ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ, 2023, том 59, № 6, с. 514–521

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

МЕДИАТОРЫ СИМПАТИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ АТФ И НОРАДРЕНАЛИН В МОДУЛЯЦИИ АНТИТЕЛООБРАЗОВАНИЯ ПРИ ГЛУБОКОМ ОХЛАЖДЕНИИ ОРГАНИЗМА

© 2023 г. Т. В. Козырева[1,*], Е. С. Мейта[1,]**

[1]НИИ нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

**e-mail: kozyrevatv@neuronm.ru*

***e-mail: meytaes@neuronm.ru*

Поступила в редакцию 11.07.2023 г.
После доработки 14.10.2023 г.
Принята к публикации 22.10.2023 г.

В экспериментах на крысах исследовалось участие со-медиаторов симпатической нервной системы в угнетающем влиянии глубокого охлаждения на антителообразующую функцию селезенки. Изучалось: 1) воздействие глубокого охлаждения (снижение глубокой температуры на 3–4°С), 2) введение медиатора симпатической нервной системы норадреналина (НА, 1 мг/мл), 3) его со-медиатора АТФ (0.01 и 10 мг/мл) и 4) блокатора P2X-пуринергических рецепторов PPADS на количество антителообразующих клеток селезенки в ответ на иммунизацию эритроцитами барана. Глубокое охлаждение и АТФ угнетали, тогда как НА стимулировал антителообразование в селезенке. Блокада P2X-пуринергических рецепторов с помощью PPADS стимулировала антителообразование в норме. На фоне блокады P2X-пуринергических рецепторов угнетающее действие АТФ и глубокого охлаждения на антителообразование не проявлялось. Полученные результаты свидетельствуют о разнонаправленном влиянии со-медиаторов симпатической нервной системы на антителообразование в селезенке и позволяют считать, что угнетающее действие холода на антителообразование в селезенке происходит с участием АТФ через P2X пуринергические рецепторы.

Ключевые слова: глубокое охлаждение, норадреналин, АТФ, иммунный ответ, блокатор P2X пуринергических рецепторов, PPADS

DOI: 10.31857/S0044452923060062, **EDN:** GJUEBC

ВВЕДЕНИЕ

Реакция организма на воздействие того или иного фактора является комбинацией ответов различных физиологических систем организма. Охлаждение оказывает влияние практически на все функциональные системы организма, включая иммунную. Показано, что глубокое охлаждение приводит к угнетению иммунного ответа на антиген в селезенке, причем это проявляется в угнетении как антигенсвязывания, так и антителообразования [1–4].

Хорошо известно, что холодовое воздействие на организм вызывает активацию симпатической нервной системы, которое сопровождается выбросом норадреналина в кровь из симпатических нервных окончаний [5–8]. Механизм реализации действия эндогенного и экзогенного норадреналина на функцию различных органов и тканей предполагает вовлечение различных групп адренорецепторов [9, 10].

К настоящему времени наглядно продемонстрирована симпатическая и пуринергическая сотрансмиссия, т.е. при активации симпатических нервных окончаний выделяется не только норадреналин (НА), но и другие биологически активные вещества, в том числе и аденозин-5'-трифосфат (АТФ) [11–15]. Симпатическая нервная система, иннервируя иммунные органы, выделяет свои сотрансмиттеры – НА и АТФ – в непосредственной близости от иммунных клеток [16, 17]. АТФ, действуя как сигнальная молекула и активируя пуринергические рецепторы, может участвовать в формировании иммунного ответа организма [18]. АТФ взаимодействует с пуринергическими рецепторами клеток и индуцирует их различные реакции.

Существование со-медиаторов предполагает вариации механизмов нейромодуляции иммунных процессов. Роль АТФ, как нейротрансмиттера, в формировании иммунного ответа организма на холодовое воздействие не исследовалась. Учитывая то, что АТФ является со-медиатором норадреналина, важно понять, на какие составляющие иммунной реакции оказывают влияние каждый из этих медиаторов, а также через какие типы пуринергических рецепторов реализуется влияние АТФ. Для

изучения физиологической роли вещества, действующего через рецепторы клеточной мембраны, необходимы специфические блокаторы этих рецепторов. Показано, что пиридоксальфосфат-6-азофенил-2',4'-дисульфоновая кислота (PPADS) блокирует ионотропные P2X рецепторы АТФ [19, 20].

В настоящем исследовании предпринята попытка выяснить вклад пуринергической системы в механизмы взаимоотношения терморегуляторной и иммунной систем в условиях глубокого охлаждения организма. Мы попытались ответить на следующие вопросы: (1) какой из со-медиаторов симпатической нервной системы НА или АТФ ответственен за угнетение антителообразования в селезенке, которое происходит при глубоком охлаждении, (2) выяснить возможность участия P2X пуринергических рецепторов в эффектах АТФ и глубокого охлаждения на антителообразование.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

В экспериментах использовались крысы-самцы Вистар массой 270–290 г, содержавшиеся в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Все процедуры, включая фиксацию термопары, ионофорез, охлаждение и иммунизацию на пике охлаждения, проводились на анестезированных крысах, чтобы исключить эмоциональную составляющую и движение животных. Каждое животное использовалось только один раз.

Введение АТФ, НА и PPADS

Ионофорез биологически активных веществ АТФ (Fluka, BioChemika) и норадреналин (НА) (Sigma) производили с использованием системы доставки лекарств (медицинский гальванизатор “Поток”, Россия); сила тока составляла 0.08 мА/см^2 на площади 25 см^2 в течение 20 мин. PPADS (Sigma) вводили внутрибрюшинно. Температура применяемых растворов составляла 37–38°С. В опытных группах животным перед охлаждением проводилось внутрибрюшинное введение или ионофорез 1 мл того или иного вещества в кожу живота (область последующего приложения холодового стимула).

Охлаждение

Эксперименты проводились при температуре воздуха в помещении 24–25°С. Исходно с помощью водяного термода и термостата поддерживались температура кожи живота 37.3 ± 0.13°С, ректальная температура 38.1 ± 0.11°С. Использовалась модель быстрого охлаждения с вовлечением динамической и статической компонент активности кожных терморецепторов. Охлаждение проводилось с помощью термода и термостата в области живота, предварительно освобожденной от шерсти, со скоростью 0.1°С/с, площадь охлаждаемой поверхности составляла 25 см^2. Во всех случаях глубина охлаждения животных была одинаковой, до снижения ректальной температуры на 3–4°С. Для контроля глубины и скорости охлаждения ректальную температуру и температуру кожи измеряли с помощью термопар и регистрировали с помощью системы “BIOPAC” (Biopac Systems Inc., Goleta, CA, США).

Экспериментальные группы животных

Для выявления иммуномодулирующих эффектов животных подвергали экспериментальному воздействию по одной из указанных схем: (1) анестезия, иммунизация (контроль, $n = 19$); (2) анестезия, охлаждение, иммунизация на пике охлаждения (влияние быстрого глубокого охлаждения, предшествующего иммунизации, на иммунный ответ (БГО, $n = 12$); (3) анестезия, ионофорез биологически активных веществ, иммунизация (влияние биологически активных веществ на иммунный ответ в термонейтральных условиях (АТФ 0.001 мг/мл, $n = 13$; АТФ 10 мг/мл, $n = 11$; НА 1 мг/мл, $n = 10$; PPADS 0.001 мг/мл, $n = 12$; АТФ 0.001 мг/мл + PPADS 0.001 мг/мл, $n = 12$)); и (4) анестезия, ионофорез биологически активных веществ, быстрое глубокое охлаждение (БГО), иммунизация (влияние охлаждения на фоне биологически активных веществ на иммунный ответ (НА 1 мг/мл + БГО, $n = 10$; PPADS 0.001 мг/мл + БГО, $n = 10$; АТФ 0.001 мг/мл + PPADS 0.001 мг/мл + БГО, $n = 14$).

Иммунизация и забор материала

Животных иммунизировали эритроцитами барана (внутрибрюшинное введение 5×10^8 эритроцитов барана в 0.5 мл 0.9%-ного NaCl) на пике охлаждения, в момент снижения ректальной температуры на 3–4°С. На пятые сутки после процедур охлаждения и иммунизации животных декапитировали и производили забор селезенки для иммунологического анализа.

Выделение клеток селезенки

Селезенку забирали во флакончик со средой, затем вынимали, очищали от жира и взвешивали. Из середины селезенки, захватывая все слои, ножницами отрезали кусочек, взвешивали на торсионных весах, помещали в среду. Вес кусочка составлял 100–200 мг. Результаты взвешивания фиксировали в журнале.

В гомогенизатор наливали 1.5 мл среды Хенкса и гомогенизировали вышеуказанную часть селезенки двумя плавными движениями. Добавляли еще 1.5 мл среды, встряхивали. Полученную смесь фильтровали через металлическую сеточку. Ядро-

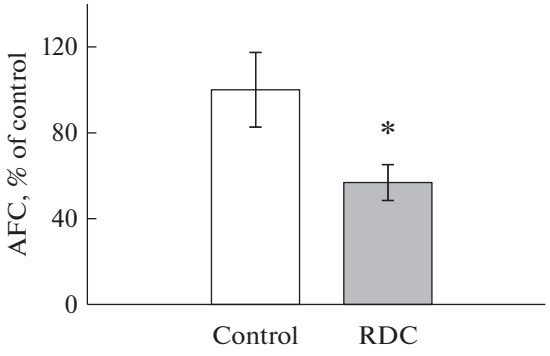

Рис. 1. Влияние быстрого глубокого охлаждения (БГО, RDC-Rapid Deep Cooling) на показатели антителообразования в селезенке у крыс. Контроль принят за 100% – исходные показатели у животных в термонейтральных условиях без воздействия холода. * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем. AFC (Antibody Forming Cells) – АОК (антителообразующие клетки).

содержащие клетки, если было необходимо знать их количество, подсчитывали в камере Горяева.

Иммунная реакция

Антителообразование (АОК) в селезенке оценивалось по количеству бляшкообразующих клеток с помощью метода локального гемолиза [21, 22]. Принцип метода заключается в следующем: иммунные лимфоциты инкубируются с эритроцитами барана (ЭБ), которыми проводили иммунизацию. Секретируемые иммунными лимфоцитами антитела диффундируют в окружающее пространство и фиксируются на эритроцитах. Добавление комплемента вызывает лизис эритроцитов с присоединенными антителами, и вокруг лимфоцитов, выделивших антитела, образуются прозрачные зоны гемолиза, число которых можно сосчитать.

Для определения АОК в жидкой среде готовили инкубационную смесь: 0.8 мл разведенной в 50 раз клеточной суспензии, 0.1 мл суспензии ЭБ (4×10^9) и 0.1 мл разведенной в 1.5 раза сыворотки морской свинки (источник комплемента). Компоненты перемешивали, смесь заливали в стеклянные камеры для подсчета зон гемолиза. Объем камеры фиксировался для последующего подсчета антителообразующих клеток во всей селезенке.

Расчет АОК на селезенку производили по следующей формуле:

$$A = \frac{n}{(0.8 \times V_k)} \times S \times V_1 \times \frac{M_1}{M_2}$$

Где А – количество АОК в селезенке;

n – количество АОК в камере;

V_k – объем камеры;

S – разведение;

V_1 – исходный объем;

M_1 – масса всей селезенки;

M_2 – масса кусочка селезенки.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 8 (Statsoft Russia). Проверку на нормальность распределения проводили с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Для сравнения идентичных показателей в контрольной и экспериментальной группах использовали *t*-критерий Стьюдента. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Критический уровень значимости принимался равным 5% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Быстрое глубокое охлаждение (БГО) со снижением ректальной температуры на 3–4°С приводило к угнетению антителообразования в селезенке, количество антителообразующих клеток в селезенке снижалось в два раза ($p < 0.05$) при быстром глубоком охлаждении (рис. 1). Что подтверждает данные, ранее полученные нами и другими исследователями [4, 23, 24].

Для выявления ведущего медиатора в эффекте глубокого охлаждения на антителообразование проводились следующие исследования.

Ионофоретическое введение НА (1 мг/мл) вызывало стимуляцию антителообразования в селезенке в два раза (рис. 2), т.е. эффект НА в данном случае был противоположным эффекту глубокого охлаждения (БГО). Глубокое охлаждение на фоне предварительного введения НА также приводило к угнетению уровня антителообразования в селезенке (число антителообразующих клеток селезенки – контроль: 349125.70 ± 42928.28, $n = 10$; НА+ БГО: 160651.20 ± ± 55435.45, $n = 7$; $t = 2.62$, $p < 0.05$), как и при охлаждении без воздействия веществами (рис. 1).

Ионофоретическое введение АТФ, как в концентрации 0.001 мг/мл, так и в концентрации 10 мг/мл приводило к угнетению антителообразования в селезенке более, чем в два раза (рис. 2). Эффект АТФ оказался однонаправленным с действием холода и противоположным эффекту НА, который вызывал стимуляцию антителообразования.

*Участие P2X пуринергических рецепторов в эффектах АТФ на антителообразование. Б*локада P2X рецепторов с помощью PPADS в противоположность АТФ вызывала значительную (в 2 раза) стимуляцию антителообразования в селезенке (рис. 3).

Введение же АТФ на фоне блокады P2X рецепторов уже не вызывало статистически значимых изменений антителообразования в селезенке.

Угнетающее влияние глубокого охлаждения на антителообразование в селезенке не проявлялось,

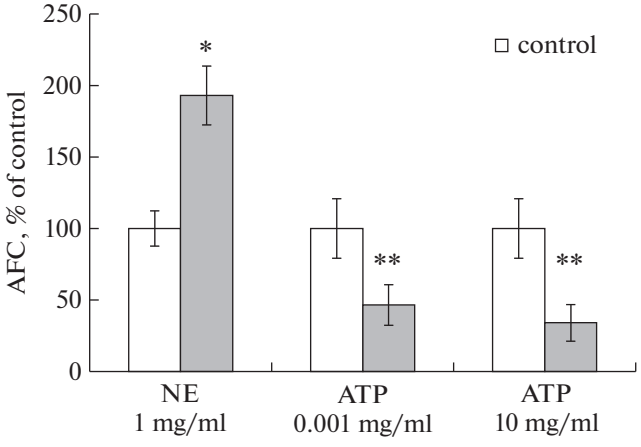

Рис. 2. Влияние норадреналина (НА 1мг/мл) и АТФ (0.001 и 10 мг/мл) на показатели антителообразования в селезенке у крыс в термонейтральных условиях. Контроль принят за 100% – исходные показатели у животных в термонейтральных условиях без воздействия веществ. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ по сравнению с контролем. AFC (Antibody Forming Cells) – АОК (антителообразующие клетки).

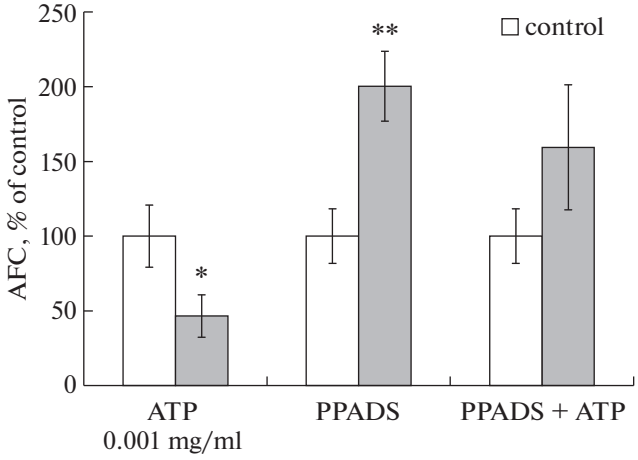

Рис. 3. Влияние АТФ (0.001 мг/мл), блокатора пуринергических рецепторов PPADS и PPADS на фоне предварительного введения АТФ на показатели антителообразования в селезенке у крыс в термонейтральных условиях. Контроль принят за 100% – исходные показатели у животных в термонейтральных условиях без воздействия веществ. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ по сравнению с контролем. AFC (Antibody Forming Cells) – АОК (антителообразующие клетки).

если охлаждение проводилось после предварительного введения блокатора P2X рецепторов (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты показали, что два со-медиатора симпатической нервной системы могут поразному изменять характер антителообразования в селезенке. НА преимущественно стимулирует антителообразование, тогда как АТФ в исследованных дозах, наоборот, угнетает. Угнетающий эффект глубокого охлаждения на антителообразование, по-видимому, связан именно с АТФ. Об этом свидетельствуют следующие результаты, полученные в настоящем исследовании. В термонейтральных условиях НА стимулирует антителообразование, тогда как АТФ его угнетает. Глубокое охлаждение на фоне НА угнетает антителообразование, т.е. предварительное введение НА не снимает угнетающего эффекта глубокого охлаждения. АТФ угнетающе влияет на антителообразование в термонейтральных условиях, при этом предварительная блокада пуринергических P2X рецепторов предотвращает это угнетающее действие АТФ. Угнетающее действие глубокого охлаждения также не проявляется на фоне блокады P2X рецепторов. Это свидетельствует о том, что именно P2X рецепторы вовлечены в угнетающее действие АТФ на антителообразование при глубоком охлаждении. В литературе имеются немногочисленные факты, свидетельствующие о специфической температурной чувствительности пуринергических P2X3 рецепторов [25, 26], и взаимосвязи P2X7 рецепторов с регулированием температуры тела, особенно при воспалении [27, 28].

Попав в кровь, АТФ, помимо паракринной роли как межклеточного мессенджера, высвобождаемый клетками, также может действовать аутокринно, что помогает регулировать и настраивать функции клеток [18, 29]. Высвобождение АТФ из иммунных кле-

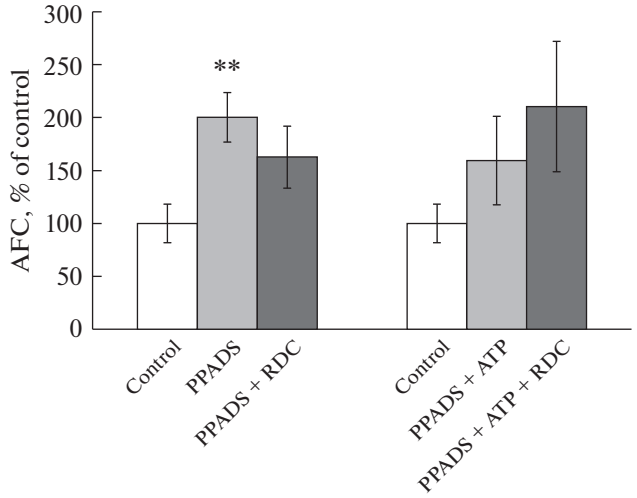

Рис. 4. Влияние быстрого глубокого охлаждения (RDC) после предварительного введения PPADS или сочетания PPADS+АТФ на антителообразование в селезенке у крыс. Контроль принят за 100% – исходные показатели у животных в термонейтральных условиях без воздействия веществ или холода. ** – $p < 0.01$ по сравнению с контролем. AFC (Antibody Forming Cells) – АОК (антителообразующие клетки).

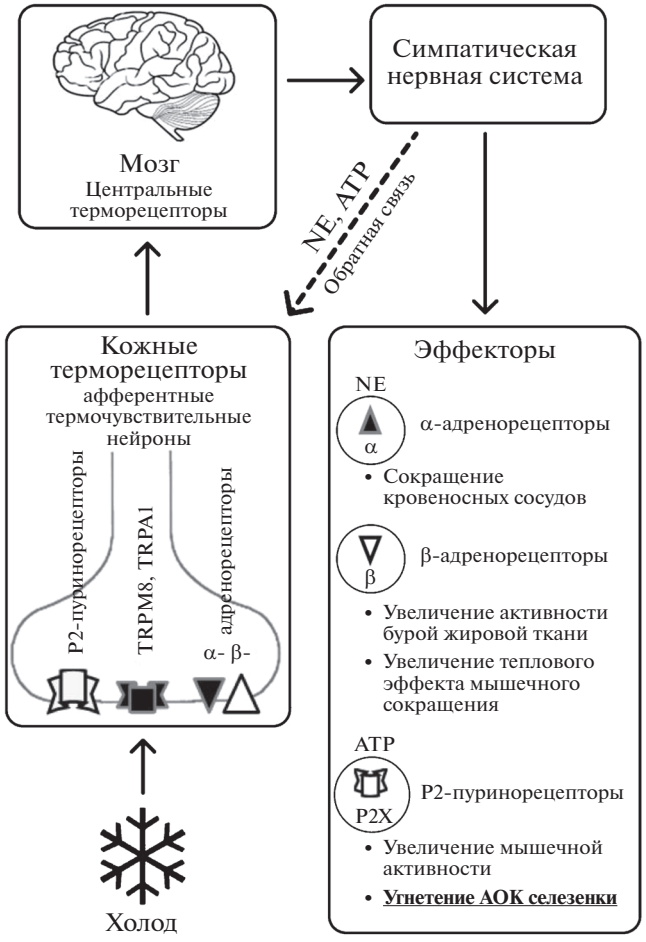

Рис. 5. Схема развития реакций организма на внешнее охлаждение. Переработано и дополнено из [40]. Факты, установленные в настоящем исследовании, подчеркнуты. АОК – антителообразующие клетки.

ток происходит в субклеточных доменах, где локально высвобождаемый АТФ стимулирует пуринергические рецепторы, которые регулируют функциональные клеточные ответы [30–32]. Иммунные клетки, например, высвобождают АТФ в ответ на различные стимулы и формируют околоклеточные горячие точки АТФ, которые активируют соседние пуринергические рецепторы, и тем самым помогают инициировать и управлять последующими функциональными клеточными реакциями, такими как миграция клеток, распознавание антигена и другие важные задачи, необходимые для защиты организма [33–35]. Такие локализованные пуринергические сигнальные домены обнаруживаются на поверхности нейтрофилов, Т-клеток и других иммунных клеток [36–38].

Ранее нами были получены данные об участии НА и адренорецепторов в модуляции функции антигенсвязывания [4, 9]. Возможно, что два эти процесса, антигенсвязывание и антителообразование, по-разному реагируют на со-медиаторы симпатической нервной системы. Нами было показано, что при неглубоком охлаждении, когда повышение концентрации НА в крови значительно меньше, чем при глубоком [5], наблюдается стимуляция антигенсвязывания с участием α-адренорецепторов. При глубоком охлаждении и более значительном выбросе НА в кровь, происходит угнетение антигенсвязывания, но уже с участием β-адренорецепторов [9]. Антителообразование при неглубоком охлаждении также стимулируется, а при глубоком – угнетается, но это угнетение, как показывают результаты настоящей работы, связано уже не с НА, а с АТФ и P2X пуринергическими рецепторами. Следовательно, можно полагать, что при активации симпатической нервной системы два со-медиатора НА и АТФ преимущественно регулируют разные компоненты иммунного ответа организма.

Интересно также отметить, что в механизмах формирования терморегуляторных реакций, НА и АТФ также регулируют разные составляющие терморегуляторного ответа на холод. НА преимущественно влияет на сосудистую реакцию, несократительный термогенез и первую срочную фазу метаболического ответа, тогда как АТФ ответственна за сократительный мышечный термогенез – дрожь [39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов и предыдущих исследований, а также данных литературы можно представить следующую схему развития реакции организма на глубокое охлаждение (рис. 5). Внешнее холодовое воздействие активирует периферические кожные терморецепторы через термочувствительные ионные каналы (например, TRPM8, TRPA1). Термосенсоры посылают сигнал в структуры мозга, где формируется эфферентный сигнал, который стимулирует симпатическую нервную систему. Со-трансмиттеры симпатической нервной системы норадреналин (НА) и АТФ действуют на эффекторные органы, вызывая констрикцию кожных кровеносных сосудов через α-адренорецепторы, усиливая активность бурой жировой ткани и повышая эффект теплового сокращения мышц, через β-адренорецепторы, усиливая терморегуляторную активность скелетных мышц (дрожь) и угнетая антителообразование клеток (АОК) селезенки через P2X-рецепторы. В то же время НА и АТФ воздействуют на кожные термочувствительные афференты через P2X и адренорецепторы, изменяя их чувствительность к температуре и осуществляя, таким образом, обратную связь с периферическими афферентами.

Таким образом, и прежние данные, и результаты настоящего исследования демонстрируют наличие разных путей реализации у со-медиаторов симпатической нервной системы, т.е. АТФ и НА, воздействуя на различные компоненты, обусловливают

комплексную регулируемую эффекторную реакцию. Уточнение роли каждого из со-медиаторов симпатической нервной системы в эффекторных реакциях требует дополнительных исследований.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям этического комитета НИИ нейронаук и медицины, протокол № 3-О от 18 марта 2021 г.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование было поддержано за счет бюджетного финансирования фундаментальных научных исследований (тема № 122042700001-9).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в отношении публикации данной рукописи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Т.В.К.), постановка эксперимента (Е.С.М.), обработка данных (Т.В.К., Е.С.М.), написание и редактирование манускрипта (Т.В.К., Е.С.М.)

БЛАГОДАРНОСТИ

Галине Михайловне Храмовой за оказанное содействие в постановке экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hu GZ, Yang SJ, Hu WX, Wen Z, He D, Zeng LF, Xiang Q, Wu XM, Zhou WY, Zhu QX* (2016) Effect of cold stress on immunity in rats. Exp Therapeut Med 11 (1): 33–42. https://doi.org/10.3892/etm.2015.2854
2. *Vialard F, Olivier M* (2020) Thermoneutrality and immunity: how does cold stress affect disease? Front Immunol 11: 588387. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.588387
3. *Kozyreva TV, Eliseeva LS* (2000) Immune response in cold exposures of different types. J Thermal Biol 25 (5): 401–404. https://doi.org/10.1016/S0306-4565(99)00113-8
4. *Kozyreva TV, Gonsales EV, Eliseeva LS* (2004) β-adrenoreceptor participation in the formation of the thermoregulatory and immune responses under the effect of rapid deep cooling. J Therm Biol 29 (7–8): 819–824. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2004.08.077
5. *Kozyreva TV, Tkachenko EY, Kozaruk VP, Latysheva TV, Gilinsky MA* (1999) Effects of slow and rapid cooling on catecholamine concentration in arterial plasma and the skin. Am J Physiol 276 (6): R1668–72. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.276.6.R1668
6. *Brazaitis M, Eimantas N, Daniuseviciute L, Mickeviciene D, Steponaviciute R, Skurvydas A* (2014) Two Strategies for Response to 14°C Cold-Water Immersion: Is there a Difference in the Response of Motor, Cognitive, Immune and Stress Markers? PLoS ONE 9 (10): e109020. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109020
7. *Gagnon DD, Gagnon SS, Rintamäki H, Törmäkangas T, Puukka K, Herzig KH, Kyröläinen H* (2014) The effects of cold exposure on leukocytes, hormones and cytokines during acute exercise in humans. PLoS One 9 (10): e110774. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110774
8. *Alba BK, Castellani JW, Charkoudian N* (2019) Cold-induced cutaneous vasoconstriction in humans: Function, dysfunction and the distinctly counterproductive. Exp Physiol 104 (8): 1202–1214. https://doi.org/10.1113/EP087718
9. *Eliseeva LS, Chramova GM, Gonsales EB, Kozyreva TV* (2009) α1- and β-Adrenoblockers Effects on Immunogenesis in Rats under Thermoneutral Conditions and after Cooling of Various Extent. Bull Exp Biol Med 147: 208–212. https://doi.org/10.1007/s10517-009-0476-4
10. *Gein SV, Karnaukhova AV* (2022) The Role of β-Adrenergic Receptors in the Regulation of the Functions of Innate Immune Cells during Cold Stress In Vivo. Bull of Exp Biol Med 173 (1): 72–76. https://doi.org/10.1007/s10517-022-05496-1
11. *Townsend AD, Wilken GH, Mitchell KK, Martin RS, Macarthur H* (2016) Simultaneous analysis of vascular norepinephrine and ATP release using an integrated microfluidic system. J Neurosci Method 266: 68–77. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.03.015
12. *Burnstock G* (2017) Purinergic signaling in the cardiovascular system. Circul Res 120 (1): 207–228. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309726
13. *Burnstock G* (2020) Introduction to purinergic signalling in the brain. Glioma signaling: 1–12. https://doi.org/10.1007/978-3-030-30651-9_1
14. *Kennedy C* (2021) ATP as a cotransmitter in sympathetic and parasympathetic nerves-another Burnstock legacy. Autonom Neurosci 235: 102860. https://doi.org/10.1016/j.autneu.2021.102860
15. *Burnstock G* (2020) Introduction to Purinergic Signaling. Methods Mol Biol 2041: 1–15. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9717-6_1
16. *Haskó G, Szabó C* (1998) Regulation of cytokine and chemokine production by transmitters and co-transmitters of the autonomic nervous system. Biochem Pharmacol 56 (9): 1079–1087. https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00153-1
17. *Pongratz G, Straub RH* (2014) The sympathetic nervous response in inflammation. Arthrit Res Ther 16: 1–12. https://doi.org/10.1186/s13075-014-0504-2

18. *Cekic C, Linden J* (2016) Purinergic regulation of the immune system. Nat Rev Immunol 16 (3): 177–192. https://doi.org/10.1038/nri.2016.4

19. *Cho JH, Jung KY, Jung Y, Kim MH, Ko H, Park CS, Kim YC* (2013) Design and synthesis of potent and selective $P2X_3$ receptor antagonists derived from PPADS as potential pain modulators. Eur J Med Chem 70: 811–830. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.10.026

20. *Huo H, Fryatt AG, Farmer LK, Schmid R, Evans RJ* (2018) Mapping the binding site of the P2X receptor antagonist PPADS reveals the importance of orthosteric site charge and the cysteine-rich head region. J Biol Chem 293 (33): 12820–12831. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003737

21. *Шварцман ЯС* (1966) Изучение синтеза антител одиночными клетками к растворимым белкам. Бюл экспер биол мед 12: 88–92. [Shvartsman YaS (1966) Study of the synthesis of antibodies by single cells to soluble proteins. Bull Exp Biol Med 12: 88–92. (In Russ)].

22. *Козлов ВА, Кудаева ОТ, Наумова ЕН, Елисеева ТВ* (1988) Методическое руководство по применению метода локального гемолиза к статистическому оцениванию результатов. Новосибирск. СО АМН СССР: 15. [*Kozlov VA, Kudaeva OT, Naumova EN, Eliseeva TV* (1988) Methodological guide to the application of the method for determining hemolysis by a statistical method for evaluating results. Novosibirsk. SO AMS USSR: 15. (In Russ)].

23. *Gein SV, Sharav'eva IL* (2018) Immunomodulating effects of cold stress. Biol Bull Rev 8: 482–488. https://doi.org/10.1134/S207908641806004X

24. *Patrakeeva VP, Basova EE* (2018) Effects of Low Temperatures on the Formation of Adaptive Reactions: A Review. Internat J Biomed 8 (2): 95–101. https://doi.org/10.21103/Article8(2)_RA1

25. *Giniatullin R, Nistri A* (2013). Desensitization properties of P2X3 receptors shaping pain signaling. Fron Cell Neurosci 7: 245. https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00245

26. *Fabbretti E* (2019) P2X3 receptors are transducers of sensory signals. Brain Res Bull 151: 119–124. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.12.020

27. *Davis CJ, Taishi P, Honn KA, Koberstein JN, Krueger JM* (2016) P2X7 receptors in body temperature, locomotor activity, and brain mRNA and lncRNA responses to sleep deprivation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 311 (6): R1004–R1012. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00167.2016

28. *Di Virgilio F, Sarti AC, Grassi F* (2018) Modulation of innate and adaptive immunity by P2X ion channels. Curr Opin Immunol 52: 51–59. https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.03.026

29. *Corriden R, Insel PA* (2010) Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. Sci Signal 3: re1. https://doi.org/10.1126/scisignal.3104re1

30. *Bao Y, Chen Y, Ledderose C, Li L, Junger WG* (2013) Pannexin 1 channels link chemoattractant receptor signaling to local excitation and global inhibition responses at the front and back of polarized neutrophils. J Biol Chem 288: 22650–22657. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.476283

31. *Ledderose C, Bao Y, Zhang J, Junger WG* (2015) Novel method for real-time monitoring of ATP release reveals multiple phases of autocrine purinergic signalling during immune cell activation. Acta Physiol (Oxf) 213: 334–345. https://doi.org/10.1111/apha.12435

32. *Ledderose C, Bromberger S, Slubowski CJ, Sueyoshi K, Aytan D, Shen Y, Junger WG* (2020) The purinergic receptor P2Y11 choreographs the polarization, mitochondrial metabolism, and migration of T lymphocytes. Sci Signal 13: eaba3300. https://doi.org/10.1126/scisignal.aba3300

33. *Wang X, Chen D* (2018) Purinergic regulation of neutrophil function. Front Immunol 9: 399. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00399

34. *Sáez PJ, Vargas P, Shoji KF, Harcha PA, Lennon-Duménil AM, Sáez JC* (2017) ATP promotes the fast migration of dendritic cells through the activity of pannexin 1 channels and P2X(7) receptors. Sci Signal 10: eaah7107. https://doi.org/10.1126/scisignal.aah7107

35. *Borges da Silva H, Beura LK, Wang H, Hanse EA, Gore R, Scott MC, Walsh DA, Block KE, Fonseca R, Yan Y, Hippen KL, Blazar BR, Masopust D, Kelekar A, Vulchanova L, Hogquist KA, Jameson SC* (2018) The purinergic receptor P2RX7 directs metabolic fitness of long-lived memory CD8+ T cells. Nature 559: 264–268. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0282-0

36. *Bao Y, Ledderose C, Graf AF, Brix B, Birsak T, Lee A, Zhang J, Junger WG* (2015) mTOR and differential activation of mitochondria orchestrate neutrophil chemotaxis. J Cell Biol 210: 1153–1164. https://doi.org/10.1083/jcb.201503066

37. *Takenaka MC, Robson S, Quintana FJ* (2016) Regulation of the T cell response by CD39. Trends Immunol 37 (7): 427–439. https://doi.org/10.1016/j.it.2016.04.009

38. *Ledderose C, Liu K, Kondo Y, Slubowski CJ, Dertnig T, Denicoló S, Arbab M, Hubner J, Konrad K, Fakhari M, Lederer JA, Robson SC, Visner GA, Junger WG* (2018) Purinergic P2X4 receptors and mitochondrial ATP production regulate T cell migration. J Clin Invest 128: 3583–3594. https://doi.org/10.1172/JCI120972

39. *Kozyreva TV, Meyta ES, Khramova GM* (2015) Effect of the sympathetic nervous system co-transmitters ATP and norepinephrine on thermoregulatory response to cooling. Temperature 2 (1): 121–128. https://doi.org/10.1080/23328940.2014.1000705

40. *Kozyreva TV, Meyta ES, Kozaruk VP* (2017) Participation of Purinergic P2X Receptors in the Thermoregulatory Response to Cooling. Bull Exp Biol Med 162 (5): 606–610. https://doi.org/10.1007/s10517-017-3668-3

MEDIATORS OF THE SYMPATHETIC NERVOUS SYSTEM ATP AND NORADRENALINE IN THE MODULATION OF ANTIBODY FORMATION DURING DEEP COOLING OF THE ORGANISM

T. V. Kozyreva[a,#] and E. S. Meyta[a,##]

[a]*Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia*

[#]*e-mail: kozyrevatv@neuronm.ru;*

[##]*e-mail: meytaes@neuronm.ru*

In experiments on rats, the participation of co-mediators of the sympathetic nervous system in the suppressive effect of deep cooling on the antibody-forming function of the spleen was studied. Studied: 1) the effect of deep cooling (decrease in deep temperature by 3–4°C), 2) the introduction of the mediator of the sympathetic nervous system norepinephrine (NE, 1 mg/ml), 3) its co-transmitter ATP (0.01 mg/ml and 10 mg/ml) and 4) P2X-purinergic receptor blocker PPADS on the number of antibody-forming cells of the spleen in response to immunization with sheep erythrocytes. Deep cooling as well as ATP inhibited, while NE stimulated antibody formation in the spleen. Blockade of P2X-purinergic receptors by PPADS stimulated antibody formation in the norm. Against the background of blockade of P2X-purinergic receptors, the inhibitory effect of ATP and deep cooling on antibody formation was not manifested. The results obtained indicate the opposite effects of co-mediators of the sympathetic nervous system on antibody formation in the spleen and suggest that the inhibitory effect of cold on antibody formation in the spleen occurs with the participation of ATP through P2X-purinergic receptors.

Keywords: cold, norepinephrine, ATP, immune response, P2X purinergic receptor blocker, PPADS