки (которая изменяется во время созревания мышц), так и от наличия соответствующих нуклеотидов в межклеточном пространстве. В состоянии покоя скелетные мышцы имеют довольно низкую скорость метаболизма, при этом концентрация АТР в цитозоле находится в диапазоне 5–10 мкМ [2]. АТР высвобождается во внеклеточное пространство в небольших количествах в ответ на мышечную активность или в больших количествах после повреждения и/или гибели мышечных клеток [3].

Активация всех Р2Х и большинства Р2У-рецепторов приводит к увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Однако относительный вклад специфических рецепторов зависит от вида животного, стадии эмбрионального и постнатального развития и стадии дифференцировки мышечных клеток. Значимость пуринергической сигнализации возрастает в ряде патологических

состояний, например при гипотермии или при стрессе [4, 5].

Нуклеотиды и пуринорецепторы играют роль не только в развитии и регенерации мышц, но и в процессах передачи сигналов в нервно-мышечных синапсах. Как известно, АТР высвобождается из окончаний двигательного нерва в нервно-мышечное соединение (НМС) [6]. НМС — это специализированный периферический синапс между двигательным нейроном и волокном скелетной мускулатуры, который позволяет мышечным волокнам возбуждаться пресинаптическими двигательными нервами, что приводит к быстрому сокращению мышц [8]. АТР высвобождается вместе с ацетилхолином (АХ), который является основным нейромедиатором в нервно-мышечном синапсе, а АТР стимулирует как P2-рецепторы, так и рецепторы АХ (AChR), расположенные на постсинаптической мембране [9]. АТР осуществляет свою основную функцию комедиатора (сопутствующего медиатора), регулируя сократимость двигательных единиц [10].

Итак, эффекты АТР на НМС хорошо изучены, однако патофизиологическая роль пуринергического сигнального звена до конца не раскрыта [11]. В настоящей работе мы впервые продемонстрировали, что АТР вызывает сокращение денервированной скелетной мышцы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение препаратов денервированных мышц. Эксперименты проводились на изолированных препаратах денервированных мышц *m. soleus* и *m. EDL* белых мышей массой 25–32 г. Животных содержали в специальных боксах на обычном пищевом режиме, со свободным доступом к воде. После очистки операционного поля от шерсти фиксировали оперируемое животное для удобства дальнейших манипуляций. Под наркозом в сочетании с местной новокаиновой анестезией вырезали участок длиной 2–3 мм, дистальную культю седалищного нерва перетягивали лигатурой. Конечным этапом операции являлось ушивание раны, обработка операционного поля 0.1% раствором хлоргексидина и раствором бриллиантового зеленого. После проведения операции животных содержали в течение 28 суток в одиночных клетках с водой и кормом *ad libitum*. После восстановления животных предварительно наркотизировали, вводя внутривенно раствор этанола натрия в дозе 40 мг/кг, обескровливали, после чего выделяли *m. soleus* и *m. EDL* с обеих задних конечностей.

Регистрация 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 (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. Во время экспериментов раствор термостатировали при 22 ± 0.5°C. На мышцы изначально подавали нагрузку в 0.5 г, затем оставляли в покое на полчаса для адаптации к среде.

Изометрические сокращения вызывали внесением в ванночку агонистов: АТР и карбахола при остановленной перфузии, с последующей отмывкой и повторной индукцией сокращения через каждые 30 мин. АТР использовали в концентрации 100 мкМ. Контролем считали сокращение мышцы в ответ на карбахол в субмаксимальной концентрации, равной 50 мкМ. Силу сокращений мышц регистрировали с помощью датчика двигательной активности Linton FCG-01 (Великобритания), аналоговый сигнал преобразовывался системой сбора данных Biopack MP100MSW (США).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы IBM 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. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Данные представлены в виде средних значений ± стандартной ошибки среднего значения; n — количество мышечных препаратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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* мышц.

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 карбахолом, 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 сенсibilизацией постсинаптических холинорецепторов, спрово-

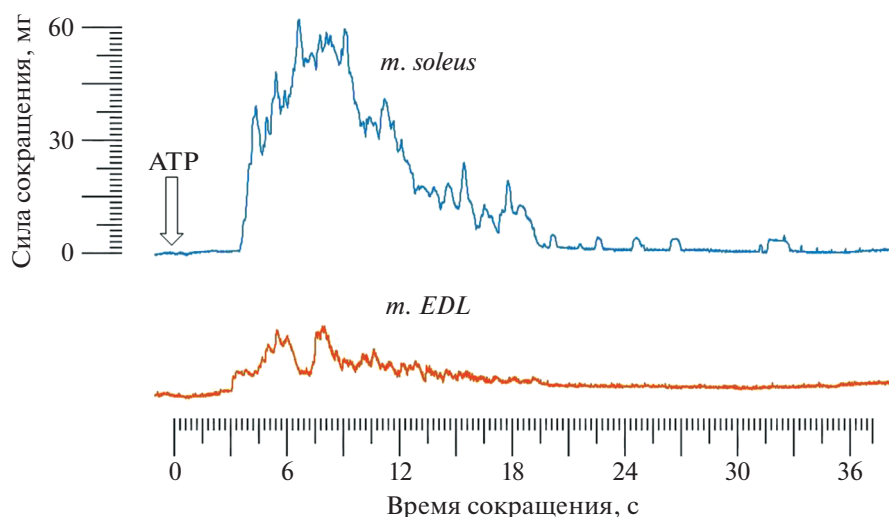


Рис. 1. Репрезентативные кривые сокращения *m. soleus* и *m. EDL* в ответ на аппликацию 100 мкМ АТР.

цированной усилением неквантовой секреции АХ [12]. Это согласуется с нашими данными [13] и объясняет повышение сократимости денервированных мышц. Усиление неквантовой секреции приводит к увеличению количества основного медиатора, АХ в синаптической щели.

Изучение вызванного АТР сокращения денервированных *m. soleus* и *m. EDL* мышцы (рис. 1) показало, что первое добавление АТР вызывало сокращение мышцы силой 64 ± 24 мг и ЛП 3.0 ± 0.5 с ($n = 12$) и 22 ± 11 мг и ЛП 2.7 ± 0.4 с ($n = 12$). Повторное добавление АТР после 20-мин отмытки не вызывало сокращения мышц. При этом аппликация АТР на интактные (неденервированные) мышцы вообще сокращений не вызывала. На данный момент мы не имеем объяснения феномена однократного сократительного ответа денервированной мышцы на внесение АТР. 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 АТР запускает сократимость через P2X-рецепторы, но в дальнейшем стимуляция P2Y-рецепторов инициирует долговременное увеличение концентрации ионов кальция, что восстанавливает Ca^{2+} -регуляцию до состояния, близкого к нативному.

На фоне неселективного антагониста P2-рецепторов сурамина прекращалось действие АТР. Мы не обнаружили в доступной нам литературе сведений о способности денервированных мышц

мышцы отвечать на АТР и полагаем, что факт сокращения денервированных *m. soleus* и *m. EDL* мышцы в ответ на АТР нами выявлен впервые.

Как известно, повреждение мотонейронов или их аксонов сопровождается развитием денервационной атрофии скелетной мышцы. В денервированных мышечных волокнах резко снижается количество миофибрилл и митохондрий, происходит значительное увеличение чувствительности мышечных волокон к эффектам ацетилхолина [14]. По всей поверхности мышечного волокна в мембрану встраиваются экstrasинаптические холинорецепторы ($\alpha 2\beta \gamma \delta$), наблюдается возврат к так называемому эмбриональному типу распределения холинорецепторов.

АТР увеличивает время открытого состояния и частоту открытий АХ-активируемых ионных каналов в эмбриональных мышцах [15, 16]. В зрелых мышцах АТР также, по-видимому, может оказывать потенцирующий эффект, хотя здесь увеличение частоты открытий ионных каналов холинорецептора не сопровождается изменением времени их открытого состояния, а продукты гидролиза АТР (ADP, AMP, аденозин) неактивны [17].

Вероятно, АТР способна активировать непосредственно ионный канал холинорецептора. Это было отмечено при анализе действия АТР на зрелые мышцы крысы [18] и на культивируемые мышечные клетки лягушки [19]. Установлено, что никотиновый рецептор имеет сайты связывания АТР [20].

Можно предположить наличие следующих возможных механизмов сокращения денервированных скелетных мышц мыши в ответ на воздействие АТР. Под влиянием АТР активируются постсинаптические P2-рецепторы, которые экс-

прессироваться на мембране волокон скелетных мышц после их денервации. Возможна активация, предположительно быстрых ионотропных P2X-рецепторов, а не медленных метаболитических P2Y-рецепторов, что определяет скорость латентного периода.

Степень денервационных нарушений мышцы зависит от продолжительности денервации. Возрастание активности протеолитических ферментов ведет к распаду белка в мышечных волокнах, уменьшению объема и массы мышцы [21]. На поздних стадиях денервации происходит разрастание соединительной ткани, возникают застойные явления в сосудах, развивается жировая дегенерация мышечной ткани, утрачивается способность мышцы к регенерации.

Результаты наших исследований позволяют полагать, что при выбранных нами сроках денервации в сократительной способности денервированной скелетной мышцы мышцы наиболее значительную роль играют синаптические факторы. А именно, полученные нами результаты предполагают активацию ионотропных P2X-рецепторов. Они опосредуют передачу сигналов АТР благодаря способности функционировать как лиганд-зависимые катионные каналы, но при определенных условиях могут способствовать образованию большой поры за счет образования комплексов с другими белками и мембранными липидами. Было продемонстрировано, что рецепторы P2X2, P2X4 и P2X7 экспрессируются как в миоцитах, так и в миотрубках, однако мРНК рецепторов P2X2 была обнаружена только в миотрубках [22].

Также было показано, что P2X2-рецепторы экспрессируются вместе с AChR [23], и считается, что АТР стабилизирует нервно-мышечное соединение и может играть ключевую роль в синаптической модификации во время развития НМС [9].

Подтипы P2X-рецепторов различаются по своей чувствительности к агонисту, регуляции и кинетике действия. Однако все они проницаемы для Ca^{2+} , их активация приводит к притоку внеклеточного кальция в клетку и повышению цитозольной концентрации этого иона. Поступление Ca^{2+} из-за активации рецепторов P2X также может привести к деполяризации плазматической мембраны, что, как известно, практически не влияет на электрохимический потенциал для входа Ca^{2+} . Основным эффектом стационарной деполяризации — изменение активационной кривой для потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов. Затем вход Ca^{2+} через P2X инициирует локальные Ca^{2+} сигналы и может запустить кальций-индуцированное высвобождение кальция [1].

Сообщалось, что рецепторы P2X4 локализируются внутри мембран Т-каналцев в мышцах крыс [6], что может свидетельствовать о важной роли этих рецепторов в сопряжении возбуждения с сокращением. Однако точная роль P2X4 рецепторов в миоцитах до конца не изучена.

Аномальная экспрессия рецепторов P2X не является уникальной для мышечных расстройств. Изменения в экспрессии P2X-рецепторов также были обнаружены при воспалительной и хронической боли, эпилепсии, депрессии и некоторых видах рака, это привело к разработке новых экспериментальных терапевтических подходов с использованием агонистов P2X-рецепторов [24].

P2-сигнализация в НМС может играть сразу несколько важных ролей. Есть основания считать, что P2-рецепторная система эволюционно гораздо более ранняя, нежели другие рецепторные системы [25]. Предполагается, что в НМС позвоночных P2-рецепторная система в онтогенезе стала менее значима, чем более эволюционно-развитая холинергическая система. Однако при возникновении патологических состояний, таких как гипотермия, гипогравитация и стресс, роль P2-рецепторов существенно возрастает [26–28]. Таким образом, можно предполагать, что P2-рецепторная сигнализация — это своеобразный защитный механизм, который организм может активировать при развитии патологического процесса. В частности, при денервации, видимо, происходит перестройка P2-рецепторного аппарата на постсинаптическом участке НМС, которая проявляется в изменении чувствительности P2-рецепторов к действию агонистов и проявлению контрактильной деятельности [29].

P2-рецепторы в настоящее время остаются в центре внимания исследователей из-за их широкой представленности во многих тканях и значительной роли, которую они играют в различных физиологических и патологических процессах. Представленные в этой работе результаты демонстрируют, что при денервации активация P2-рецепторов вызывает сокращение скелетных мышц. Для понимания механизмов этого эффекта необходимы дальнейшие исследования. Можно предполагать, что P2-рецепторы представляют собой потенциальную терапевтическую мишень для стимуляции регенерации скелетных мышц после травм или при лечении мышечных патологий.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Соответствие принципам этики. Все применимые международные, национальные и/или ин-

ституциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта 2/22-5 ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России на проведение научных исследований в рамках Программы развития Университета, а также в рамках программы “Стратегическое академическое лидерство Казанского федерального университета” (ПРИОРИТЕТ-2030).

Благодарность. Коллектив авторов выражает глубокую признательность С.С. Колесникову за обсуждение материалов данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ralevic V., Burnstock G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **50**, 413–492.
- Macintosh B.R., Holash R.J., Renaud J.M. 2012. Skeletal muscle fatigueregulation of excitation-contraction coupling to avoid metabolic catastrophe. *J. Cell. Sci.* **125**, 2105–2114.
- Becq F. 2010. CFTR channels and adenosine triphosphate release: The impossible rendez-vous revisited in skeletal muscle. *J. Physiol.* **588**, 4605–4606.
- Khairullin A.E., Ziganshin A.U., Grishin S.N. 2020. The influence of hypothermia on purinergic synaptic modulation in the rat diaphragm. *Biophysics.* **65** (5), 858–862.
- Ziganshin A.U., Kamaliev R.R., Gabdrakhmanov A.I., Khairullin A.E., Grishin S.N. 2018. Foot-shock stimulation decreases the inhibitory action of ATP on contractility and end-plate current of frog sartorius muscle. *Int. J. Pharmacol.* **14**, 1198–1202.
- Sandonà D., Danieli-Betto D., Germinario E., Biral D., Martinello T., Liroy A., Tarricone E., Gastaldello S., Betto R. 2005. The T-tubule membrane ATP-operated P2X4 receptor influences contractility of skeletal muscle. *FASEB J.* **19**, 1184–1186.
- Романов Р.А., Колесников С.С. 2011. Первичные медиаторы. Методы и подходы для исследования секреции. *Биол. мембраны.* **28** (1), 3–13.
- Sleigh J.N., Burgess R.W., Gillingwater T.H., Cader M.Z. 2014. Morphological analysis of neuromuscular junction development and degeneration in rodent lumbrical muscles. *J. Neurosci. Methods.* **227**, 159–165.
- Burnstock G., Arnett T.R., Orriss I.R. 2013. Purinergic signaling in the musculoskeletal system. *Purinergic Signal.* **9**, 541–572.
- Schweitzer E. 1987. Coordinated release of ATP and ACh from cholinergic synaptosomes and its inhibition by calmodulin antagonists. *J. Neurosci.* **7**, 2948–2956.
- Khairullin A.E., Teplov A.Y., Grishin S.N., Farkhutdinov A.M., Ziganshin A.U. 2019. The thermal sensitivity of purinergic modulation of contractile activity of locomotor and respiratory muscles in mice. *Biophysics.* **64** (5), 812–817.
- Маломуж А.И., Никольский Е.Е. 2010. Неквантовое освобождение медиатора: миф или реальность? *Усп. физиол. наук.* **41** (2), 27–43.
- Galkin A.V., Giniatullin R.A., Mukhtarov M.R., Grishin S.N., Švandová I., Vyskočil F. 2001. ATP but not adenosine inhibits nonquantal acetylcholine release at the mouse neuromuscular junction. *Eur. J. Neurosci.* **13** (11), 2047–2053.
- Cisterna B.A., Vargas A.A., Puebla C., Fernández P., Escamilla R., Lagos C.F., Matus M.F., Vilos C., Cea L.A., Barnafi E., Gaete H., Escobar D.F., Cardozo C.P., Sáez J.C. 2020. Active acetylcholine receptors prevent the atrophy of skeletal muscles and favor reinnervation. *Nat. Commun.* **11** (1), 1073.
- Fu W.M. 1994. Potentiation by ATP of the postsynaptic acetylcholine response at developing neuromuscular synapses in *Xenopus* cell cultures. *J. Physiol.* **477**, 449–458.
- Fu W.M. 1995. Regulatory role of ATP at developing neuromuscular junctions. *Prog. Neurobiol.* **47** (1), 31–44.
- Lu Z., Smith D.O. 1991. Adenosine 5'-triphosphate increases acetylcholine channel-opening frequency in rat skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)*. **436**, 45–56.
- Mozrzymas J.W., Ruzzier F. 1992. ATP activates junctional and extrajunctional acetylcholine receptor channels in isolated adult rat muscle fibres. *Neurosci. Lett.* **139** (2), 217–220.
- Igusa Y. 1988. Adenosine 5'-triphosphate activates acetylcholine receptor channels in cultured *Xenopus* myotomal muscle cells. *J. Physiol. (Lond.)*. **405**, 169–185.
- Carlson B.J., Raftery M.A. 1993. Specific binding of ATP to extracellular sites on Torpedo acetylcholine receptor. *Biochem.* **32**, 7329–7333.
- Kostrominova T.Y. 2022. Skeletal muscle denervation: Past, present and future. *Int. J. Mol. Sci.* **23** (14), 7489.
- Banachewicz W., Supłat D., Krzemiński P., Pomorski P., Barańska J. 2005. P2 nucleotide receptors on C2C12 satellite cells. *Purinergic Signal.* **1** (3), 249–257.
- Ryten M., Hoebertz A., Burnstock G. 2001. Sequential expression of three receptor subtypes for extracellular ATP in developing rat skeletal muscle. *Dev. Dyn.* **221**, 331–341.
- Burnstock G., Kennedy C. 2011. P2X receptors in health and disease. *Adv. Pharmacol.* **61**, 333–372.
- Burnstock G., Verkhratsky A. 2009. Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta Physiol. (Oxf.)*. **195** (4), 415–447.
- Khairullin A.E., Grishin S.N., Gabdrakhmanov A.I., Ziganshin A.U. 2023. Effects of ATP on time parameters of contractility of rats' slow and fast skeletal muscles in normal and hypothermic conditions. *Muscles.* **2**, 23–35.
- Khairullin A.E., Grishin S.N., Eremeev A.A. 2019. Synaptic aspects of hypogravity motor syndrome. *Biophysics.* **64** (5), 828–835.
- Grishin S.N., Gabdrakhmanov A.I., Khairullin A.E., Ziganshin A.U. 2017. The Influence of glucocorticoids and catecholamines on the neuromuscular transmission. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A.* **11**, 253–260.
- Khairullin A.E., Grishin S.N., Ziganshin A.U. 2023. P2 receptor signaling in motor units in muscular dystrophy. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 1587.

ATP Causes Contraction of Denervated Skeletal Muscles

A. E. Khairullin^{1, 2, *}, A. Y. Teplov¹, S. N. Grishin¹, A. U. Ziganshin¹

¹Kazan State Medical University, Kazan, 420012 Russia

²Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

*e-mail: khajrulli@ya.ru

In this work we investigated the ability of humoral agonists (and their stable analogues) to induce contractions in mouse denervated *m. soleus* and *m. EDL*. Previously, we had found a change in the effectiveness of the modulating effect of ATP under the influence of some non-physiological factors in the neuromuscular synapses of rodents. The aim of this study is to evaluate the effect of ATP on the contractility of isolated skeletal muscles of mice after traumatic denervation. It was shown that 28-day denervation led to an increase in the strength of contractions of *m. soleus* and *m. EDL* induced by an acetylcholine analog. The application of ATP caused the contraction of denervated but not intact muscles. In the presence of a non-selective antagonist of the P2 receptors suramin, the effect of ATP ceased. We assume that the observed ATP-induced contraction can be accounted for by activation of postsynaptic P2X receptors in denervated muscles. Apparently, this effect is caused by an increase in the expression of postsynaptic receptors in response to a violation of neurotrophic control and the conductive ability of the nerve fiber.

Keywords: ATP, muscle contraction, P2 receptors, denervation, skeletal muscles, neuromuscular synapse