

ПУРИНЕРГИЧЕСКАЯ МОДУЛЯЦИЯ СОКРАЩЕНИЯ ГЛАЗНЫХ МЫШЦ

© 2025 г. С.Н. Гришин*, #, А.Н. Горшунова**, А.Ю. Теплов*, А.С. Гришин***,
А.Р. Насыбуллин***, А.Е. Хайруллин*, ****

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

**Казанский юридический институт МВД России, Магистральная ул., 35/1, Казань, 420108, Россия

***Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева,
ул. К. Маркса, 10, Казань, 420111, Россия

****Казанский федеральный университет, Кремлевская ул., 18, Казань, 420008, Россия

#E-mail: sgrishin@inbox.ru

Поступила в редакцию 27.12.2024 г.

После доработки 10.01.2025 г.

Принята к публикации 15.01.2025 г.

Исследована проблема пуринергической регуляции в синапсах фазных и тонических мышц теплокровных. Для этого оценено действие котрансмиттера основного медиатора – АТФ – и его стойкого метаболита аденоzin на сокращение различных окуломоторных систем крысы – латеральной прямой (тонической) и круговой (фазной) мышц глаза. АТФ на четверть потенцировала карбахолин-вызванное сокращение латеральной прямой мышцы глаза крысы, а данный пурин, наоборот, достоверно угнетал карбахолин-вызванные сокращения круговой мышцы глаза. Не выявлено сколько-нибудь значимого проявления модуляционного действия аденоzина на карбахолин-вызванное сокращение исследуемых мышц. Полученные результаты свидетельствуют о разнонаправленном постсинаптическом действии АТФ на фазные и тонические окуломоторные системы.

Ключевые слова: круговая мышца глаза, латеральная прямая мышца глаза, АТФ, карбахолин, механомиография, мышечное сокращение.

DOI: 10.31857/S0006302925020146, **EDN:** KYVPPG

Изменение интенсивности выделения медиатора из нервного окончания является эффективным способом обеспечения синаптической пластиности [1]. Один из конкретных механизмов, контролирующих нейросекрецию, связан с активацией пресинаптических рецепторов медиаторами и комедиаторами.

Синаптическая модуляторная функция эндогенного пурина – аденоzинтрифосфорной кислоты (АТФ) – была открыта лишь в конце прошлого века, причем первоначально ей предполагалось значение только как предшественника синаптически активного аденоzина [2]. В последующем работами других исследователей было доказано собственное модуляционное действие АТФ по принципу отрицательной обратной связи в синапсах фазных мышц амфибий [3]. Выделяясь из синаптических везикул нервного окончания мотонейрона совместно с основным медиатором ацетилхолином, АТФ угнетает секрецию ацетилхолина [4]. АТФ угнетает квантовую [5] и неквантовую [6, 7] секрецию медиатора, действуя на

P2-рецепторы. Конечный продукт ее распада – аденоzин – реализует свое действие на вызванную и спонтанную квантовую секрецию через аденоzиновые рецепторы. Аденоzиновые рецепторы являются по структуре метаботропными. Различают A₁, A_{2A}, A_{2B} и A₃ подтипы аденоzиновых рецепторов. P2-рецепторы, агонистом которых является АТФ, делятся на ионотропные (P2X_{1–7}) и метаботропные (P2Y_{1,2,4,6,11–14}) подтипы [8]. Выявление конкретных подтипов задействованных аденоzиновых и P2-рецепторов, их фармакологическая характеристика являются начальными этапами изучения эффекторных механизмов синаптической регуляции пуринами функции различных типов скелетных мышц.

Пресинаптическое ингибиторное действие АТФ и аденоzина в нервно-мышечном синапсе было описано в основном на препаратах холднокровных животных, при этом исследования были проведены лишь на быстрых фазных скелетных мышцах [9–11]. В тех немногих работах [12], где опыты ставились на теплокровных животных, эксперименты проводили, руководствуясь удобством препарирования, на синапсах диафрагмы,

Сокращение: АТФ – аденоzинтрифосфорная кислота.

что не может быть экстраполировано как типичное воздействие пуринов на все фазные скелетные мышцы теплокровных. Кроме того, в упомянутых исследованиях практически не исследовались вызванные пуринами изменения параметров сократительной активности самой мышцы. Остается обойденной вниманием такая важная, пусть и не столь распространенная, тоническая мускулатура теплокровных — мышцы среднего уха и мышцы, приводящие глазное яблоко.

В данной работе мы представили результаты исследования действия пуринов — АТФ и аденоцина — на карбахолин-вызванное сокращение различных окуломоторных систем крысы — латеральной прямой (тонической) и круговой (фазной) мышц глаза, чтобы выявить особенности их пуринергической регуляции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на лабораторных крысах обоего пола массой тела 140–180 г. Для механомиографических исследований выделяли препараты латеральной прямой и круговой мышц глаза крысы (рис. 1). Для получения препарата круговой мышцы глаза выделяли ее мышечное кольцо, отсепарируя собственно мышечную ткань и удаляя покровную. Для выделения латеральной прямой мышцы глаза крысы предварительно иссекали наружную стенку глазницы.

Регистрацию сокращения проводили в условиях изометрии, которая достигалась растяжением мышц в течение 20 мин с силой 0.5 г при постоянной перфузии раствором Кребса и температурном режиме 20–21°C. Сокращение регистрировали изометрическими датчиками механической активности MLT050/D (ID Instruments, Австралия), аналоговый сигнал оцифровывали и обрабатывали стандартной системой сбора данных.

Сократительную функцию анализировали по показателям сокращения мышц на карбахолин. Оценивали силу сокращения мышцы.

Влияние на мышцы АТФ и аденоцина (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) оценивали при сравнении показателей сокращения до и после 5-минутной перфузии их раствором, содержащим либо АТФ, либо аденоцин в заданной молярной концентрации ($1 \cdot 10^{-4}$ М); время действия пуринов на мышцу определялось длительностью перфузии.

Полученные результаты подвергали статистической обработке (BIOSTATISTICA, S.A. Glantz, McGraw Hill). Для анализа данных использовали параметрические и непараметрические критерии. При вероятности (p) не больше 0.05 разницу считали достоверной. Результаты представлены в

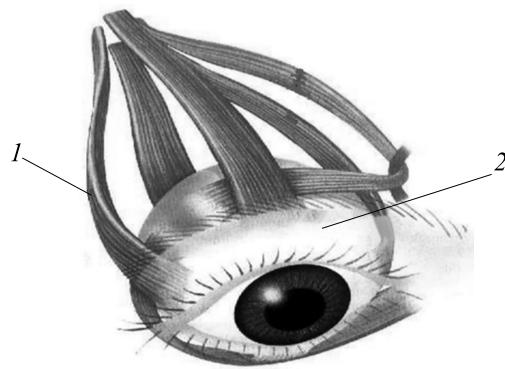


Рис. 1. Схематичное изображение расположения латеральной прямой (1) и круговой (2) мышц глаза крысы.

виде $X \pm Sx (n)$, где X — среднее арифметическое значение, Sx — средняя ошибка, n — количество наблюдений.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выявление субмаксимальной концентрации контракtilного агента. В первых сериях экспериментов мы выявляли субмаксимальные концентрации используемого контракtilного агента карбахолина — агониста холинорецепторов. Субмаксимальная концентрация для латеральной прямой мышцы глаза составила $1 \cdot 10^{-4}$ М, для круговой мышцы глаза — $2 \cdot 10^{-4}$ М.

Эксперименты с аппликацией пуринов. После 5-минутной перфузии раствором, содержащим 100 мкМ АТФ, было отмечено повышение силы карбахолин-вызванного сокращения содержащей в основном тонические волокна латеральной прямой мышцы глаза крысы до $127.5 \pm 7.2\%$ ($n = 10$, $p < 0.05$) от силы контрольных сокращений, принятой за 100%.

Мы не выявили сколь-нибудь значимое проявление модуляционного действия конечного метаболита АТФ — аденоцина — на карбахолин-вызванное сокращение наружной прямой мышцы глаза крысы. Так, после 5-минутной перфузии раствором, содержащим 100 мкМ аденоцина, сила сокращения наружной прямой мышцы глаза крысы составила $102.5 \pm 5.1\%$ ($n = 10$, $p > 0.05$) от контрольных значений (рис. 2).

Следующие серии экспериментов были проведены на препарате фазной мускулатуры крысы. АТФ (100 мкМ) угнетала карбахолин-вызванные сокращения круговой мышцы глаза до $73.4 \pm 8.1\%$ ($n = 10$), что достоверно ($p < 0.05$) отличалось от исходных значений в контроле.

В экспериментах с аденоцином данный пурин никак не модулировал карбахолин-вызванное сокращение круговой мышцы глаза:

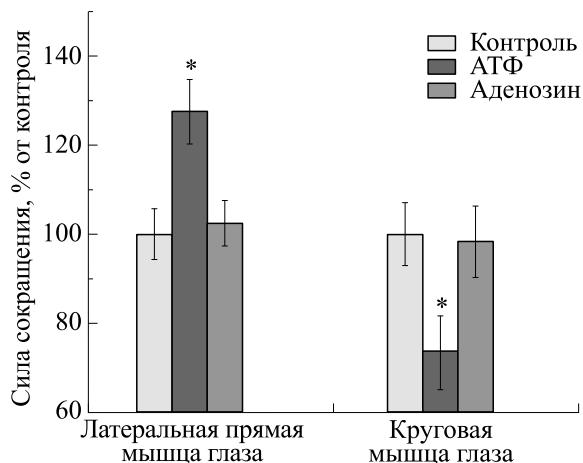


Рис. 2. Влияние АТФ и аденоцина на силу сокращения латеральной прямой и круговой мышц глаза крысы. Результаты представлены в виде $M \pm m$ в % от исходных величин, принятых за 100%; * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

после 5-минутной перфузии раствором, содержащим 100 мкМ аденоцина, сила сокращения круговой мышцы глаза составила $98.4 \pm 8.0\%$ ($n = 10$, $p > 0.05$) от контроля (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В середине прошлого века было установлено, что мышцы, приводящие глазное яблоко, имеют тонические волокна, которые способны длительно удерживать функциональную контрактуру без значительных энергетических затрат [13]. Одно из самых важных различий этих мышц заключается в том, что тонические мышечные волокна иннервируются тонкими нервными волокнами диаметром 2–4 мкм, имеющими скорость проведения менее 6 м/с и образующими синапсы в нескольких точках (от 4 до 12), распределенных вдоль волокна [14]. Иннервация может осуществляться как от одного, так и от двух-трех мотонейронов. Концевой аппарат имеет конфигурацию, резко отличающуюся от таковой у фазных волокон и получившую название «виноградной кисти» [15]. По размерам каждая синаптическая зона тонического волокна значительно меньше, чем фазного, но сумма площадей всех синаптических зон на волокне приблизительно равна площади синаптической зоны соответствующего по размерам фазного волокна [16]. Тонические волокна глаза характеризуются особой выраженностью суммации синаптических потенциалов во время ритмического раздражения, что в значительной мере определяется затянутостью отдельных потенциалов [17]. Дальнейшее поддержание высокого уровня слитной деполяризации, учитывая быстрое уменьшение амплитуды дискретных синап-

тических потенциалов, определяется, вероятно, накоплением медиатора в синаптических зонах по ходу ритмической стимуляции. Последнему, возможно, способствует малая холинэстеразная активность постсинаптической мембранны тонического волокна. Амплитуда синаптических потенциалов при частом раздражении значительно уменьшена по сравнению с исходной, что говорит о том, что равновесие между выделением медиатора на постсинаптическую мембрану и пополнением его запасов у пресинаптической мембранны при ритмическом раздражении нерва устанавливается здесь на более низком уровне, чем у фазных волокон.

Более 40 лет тонические волокна позвоночных вообще и глазодвигательные мышцы млекопитающих в частности специально не изучались. Только в текущем столетии нами было установлено [18], что АТФ, в отличие от своего производного — аденоцина, усиливала вызванное электростимуляцией сокращение тонической мышцы озерной лягушки — вентральной (передней) головки *m. triceps femoris* (*m. cruralis*). До этого в основном признавалась в первую очередь ингибиторная роль как АТФ, так и аденоцина на силу сокращения скелетных мышц [19, 20].

В данном исследовании в условии карбахолин-вызванного сокращения другого тонического образования, на этот раз у теплокровного — латеральной прямой мышцы глаза крысы, мы получили сходный эффект этого пурина на силу сокращения. При прочих равных условиях (изотоническое сокращение) в настоящем случае возбуждались напрямую постсинаптические холинорецепторы, а не пресинаптические нервные окончания, что не могло не сказаться на модулирующем эффекте пуринов. Действительно, конечный метаболит АТФ в синаптической щели — аденоцин — в случае карбахолин-вызванного сокращения уже не оказывал никакого значимого действия. В то же время при непрямой инициации сокращения, при электростимуляции нерва аденоцин обладает выраженным ингибиторным эффектом на силу сокращения мышц всех профилей [18–20]. Следует заметить, что описанный в данной работе ингибиторный эффект АТФ на сокращение фазной мышцы и потенцирующий — на тоническую мышцу — при общем совпадении с действием данного пурина на схожие по типу мышечные препараты при электростимуляции имеют разные механизмы. Таким образом, в данной работе мы вычленяем пре- и постсинаптические эффекты основных эндогенных модуляторов — пуринов — на функционирование тонических и фазных мышечных систем глаз теплокровных.

Выявление разнонаправленных постсинаптических эффектов АТФ на фазные и тонические окуломоторные системы имеет потенциально

важное значение для возможного фармакологического воздействия в случае ряда патологий. Без сомнения, необходимы дальнейшие глубокие изыскания в данном направлении.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках программы «Стратегическое академическое лидерство Казанского федерального университета» (ПРИОРИТЕТ-2030).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования были проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Протокол исследования на животных был одобрен локальным этическим комитетом Казанского федерального университета (номер протокола 24/5 от 20 ноября 2024 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Miller R. J. Presynaptic receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **38**, 201–227 (1998). DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.38.1.201
- Redman R. S. and Silinsky E. M. ATP released together with acetylcholine as the mediator of neuromuscular depression at frog motor nerve endings. *J. Physiol.*, **477** (Pt 1), 117–127 (1994). DOI: 10.1113/jphysiol.1994.sp020176
- Гиниатуллин Р. А. и Соколова Е. М. Модулирующая роль АТФ в нервно-мышечном синапсе. *Росс. физiol. журн. им. И.М. Сеченова*, **10**, 1132–1138 (1998).
- Ziganshin A. U., Kamaliev R. R., Grishin S. N., Ziganshina L. E., Zefirov A. L., and Burnstock G. The influence of hypothermia on P2 receptor-mediated responses of frog skeletal muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, **509** (2–3), 187–193 (2005). DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.11.031
- Giniatullin R. A. and Sokolova E. M. ATP and adenosine inhibit transmitter release at the frog neuromuscular junction through distinct presynaptic receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **124** (4), 839–844 (1998). DOI: 10.1038/sj.bjp.0701881
- Galkin A. V., Giniatullin R. A., Mukhtarov M. R., Svanidova I., Grishin S. N., and Vyskocil F. ATP but not adenosine inhibits nonquantal acetylcholine release at the mouse neuromuscular junction. *Eur. J. Neurosci.*, **13** (11), 2047–2053 (2001). DOI: 10.1046/j.0953-816x.2001.01582.x
- Маломуж А. И. и Никольский Е. Е. Неквантовое освобождение медиатора: миф или реальность? *Успехи физiol. наук*, **41**, 27–43 (2010).
- Зиганшин А. У. и Зиганшина Л. Е. *P2-рецепторы: перспективная мишень для будущих лекарств* (ЭОТАР-Медиа, М., 2009).
- Ribeiro J. A. and Sebastiao A. M. On the role, inactivation and origin of endogenous adenosine at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.*, **384**, 571–585 (1987). DOI: 10.1113/jphysiol.1987.sp016470
- Fu W. M. Regulatory role of ATP at developing neuromuscular junctions. *Prog. Neurobiol.*, **47** (1), 31–44 (1995). DOI: 10.1016/0301-0082(95)00019-r
- Sokolova E. M., Grishin S. N., Shakiryanova A. V., Talandova M. V., and Giniatullin R. A. Distinct receptors and different transduction mechanisms for ATP and adenosine at the frog motor nerve endings. *Eur. J. Neurosci.*, **18** (5), 1254–1264 (2003). DOI: 10.1046/j.1460-9568.2003.02835.x
- Salgado A. I., Cunha R. A., and Ribeiro J. A. Facilitation by P(2) receptor activation of acetylcholine release from rat motor nerve terminals: interaction with presynaptic nicotinic receptors. *Brain Res.*, **877** (2), 245–250 (2000). DOI: 10.1016/s0006-8993(00)02679-2
- Матюшкин Д. П. О наличии фазных и тонических нейромоторных единиц в глазодвигательном аппарате кролика. *Физiol. журн. СССР им. И.М. Сеченова*, **47**, 960–976 (1961).
- Kuffler S. W. and Gerard R. W. The small-nerve motor system to skeletal muscle. *J. Neurophysiol.*, **10** (6), 383–394 (1947). DOI: 10.1152/jn.1947.10.6.383
- Page S. G. A comparison of the fine structures of frog slow and twitch muscle fibers. *J. Cell Biol.*, **26** (2), 477–497 (1965). DOI: 10.1083/jcb.26.2.477
- Csillik B., Schneider I., and Kalman G. On the histochemical structure of tetanic and tonic myoneural synapses. *Acta Neuroveg. (Wien)*, **22**, 212–224 (1961). DOI: 10.1007/BF01226813
- Блохина Г. И. и Зефиров А. Л. Электрофизиологическое и морфологическое исследование синаптической организации тонических мышечных волокон лягушки. *Физiol. журн. СССР им. И.М. Сеченова*, **2**, 157–165 (1984).
- Гришин С. Н., Камалиев Р. Р., Теплов А. Ю. и Зиганшин А. У. Разнонаправленное действие АТФ на силу сокращения тонической и фазной скелетных мышц лягушки. *Бiol. эксперим. биологии и медицины*, **151**, 251–254 (2011).
- Ziganshin A. U., Kamaliev R. R., Grishin S. N., Ziganshin B. A., and Burnstock G. Interaction of hydrocortisone with ATP and adenosine on nerve-mediated contractions of frog skeletal muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, **607**, 54–59 (2009). DOI: 10.1016/j.ejphar.2009.02.028
- Khairullin A. E., Grishin S. N., and Ziganshin A. U. Presynaptic purinergic modulation of the rat neuro-muscular transmission. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **45**, 8492–8501 (2023). DOI: 10.3390/cimb45100535

Purinergic Modulation of Ocular Muscle Contraction

S.N. Grishin*, A.N. Gorshunova**, A.Y. Teplov*, A.S. Grishin***,
A.R. Nasybullin***, and A.E. Khairullin*, ****

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

**Kazan Law Institute of the Ministry of Internal Affairs of Russia, Magistralnaya ul. 35, Kazan, 420108 Russia

***Tupolev Kazan National Research Technical University, ul. K. Markska 10, Kazan, 420111 Russia

****Kazan Federal University, Kremlevskaya ul. 18, Kazan, 420008 Russia

The problem of purinergic regulation in synapses of phasic and tonic muscles of warm-blooded animals was investigated. For this purpose, the effect of the cotransmitter of the main mediator, ATP, and its persistent metabolite, adenosine, on the contraction of various oculomotor systems of the rat, the lateral rectus (tonic) and circular (phasic) muscles of the eye, was evaluated. ATP potentiated the carbacholine-evoked contraction of the rat lateral rectus muscle by a quarter, while this purine, on the contrary, significantly inhibited the carbacholine-evoked contraction of the circular eye muscle. No significant manifestation of the modulatory effect of adenosine on the carbacholine-evoked contraction of the muscles under study was revealed. The results obtained indicate a multidirectional postsynaptic effect of ATP on phasic and tonic oculomotor systems.

Keywords: circular eye muscle, lateral rectus eye muscle, ATP, carbacholine, mechanomyography, muscle contraction