

Т.А. АНИКИНА, Ф.Г.СИТДИКОВ

ПУРИНОРЕЦЕПТОРЫ СЕРДЦА В ОНТОГЕНЕЗЕ

Казань 2010

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ ГОУ ВПО «ТАТАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ГУМАНИТОРНО-ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Т.А. АНИКИНА, Ф.Г. СИТДИКОВ

ПУРИНОРЕЦЕПТОРЫ СЕРДЦА В ОНТОГЕНЕЗЕ

Казань 2010

Печатается по решению редакционного совета Татарского государственного гуманитарно-педагогического университета.

УДК 612.17

Аникина Т.А., Ситдиков Ф.Г. «Пуринорецепторы сердца в онтогенезе»

Монография посвящена одной из наиболее актуальных и современных проблем физиологии – изучению пуринергической регуляции сердца в раннем постнатальном онтогенезе. Представленные результаты расширяют представление о физиологической роли внеклеточной АТФ, участии разных подтипов P2X-рецепторов в хронотропной и сократительной деятельности сердца. На ранних этапах развития организма обнаружена высокая чувствительность миокарда к агонистам P2X-пуринорецепторов. Показано гетерохронное проявление функциональной активности разных подтипов P2X-рецепторов в разных отделах сердца. На ранних этапах онтогенеза, в условии незрелости симпатических и парасимпатических механизмов регуляции, разных этапов биологического созревания организма, возможным регулятором сердечной деятельности является АТФ. Роль P2X-рецепторов в деятельности сердца и модулирующее влияние внеклеточной АТФ на эффекты классических медиаторов возрастает.

Результаты исследования могут использоваться специалистами по возрастной физиологии, аспирантами и студентами биологических факультетов.

Рецензенты:

доктор биологических наук, профессор
Р.Р. Нигматуллина;

доктор биологических наук, профессор
Х.Л. Гайнутдинов

ISBN 978-5-87730-472-7

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	10
1.1. Общие сведения об АТФ	10
1.2. Классификация пуринорецепторов	12
1.3. Общая характеристика Р2-пуринорецепторов	13
1.3.1. Р2-рецепторы в сердце	15
1.4. Влияние АТФ на сердце	17
1.4.1. Участие Р2Х-рецепторов в инотропной и хронотропной функции сердца. Молекулярные и клеточные механизмы	18
1.4.2. Р2У-рецепторы сердца. Внутриклеточные пути передачи сигнала	20
1.5. Модулирующие влияние АТФ	22
1.6. Р2-пуринорецепторы сердца в онтогенезе	24
ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	26
2.1. Объект исследований	26
2.2. Организация и методы экспериментов в условиях <i>in vitro</i> . Методика регистрации сократимости полосок миокарда	28
2.3. Организация и методы экспериментов в условиях <i>in vivo</i>	30
2.4. Методика фармакологических воздействий	32
2.5. Статистическая обработка результатов исследования	33
ГЛАВА 3. Р2Х-ПУРИНОРЕЦЕПТОРЫ В РЕГУЛЯЦИИ СЕРДЕЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ КРЫС В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ	34
3.1. Влияние экзогенной АТФ и ее аналогов на сердечную деятельность крыс	34
3.1.1. Влияние аденоцина на деятельность сердца	35
3.1.2. Влияние экзогенной АТФ на сердце при блокаде β-адренорецепторов и М-холинорецепторов сердца	36
3.1.3. Влияние АТФ и α,β-метилен-АТФ на деятельность сердца крыс в онтогенезе	37
3.1.4. Влияние сурамина на показатели сердечной деятельности крыс	44
3.1.5. Влияние экзогенных АТФ и α,β-метилен АТФ на показатели сердечной деятельности крыс на фоне блокады Р2-рецепторов сурамином	47

3.1.6. Влияние экзогенных АТФ и α,β -метилен АТФ на показатели сердечной деятельности крыс на фоне селективного блокатора P2Y-рецепторов реактива голубого-2	47
3.1.7. Влияние α,β -метилен-АТФ на фоне селективного блокатора P2X ₁ -рецепторов на показатели сердечной деятельности крыс в онтогенезе	48
3.1.8. Влияние селективного агониста P2X-пуринорецепторов на деятельность сердца	51
3.1.9. Совместное влияние α,β -метилен-АТФ, норадреналина и ацетилхолина на деятельность сердца	54
3.1.9.1. Совместное влияние норадреналина и α, β -метилен-АТФ на показатели сердечной деятельности крыс в онтогенезе	54
3.1.9.2. Совместное влияние ацетилхолина и α, β -метилен-АТФ на показатели деятельности сердца крыс в постнатальном онтогенезе	63
3.2. Влияние АТФ и ее аналогов на сократимость миокарда крыс в постнатальном онтогенезе	71
3.2.1. Определение зависимости концентрация – эффект на сократимость полосок миокарда крыс 14-100-суточного возраста при добавлении АТФ	72
3.2.2. Влияние АТФ на фоне блокады P1-рецепторов	72
3.2.3. Влияние 2-метилтио-АТФ на сократимость миокарда крыс в онтогенезе	74
3.2.4. Влияние 2-метилтио-АТФ на сократимость миокарда крыс в раннем постнатальном онтогенезе при блокаде P2X-рецепторов	77
3.2.5. Влияние 2-метилтио-АТФ на сократимость миокарда крыс при блокаде P2Y-рецепторов	78
3.2.6. Влияние агониста P2X-рецепторов β, γ метилен-АТФ на сократимость миокарда крыс в онтогенезе	80
3.2.7. Влияние β, γ метилен-АТФ на сократимость миокарда крыс при блокаде P2X ₁ -рецепторов	83
3.3..Совместное влияние 2-м-АТФ и карбахолина и 2-м-АТФ и изопротеренола на сократительную активность миокарда	85
3.3.1. Влияние карбахолина на сократимость миокарда крыс в онтогенезе	85
3.3.2. Совместное влияние 2-метилтио-АТФ и карбахолина на сократимость миокарда крыс в постнатальном онтогенезе	89
3.3.3. Определение дозозависимого влияния изопротеренола на сократимость миокарда 14-100-суточных крыс	96
3.3.4. Возрастные особенности чувствительности и реактивности адренорецепторов, холинорецепторов и пуринорецепторов крыс 14-100-суточного возраста	97

3.3.5. Совместное влияние изопротеренола и 2-метилтио-АТФ на сократимость миокарда крыс 14-100-суточного возраста	101
3.4 Участие Р2У-рецепторов в сократительной активности миокарда	110
3.4.1. Влияние УТФ на силу сокращения миокарда крыс в постнатальном онтогенезе	110
3.4.2. Роль Р2У4 подтипа рецепторов в сократимости миокарда	112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	115
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	130

ВВЕДЕНИЕ

*Онтогенетические исследования
требуют несопоставимо большего материала,
чем исследования на взрослых...
Б.С.Кулаев*

В более чем 300-летний истории исследований физиологической роли парасимпатических и симпатических нервов, холинергической и адренергической регуляции деятельности сердца накоплен обширный фактический материал, который приведен в трудах И.А.Аршавского (1936); М.Г.Удельнова (1961); О.Д.Курмаева (1966); В.Н.Швалева (1972); Ф.Г.Ситдикова (1974); И.И.Новикова (1975); Р.А.Абзалова (1985); Т.Л.Зефирова (1999); Р.Р. Нигматуллина (2000); Adolf (1967) и многих других.

Классические опыты братьев Вебер (1846), И.П.Павлова, О.Леви (1921) на сердце заложили основу изучения физиологии торможения, трофического влияния нервов, медиаторной теории в физиологии.

Становление парасимпатических и симпатических влияний на сердце в постнатальном онтогенезе происходит постепенно: раньше обнаруживаются холинергические и позже (например, к концу 3-й недели у крыс) адренергические регуляторные влияния. Первыми источниками иннервации сердца человека и животных в эмбриогенезе являются блуждающие нервы. Однако нет единого мнения об очередности дифференцировки эfferентных и afferентных связей в сердце. Регуляторные влияния в постнатальном онтогенезе раньше проявляются на частоту сердечных сокращений. Это зависит и от уровня развития нервно-мышечных связей эффектора (сократительного и проводящего миокарда). Однако сердце имеет возможность адекватного реагирования и при незрелости этих механизмов регуляции.

В 60-е годы прошлого столетия было показано, что во многих висцеральных тканях наблюдаются нейрогенные ответы, которые не блокируются адрено- и холинергическими блокаторами. Проверке были подвергнуты многие соединения: серотонин, гистамин, энкефалины, аминокислоты, полипептиды. И оказалось, что обнаруженный эффект вызывает... давно известная АТФ, известная в биохимии как «энергетическая валюта» клетки. В начале 70-х годов было установлено, что АТФ выделяется из нервных окончаний и взаимодействуют с пуриновыми рецепторами, обнаруженными во многих органах и тканях, в том числе сердечной мышцы. Разнообразие пуринорецепторов так велико, что оно превышает все подтипы рецепторов для классических гормонов и нейромедиаторов.

Каково же место АТФ в системе медиаторов? Согласно гипотезе Д. Бернстока (1972) функцию медиатора АТФ начала выполнять еще на начальных этапах эволюции, задолго до появления основных медиаторов. АТФ считается одним из наиболее филогенетически древних медиаторов. И подтверждением тому является тот факт, что внеклеточные эффекты АТФ обнаруживаются у таких примитивных организмов как бактерии и диатомовые морские водоросли.

Имеется большое количество исследований о влиянии АТФ на силу, частоту сокращений препаратов из сердечной мышцы, выполненные на разных животных. АТФ обладает доза – зависимым эффектом: небольшие дозы вызывают тахикардию, а более высокие концентрации АТФ замедляют сердечную деятельность и блокируют проведение возбуждения в атриовентрикулярном узле.

Действие АТФ может быть реализовано как ее прямым влиянием на кардиомиоциты так и изменением активности регуляторных каналов сердца. Известно, что АТФ находится в везикулах вместе с классическими медиаторами: АХ или НА и участвует в передаче нервных импульсов, выполняя функции контрансмиттера.

Онтогенетический аспект пуринергической регуляции сердца практически не изучен и рассматривался только на взрослых организмах и в период их неонatalного развития. Можно предположить, что на ранних этапах постнатального онтогенеза, в условиях незрелости симпатических и парасимпатических регуляторных влияний на сердце, его рецепторного аппарата, возможны разные механизмы влияния АТФ на эффекты основных медиаторов и модулирующее влияние АТФ зависит от этапов биологического созревания организма. В данной работе проводятся новые результаты исследования возрастных особенностей участия пуринергических Р2 рецепторов в регуляции сердечной деятельности в постнатальном онтогенезе.

Список используемых сокращений

АХ – ацетилхолин

АДФ – аденоzin 5'-дифосфорная кислота

АМФ – аденоzin 5'-монофосфорная кислота

АТФ – аденоzin 5'-трифосфорная кислота

исх – исходное значение показателя

НА – норадреналин

КХ-карбахолин

цАМФ – циклический аденоzinмонофосфат

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

ИФ₃-инозитотрифосфат

ФЛС-фосфолипаза С

п – количество животных

PPADS – пиридоксальфосфат-6-азофенил-2'4'-дисульфоновая кислота

Rb-2- реагент голубой-2

TNP-ATP-(2` , 3` -о-(2,4,6-тринитрофенил) аденоzin-5`-трифосфат

β , γ -мАТФ - бета, гамма-метеленаденоzin 5'-трифосфорная кислота

2-мАТФ–2-метилтио-аденоzin 5'-трифосфорная кислота

М – моль

мин – минута

мл – миллилитр

рис. – рисунок

РНК – рибонуклеиновая кислота

с - секунда

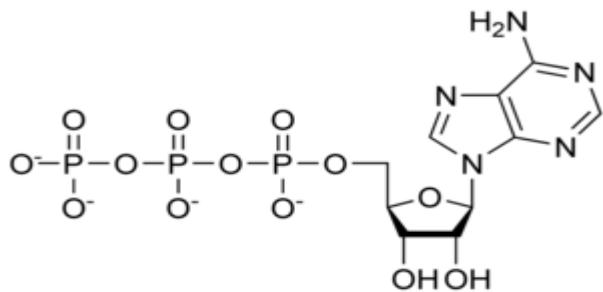
сут.-сутки

табл. – таблица

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие сведения об АТФ

Аденозинтрифосфорная кислота хорошо известна как основной поставщик энергии для клеточной активности. Энергия, запасенная в высокоэнергетических связях молекулы АТФ, необходима для большого числа внутриклеточных процессов, таких как движение клетки, секреция гормонов или нейромедиаторов, сокращение мышц, деление клетки. АТФ обеспечивает протекание процессов фотосинтеза, клеточного дыхания, фосфорилирования различных белков и много другого. АТФ является одним из мономеров, необходимых для синтеза нуклеиновых кислот, а также донором фосфатных групп для молекул системы вторичных посредников, например, протеин-киназ (Champe et al., 2004).



АТФ

Скорость обмена АТФ в сердце очень высока. Работа кардиомиоцита обеспечивается энергией, образуемой главным образом в митохондриях, где происходит окисление различных субстратов: глюкозы, молочной кислоты или свободных жирных кислот. Образующиеся молекулы АТФ расходуются в основном для сокращения миофибрилл, что составляет 80% от всего АТФ, вырабатываемого в кардиомиоцитах. Еще 10-15% АТФ уходит для обеспечения работы мембранных насосов: это кальциевая АТФаза и Na^+/K^+ -АТФаза сарколеммы. Примерно 5% АТФ используется на обеспечение энергией синтетических процессов (В. Капелько, 2007). Следует отметить, что АТФ необходима для поддержания в закрытом состоянии АТФ-зависимых калиевых каналов.

Транспорт молекул АТФ из митохондрий в цитоплазму затруднен из-за большого количества в ней АТФаз. Американский биохимик С.Бессман предложил креатинфосфатный путь транспорта АТФ, который получил подтверждение и в Российском кардиологическом центре (В. Капелько, 2007). Изофермент креатинфосфокиназа (КФК) в митохондриях преобразует синтезированный АТФ в креатинфосфат. Эта молекула, имеющая меньшие размеры, чем АТФ, транспортируется к

миофибриллам. Здесь другой изофермент КФК вновь отделяет фосфатную группу, переносит ее на АТФазу миозина, а освобожденный креатин возвращается обратно, как членок. Этот путь эффективнее, требует меньше энергии, а креатинфосфат в цитоплазме не подвергается превращениям, потому что изоферменты находятся только в митохондриях и миофибриллах.

О кардиоваскулярных эффектах аденоцина известно с конца 20-х годов XX века. В 1929 году Drury и Szent-Gyorgy описали влияние адениновых соединений на сердце млекопитающих. Авторы впервые установили, что АТФ и ее метаболиты, вводимые внутривенно, приводят к снижению частоты сердечных сокращений, падению артериального давления и дилатации коронарных сосудов (A.Drury et al., 1929).

В дальнейшем появился целый ряд исследований, посвященных влиянию пуриновых соединений на сердечно-сосудистую систему. В 50-ые годы АТФ впервые используется в клинической практике для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы у пожилых людей.

Кроме хорошо известной роли пуриновых соединений в метаболизме за последние два десятилетия накопился большой фактический материал, свидетельствующий о важной роли пуринов в межклеточных взаимодействиях. В 60-ые годы прошлого века было убедительно показано, что во многих висцеральных тканях наблюдаются нейрогенные ответы, которые не блокируются адрено - и холинергическими блокаторами (G. Burnstock, 1969). В начале 70-годов Дж. Бэрнсток и его сотрудники установили, что АТФ выделяется из нервных окончаний, не относящихся ни к адренергическим, ни к холинергическим.

Вскоре было установлено, что эти ответы опосредуются пуриновыми соединениями, преимущественно АТФ и аденоцином. Поэтому исследуемые не-адренергические, не-холинергические нервы были названы «пуринергическими», а рецепторы, на которые воздействует АТФ и ее производные - пуринорецепторами (G. Burnstock, 1972). Установлено, что ряд физиологических и патофизиологических реакций приводит к высвобождению клетками пуриновых соединений, преимущественно АТФ и аденоцина, которые способны взаимодействовать со специальными рецепторами для них – пуринорецепторами (M. Abbracchio, G. Burnstock, 1994, V. Relavic, 1998, Nort, 2002).

В 70-ые годы профессор Д. Бэрнсток объединил все имеющиеся на тот момент данные о медиаторных свойствах АТФ и аденоцина в классическом обзоре «Пуринергические нервы» (G. Burnstock, 1972).

Было установлено, что цитоплазматическая мембрана клеток практически всех исследованных тканей содержит специальные рецепторы, чувствительные к пуринам – пуринорецепторы. Посредством воздействия на эти рецепторы АТФ и аденоцин могут

регулировать многие внутриклеточные процессы (M. Abbracchio et al., 1994; G. Burnstock et al., 1996).

1.2. Классификация пуринорецепторов

Согласно современной классификации Номенклатурного комитета Международного фармакологического общества (G. Burnstock et al., 1996; Fredholm et al., 1997) все пуринорецепторы делятся на две большие группы: P1- и P2-пуринорецепторы, каждая из которых включает в себя еще несколько подгрупп (B. Fredholm et al., 1997).

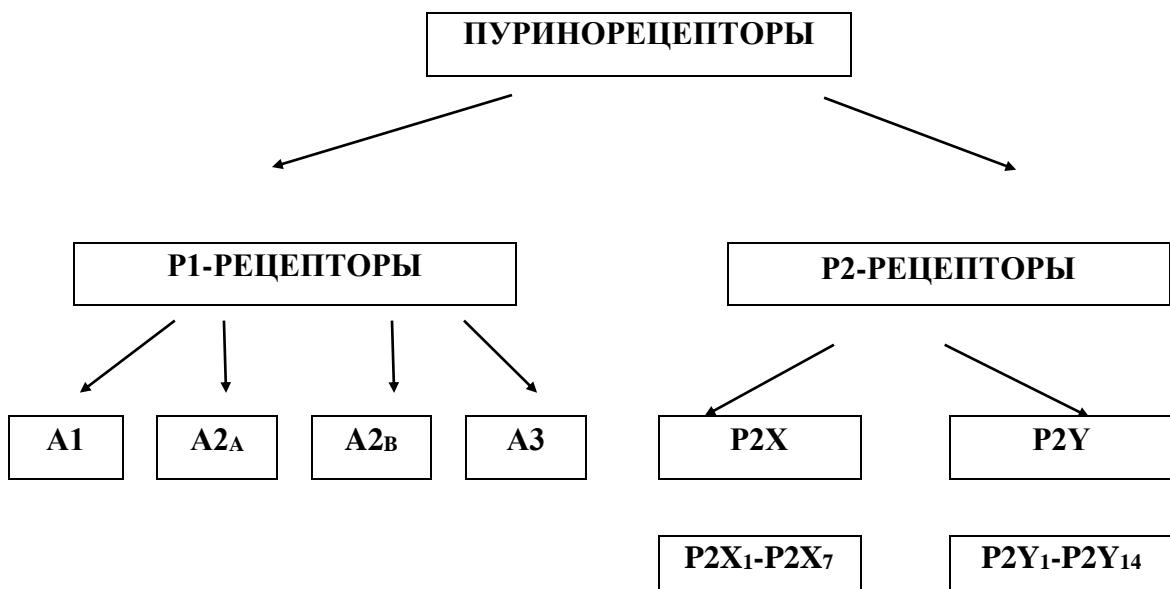


Рис. 1. Классификация пуринорецепторов

Еще в 1978г. G. Burnstock предложил критерии для подразделения пуринорецепторов на два основных класса – P1- и P2-пуринорецепторы. P1-пуринорецепторы характеризуются большей чувствительностью к аденоzinу и АМФ, чем АТФ и АДФ (А. Зиганшин и др., 1999). Аденоzinовые рецепторы (P1) были подразделены на четыре подтипа: A1, A2A, A2B и A3. Рецепторы АТФ обозначаются как P2-рецепторы. Они делятся на два семейства: P2X и P2Y-пуринорецепторы (M. Abbracchio; G. Burnstock, 1995). В основе классификации лежат фармакологические доказательства: тип ответа, порядок активности агонистов, разная степень десенситизации, вызываемая АТФ и ее структурными аналогами. Для P2X - пуринорецепторов наиболее активным агонистом является АТФ, а для P2Y - 2 - метилтиоАТФ и УТФ (А.У. Зиганшин и др., 1999). Порядок активности агонистов может зависеть от скорости их гидролиза до неактивных соединений, и значительно различаться в зависимости от вида ткани. Более четким

доказательством для подразделения P2 рецепторов на подтипы служит наличие селективных блокаторов. Сейчас известны селективные антагонисты как для P2X-, так и P2Y - рецепторов. Для P2X - рецепторов - а,β-метилен АТФ, который обладает десенситизирующим действием, пиридоксальфосфат-б-азофенил-2',4'-дисульфоновая кислота (PPADS) и другие; для P2Y пуринорецепторов - реактив голубой 2 (А. Зиганшин и др., 1999).

В каждом из этих семейств выделяют несколько подтипов рецепторов, обозначаемых соответствующими цифрами. Эти цифры присваиваются только после определения молекулярной структуры рецепторов и их клонирования. В настоящее время описано 7 подтипов P2X рецепторов (P2X₁-P2X₇), сюда же были отнесены P2Z рецепторы, а так же 6 подтипов P2Y рецепторов (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₃, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂), с включением бывших P2T, P2U и P2D рецепторов (А. У.Зиганшин и др., 1999).

В настоящее время P2-рецепторы клонированы и экспрессированы в различных клеточных системах; известна их структура, которая отличается от аналогичных по функции рецепторов для классических нейромедиаторов.

1.3. Общая характеристика P2-пуринорецепторов

P2X - рецепторы – это белковые комплексы, состоящие из 379-472 аминокислот, встроенных в мембрану в форме поры, охватывающей два гидрофобных трансмембранных домена с большой внеклеточной гидрофильной петлей (V. Ralevic et al., 1998; G. Vassort, 2001). Большая часть молекулы этого белка находится внеклеточно, образуя большую петлю, при том, что оба концевых фрагмента располагаются внутри клетки. Оба концевых фрагмента располагаются внутри клетки. Подтипы P2X-рецепторов в основном отличаются по длине С-концевого фрагмента молекулы белка (P. Dunn et al., 2001).

Все P2Y - рецепторы имеют широкое распространение в тканях.

1) P2X₁ - рецептор клонирован из мочевого пузыря мыши H. Valera в 1994, а в 1999 этот рецептор клонировал W. Haines из сердца крысы. Присутствие P2X₁ -рецептора в сердце крысы подтверждается и рядом других исследователей (S.Nori et al., 1998; B.Khakh et al., 2001). Рецептор представлен во всех гладкомышечных органах: мочевом пузыре, семявыносящих протоках, матке, кишечнике, сосудах. Стимуляция P2X₁ - рецепторов ведет к выраженной сократительной реакции этих органов, а блокада угнетает сократительную активность (А.У. Зиганшин и др., 2002

2) P2X2 - рецептор впервые клонирован из клеток феохромоцитомы крысы в 1994 H. Brake. P2X2 - рецептор присутствует в миокарде (M. Hansen et al., 1999; G. Vassort, 2001).

3) P2X3 - рецептор клонирован Z.-P. Chen et al. из заднего корешка спинного мозга крысы в 1995 г. У взрослых людей распространение P2X3 - рецепторов ограничено сердцем и спинным мозгом.

4) P2X4 - рецептор клонировали из гиппокампа крысы (X. Bo et al., 1995) и головного мозга человека (F. Soto et al., 1996). Он отдаленно относится к P2X1, P2X2 и P2X3-рецепторам. Транскрипция P2X4 рецепторов выявлена во многих тканях крысы включая кровеносные сосуды и сердце. 5) P2X5 - рецептор впервые клонирован из брюшного ганглия крысы M. Collo в 1996г. Этот рецептор обнаружен в кишечнике, сердце, мочевом пузыре и спинном мозге (A.У. Зиганшин и др., 2002; V. Ralevic et al., 1998). У крыс P2X5 - рецептор найден в сердце и мозге (G. Vassort, 2001). P2X5-рецепторы обнаружены в клетках, находящихся в стадии интенсивного роста и дифференцировки.

6) P2X6 - отсутствует в сердце.

7) P2X7 - рецептор впервые клонирован из макрофагов и мозга крысы и человека, обнаружен в клетках иммунной системы, кожи и поджелудочной железы. Этот подтип рецептора является на сегодняшний день наиболее крупной молекулой из всех известных рецепторов этого семейства. Гомомультимер из 2 или 3 молекул P2X7 - рецептора образует большую пору в мембране, проходимую для веществ с молекулярной массой до 900 дальтон. Образование подобных пор отмечено при ишемии, воспалении и аллергических реакциях. Стимуляция P2X7-рецепторов приводит к генетически запограммированной, т.е. естественной гибели клеток – апоптозу (Успенская Ю.А., 2007; G. Vassort, 2001).

P2X рецепторы можно подразделить на две большие группы в соответствии с динамикой десенситизации: быстрой – в пределах 100-300 мсек, или медленной или ее отсутствием. Быстро десенситизирующиеся P2X рецепторы активируются АТФ, альфа, бета-метилен - АТФ. Они включают в себя рекомбинацию P2X1 и P2X3 – рецепторов. Возможно, в десенситизации участвует первый или второй гидрофобный домен рецепторов (P.Werner et al, 1996).

P2Y-пуриноцепторы по механизму действия являются типичными G-протеинзависимыми рецепторами.

Задача разделения подтипов P2Y рецепторов является сложной, поскольку пока не существует селективных антагонистов для выделения подтипов.

1) P2Y1 - рецепторы клонированы из мозга цыпленка (T. Webb et al., 1993). В последующем P2Y1 был изолирован из нескольких видов, включая крысу, мышь, быка и человека с широким спектром распределения в тканях, включая сердце. P2Y₁-рецепторы найдены на эндотелии кровеносных сосудов. Внутривенное введение АТФ и стимуляция этих рецепторов приводит к высвобождению оксида азота и последующему расширению сосудов.

2) P2Y2 - рецептор клонирован из клеток нейробластомы мыши J. Lustig в 1993.

3) P2Y3 - рецепторы клонированы из мозга цыпленка в 1995 T. Webb et al.

4) P2Y4 - рецептор клонирован из плаценты человека T. Communi в 1996. Этот рецептор найден в эпителиальных клетках и сердце крысы (А.У. Зиганшин и др., 2002; V. Ralevic et al., 1998), а также в симпатических нейронах крысы и эмбриональном сердце человека (G. Vassort, 2001).

5) P2Y6 - рецепторы клонированы из гладких мышц аорты крысы M. Chang в 1995. Они находятся в некоторых эпителиальных клетках, плаценте, Т-клетках и тимусе (А.У. Зиганшин и др., 2002; Ralevic V. et al., 1998) и эмбриональном сердце человека.

6) P2Y11- рецепторы клонированы из плаценты человека T. Communi в 1997г. Рецепторы локализованы в кишечнике, сердце, селезенке и гранулоцитах.

7) P2Y12 - рецепторы обнаружены в тромбоцитах (А.У. Зиганшин и др., 2002). P2Y₁₂ -рецепторы находятся на мембране тромбоцитов, участвующих в свертывании крови. Стимуляция этих рецепторов повышает способность тромбоцитов к склеиванию, образованию внутрисосудистых тромбов, вызывая инфаркт миокарда, инсульт. В настоящее время на фармацевтическом рынке появился новый эффективный препарат, применяемый при стенокардии и профилактике инфаркта – клопидогрел. Механизм его действия заключается в угнетении P2Y12 подтипа рецепторов, расположенных на тромбоцитах, что делает невозможной их агрегацию и предупреждает тромбоз (А.У. Зиганшин 2003; B.Jarvis, 2000).

1.3.1. P2-рецепторы в сердце

В сердечно-сосудистой системе P2-пуриноценторы присутствуют на поверхности кардиомиоцитов предсердий, желудочков, проводящей системы сердца, в эндотелии и гладкомышечных клетках стенок сосудов.

Проведенный иммуногистохимический анализ тканей сердца крысы (M. Hansen et al., 1999) показал широкое распространение P2X2, P2X5 подтипов ионотропных P2-рецепторов на сарколемме кардиомиоцитов, а P2X1 и P2X3 подтипов вблизи

синаптических контактов нейронов с кардиомиоцитами. Исследования микросрезов ткани из разных частей сердца крысы выявили присутствие P2X1, P2X2, P2X4 – пуринорецепторов в предсердии и P2X4 - рецепторов в желудочке (G. Vassort, 2001).

Адениновые нуклеотиды во внеклеточном пространстве находятся в достаточно разном количестве, которое зависит от состояния клеток. Содержание АТФ, обнаруженной в коронарном токе изолированного сердца, было ниже 1 нМ (M. Borst et al., 1991). Такая низкая концентрация связана с быстрым распадом АТФ. При одноразовом прохождении через коронарный ток более 95% АТФ распадается. По другим данным, с использованием микродиализа, содержание АТФ в интестициальной области составляла 40 нМ (A. Kuzmin et al., 1998). Таким образом, внутриклеточная концентрация АТФ составляет 10 мМ, а внеклеточная приблизительно 10 нМ.

Механизмы освобождения АТФ через клеточную мембрану клеток не полностью понятны. Известно, что мембранныя проходимость АТФ очень мала, что согласуется с молекулярными размерами АТФ. АТФ не может проникать через неповрежденную мембрану клетки путем простой диффузии. В физиологических условиях в результате диссоциации и отщеплении атома водорода от гидроксильных радикалов остатков фосфорной кислоты молекула нуклеотидов (особенно АТФ) приобретает электрический заряд и клеточная стенка становится для них непроницаемой. Поэтому существует высокая разница между концентрациями пуриновых соединений внутри и вне клетки, доходящая до 1000 раз (А. Зиганшин, 2005).

Заслуживает внимания факт, что большинство внеклеточных эффектов АТФ производит в микромолярной дозе, то есть в концентрации меньшей в 1000 раз, чем необходимо для внутриклеточного метаболизма (G. Vassort, 2001).

В немногочисленных исследованиях показано наличие нескольких способов освобождения АТФ из клеток, которые находятся в стадии проверки: трансмиссии, специальные каналы клетки и обычным путем. На эндотелиальных клетках, гладкомышечных, клетках крови показано, что при механической стимуляции АТФ освобождается при участии АТФ – связывающих белков (ATP binding cassette proteins), стрейч-активируемых и потенциал-управляемых каналов (P.Bodin, G. Burnstock 2001; Knight et al., 2002; Lazarowski et al., 2003).

В последних исследованиях показано, что внутриклеточная АТФ выделяется в межклеточное пространство через крупные поры - гемиканалы. Так, АТФ освобождается через гемиканалы из сердечных фибробластов эпителиальных клеток при механическом напряжении, а экспрессия каналов регулируется профибриногенной стимуляцией (S.Soleymani, 2008; Gomes P. et al., 2005).

АТФ и аденин освобождаются во внеклеточную жидкость и в физиологических условиях и при патологических. Известно, что АТФ освобождается путем экзоцитоза подобно другим нейротрансмиттерам или просачивается при распаде клетки (G. Dubyak et al, 1993; J. Gordon, 1986). Например, АТФ освобождается из цитоплазмы через аденин нуклеотид, связывающий канал - как контрансмиттер из симпатических и парасимпатических нервных терминалей (G. Burnstock, 1990; P. Richardson et al., 1987). АТФ может также высвобождаться при внутрисосудистой агрегации тромбоцитов и из интактных или поврежденных гладкомышечных клеток сосудов (P. Bodin et al, 1991; T. Katsuragi et al, 1991), эритроцитов (G. Bergfeld et al., 1992; M. Ellsworth et al., 1995; B. Kegel et al., 1997), эндотелиальных клеток (P. Bodin et al., 1996; R. Ralevic et al., 1992; S. Yang et al., 1994), воспалительных клеток (F. Di Virgilio et al., 1996). АТФ и аденин освобождаются из ишемизированных сердечных миоцитов (T. Forrester et al., 1977; B. Paddle, G. Burnstock, 1974; C. Williams et al., 1983; A. Pelleg, 1997). При нервной стимуляции, гипоксии, ишемии, рабочей нагрузке содержание внеклеточной также АТФ увеличивается (R. Berne, 1963; T. Forrester et. al.; A. Kuzmin et al., 1998; C. Vial et al., 1987).

Освободившаяся в тканевую жидкость или синаптическую щель АТФ подвергается быстрому распаду мембраннысвязанными эктонуклеотидазами, расположенными на поверхности клетки (А.У.Зиганшин, Л.Е. Зиганшина, 1999). Этую цепочку в общем, виде можно представить так:



В последние годы было установлено, что вместе с мембраннысвязанными эктонуклеотидазами в расщеплении АТФ участвуют эктонуклеотидазы, которые выделяются из нервных окончаний одновременно с АТФ (C.Kennedy, L.Todorov et al., 1997). Это новый механизм инактивации нейромедиатора.

1.4. Влияние АТФ на сердце

Благоприятный эффект адениннуклеотидов на сократимость миокарда известен давно и этот эффект АТФ связан со снабжением мышцы энергией высоко энергетичными фосфатами (A. Shah et al., 1974).

Более 50 лет назад Green и Stoner (1950) сообщили о том, что после короткой остановки сердца аденин нуклеотиды имели сильный положительный инотропный эффект в опыте на изолированном перфузируемом сердце млекопитающих. Они показали, что усиленный инотропный эффект связан с повышенным уровнем фосфорилирования

аденозиновой молекулы. Ими было сделано предположение, что аденин нуклеотиды осуществляют свое воздействие, скорее всего, непосредственно на миокард, а не через вазодилатацию. Позднее было показано, что АТФ как медиатор симпатической нервной системы участвует в барорефлекторной регуляции кровообращения (О. Tarasova, M.Rodionov. 1992). Доказана роль АТФ как медиатора симпатической нервной системы в стабилизации уровня артериального давления (В.О.Голубинская, 2000; О.С.Тарасова, 2005).

В самых первых исследованиях описывался отрицательный инотропный эффект в ответ на аппликацию АТФ на сердце млекопитающих, особенно на предсердия (G. Burnstock and P. Meghji, 1983; A. Drury and A. Szent-Gyorgy, 1929; A. Fabiato and F. Fabiato, 1978; P. Hollander and J. Webb, 1957; S. Hopkins, 1973). Эти эффекты объяснялись активацией А1-аденозинового рецептора после расщепления АТФ в тканях. В более поздних исследованиях на предсердиях морских свинок и крыс был выявлен положительный инотропный эффект АТФ, который развивался после временного быстрого падения амплитуды сокращения (P. Dorigo, 1988; G. Froldi et al., 1994, 1997; L. Mantelli, 1993). В этих исследованиях АТФ, АДФ, АМФ, аденоzin, альфа-бета-метиленАТФ, бета-гамма-метиленАТФ обладают этим двойным эффектом и они могут быть отнесены к активации А1 аденозиновых рецепторов после распада АТФ в тканях.

Существует целый ряд экспериментальных доказательств прямого действия АТФ независимо от его превращения в аденоzin. Согласно последним литературным данным вероятность собственного эффекта АТФ высока.

Для разделения воздействия аденоzина и АТФ на фоне блокады аденоzиновых Р1 рецепторов в присутствии экзогенного АТФ наблюдали положительный инотропный эффект левых предсердий морских свинок, который, вероятно, устанавливается за счет возбуждения Р2У рецепторов. L.Mantelli, 1993; Q. Mei и B. Liang, 2001 показали, что активация Р2 рецепторов вызывает значительный положительный инотропный эффект в кардиомиоцитах.

1.4.1. Участие Р2Х-рецепторов в инотропной и хронотропной функции сердца. Молекулярные и клеточные механизмы

Р2Х - рецепторы – это белковые комплексы, состоящие из 379-472 аминокислот, встроенных в мембрану в форме поры, охватывающей два гидрофобных трансмембранных домена с большой внеклеточной гидрофильной петлей (V. Ralevic et al., 1998; G. Vassort, 2001). Большая часть молекулы этого белка находится внеклеточно,

образуя большую петлю, при том, что оба концевых фрагмента располагаются внутри клетки. Оба концевых фрагмента располагаются внутри клетки. Подтипы рецепторов в основном отличаются по длине С-концевого фрагмента молекулы белка (P. Dunn et al., 2001).

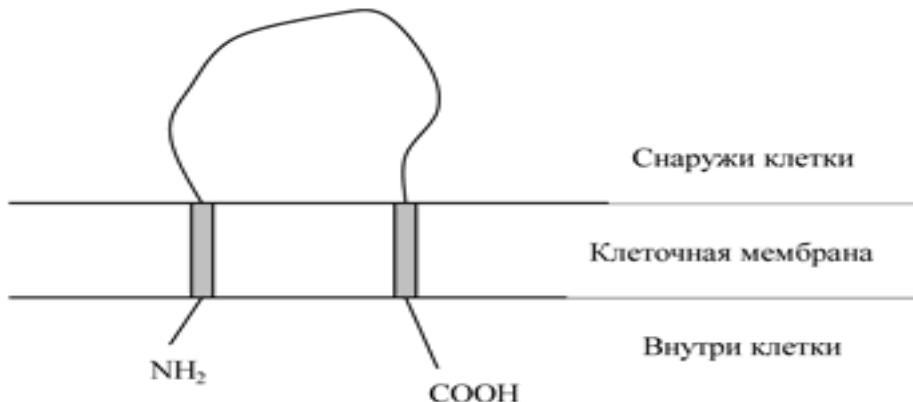


Рис.2. Молекулярная структура P2X-рецепторов

Возбуждение P2X-рецепторов сердца вызывается микромолярной концентрацией внеклеточной АТФ. Ионые каналы АТФ открываются через миллисекунды после аппликации АТФ (M. Abbracchio, 1977). На одиночных кардиомиоцитах микромолярная АТФ вызывает неспецифический катионный и анионный Cl⁻ ток, которые деполяризует клетку.

Все P2X-рецепторы имеют катион-селективные каналы с почти одинаковой проницаемостью для Na⁺, K⁺ и высокой проницаемостью для Ca²⁺ (Evans 1992).

Результаты многочисленных экспериментов позволяют предположить, что АТФ также усиливает инотропизм за счет взаимодействия с P2X-рецепторами через кальций-зависимый механизм (G. Froldi, 1997).

Возбуждение P2X-рецепторов приводит к двойному эффекту. Во-первых, через эти каналы происходит непосредственный вход Ca²⁺ в клетку. Во-вторых, вызванная этим деполяризация клеточной мембранны приводит к дополнительному току Ca²⁺ внутрь клетки через потенциал-зависимые кальциевые каналы L- типа и дополнительному поступлению кальция из саркоплазматического ретикулума. Свободный кальций саркоплазмы соединяется с регуляторным белком тропонином, увеличивая образование актомиозиновых комплексов и запуская сократительный ответ. Оба механизма в итоге приводят к сократительному ответу (Benham et al., 1987).

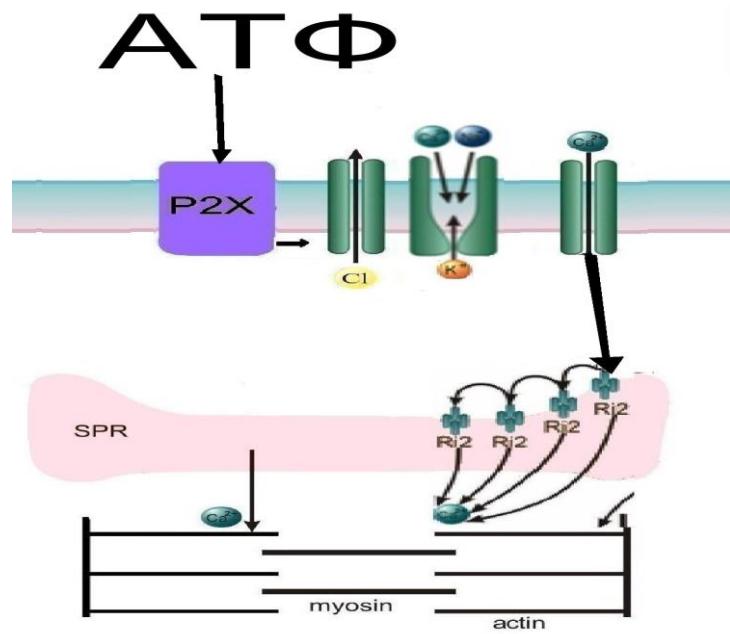


Рис. 3. Эффект АТФ при активации Р2Х-рецепторов.

1.4.2. Р2У-рецепторы сердца. Внутриклеточные пути передачи сигнала

В настоящее время известно 8 подтипов Р2Y-рецепторов, которые чувствительны к пуриновым и пиридиновым нуклеотидам (Burnstock, 2009). Р2Y-рецепторы состоят из 7 трансмембранных белков, и образуют по три петли внеклеточно и три внутриклеточно. Различия между подтипами касаются в основном трансмембранных фрагментов молекулы.

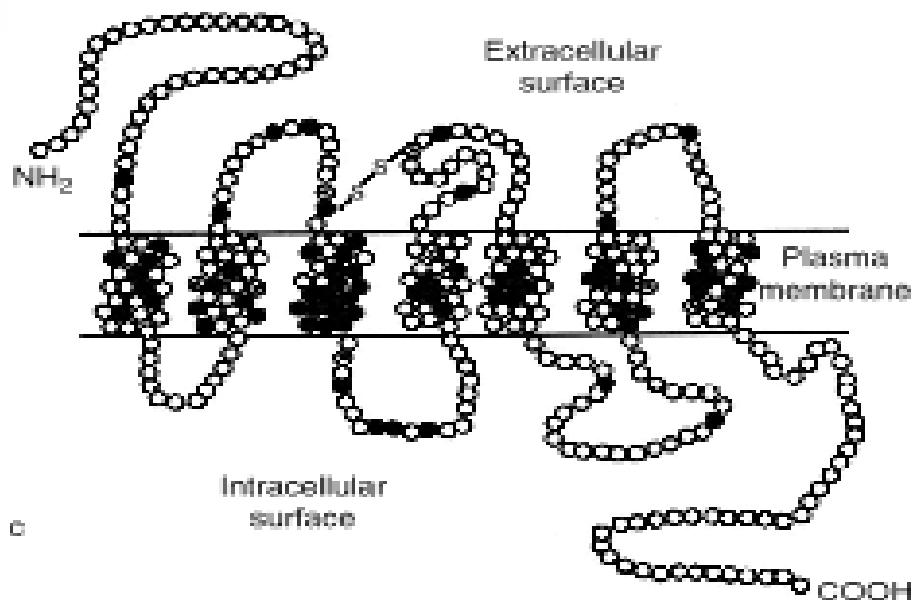


Рис.4 Молекулярная структура Р2У-рецепторов.

В целом сердце локализованы P2Y_{1,2,4,6,11,12,13} подтипы рецепторов. Они локализованы на кардиомиоцитах (Webb et al., 1996; Zhenget et, 2001G. Vassort, 2001; G.Burnstock, 2009), сердечных миофибробластах (Talasila et al., 2009), эндотелии и гладкомышечных клетках сосудов (Wang et al., 2002).

Классификация P2Y-рецепторов проводилась по нескольким принципам. Так, по чувствительности к агонистам P2Y- рецепторы делятся на 3 группы. Первая группа рецепторов - P2Y₁ -, P2Y₁₁ -, P2Y₁₂ - и P2Y₁₃ -активируются адениннуклеотидами, т.е. АТФ и АДФ. Вторая группа, к которой относятся P2Y₆-рецепторы стимулируются урацилнуклеотидами УТФ и УДФ, и третья группа (P2Y₂ и P2Y₄) отвечают на оба нуклеотида: урациловый и адениновый (G. Vassort, 2001, Von Kugelgen, 2006, Talasila et al., 2009).

В литературе показано, что в неонатальном целом сердце крыс наиболее распространены P2Y₆ рецепторы, а в неонатальных кардиомиоцитах P2Y₁ (Webb et al., 1996; G. Vassort, 2001). На отдельных кардиомиоцитах и сердечных миофибробластах были найдены P2Y₁-, P2Y₂, P2Y₄ -, P2Y₆-, и P2Y₁₁ - рецепторы неонатальных животных (Webb et al., 1996; Talasila et al., 2009). В то время как у взрослых животных P2Y₄-рецепторов обнаружено не было (Webb et al., 1996; Shacher J.B. et al., 1997).

Время от воздействия агониста и до появления ответа у P2Y-рецепторов длиннее, чем у P2X-пуринорецепторов. Это объясняется тем, что для возникновения ответа необходимо время для включения вторичных посредников. P2Y-рецепторы – это метаботропные рецепторы, которые сопряжены с G-белками и опосредуют медленные ответы (Boyer, 1996; Yamada, 1992).

Большая часть P2Y-рецепторов (P2Y₁-, РУ₂-, РУ₄ -, РУ₆ - и P2Y₁₁) связаны с Gq/11- белком, который активирует ФЛС с последующим образованием инозитолфосфата. Недавно определены новые подтипы этого семейства рецепторов. Это - P2Y₁₂ -, P2Y₁₃ -, и P2Y₁₄ - подтипы. На сердечных фибробластах показано присутствие P2Y₁₃ подтипа. Также было установлено, что с этими рецепторами связан другой мембранный белок – это Gi/o белок, который как известно ингибируют АЦ, снижает образование цАМФ и снижает поступление Ca²⁺ в клетку, вызывая уменьшение сократимости миокарда. (Abbracchio et all., 2006; Von Kugelgen, 2006). Также отрицательный инотропный эффект может происходить в ряде случаев и при возбуждении и P2Y₂ - и P2Y₄ - рецепторов, которые активируются АТФ и УТФ и связаны с Gi/o белком.

В последнее время в литературных обзорах появились новые данные о клеточных и молекулярных механизмах пуринергической регуляции. Положительный инотропный эффект УТФ оказывает при участии мембранного фермента фосфолипазы С, который как

известно расщепляет фосфолипиды мембраны до диацилглицерола и инозитолтрифосфата, каждый из которых в свою очередь приводит к увеличению кальция в клетке. P2Y₁-, P2Y₂-, P2Y₄ и P2Y₆-подтипы рецепторов увеличивают инозитолтрифосфат и цитозольный кальций.

Механизм ингибирующего влияния УТФ на сократимость миокарда на сегодняшний день не установлен. Возможно, пуриновые и пуриновые нуклеотиды через активацию Gi/o белка ингибирует АЦ, снижает образование цАМФ и снижает поступление Са в клетку, вызывая уменьшение сократимости миокарда.

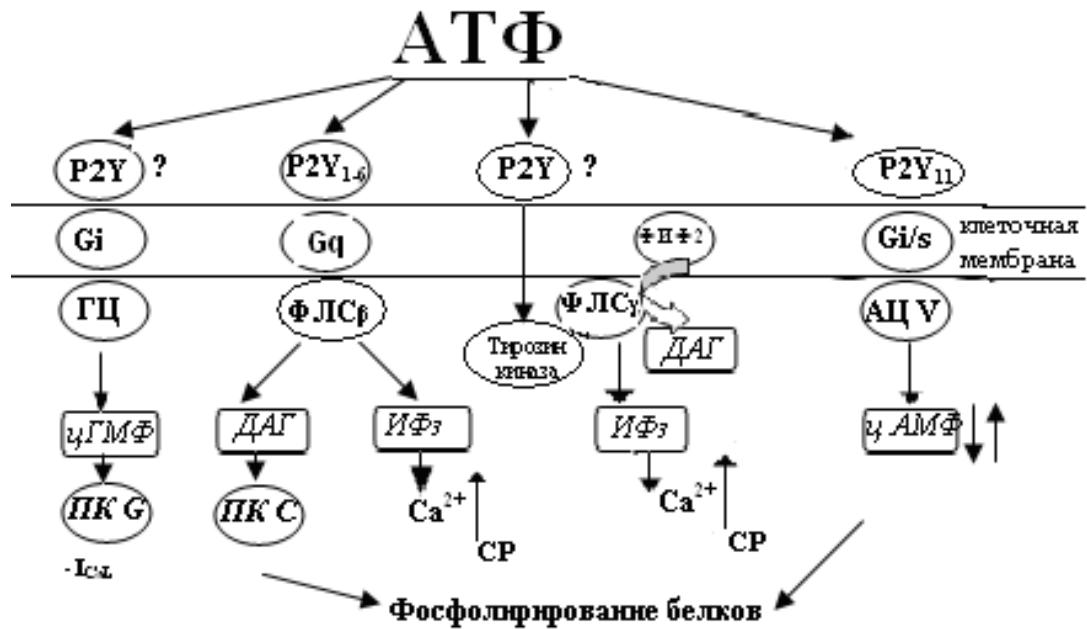


Рис. 5. Возможная реализация инотропного эффекта АТФ.

1.5. Модулирующие влияние АТФ

Можно считать установленным, что помимо хорошо известной роли АТФ в энергетическом обмене она выполняет и другую важную функцию – синаптического медиатора. Хранение АТФ вместе с ацетилхолином в синаптических везикулах нервных окончаний является общепризнанным фактом. На сегодняшней день известно, что соотношение между содержанием АТФ и АХ в синаптической везикуле составляет в центральной нервной системе 1:7 (M. Abbruchio, G. Burnstock, 1994), а в эмбриональных мышцах цыпленка 1:6.

Большой экспериментальный материал, полученный на разных биологических объектах убедительно доказывает, что АТФ модулирует нервную передачу в ЦНС и периферических вегетативных и двигательных нервных окончаниях (Р. Гиннатуллин и др., 1998; С. Гришин, 2001; А. Шакирзянова и др., 2005; Su et al., 1971; G. Burnstock 1976, 1998,

2006; Langer et al., 1976; Neild et al., 1984; Smith 1991; E.Silinsky, R. Readman, 1996, 1998; V.. Ralevic, 1998).

Действие АТФ может быть реализовано как прямым действием на кардиомиоциты, так и изменением активности регуляторных каналов сердца, которое находится под контролем симпатических и парасимпатических нервов. В настоящее время известно, что АТФ хранится в везикулах вместе с АХ или НА и участвует в передаче нервных импульсов, выделяясь из нервных окончаний вместе с основными медиаторами, т.е. является котрансмиттером. Исследования подтверждают наличие совместной секреции норадреналина, ацетилхолина и АТФ из симпатических и парасимпатических нервов, что подтверждает способность АТФ модулировать нервную передачу и автономный нервный контроль сердечных функций (L.Fieber et al., 1991; A.Pelleg et al., 1997; G.Burnstock, 1996, 2006).

Отрицательное хронотропное действие на сердечные пейсмейкеры внеклеточная АТФ может оказывать через блуждающий нерв (G. Katchanov et al., 1996). Чувствительные к АТФ рецепторы обнаружены на мемbrane афферентных волокон блуждающего нерва. При ишемии сердца, развитии гипоксии АТФ освобождается в большом количестве из ишемизированных кардиомиоцитов, и уже внеклеточная АТФ запускает кардио-кардиальные депрессорные рефлексы за счет стимуляции P2X-рецепторов на вагусных афферентных волокнах. Возможно, АТФ играет определенную роль в механизме брадикардии сердца при ишемии миокарда (A.Pelleg et al., 1996, 1997).

Исследования показали, что АТФ способна влиять на активность внутрикардиальных нейронов как *in vitro* так и *in vivo*. Например, введенная локально в эпикард, АТФ генерирует афферентный поток в вагусных С-волокнах, зарегистрированных в узловом ганглии (A.Pelleg et al.; 1997 B. King, 2004).

Еще в 1971 G. Burnstock предположил, что АТФ может играть роль котрансмиттера в симпатической нервной системе и модулировать освобождение норадреналина в сердце (G. Burnstock, 2006). Например, АТФ ослабляет положительный инотропный эффект при стимуляции нервных окончаний в предсердиях крысы и морской свинки (Kugelgen et al., 1995).

Пресинаптические P2X рецепторы, модулирующие освобождение НА по принципу положительной обратной связи, по своему фармакологическому профилю, относятся к P2X₂- пуринорецепторам. Блокада этих рецепторов PPADS при стимуляции электрическим током симпатических нервов ведет к снижению количества выделяющегося НА. В предсердии морской свинки пресинаптические P2X рецепторы производят АТФ - зависимое освобождение основного медиатора по принципу

положительной обратной связи. Но в предсердии крысы АТФ и родственные нуклеотиды вызывают только блокаду освобождения НА через пресинаптические Р2У - рецепторы, которые опосредуют АТФ-зависимое освобождение основного медиатора по принципу отрицательной обратной связи (S.Boehm, 2002) а, Р2Х₂- пуринорецепторы, расположенные на симпатических нервах, усиливают выделение НА.

Однако установлено, что НА в свою очередь также регулирует освобождение АТФ из нервного окончания. Это показано в экспериментах О.С.Тарасовой (2000) на сосудах крысы с применением дезипрамина – блокатора обратного захвата НА. Известно, что нейрональный захват норадреналина играет важную роль в удалении этого медиатора из синаптической щели. В периферических синапсах обратному захвату подвергается около 80% выделившегося норадреналина и только 20% удаляется путем экстрапирамидального захвата и диффузии. Следует отметить, что при действии АТФ сократительный ответ сосуда развивается значительно быстрее, чем при действии норадреналина. Каждый из этих медиаторов может подавлять не только свою собственную секрецию, но и секрецию другого медиатора, действуя через ауторецепторы, расположенные на пресинаптической мембране.

1.6. Р2-пуринорецепторы сердца в онтогенезе

Следует отметить, что онтогенетический аспект пуринергической регуляции сердца практически не изучен и рассматривался только на взрослых организмах и в период их неонтального развития. Известно, что пуринорецепторы появляются одними из первых в онтогенезе. Внеклеточные рецепторы к АТФ, наряду с М-ХР являются первыми функционально активными мембранными рецепторами, выявляемыми в период формирования зародыша (J.Liou, 1995; L.Sun et al., 1996; J.Shacher, 1997).

О возрастных особенностях локализации Р2У-рецепторов в сердце имеются следующие данные. В сердце крысы были описаны Р2У1-, Р2У2-, Р2У4-, Р2У6 - рецепторы. Все рецепторы были выявлены в целом неонатальном сердце, неонаатальных сердечных фибробластах и неонатальных сердечных миоцитах, где преимущественно содержались Р2У1 –пуринорецепторы. Интересно, что Р2У1-, Р2У2- и Р2У6 -рецепторы были найдены на миоцитах взрослых животных, в то время как Р2У4- рецепторов обнаружено не было (T. Webb et al., 1996; Y.Bogdanov et al., 1998; K. Cheung, 2003). Таким образом, экспрессия Р2У-рецепторов меняется в онтогенезе и усиливается для Р2У_{1,2,6}-рецепторов, а экспрессия Р2У₄ рецептора вовсе прекращается во взрослых кардиомиоцитах.

Меньше известно о том, как меняется распространение P2X-рецепторов в сердце и кардиомиоцитах в онтогенезе. Так, P2X3- рецепторы найдены в эмбриональном сердце человека, где показано обилие подтипов P2X-пуриноцепторов (M.Hansen, 1999; G. Vassort, 2001).

При исследовании миокарда взрослых людей, выявили присутствие P2X1-, P2Y1-, P2Y2-, P2Y6 - и P2Y11 - рецепторов в правом и левом предсердиях и желудочках, при отсутствии P2Y4 рецепторов (G. Vassort, 2001). P2Y2-, P2Y4- и P2Y6-пуринорецепторы были недавно клонированы из эмбрионального сердца человека. При сердечной недостаточности наблюдаются выраженные изменения: уровень рецепторной мРНК P2X1 и P2Y2 увеличивается до 2,7 и 4,7 соответственно.

Показано также, что неонатальные миокардиальные клетки больше чувствительны к стимуляции P1-рецепторов аденоzinом чем кардиомиоциты взрослых крыс. Роль P2-рецепторов в ингибировании Ca^{2+} токов в неонатальных клетках относительно мала. Высокая чувствительность к аденоzinу, с его кардиопротекторным действием, определяет ишемическую толерантность новорожденных сердец (F. Suto, et al., 2000).

Вышесказанное свидетельствуют о важной физиологической роли P2-пуриноцепторов сердца в регуляции его деятельности. АТФ оказывает прямое влияние на кардиомиоциты и модулирующее действие на активность адрено - и холинорецепторов сердца. Результаты исследований по влиянию АТФ на хронотропную и инотропную функцию сердца, полученные *in vivo* и *in vitro* носят противоречивый характер. На сегодняшний день изучение пуринергической регуляции сердца в онтогенезе затрагивает только неонатальный период развития (J. Liou, 1995; T. Webb et al 1996; K. Cheung et al., 2003). Многие аспекты функционирования P2-рецепторов на важнейших этапах раннего постнатального онтогенеза остается малоизученными, а постсинаптические эффекты АТФ различаются в различных тканях и на разных этапах онтогенеза. В данной работе приводятся новые результаты исследования возрастных особенностей функциональной активности пуринергических рецепторов в регуляции сердечной деятельности.

Глава 2. ОРГАНИЗАЦИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследований

В экспериментах использовались белые лабораторные беспородные крысы, которые содержались в виварии Татарского государственного гуманитарно-педагогического университета. Условия содержания для всех крыс были одинаковыми. Все эксперименты проводились с соблюдением биоэтических правил. Клетки, поилки, кормушки и весь необходимый инвентарь систематически обрабатывались с использованием специальных дезинфицирующих средств. В качестве подстилки использовали опилки и мелкую стружку.

В состав суточного рациона крыс включались зерновая смесь (пшеница, рис, горох, овес, гречка, ячмень, перловая и манная крупы), яйца, хлеб, овощи (морковь, свекла, капуста), растительное масло. В осенне-зимний период в рацион включались витамины. В весенне-летний период ежедневно давалась свежая зелень.

Для разведения использовали специально отобранных животных, строго следя за исключением смешивания родственных связей. Беременных самок после случки рассаживали в отдельные клетки. В возрасте 28-30 дней крысята выходят из гнезда, переходят на общий корм и в это время их отделяли от матери. По достижении животными 5-6 недельного возраста самки и самцы отделялись друг от друга и помещались в отдельные клетки по 3-4 особи.

Критериями удовлетворительного содержания животных были: регулярный многочисленный приплод у самок, хорошая прибавка массы тела крысят, своевременное появление шерсти, а также сроки прозревания и начала двигательной активности.

Литературные данные о периодизации постнатального развития белых крыс немногочисленны и в некоторой степени противоречивы. Одни исследователи считают, что крысы от 1-21 суток относятся к периоду молочного кормления, в этот период парасимпатические влияния выражены у новорожденных крысят слабо и начинают усиливаться с 3 по 10 неделю постнатального онтогенеза. С 3 по 6 неделю постнатального онтогенеза происходит становление симпатической регуляции сердца и в этом возрасте у крыс зафиксировано первое и максимальное повышение частоты сердечных сокращений (Ситдиков Ф.Г., Зефиров Т.Л., 2006). И к 3-4 недельному возрасту у крыс полностью сформирована симпатическая и парасимпатическая система. С 1 до 4 месяцев крысята находятся в периоде полового созревания, а к репродуктивным животным относятся крысы от 11-18 месяцев, старческий возраст охватывает период развития от 19 до 40 месяцев (И.П. Западнюк, 1983 и др.). По их данным каждый период делится еще на

подгруппы. Возраст 2 месяцев для крыс является пубертатным. Имеются также данные о периодах молочного кормления и о выраженных старческих изменениях (В.Д. Розанова, 1968; В.В. Фролькис, 1975). Авторы сравнивают экспериментальные данные, полученные на крысятках и старых крысах, с показателями взрослых животных. Под зрелыми животными подразумевают крыс в возрасте от 2 до 8-10 и даже 14-22 месяцев. Таким образом, существует разная классификация возрастных особенностей развития крыс.

На протяжении жизни белых крыс от 1 до 100 суточного возраста происходит 5 удвоений массы тела, каждому из которых соответствуют морфофизиологические изменения. К 7-суточному возрасту происходит первое удвоение массы тела. Этот ранний молочный период характеризуется высокой скоростью объемного и линейного роста по сравнению со всеми последующими возрастами. В этот период приходится наибольшая величина поверхности тела на единицу массы тела. Крысят 8-14-суточного возраста относят к среднему молочному периоду развития. В 14 суток происходит второе удвоение массы тела. Этот период длится от появления резцов и шерсти до открывания глаз и заметного повышения двигательной активности, но терморегуляция в этот период еще не совершенна. Крысят 15-30-суточного возраста включают в поздний молочный период. На 19-21 сутки развития прорезываются зубы, и крысята частично переходят к самостоятельному питанию. В этом же возрасте происходит первое удвоение длины тела (В.И. Махинько и др. 1975).

В 30-суточном возрасте крысята переходят на общий корм, эмансипируются от матери и способны в дальнейшем к самостоятельному существованию. В этот период формируется тонус скелетных мышц и заканчивается формирование механизмов терморегуляции (И.А. Аршавский, 1982).

В возрасте 42-суток крысят относят предпубертатному периоду развития. В пубертатном периоде, к которому относятся 49 - 70 суточные крысы, происходит четвертое удвоение массы тела.

Половозрелыми считаются крысы 100-суточного возраста. В этом периоде происходит функциональное созревание половых желез и наблюдается очередное пятое удвоение массы тела (В.И. Махинько и др., 1975).

В своих экспериментах мы придерживались общепринятой в настоящее время классификации постнатального развития белых лабораторных крыс. Двух и трехнедельный возраст - период молочного кормления, 4-6 недель - неполовозрелый (причем 6-ти недельный возраст соответствует предпубертатному периоду), 7 недельный - первый этап пубертатного периода развития, 8-10 недельный - пубертатный и 12 - 20 недельные - половозрелые крысы (И.А. Аршавский, 1982; И.П. Западнюк и др., 1983). При

таком подходе, на наш взгляд, удается охватить основные периоды развития крыс и проследить формирование регуляции сердечной деятельности в разные этапы постнатального онтогенеза.

2.2. Организация и методы экспериментов в условиях *in vitro*.

Методика регистрации сократимости полосок миокарда

Исследования проведены на лабораторных белых крысах стадного разведения. Исследовали 4 возрастные группы животных: 14-, 21-, 56-, и 100-суточного возраста.

В качестве наркоза использовали 25% раствор уретана из расчета 1,2 г/кг массы животного, который вводился внутрибрюшинно (В.М. Смирнов, 1995).

Сократительную активность миокарда в эксперименте *in vitro* изучали на полосках предсердий и желудочков. Определение реакции сократительной функции миокарда на действие агонистов проводили в трех последовательно возрастающих концентрациях на установке "PowerLab" ("ADInstruments") с датчиком силы "MLT 050/D" ("ADInstruments").

Наркотизированную крысу фиксировали на специальном, освещенном операционном столе, затем вскрывали грудную клетку, сердце быстро извлекали и помещали в чашку Петри с оксигенированным рабочим раствором при подключенном стимуляторе "ЭСЛ-2". Затем из правого желудочка и предсердия при помощи специальных ножниц и пинцетов препарировали полоски. Длина полосок составляла 1,5-2 мм, ширина не превышала 1мм. Препарат фиксировали вертикально одним концом к датчику силы, другим — к точке опоры, затем каждый препарат погружали в отдельный резервуар объемом 10 мл, в который подавался рабочий раствор

Состав раствора Кребса (мкмоль/л: NaCl - 119.8, KCl-5.4, CaCO₃ - 1.8, MgCl₂ - 1.05, NaHPO₄ - 0.42, глюкоза - 5.05) с кислородом (95% O₂ и 5% CO₂). Для поддержания pH в пределах 7.3-7.4 в раствор добавляли основной и кислотный буферы Trizma ("Sigma"). Полоски стимулировались через платиновые электроды с частотой 6 и 10 стимулов для 7-, 21- и 100-суточных животных соответственно, длительностью 5 мс.

Раствор постоянно аэрировали карбогеном 95% O₂ и 5% CO₂ pH=7.4

Рабочий раствор готовился в день проведения эксперимента. Определение pH проводили с помощью pH-метра-иономера ЭКСПЕРТ-001. Для поддержания pH в пределах 7.3-7.4 в раствор добавляли основной и кислотный буферы Trizma ("Sigma"). Полоски стимулировались через платиновые электроды с частотой 6 и 10 стимулов для 14-, 21- и 56-, 100-суточных животных соответственно, длительностью 5 мс.

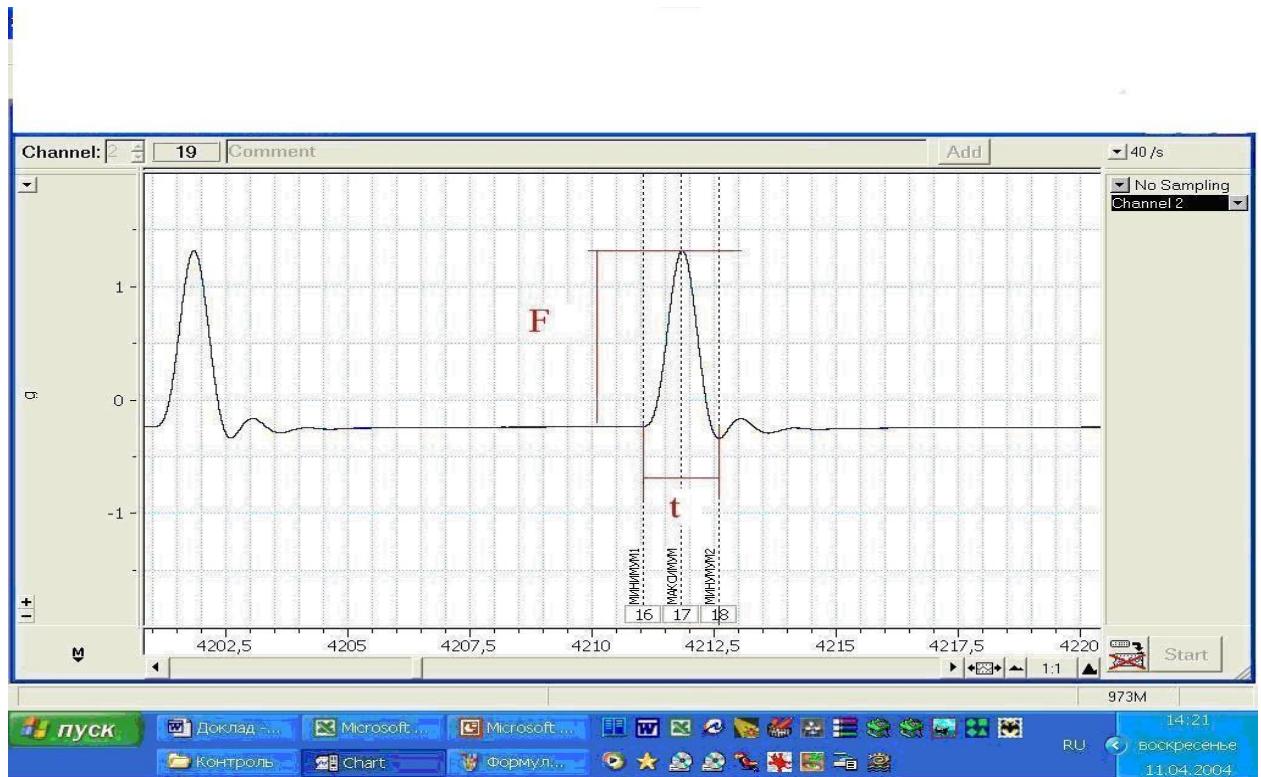
Запись кривой регистрировали на персональном компьютере при помощи программного обеспечения "Chart 5.0". После погружения препаратов в резервуары следовал "период приработки" в течение 40-60 мин, в ходе которой мышечным полоскам постепенно придавалось оптимальное натяжение. Исходные параметры сокращения регистрировали 10 мин, затем в рабочий раствор добавляли агонист одной из концентраций и записывали в течение 20 мин. Агонисты Р2-рецепторов: АТФ, 2-метилтио-АТФ, β , γ -метиленАТФ добавляли в различных концентрациях и оценивали изменения сокращений полосок миокарда крыс. По окончании стимуляции агонистами препараты трехкратно отмывали рабочим раствором в течение 10 мин, затем регистрировали исходные показатели для каждой последующей дозы. Фармакологические вещества не добавлялись до тех пор, пока не происходила стабилизация изометрического сокращения. После этого в течение десяти минут записывали исходные параметры сокращения. Рассчитывали реакцию силы и длительности сокращения в ответ на действие агонистов в абсолютных значениях и в процентах от исходного. Исходные сокращения полосок миокарда принимали за 100%, относительно них рассчитывали влияние используемых фармакологических агентов.

Для определения модулирующего влияния 2-метилтио-АТФ на эффект карбахолина записывали влияние карбахолина в течении 20 мин, затем отмывали, записывали исходную сократимость в течении 10 мин, вновь добавляли карбахолин и на 10 мин добавляли 2-метилтио-АТФ. Также проводили эксперимент с обратной последовательностью подачи веществ, когда карбахолин добавляли на фоне действия 2-метилтио-АТФ.

При изучении совместного влияния изопротеренола и 2-метилтио-АТФ сначала регистрировали контрольное влияние изопротеренола в течение 30 мин. Затем, полоски промывали, записывали исходную сократимость и на 10 мин добавляли 2-метилтио-АТФ. Проводили регистрацию сократимости при обратной последовательности подачи веществ, когда на фоне действия 2-метилтио-АТФ добавляли изопротеренол.

Рассчитывали абсолютные значения силы в граммах и общую длительность изометрического сокращения полосок миокарда предсердий и желудочков в секундах, а также оценивали процент изменения на воздействие агониста от исходных показателей.

Исходные значения сокращения принимали за 100%.



Использовали следующие формулы:

$$F = F_{\text{максимум}} - (F_{\text{минимум1}} + F_{\text{минимум2}})/2,$$

где F – сила сокращения в граммах, а $F_{\text{максимум}}$, $F_{\text{минимум1}}$, $F_{\text{минимум2}}$ – соответствующие точки, на кривой одиночного изометрического сокращения.

$$t=t_{\text{максимум}}+t_{\text{минимум1}}+t_{\text{минимум2}},$$

где t – время сокращения в секундах, а $t_{\text{максимум}}$, $t_{\text{минимум1}}$, $t_{\text{минимум2}}$ – соответствующие точки.

2.3. Организация и методы экспериментов в условиях *in vivo*

Наркотизированную крысу фиксировали на специальном операционном столе с сильным освещением. Операционное поле предварительно обрабатывали, затем по серединной линии шеи (для обнажения яремной вены) или на внутренней стороне бедра (для обнажения бедренной вены) производили разрез кожи длиной 1-2 см. При помощи специально изготовленных препаровальных игл и хирургических пинцетов осторожно, при визуальном контроле под бинокулярным микроскопом МБС 2, обнажали нервно-сосудистый пучок, не допуская его повреждения и возможных кровотечений. Отделяли, соответственно, яремную или бедренную вену, брали на шелковую лигатуру. Через небольшой разрез в вену вводили пластиковый катетер, наполненный 1% раствором

тепарина. Во избежание высыхания тканей операционное поле закрывали марлей, смоченной в физиологическом растворе.

Для визуального контроля над изменением реограммы и электрокардиограммы использовали осциллограф С1-83.

Регистрацию и анализ сердечной деятельности проводили на комплексной электрофизиологической лаборатории "Diggers", обладающей возможностью обработки электрокардиограммы по методике Р.М. Баевского и дифференцированной реограммы для расчета УОК по формуле Kubicek (1974).

Методика регистрации электрокардиограммы

В наших исследованиях животные после наркоза в течение 30-45 мин находились в "покое". Далее, с помощью стальных игольчатых электродов электрические сигналы отводились на электрокардиограф ЭК1Т- 04, с которого сигналы через аналого-цифровой преобразователь передавались на память ЭВМ и для визуального контроля параллельно поступали в осциллограф С1- 83. Управление работой осуществлялось комплексно с пульта управления. Последующий анализ R-R интервалов осуществлялся путем вызова сигналов из памяти машины.

Методика регистрации дифференцированной реограммы и определения ударного объема крови

В последние годы для определения ударного объема крови в физиологических исследованиях широкое применение получил метод тетраполярной импедансной реоплетизмографии. По мнению многих исследователей, данный метод отличается информативностью и малотравматичен (И.Н. Вульфсон, 1977; Р.Р. Нигматуллина и др., 1999; I.C. Denniston et al., 1976, B.I. Chapman et al., 1977; S.N. Mohapatra et al., 1977 и другие). В лаборатории кровообращения ИМБП под руководством проф. Б.С. Кулаева, Р.А. Абзалова и А.М. Бадаквы данный метод усовершенствован для исследования сердечной деятельности мелких лабораторных животных. Это позволило в дальнейшем регистрировать УОК крысят в широком возрастном диапазоне и при различных воздействиях (Р.Р. Нигматуллина, 1991; Р.И. Гильмутдинова, 1991).

Учитывая вышеперечисленные преимущества, мы в своих исследованиях для определения величины ударного объема крови сердца растущих крыс, применили метод тетраполярной импедансной реоплетизмографии, разработанный Кубичеком с соавторами (W.G. Kubicek, 1974).

Регистрация дифференцированной реограммы осуществлялась параллельно с электрокардиограммой при естественном дыхании с помощью реоплетизмографа РПГ - 204. Для снятия дифференцированной реограммы мы использовали игольчатые

электроды, которые укрепляли подкожно, предварительно обработав спиртом. Первый и четвертый - токовые электроды устанавливали подкожно на нижнюю челюсть и бедро, второй и третий - потенциальные, укрепляли параллельно друг другу над ключицей и серединой мечевидного отростка. Сигналы от реографа, через аналого - цифровой преобразователь поступали в ЭВМ и анализировались.

Определение УОК проводилось по формуле Kubicek et al, (1974), которая заранее была введена в память ЭВМ.

$$V_0 = p \cdot L^2 / R^2 \cdot A_d \cdot T_u , \text{ где}$$

V_0 - величина УОК, см³;

p - удельное сопротивление крови, Ом/см;

L - расстояние между токоизмеряющими электродами, см;

R - межэлектродный импеданс, Ом;

A_d - амплитуда дифференцированной реограммы, Ом/с;

T_u - время изgnания крови, с.

При вычислении УОК усредняли показатели 100 кардиоинтервалов. Значение удельного сопротивления крови, которое входит в формулу расчета УОК, индивидуально для каждого возраста животных (Р.А. Абзалов, 1985), мы использовали данные, полученные Р.Р. Нигматуллиной и др. (1988).

2.4 Методика фармакологических воздействий

Для введения фармакологических агентов открывали доступ к яремной или бедренной вене. В экспериментах использовали следующие вещества, вводимые в бедренную вену:

- неселективные агонисты P2X-пуринорецепторов аденоzin трифосфорную кислоту (АТФ) 10-4М (0,02 мг/кг) (Г.А. Билалова, 2000) и α,β-метилен АТФ 10-4М (0,02 мг/кг);

- неселективный блокатор P2-пуринорецепторов сурамин (20мг/кг) (McQueen D.S. et al., 1998);

- селективный блокатор P2Y-пуринорецепторов реактив голубой-2 (5 мг/кг) (Kichenin et al., 2000);

- селективный блокатор P2X1-,P2X2/3- и P2X3-пуринорецепторов TNP-ATP (0,8 мг/кг) (King et al., 2004);

А так же вещества, вводимые в яремную вену:

- селективный агонист P2X1-пуринорецепторов β,γ -метилен АТФ 10-4М (0,02 мг/кг) (Bo, 2002);
- ацетилхолин хлорид 10-4М (20 мкг/кг) (Р.И. Гильмутдинова, 1991);
- норадреналина битартрат 10-5М (3,2 мкг/кг) (Р.И. Гильмутдинова, 1991);
- прозерин (0,005мг/кг).

Все препараты, используемые нами, предназначены для внутривенного введения и разводились в физиологическом растворе до конечного объема 0,075мл/200г массы тела. Различия мест введения фармакологических препаратов обусловлены скоростью их распада *in vivo*.

Препараты АТФ, УТФ,, α,β -метилен АТФ, сурамин, реактив голубой-2, PPADS, TNP-АТР, β,γ -метилен АТФ, ацетилхолин производства фирмы «Sigma». Все остальные вещества отечественного производства.

2.5. Статистическая обработка результатов исследования

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась в редакторе Microsoft Excel, где вычисляли: среднее значение (M), среднее квадратическое отклонение (δ), ошибку средней (m). Результаты экспериментов, проведенные на целом организме представлены в таблицах в абсолютных значениях, а в условиях *in vitro* в абсолютных и относительных значениях. Данные по относительным значениям силы и длительности сокращения полосок миокарда вычислялись до 12 знака после запятой. Результаты в абсолютных значениях округлены до 5 знака после запятой. Достоверность различий в экспериментах в условиях *in vitro* проводили с использованием непараметрического парного и непарного критерия Стьюдента. В экспериментах *in vivo* достоверность различий достоверность различий в связанных группах проводили с использованием непараметрического критерия Вилкоксона. Достоверными считались результаты при $p<0,05$.

ГЛАВА 3. Р2Х-ПУРИНОРЕЦЕПТОРЫ В РЕГУЛЯЦИИ СЕРДЕЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ КРЫС В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

3.1. Влияние экзогенной АТФ и ее аналогов на сердечную деятельность крыс

В первой серии экспериментов в опытах *in vivo* на половозрелых крысах исследовали влияние экзогенной АТФ на сердечную деятельность. Для определения зависимости доза-эффект животным внутривенно вводили растворы АТФ в концентрации 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} М объемом 0,075 мл (Рис. 6). Введение раствора АТФ в концентрации 10^{-6} М не оказалось действия.

АТФ в концентрации 10^{-5} М в течение 1 мин вызывала небольшое, но достоверное увеличение ЧСС с $377 \pm 9,5$ до $388 \pm 10,1$ уд/мин ($n=6$; $p<0,05$). К концу 1-й минуты ЧСС возвращалась к исходным значениям и сохранялась на этом уровне в течение 10 мин наблюдения. Увеличение концентрации АТФ до 10^{-4} М (0,02 мг/кг) привело к усилению хронотропного эффекта с $387 \pm 10,5$ уд/мин до $415 \pm 13,4$ уд/мин ($n=12$; $p<0,001$). Дальнейшее повышение концентрации пуринового нуклеотида до 10^{-3} М привело к исчезновению хронотропного эффекта АТФ с $396 \pm 9,2$ уд/мин до $399 \pm 9,7$ уд/мин). Следует отметить, что при повторном введении АТФ в концентрации 10^{-4} М и 10^{-5} М ее влияние на ЧСС полностью воспроизводилось, что указывает на его закономерный характер. Введение эквиобъемного количества физиологического раствора не изменяло работу сердца.

Для более детального анализа влияния АТФ на функции сердца проводилась одновременная регистрация ударного объема крови и показателей пульсограммы: вариационный размах и амплитуда моды. В течение 10 мин наблюдений УОК достоверно не изменяется.

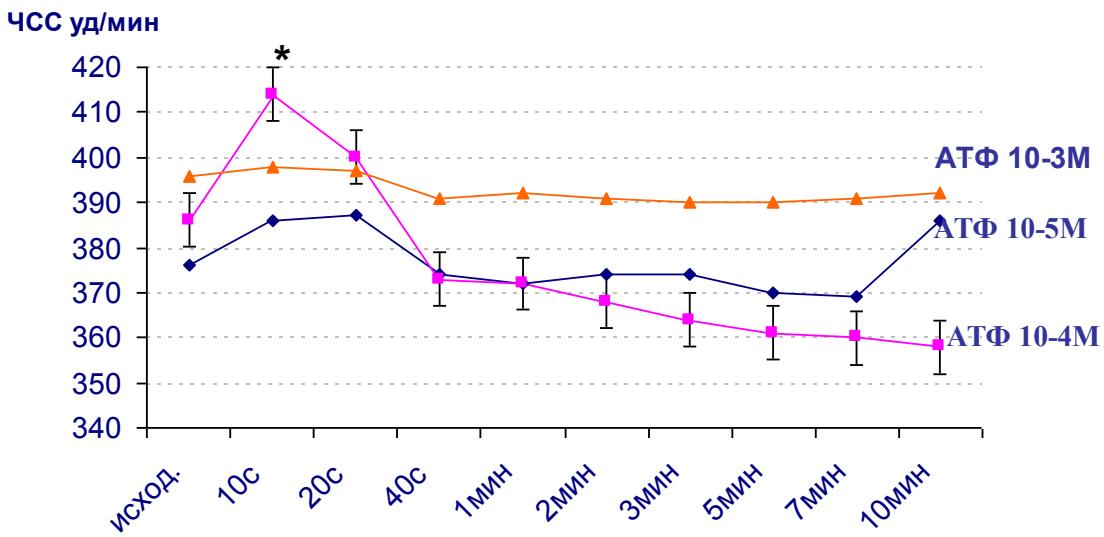


Рис.6. Изменение частоты сердечных сокращений крыс при внутривенном введении раствора АТФ различной концентрации.

3.1.1. Влияние аденозина на деятельность сердца

Наблюдаемые изменения ЧСС могли быть связаны как с прямым эффектом АТФ на сердце, так и с действием аденозина, который образуется при гидролизе АТФ и может действовать через собственные Р1-рецепторы. АДФ - продукт распада АТФ во многих тканях равно эффективен с АТФ, а аденозин – конечный продукт распада АТФ – высокоактивный агонист Р1-рецепторов. АТФ, влияя на Р2-рецепторы и аденозин, действуя на Р1-рецепторы, могут вызвать суммарные эффекты, которые взаимно перекрываются. (А.У. Зиганшин., 1999). Введение аденозина в концентрации 10^{-4} М не привело к изменению основных показателей работы сердца (Табл. 1). Следовательно, увеличение ЧСС было вызвано прямым действием экзогенного АТФ, а не аденозином.

Определение зависимости доза-эффект показало, что АТФ вызывает концентрационное зависимое повышение хронотропной реакции сердца. Внутривенное введение АТФ вызывает положительную хронотропную реакцию сердца без заметного изменения ударного объема крови, что обусловлено активацией Р2-рецепторов, а не действием продуктов гидролиза АТФ, так как введение агониста Р1-рецепторов аденозина было не эффективным.

Таблица 1.

Показатели частоты сердечных сокращений при внутривенном введении физиологического раствора и аденоцина $10^{-4}M$ ($M\pm m$)

Показатели	Исх. значение	10 с	20 с	40 с	1 мин	5 мин	10 мин
АТФ $10^{-4}M$ На фоне физ.раствора ЧСС, уд/мин	$334\pm14,5$	$334\pm15,0$	$333\pm14,4$	$334\pm14,5$	$334\pm14,2$	$330\pm15,3$	$329\pm15,9$
Аденоцин $10^{-4}M$ ЧСС, уд/мин	$300\pm11,5$	$301\pm11,6$	$300\pm10,5$	$300\pm9,6$	$301\pm10,8$	$300\pm8,2$	$302\pm8,8$

Примечание: * $p<0,01$

3.1.2. Влияние экзогенной АТФ на сердце при блокаде β -адренорецепторов и М-холинорецепторов сердца

Положительное хронотропное действие АТФ на сердце могло быть обусловлено как прямым действием АТФ на миокард, так и изменением активности симпатических и парасимпатических каналов регуляции. В следующей серии экспериментов изучали влияние экзогенного АТФ на фоне блокады β -адренорецепторов обзиданом и М-холинорецепторов атропином.

При введении экзогенной АТФ $10^{-4}M$ при блокаде β -адренорецепторов наблюдали такое же, как в контроле увеличение ЧСС к 20секунде ($p<0,01$). При воздействии АТФ на фоне блокады М-холинорецепторов атропином характер изменений ЧСС был таким же. Увеличение ЧСС составило $17\pm0,58$ уд/мин ($p<0,01$) по сравнению с исходным.

На фоне блокады М-холинорецепторов увеличение этого параметра было четырехкратным ($n=13$; $p<0,001$). Сохранение положительного эффекта АТФ на фоне блокад как β -адренорецепторов, так и М-холинорецепторов, позволяет высказать предположение о прямом действии АТФ на сердце. Эффект АТФ на вариабельность сердечного ритма подтверждает самостоятельное регулирующее действие этого нуклеотида на миокард.

В наших экспериментах увеличение ЧСС не сопровождалось изменением УОК. Появление АТФ во внеклеточной среде и сердечной ткани приводит к эффектам, обусловленным взаимодействием АТФ с Р2-рецепторами клеточной мембраны кардиомиоцитов.

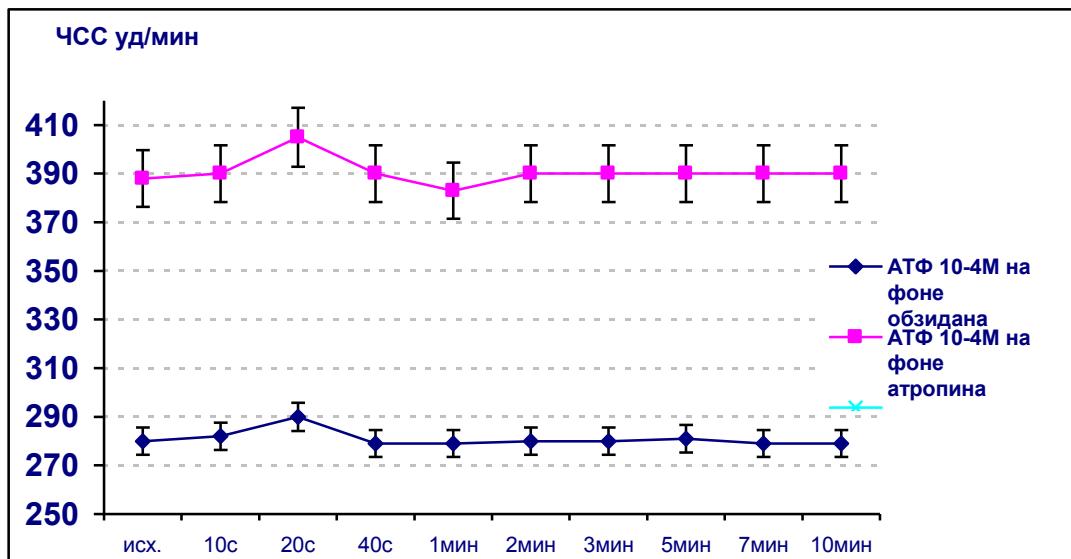


Рис. 7. Динамика ЧСС при введении АТФ на фоне блокады М-холинорецепторов и β -адренорецепторов сердца 100-дневным животным.

3.1.3. Влияние АТФ и α,β – метилен –АТФ на деятельность сердца крыс в онтогенезе

Ранее проведенная серия экспериментов показала, что введение АТФ в концентрации 10^{-4} М приводит к появлению положительного хронотропного эффекта. Для определения возрастных особенностей чувствительности Р2-рецепторов сердца к агонистам определяли дозозависимый эффект на введение АТФ животным 14, 21, 56 и 100-суточного возраста.

У 14-сут. крысят внутривенное введение АТФ в концентрации 10^{-6} увеличивает ЧСС с $352 \pm 5,7$ уд/мин до $362 \pm 1,9$ уд/мин ($p < 0,05$). Концентрации АТФ 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-7} М не изменяли ЧСС.

Введение АТФ 10^{-4} М 21-суточным крысятам увеличивает ЧСС к 15 секунде наблюдения с $463 \pm 2,8$ уд/мин до $473 \pm 2,9$ уд/мин ($p < 0,05$). Экзогенная АТФ в эквимолярной концентрации у 14-суточных крысят не вызывает достоверных изменений ЧСС и УОК. Снижение концентрации АТФ до 10^{-5} М и 10^{-7} М также не приводит к изменениям сердечной деятельности. Концентрация раствора АТФ 10^{-6} М привела к возникновению положительного хронотропного эффекта к 17 секунде после введения с $352 \pm 5,7$ уд/мин до $363 \pm 1,9$ уд/мин ($p < 0,05$; рис. 9 А).

Внутривенное введение АТФ 10^{-4} М 56-суточным крысам увеличивает ЧСС к 15секунде наблюдения с $422 \pm 2,2$ уд/мин до $446 \pm 2,3$ уд/мин ($p < 0,01$; рис. 4.). Ударный объем крови не изменился. АТФ в концентрации 10^{-3} и 10^{-5} М достоверных изменений в деятельности сердца не вызвала (Рис. 10 А).

Введение 100-суточным крысам АТФ 10^{-4} М приводит к появлению положительного хронотропного эффекта на 17секунде после введения с $341 \pm 2,4$ уд/мин до $351 \pm 4,4$ уд/мин ($p < 0,05$).

Повторное введение раствора АТФ во всех возрастных группах вызывает увеличение ЧСС, что свидетельствует о воспроизводимости эффекта. Восстановление ЧСС происходило у 21-суточных крыс к 10-й, у 56-суточных – к 5-й, а у 100-суточных – к 1-й минуте и сохранялось на этом уровне в течение 10 мин наблюдения. УОК во всех возрастных группах не менялся.

Известно, что АТФ является нестойким веществом и в присутствии $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы быстро разрушается до аденоцина при однократном прохождении через сердце (G. Vassort, 2001). Поэтому в следующей серии экспериментов был использован стойкий аналог АТФ α,β – метилен –АТФ. Внеклеточная АТФ не может проникать через неповрежденную мембрану по законам диффузии. Разрушение АТФ обеспечивается ферментами, расположенными на поверхности клетки, т.е. внеклеточными ферментами.

Устойчивый к энзиматическому распаду аналог АТФ - α,β – метилен –АТФ является агонистом преимущественно для P2X-рецепторов. P2X - и P2Y-рецепторы различаются чувствительностью к ряду аналогов АТФ. Для P2X-рецепторов сродство к ряду агонистов возрастает в ряду α,β – метилен –АТФ $>>$ АТФ $>$ 2-метилтио-АТФ (А.У. Зиганшин, 2002). Некоторые исследователи считают, что α,β – метилен –АТФ является слабым агонистом P2Y-рецепторов. (Ralevic et al., 1998).

Для определения зависимости доза-эффект и определения чувствительности P2X-рецепторов в онтогенезе использовали растворы α,β – метилен – АТФ в концентрации 10^{-11} – 10^{-4} М.

У 14-суточных крысят положительный хронотропный эффект наблюдается при введении раствора α,β – метилен – АТФ в концентрации 10^{-10} М. Частота сердечных сокращений увеличивается с $369 \pm 6,0$ уд/мин до $380 \pm 5,9$ уд/мин ($p < 0,05$; рис. 8 Б) к 17 секунде с момента внутривенной инъекции. Концентрации α,β – метилен – АТФ 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-11} М не вызывают изменений регистрируемых показателей деятельности сердца .

У 21-суточных крысят введение α,β – метилен – АТФ в концентрации 10^{-7} М ($0,000002$ мг/кг)) стимулирует положительный хронотропный эффект к 15 секунде с $450 \pm 2,7$ уд/мин до $462 \pm 1,9$ уд/мин с последующим снижением к 1-й минуте ($p < 0,05$) (рис. 3). Растворы α,β – метилен -АТФ в концентрации 10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М не увеличивают ЧСС после введения (Рис. 9 Б). Стойкий аналог АТФ в концентрации 10^{-4} М снижает ЧСС к 45 секунде после введения с $478 \pm 3,3$ уд/мин до $461 \pm 2,6$ уд/мин ($p < 0,05$).

Введение α,β -метилен-АТФ 10^{-4} М 56-суточным животным приводит к увеличению ЧСС на 15 секунде эксперимента с $412 \pm 3,8$ уд/мин до $426 \pm 3,8$ уд/мин ($p < 0,01$; рис.10). Концентрации α,β -метилен-АТФ 10^{-3} М, 10^{-5} М не вызывают положительного хронотропного эффекта .

Внутривенное введение α,β -метилен-АТФ в концентрации 10^{-4} М 100-суточным животным вызывает увеличение ЧСС на 17 секунде эксперимента с $353 \pm 4,4$ уд/мин до $365 \pm 3,4$ уд/мин ($p < 0,01$; рис. 11 Б).

У 56-суточных животных ЧСС возвращается к исходному значению к 15-й минуте, у 100-суточных – к 2-й минуте и в дальнейшем существенно не меняется в течение 15 минут наблюдения. Период восстановления ЧСС на введение экзогенных АТФ и α,β – метилен – АТФ с возрастом снижается, что указывает на зрелость парасимпатического канала регуляции. ЧСС до исходного уровня после введения α,β – метилен – АТФ восстанавливалась дольше, чем после АТФ.

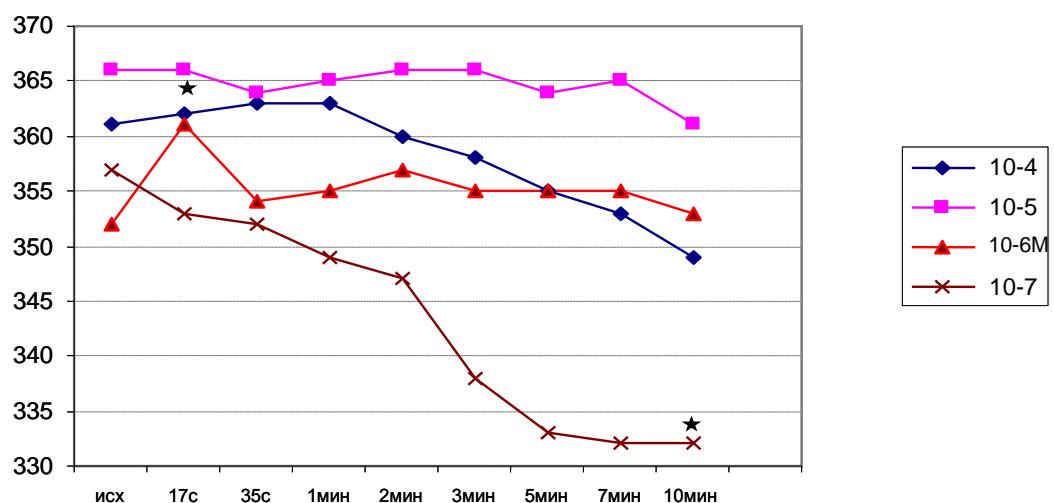
В качестве контроля всем животным вводили физиологический раствор в том же объеме, что и раствор α,β – метилен - АТФ. Изменений в работе сердца не наблюдалось.

Основным результатом данной серии экспериментов является появление положительной хронотропной реакции при введении экзогенных АТФ и α,β – метилен – АТФ. Ударный объем крови на введение вышеназванных пуринов достоверно не изменяется. Введение α,β – метилен –АТФ в эквимолярной дозе (10^{-4} М) 56 - и 100-суточным животным увеличивает ЧСС к 15 секунде. Дальнейшее определение зависимости доза-эффект показало, что у 21-суточных крысят положительный хронотропный эффект наблюдается при введении стойкого агониста в концентрации 10^{-7} М, а 14-суточных 10^{-10} М. От 14 к 100-суточному возрасту происходит снижение концентраций АТФ и α,β – метилен – АТФ, вызывающих положительную хронотропную

реакцию, что указывает на более высокую чувствительность сердца к агонистам P2-рецепторов в раннем постнатальном онтогенезе.

Эффект экзогенного α,β -метилен-АТФ был кратковременным, таким же как действие АТФ, что, возможно, вызвано быстрой десенситизацией P2-рецепторов сердца. Известно, что α,β -метилен-АТФ селективно снижает чувствительность P2X-рецепторов сердца (Ralevic V. et all., 1991, 1998). Энзиматически устойчивый аналог АТФ - α,β -метилен-АТФ – способен вызывать селективную десенситизацию P2X-рецепторов, что впервые было показано на препаратах мочевого пузыря и семявыносящего протока морской свинки (Kasakov and Burnstock. 1983; Meldrum and Burnstock, 1983). В многочисленных последующих работах α,β -метилен-АТФ широко использовался для блокады P2X-рецепторов, что позволило установить наличие и физиологическое значение этих рецепторов во многих органах. Хотя в настоящее время десенситизация посредством α,β -метилен-АТФ является широко используемым и достаточно селективным методом блокирования P2X-рецепторов, выраженный собственный агонистический эффект препарата при одновременном антагонистическом действии существенно снижает его достоинства (А.У. Зиганшин, 1999).

A.



Б

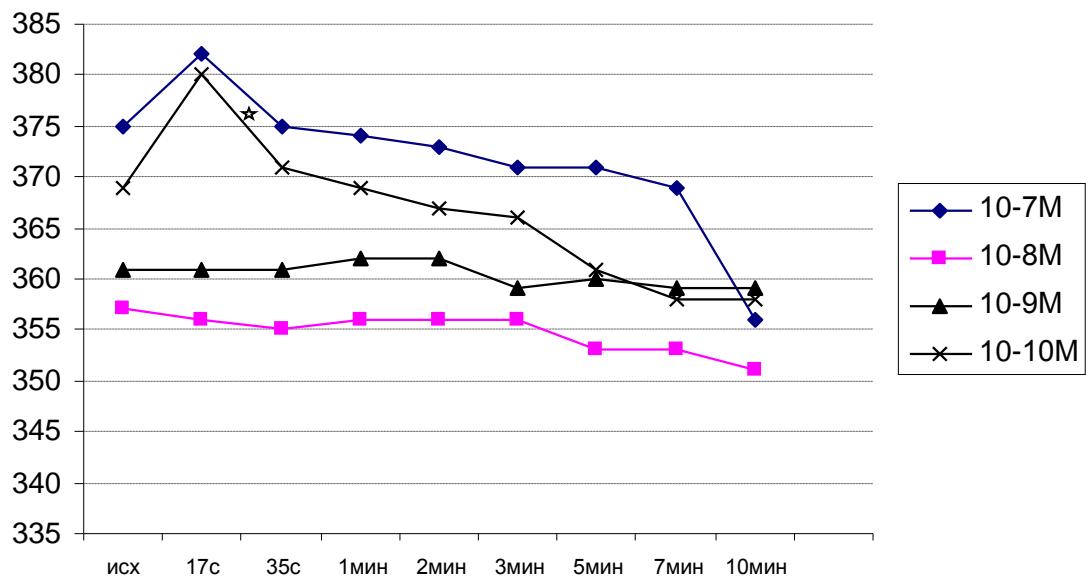
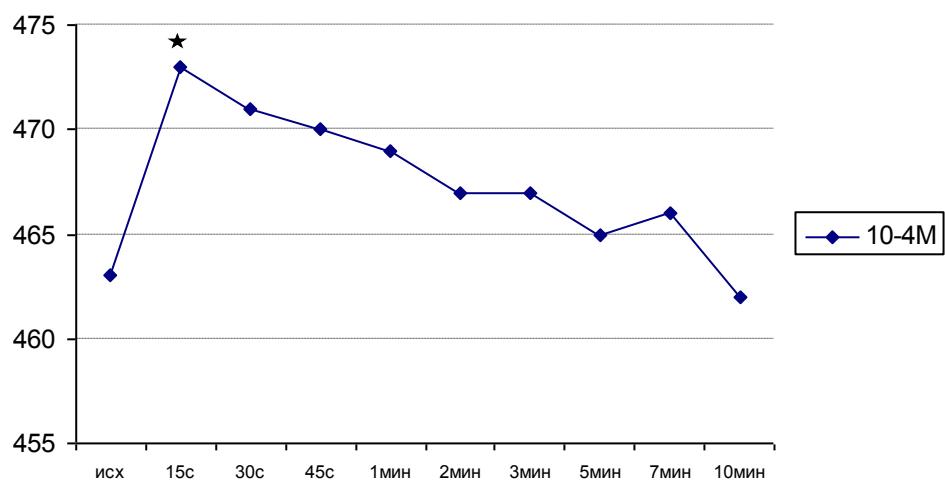


Рис. 8. Изменение частоты сердечных сокращений 14-суточных крыс при внутривенном введении растворов АТФ и α,β -метилен АТФ.

Примечание: А- введение растворов АТФ; Б- введение растворов α,β - метилен АТФ, достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$

А

ЧСС уд/мин



Б

ЧСС уд/мин

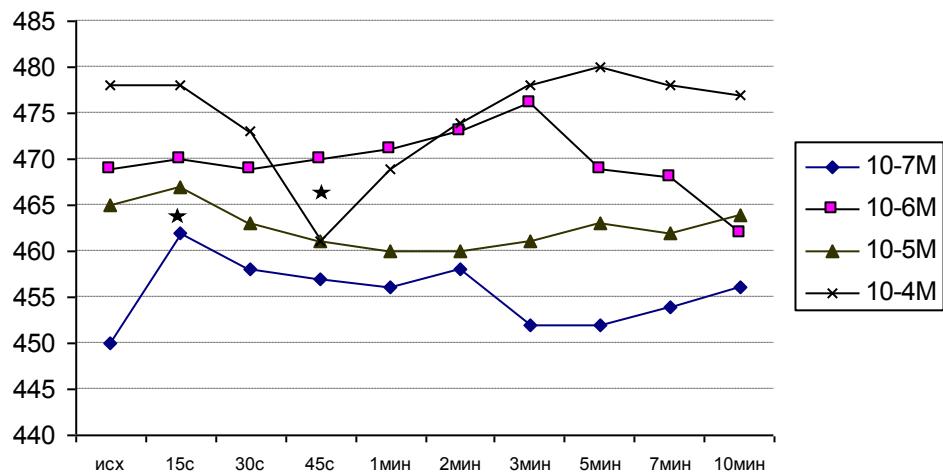
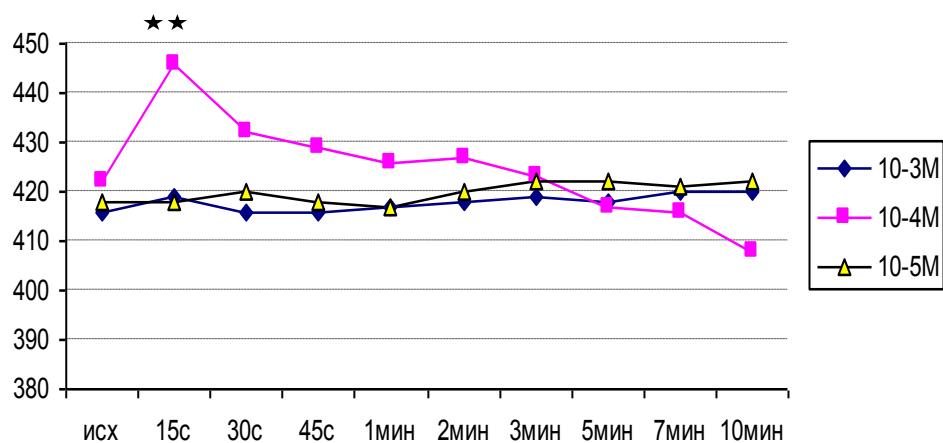


Рис. 9. Изменение частоты сердечных сокращений 21-суточных крыс при внутривенном введении растворов АТФ и α,β -метилен АТФ.

Примечание: А- введение раствора АТФ; Б- введение растворов α,β - метилен АТФ, достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$

А

ЧСС уд/мин



Б

ЧСС уд/мин

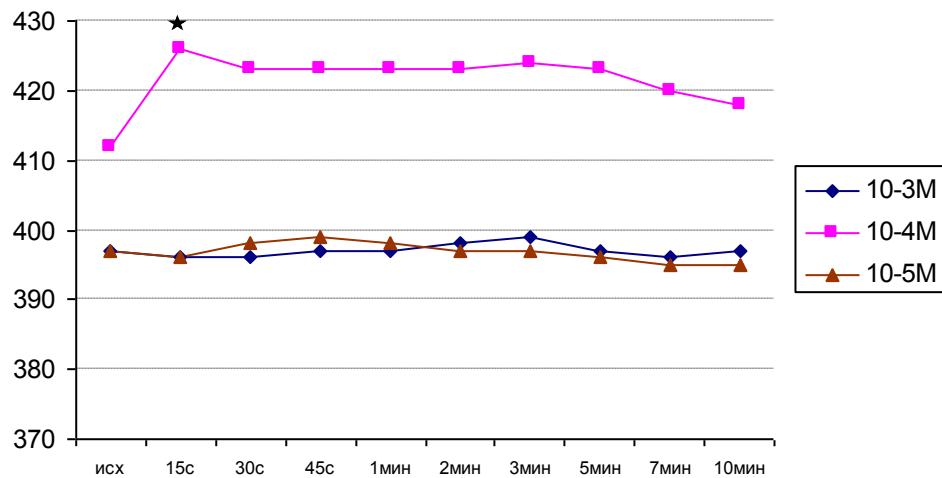
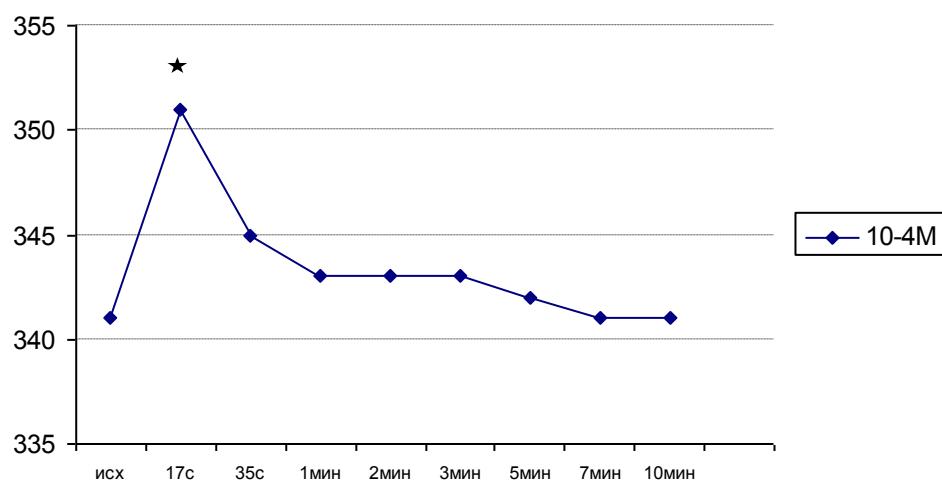


Рис. 10. Изменение частоты сердечных сокращений 56-суточных крыс при внутривенном введении растворов АТФ и α,β -метилен АТФ

Примечание: А- введение растворов АТФ; Б- введение растворов α,β - метилен АТФ
достоверность ** $p<0,005$, * $p<0,05$ по сравнению с исходным значением

А

ЧСС уд/мин



Б

ЧСС уд/мин

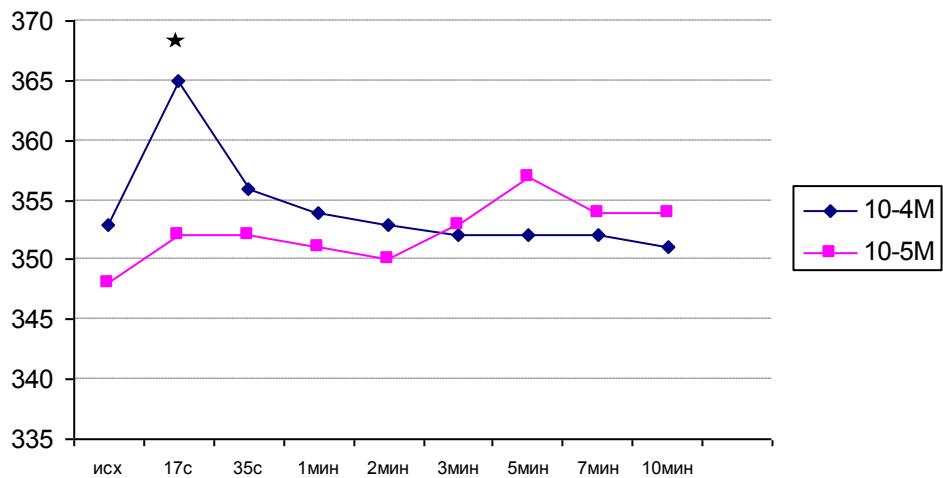


Рис.11. Изменение частоты сердечных сокращений 100-суточных крыс при внутривенном введении растворов АТФ и α,β -метилен АТФ

Примечание: А- введение раствора АТФ 10^{-4} М; Б- введение растворов α,β - метилен АТФ, достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$

3.1.4. Влияние сурамина на показатели сердечной деятельности крыс

Для подтверждения прямого влияния АТФ и его аналогов на Р2-рецепторы в следующей серии экспериментов изучали влияние экзогенных пуринов на сердечную деятельность в условиях их блокады. Неселективным блокатором Р2-рецепторов является сурамин. Блокада сурамином Р2-рецепторов в концентрации $14\mu\text{M}/\text{кг}$ (20 мг/кг) при внутривенном введении длится более часа (McQueen et al., 1998). Введение антагониста проводили медленно в течение 15-20 секунд, инъекцию агониста завершали в течение 2 секунд с минимальным интервалом между введениями 5 мин (McQueen et al., 1998).

В изученной литературе мы не нашли данных о влиянии сурамина на основные показатели деятельности сердца. Поэтому изучали влияние внутривенного введения неселективного антагониста на ЧСС, УОК. Показатели регистрировали в течение 60 минут. При введении сурамина 100-суточным животным показатели сердечного ритма достоверно не менялись. У 14-суточных крысят к 1 мин после введения ЧСС уменьшается на 3,4%. К 5 минуте с $383\pm9,1$ уд/мин до $334\pm14,5$ уд/мин, что составляет 12,8% ($p<0.005$; табл.2). К 10 минуте после введения ЧСС снижается до $330\pm12,9$ уд/мин (14%). Можно предположить, что у 14-сут. крысят АТФ принимает участие в формировании нервных

регуляторных влияний на сердце через активацию P2-рецепторов, локализованных на чувствительных волокнах и нервных окончаниях парасимпатических нервов (Hansen et al., 1999).

Таблица 2

Показатели сердечной деятельности 14-суточных крыс при введении блокатора P2-пуринорецепторов сурамина (n=6)

Показатель и сердечной деятельностью	Время								
	исх	17с	35с	1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин
ЧСС, уд/мин	383±9,1	385±8,2	376±6,3	370±5,6	360±9,3	348±10,9	334±14,5	333±13,7	330±12,9 **
УОК мл	0,0193 ±0,0003	0,0191 ±0,0004	0,0192 ±0,0005	0,0196 ±0,005	0,0943 ±0,0003	0,0190 ±0,0004	0,0189 ±0,0005	0,0190 ±0,0004	0,0191 ±0,0005

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением **p<0,005

3.1.5. Влияние экзогенных АТФ и α,β -метилен-АТФ на показатели сердечной деятельности крыс на фоне сурамина

В данной серии экспериментов рассмотрено участие Р2-рецепторов в реализации ранее наблюдаемых эффектов пуринов на деятельность сердца у животных разных этапов биологического созревания.

Внутривенное введение экзогенных АТФ и α,β -метилен АТФ на фоне неселективного антагониста Р2-рецепторов сурамина не вызывает достоверных изменений ЧСС, УОК, АМо и ΔX у крыс 14-, 21-, 56- и 100-суточного возраста. Следовательно, полученные данные доказывают положительное хронотропное влияние экзогенных АТФ и α,β -метилен АТФ на Р2-рецепторы сердца крыс.

3.1.6. Влияние экзогенных АТФ и α,β -метилен АТФ на показатели сердечной деятельности крыс на фоне селективного блокатора Р2У-рецепторов реактива голубого-2

Для определения семейства Р2-рецепторов, участвующих в положительном хронотропном эффекте, использовали селективный блокатор Р2-рецепторов реактив голубой-2 с преимущественным действием на Р2У-рецепторы. Свой блокирующий эффект реактив голубой-2 (производное антрахиносульфаниловой кислоты) проявляет в узком диапазоне концентраций и коротком времени инкубации, не более 60 минут (А.У. Зиганшин и др., 1999; А.М., Hopwood, 1987). На сердце крысы, изолированном по Лангендорфу, подтвердили существование эффективной блокады Р2У-рецепторов реактивом голубым-2 (G. Burnstock, 2006).

Введение α,β -метилен АТФ в концентрации 10^{-10} М на фоне реактива голубого-2 14-суточным крысятам увеличивает ЧСС к 17 секунде с $357 \pm 3,6$ уд/мин до $369 \pm 4,1$ уд/мин ($p < 0,05$). У 21-суточных крысят положительный хронотропный эффект с $438 \pm 2,2$ до $449 \pm 3,3$ уд/мин ($p < 0,05$) возникает при введении α,β -метилен АТФ в концентрации 10^{-7} М. Инфузия АТФ 21-суточным животным на фоне антагониста в концентрации 10^{-4} М повышает ЧСС с $438 \pm 2,2$ уд/мин до $450 \pm 3,3$ уд/мин ($p < 0,05$) (Табл. 3).

Введение α,β -метилен АТФ в концентрации 10^{-4} М на фоне реактива голубого-2 у 56-суточных увеличивает ЧСС с $394 \pm 2,8$ уд/мин до $405 \pm 2,3$ уд/мин ($p < 0,05$) и 100-суточных с $354 \pm 3,0$ уд/мин до $364 \pm 2,7$ уд/мин ($p < 0,05$). При введении АТФ в концентрации 10^{-4} М на фоне реактива голубого-2 наблюдали положительный

хронотропный эффект у 100-суточных крыс с $346 \pm 6,3$ уд/мин до $355 \pm 4,7$ уд/мин ($p < 0,05$) и у 56-суточных с $392 \pm 4,8$ уд/мин до $401 \pm 5,5$ уд/мин ($p < 0,05$; табл.4).

Таким образом, появление положительного хронотропного эффекта у крыс всех возрастных групп при введении АТФ и α,β -метилен-АТФ на фоне блокады Р2У-рецепторов указывает на активацию Р2Х-рецепторов, при участии которых экзогенные пурины осуществляют свой эффект.

3.1.7. Влияние α,β -метилен-АТФ на фоне селективного блокатора Р2Х₁-рецепторов на показатели сердечной деятельности крыс в онтогенезе

Для определения подтипа Р2Х-рецепторов, участвующих в положительной хронотропной реакции при влиянии АТФ и его аналогов использовали селективный блокатор ТНР-АТФ ($2',3'$ -о-(2,4,6-тринитрофенил) аденоzin- 5 – трифосфат), который является производным АТФ. Это сильный и неконкурентный антагонист Р2Х₁-, Р2Х_{2/3}- и Р2Х₃-пуриноцепторов сердца (Vassort G., 2001; Honore P. et al., 2002; Xu J et al., 2004). Он используется для характеристики нативных Р2Х₁- Р2Х_{2/3}- и Р2Х₃-рецепторов в низкой наномолярной концентрации (Burgard E. et al., 2000). Длительность ингибирующего эффекта ТНР-АТФ в концентрации 0,8 мг/кг более 15 минут (King K. et al., 2004).

В изученной литературе мы не нашли данных о влиянии ТНР-АТФ на деятельность сердца в опытах *in vivo*. Поэтому сначала регистрировали основные показатели деятельности сердца при внутривенном введении антагониста в течение 10 минут. Достоверных изменений ЧСС, УОК не наблюдалось. В основном эксперименте экзогенный α,β -метилен-АТФ вводили через 1 мин после введения ТНР-АТФ.

Внутривенное введение α,β -метилен-АТФ в концентрации 10^{-7} М 21-суточным и в концентрации 10^{-10} М 14-суточным на фоне ТНР-АТФ также не приводит к изменению основных показателей деятельности сердца. Введение α,β -метилен-АТФ в концентрации 10^{-4} М 100- и 56-суточным крысам на фоне ТНР-АТФ не вызывает изменений ЧСС, УОК.

Полученные данные подтверждают гистохимические данные (Hansen et al., 1999; Vassort G., 2001) о присутствии в сердце крыс Р2Х₁ и Р2Х₃ –пуринорецепторов, опосредующих положительный хронотропный эффект при действии экзогенных пуринов. По данным G.Vassorta (2001), при исследовании микросрезов ткани из разных частей сердца крысы показано присутствие Р2Х₁-, Р2Х₂-, Р2Х₄ –пуринорецепторов в предсердии и Р2Х₄ - рецепторов в желудочке.

Таблица 3

Показатели сердечной деятельности 14- и 21 сут. крыс при введении раствора α,β -метилен АТФ на фоне блокатора Р2У-пуринорецепторов реактива голубого-2

Возраст	Показатели сердечной деятельности	Время									
		Исх.	15с	30с	45с	1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин
21-сутки (n=5)	ЧСС, уд/мин	438±2,2	449±3,3 *	446±1,2	450±1,2	448±1,1	439±1,2	439 ±,1	437±1,1	437±1,3	436 ±,4
	УОК мл	0,0186± 0,007	0,0187± 0,006	0,0186± 0,006	0,0186± 0,006	0,0185± 0,006	0,0186± 0,007	0,0184± 0,007	0,0184± 0,007	0,0187± 0,006	0,0185± 0,008
Время											
14-суток (n=6)	ЧСС, уд/мин	Исх.	17с	35с		1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин
		357±3,63	369±4,1 *	364±9,1		361±8,6	361±8,5	360±9,0	358±8,7	358±9,0	355±10,0
	УОК мл	0,0166± 0,002	0,0167± 0,002	0,0159± 0,001		0,0157± 0,001	0,0168± 0,002	0,0165± 0,001	0,0175± 0,002	0,0172± 0,002	0,0168± 0,002

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением *p<0,05

Таблица 4

Показатели сердечной деятельности 56- и 100- сут. крыс при введении раствора α,β -метилен- АТФ на фоне блокатора Р2У-пуринорецепторов реактива голубого-2

Возраст	Показатели сердечной деятельности	Время								
		исх	17с	35с	1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин
100-сут. (n=6)	ЧСС, уд/мин	354±3,0	364±2,7 *	358±3,3	356±3,6	356±3,9	356±3,6	354±3,7	354±4,8	354±3,6
	УОК мл	0,0919± 0,005	0,0920± 0,005	0,0920± 0,006	0,0921± 0,007	0,0920± 0,006	0,0921± 0,004	0,0923± 0,005	0,0922± 0,006	0,0921± 0,006
56-сут. (n=6)	Время									
	ЧСС, уд/мин	исх	15с	30с	45с	1мин	2мин	3мин	5мин	7мин
		394±2,8	405±2,3 *	396±1,2	394±1,8	395±1,3	394±1,3	394±1,3	394±1,3	395±1,2
	УОК мл	0,0374± 0,006	0,0374± 0,006	0,0375± 0,0005	0,0375± 0,007	0,0374± 0,005	0,0375± 0,006	0,0375± 0,006	0,0378± 0,006	0,0375± 0,006

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$

3.1.8. Влияние селективного агониста P2X-пуринорецепторов на деятельность сердца

Синтетическим аналогом АТФ является β,γ -метилен-АТФ. В некоторых литературных источниках его определяют как селективный агонист P2X₁-пуринорецепторов (Bo X., 2002; Hu B. et al., 2002). Другие исследователи считают, что к нему чувствительны P2X₁-, P2X₃- и P2X_{2/3}-рецепторы (Nort A.R., 2002). Для активации P2X₁-рецепторов нужна концентрация в 30 раз меньше концентрации, необходимой для активации P2X₃-рецепторов. Этот агонист является нестойким соединением и во многих тканях распад β,γ -метилен-АТФ до аденоzinового аналога происходит за 1 мин (Nort A.R., 2002), поэтому введение препарата проводили в яремную вену.

В доступной нам литературе не удалось найти ссылок на дозировку используемого агониста β,γ -метилен-АТФ, рекомендуемую в опытах *in vivo*. Поэтому влияние селективного агониста на деятельность сердца изучали в большом диапазоне концентрации с 10^{-14} по 10^{-4} М. Нами установлено, что β,γ -метилен-АТФ в концентрации 10^{-13} – 10^{-8} М вызывает дозозависимое увеличение ЧСС в онтогенезе.

Введение β,γ -метилен-АТФ 14-суточным крысам в концентрации 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-14} М было неэффективным. Внутривенное введение агониста в концентрации 10^{-13} М повышает ЧСС к 17 секунде эксперимента с $365\pm5,1$ уд/мин до $375\pm8,8$ уд/мин ($p<0,05$).

У 21-суточных крысят β,γ -метилен-АТФ в концентрации 10^{-11} М увеличивает ЧСС к 15 секунде после введения с $434\pm5,1$ уд/мин до $444\pm5,8$ уд/мин ($p<0,05$; рис. 10). Введение β,γ -метилен-АТФ в концентрации 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-9} М не вызывает изменений исследуемых параметров сердечной деятельности.

У 100- и 56-суточных крыс введение агониста в концентрации 10^{-8} М приводит к развитию положительного хронотропного эффекта с $373\pm8,3$ уд/мин до $385\pm7,3$ уд/мин и с $373\pm8,3$ уд/мин до $385\pm8,3$ уд/мин соответственно ($p<0,05$; рис.11).

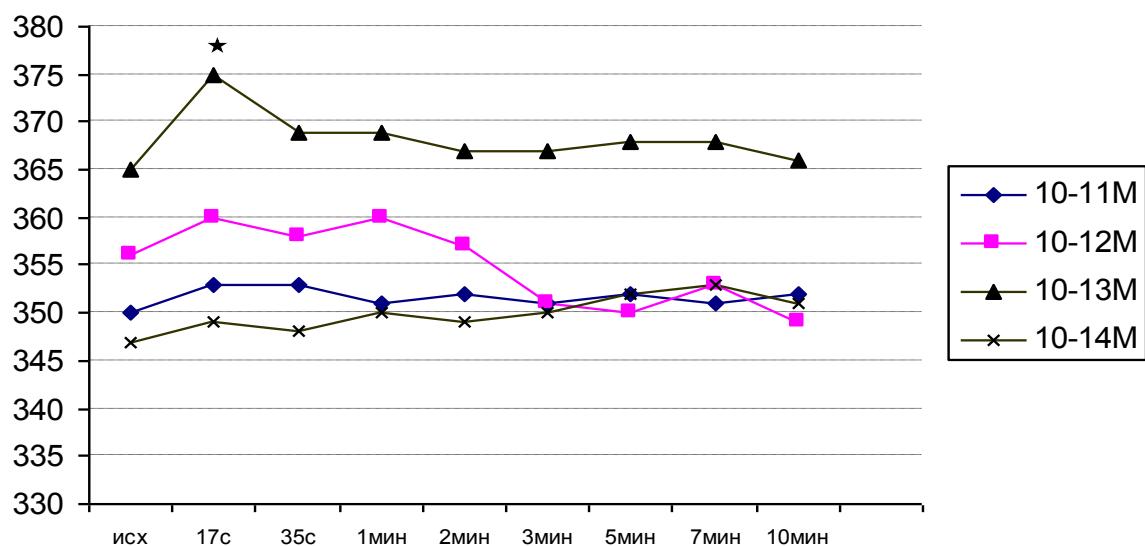
Повышение концентрации β,γ -метилен-АТФ у 100-суточных животных до 10^{-3} М вызывает отрицательный хронотропный эффект к 17 секунде после введения с $337\pm4,3$ уд/мин до $327\pm4,3$ уд/мин ($p<0,05$), который восстанавливается к 1 минуте эксперимента. Во многих тканях распад β,γ -метилен-АТФ до аденоzinового аналога происходит за 1 мин (Ralevic V. et al., 1998) и наблюдаемое снижение ЧСС вызвано активацией P1-рецепторов продуктами распада нестойкого аналога АТФ.

Агонист β,γ -метилен-АТФ в концентрации 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} М не оказывает влияния на показатели сердечной деятельности и параметры вариационной пульсограммы

у 100-суточных крыс. Повышение концентрации до 10^{-7} М и снижение до 10^{-9} М также не вызывает изменений деятельности сердца у 56-суточных крыс.

Полученные результаты подтверждают участие P2X₁-пуриноцепторов в положительном хронотропном эффекте на введение селективного агониста указанных рецепторов β,γ -метилен-АТФ. Увеличение концентрации агониста, вызывающего увеличение ЧСС, от 14- к 100-суточному возрасту указывает на высокую чувствительность сердца к агонисту P2X₁-рецепторов в раннем постнатальном онтогенезе.

А



Б

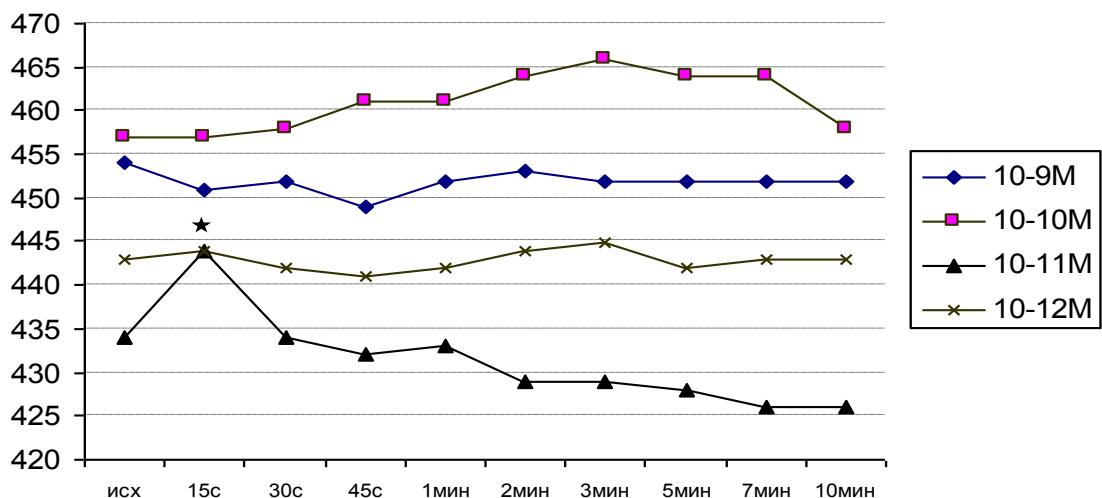
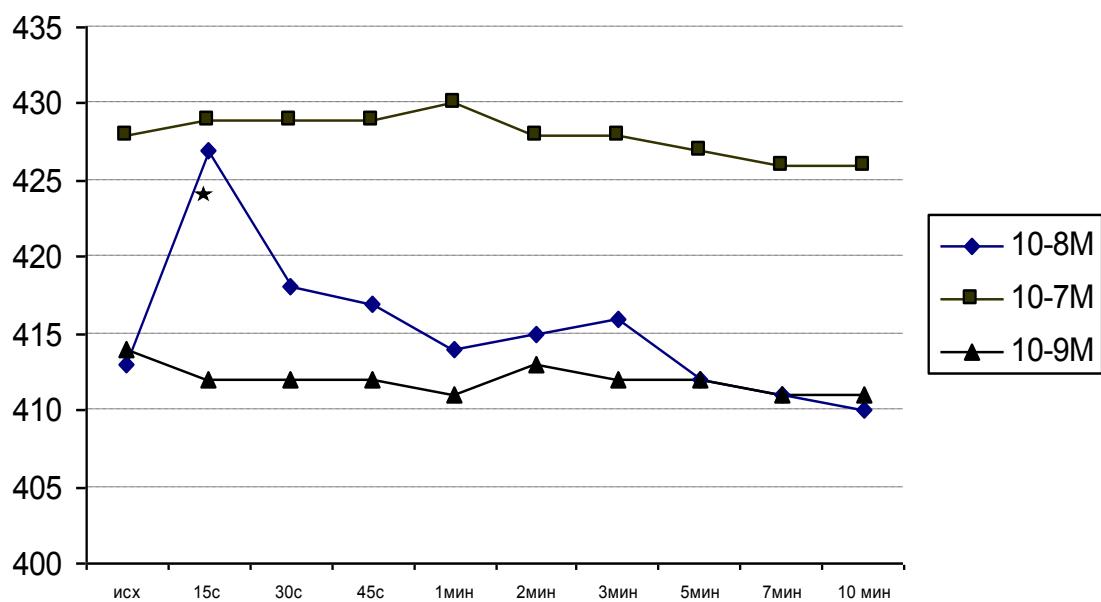


Рис. 10. Изменение частоты сердечных сокращений 14 (А) и 21-суточных крыс (Б) при внутривенном введении раствора различных концентраций β,γ -метилен АТФ.

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$

А



Б

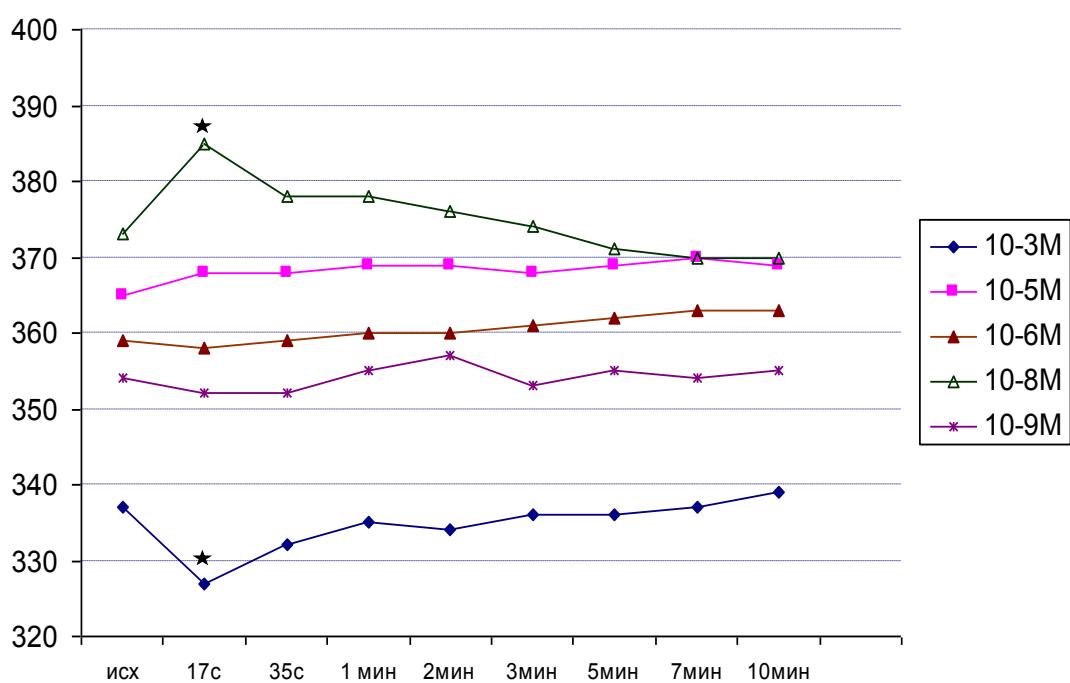


Рис. 11. Изменение частоты сердечных сокращений 56 (А) и 100-суточных крыс (Б) при внутривенном введении раствора различных концентраций β,γ -метилен АТФ.

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$

3.1.9. Совместное влияние α, β -метилен-АТФ, норадреналина и ацетилхолина

3.1.9.1. Влияние совместного введения норадреналина и α, β -метилен-АТФ на показатели сердечной деятельности крыс в онтогенезе

Введение раствора НА в концентрации 10^{-5} М 14-суточным крысятам увеличивает ЧСС к 1 мин с $363 \pm 3,1$ уд/мин до $380 \pm 3,1$ уд/мин ($p < 0,05$), УОК не изменяется (табл.5).

Совместное введение НА 10^{-5} М и α, β -метилен-АТФ 10^{-10} М животным данного возраста приводит к увеличению ЧСС к 2 мин с $363 \pm 6,6$ уд/мин до $425 \pm 9,7$ уд/мин ($p < 0,05$), изменений УОК не наблюдается (табл.6).

Введение НА в концентрации 10^{-5} М 21-суточным крысам увеличивает ЧСС к 45 секунде с $436 \pm 6,6$ уд/мин до $522 \pm 16,4$ уд/мин ($p < 0,005$). Показатель УОК повышается с 30 секунде с $0,0131 \pm 0,0003$ мл до $0,0147 \pm 0,0004$ ($p < 0,005$; табл.7).

Совместное введение НА 10^{-5} М и α, β -метилен-АТФ 10^{-7} М 21-суточным животным приводит к увеличению ЧСС на 45 секунде-1 минуте с $441 \pm 3,9$ уд/мин до $508 \pm 10,4$ уд/мин ($p < 0,005$). УОК максимально увеличивается к 15с $0,0141 \pm 0,0009$ мл до $0,00163 \pm 0,0009$ мл ($p < 0,005$; рис.12; табл. 8).

Введение НА 56-суточным крысам вызывает увеличение ЧСС к 45 секунде-1 минуте с $400 \pm 5,3$ уд/мин до $456 \pm 13,9$ уд/мин ($p < 0,005$). УОК увеличивается к 15-30 секунде с $0,0294 \pm 0,001$ мл до $0,0423 \pm 0,0007$ мл ($p < 0,005$; табл. 9).

Совместное введение НА 10^{-5} М и α, β -метилен-АТФ 10^{-4} М увеличивает ЧСС на 45 секунде-1 минуте с $412 \pm 8,4$ уд/мин до $485 \pm 19,5$ уд/мин ($p < 0,005$). УОК повышается с $0,0359 \pm 0,003$ мл до $0,0620 \pm 0,006$ мл ($p < 0,005$). Рис. 13; табл. 10.

Введение НА 100-суточным крысам также приводит к развитию положительного хронотропного эффекта. К 1 мин ЧСС увеличивается с $373 \pm 8,1$ уд/мин до $447 \pm 12,8$ уд/мин ($p < 0,005$). УОК повышается к 17-35с на 42% с $0,1520 \pm 0,007$ мл до $0,2157 \pm 0,01$ мл ($p < 0,005$).

Совместное введение НА 10^{-5} М и α, β -метилен-АТФ 10^{-4} М вызывает увеличение ЧСС на 7% к 1 мин после введения с $361 \pm 10,1$ уд/мин до $385 \pm 15,1$ уд/мин ($p < 0,05$), УОК достоверно не меняется (рис. 14; табл. 11, 12).

В наших экспериментах экзогенный НА оказывает разный эффект на частоту сердечных сокращений, ударный объем крови, что указывает на возрастные особенности функциональной активности адренорецепторов. По нашим данным хронотропная реакция сердца на введение НА меняется в постнатальном онтогенезе. У 14-сут. крысят ЧСС увеличивается на 5%, у 21-сут. на 21%, у 56 сут. на 14% и у 100-сут. на 20%. Таким образом, минимальная реакция ЧСС наблюдается у 14-сут. животных ($p < 0,05$), не

имеющих сформированной симпатической иннервации сердца и максимальная у 21- и 100-суточных животных. Следует отметить, что с 3 по 6 неделю происходит становление симпатической регуляции сердца (Rockson S.G. et al., 1981; Xiao R.P. et al., 1995) и в возрасте 3-4 недель у крыс зафиксировано первое и максимальное повышение частоты сердечных сокращений (Т.Л. Зефиров, Ф.Г. Ситдиков, 2005). По ранее полученным результатам происходит снижение чувствительности и повышение реактивности сердца в онтогенезе при введении экзогенного НА и его увеличение в миокарде (Ф.Г. Ситдиков и др., 1998).

Реакция УОК на введение НА также увеличивается от 14 к 100-суточному возрасту. У 14-сут. крысят достоверных изменений УОК не наблюдается, у 21-суточных реакция увеличивается на 12%, у 56-сут. на 47%, и у 100-сут. на 42%. На преобладание симпатических влияний в регуляции УОК у 21сут. и половозрелых крыс указывают и другие авторы (Абзалов Р.А., Нигматуллина Р.Р., 1991).

Совместное введение НА и α , β -метилен-АТФ 14-сут. крысят увеличивает ЧСС на 15% ($p<0,05$). У 21-сут. при совместном введение агонистов адрено- и пуринорецепторов ЧСС уменьшается на 4%, а 100-сут. на 13% ($p<0,005$). У 56-сут. совместное введение препаратов увеличивает ЧСС на 4%. У 14- и 21-суточных животных наблюдается удлинение латентного периода от момента совместного введения НА и α , β -метилен-АТФ до развития хронотропного эффекта.

Совместное введение НА и α , β -метилен-АТФ не изменяет УОК у 14-сут и 100-сут. животных. У 56-сут УОК при совместном введении агонистов увеличивается на 26%, а 21-сут на 4%.

Таким образом, совместное введение α , β -метилен-АТФ и норадреналина достоверно уменьшает хронотропный ответ у 100-суточных крыс на 13% ($p<0,05$), и увеличивает его у 14- суточных на 15% ($p<0,05$), по сравнению с введением норадреналина.

Таблица 5

Показатели сердечной деятельности 14-суточных крыс при введении норадреналина 10^{-5} М (n=9)

Показатели сердечной деятельности	Время								
	Исх.	17с	35с	1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин
ЧСС, уд/мин	363±3,1	366±3,1	374±3,2	380±3,1 *	376±2,3	374±1,9	370±1,7	370±2,8	369±3,2
УОК мл	0,0127± 0,0004	0,0123± 0,0005	0,0128± 0,001	0,0132± 0,0008	0,0128± 0,0006	0,0125± 0,0004	0,0124± 0,0004	0,0127± 0,0003	0,0124± 0,0003

Таблица 6

Показатели сердечной деятельности 14-суточных крыс при совместном введении норадреналина 10^{-5} М и α,β -метилен АТФ 10^{-10} М (n=7)

Показатели сердечной деятельности	время								
	исх	17с	35с	1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин
ЧСС, уд/мин	363±6,6	360±9,6	371±10,5	420±15,2 **	425±9,7 **	397±7,1	390±5,7	382±7,14	374±7,2
УОК мл	0,0116± 0,0004	0,0112± 0,001	0,0112± 0,0006	0,0110± 0,0005	0,0111± 0,0006	0,0110± 0,0005	0,0110± 0,0005	0,0111± 0,0006	0,0113± 0,0003

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$, ** $p<0,005$

Таблица 7

Показатели сердечной деятельности 21-суточных крыс при введении норадреналина 10^{-5} М (n=6)

Показатели сердечной деятельности	Время									
	Исх.	15с	30с	45с	1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин
ЧСС, уд/мин	436±6,6	429±5,8	475±14,2 **	522±16,4 **	507±16,8	489±18,3	473±15,7	462±14,9	453±12,9	444±10,0
УОК мл	0,0131± 0,0003	0,0143± 0,0004 **	0,0147± 0,0004 **	0,00139± 0,0005	0,0135± 0,0005	0,0134± 0,0005	0,0134± 0,0005	0,0132± 0,0004	0,0128± 0,0004	0,0130± 0,0005

Таблица 8

Показатели сердечной деятельности 21-суточных крыс при совместном введении норадреналина 10^{-5} М и α,β -метилен АТФ 10^{-7} М (n=6)

Показатели сердечной деятельности	Время									
	Исх.	15с	30с	45с - 1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин	
ЧСС, уд/мин	441±4,0	460±6,0	494±9,4	508±10,4 **	469±17,3	451±22,8	441±10,6	432±19,3	430±19,1	
УОК мл	исх	15с	30с	45с	1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин
	0,0141± 0,0009	0,0163± 0,0009 **	0,0158± 0,009	0,0153± 0,001	0,0152± 0,001	0,0148± 0,001	0,0148± 0,001	0,0146± 0,001	0,0144± 0,0009	0,0142± 0,0008

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением *p<0,05, ** p<0,005

Таблица 9

Показатели сердечной деятельности 56-суточных крыс при введении норадреналина 10^{-5} М (n=8)

Показатели сердечной деятельности	Время									
	Исх.	15с	30с	45с - 1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин	
ЧСС, уд/мин	400±5,3	385±7,4	410±9,5	456±13,9**	438±14,3	422±15,2	417±14,6	411±13,9	399±12,2	
УОК мл	исх	15с - 30с		45с	1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин
	0,0294±0,001	0,0423±0,007 **		0,0305±0,004	0,0264±0,003	0,0266±0,003	0,0258±0,002	0,0256±0,002	0,0263±0,002	0,0274±0,002

Таблица 10

Показатели сердечной деятельности 56-суточных крыс при совместном введении норадреналина 10^{-5} М и α,β -метилен АТФ 10^{-4} М (n=7)

Показатели сердечной деятельности	Время									
	Исх.	15с	30с	45с - 1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин	
ЧСС, уд/мин	412±8,4	409±9,6	431±10,2*	485±19,5**	463±18,0	459±16,1	452±17,3	444±17,2	431±14,0	
УОК мл	исх	15с-30с		45с	1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин
	0,0359±0,003	0,0620±0,006**		0,0405±0,006	0,0,0383±0,006	0,0335±0,003	0,0298±0,003	0,0294±0,002	0,0302±0,003	0,0309±0,003

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением * $p\leq 0,05$; ** $p\leq 0,005$.

Таблица 11

Показатели сердечной деятельности 100-суточных крыс при введении норадреналина 10^{-5} М (n=9)

Показатели сердечной деятельности	Время								
	Исх.	17с	35с	1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин
ЧСС, уд/мин	373±8,1	368±9,3	404±10,0**	447±13,8**	428±9,2	417±9,8	403±8,3	399±9,3	395±12,4
УОК мл	Исх.	17с - 35с		1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин
	0,1520±0,007	0,2157±0,01**		0,1351±0,01	0,1314±0,01	0,1354±0,01	0,1266±0,01	0,1259±0,01	0,1224±0,01

Таблица 12

Показатели сердечной деятельности 100-суточных крыс при совместном введении норадреналина 10^{-5} М и α,β -метилен АТФ 10^{-4} М (n=9)

Показатели сердечной деятельности	Время								
	Исх.	17с	35с	1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин
ЧСС, уд/мин	361±10,1	362±10,9	376±11,0*	385±15,1**	380±17,2	374±14,8	377±12,3	379±12,3	377±12,4
УОК мл	Исх.	17с	35с	1 мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин
	0,1550±0,009	0,1685±0,01	0,1669±0,01	0,1307±0,01	0,1319±0,01	0,1279±0,01	0,1245±0,01	0,1190±0,006	0,1177±0,006

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением * $p\leq 0,05$; ** $p\leq 0,005$.

ЧСС уд/мин

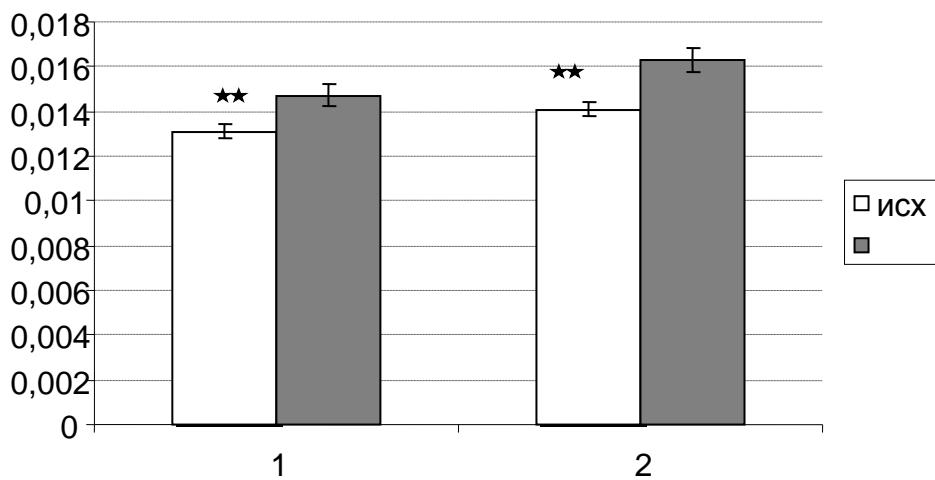
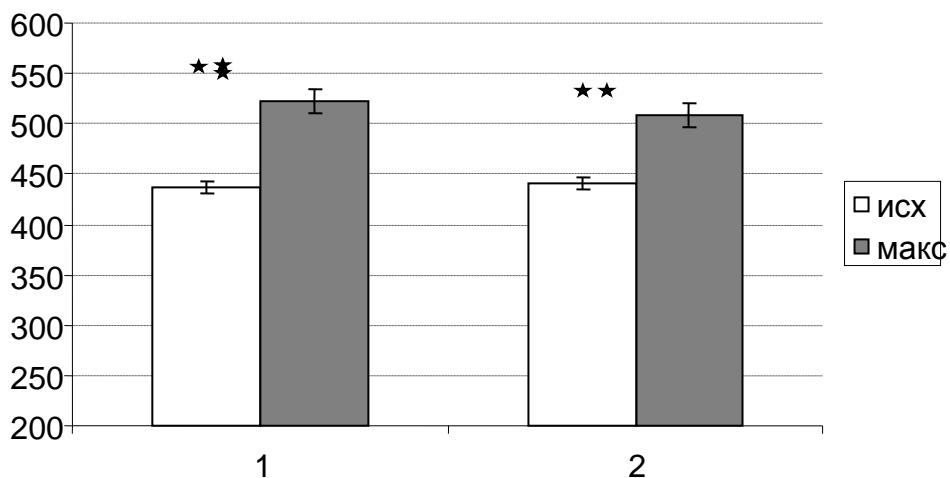
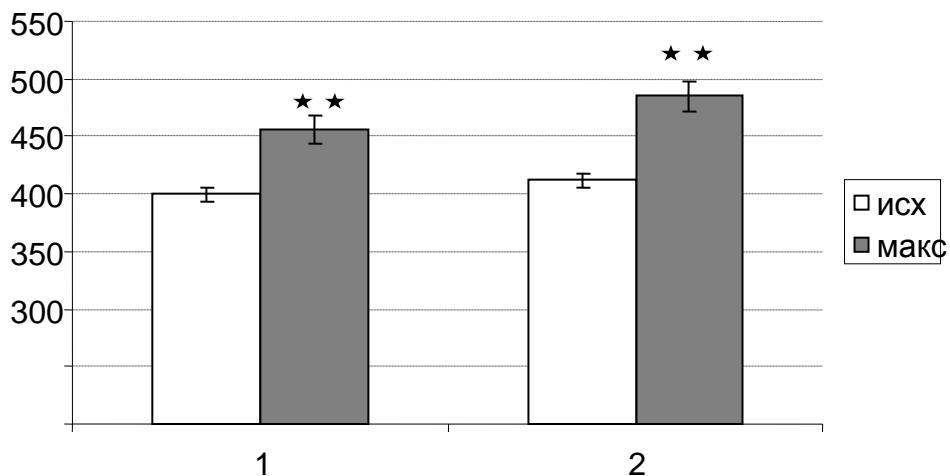


Рис. 12. Изменение ЧСС и УОК 21-суточных крыс при внутривенном введении растворов НА 10^{-5} М и НА с α,β -метилен АТФ 10^{-7} М.

Примечание: по оси абсцисс: 1 - введение НА 10^{-5} М, 2 – совместное введение НА 10^{-5} М и α,β -метилен АТФ 10^{-7} М; исх. – исходное значение, макс. - максимальное изменение параметра после введения веществ;

достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$, ** $p<0,005$

ЧСС уд/мин



ЧСС уд/мин

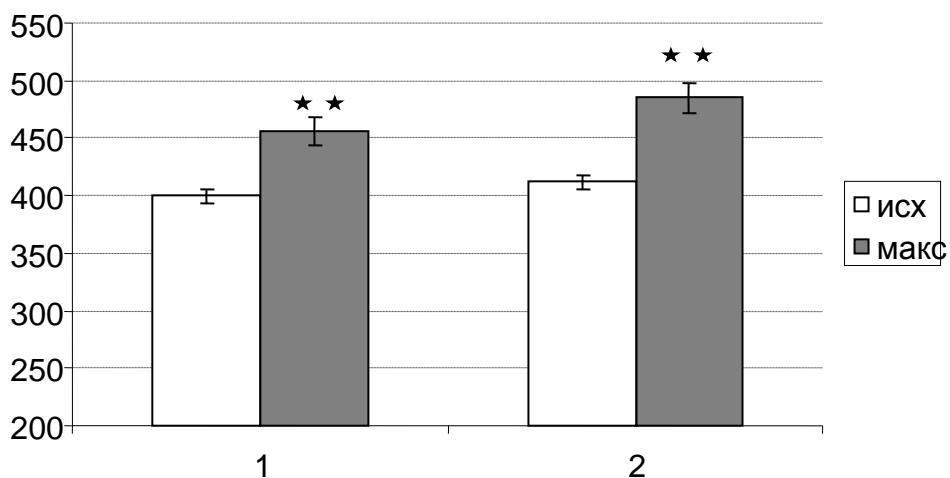
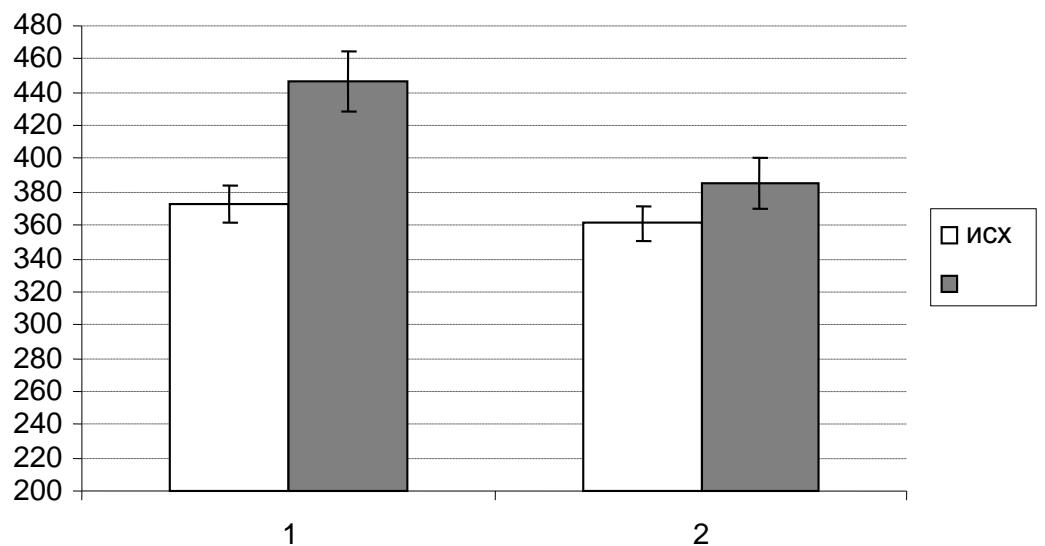


Рис. 13. Изменение ЧСС и УОК 56-суточных крыс при внутривенном введении растворов НА 10^{-5} М и НА с α,β -метилен АТФ 10^{-4} М.

Примечание: по оси абсцисс: 1- введение НА 10^{-5} М, 2 – совместное введение НА 10^{-5} М и α,β -метилен АТФ 10^{-4} М; исх – исходное значение, макс - максимальное изменение параметра после введения веществ;

достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$, ** $p<0,005$

ЧСС уд/мин



УОК мл

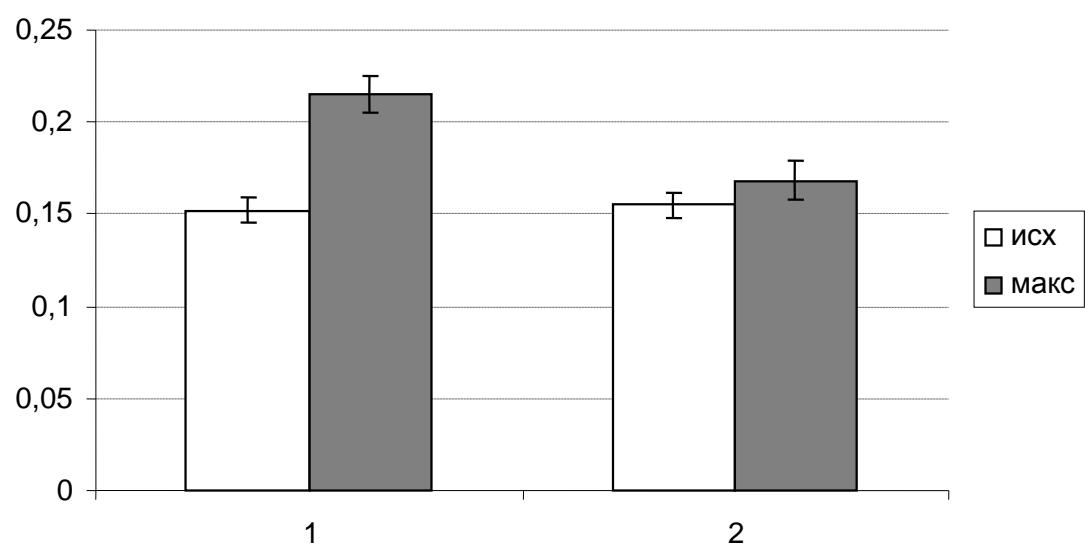


Рис. 14. Изменение показателей сердечной деятельности 100-суточных крыс при внутривенном введении растворов НА 10^{-5} М и НА с α,β -метилен АТФ 10^{-4} М.

Примечание: по оси абсцисс: 1- введение НА 10^{-5} М, 2 – совместное введение НА 10^{-5} М и α,β -метилен АТФ 10^{-4} М; исх. – исходное значение, макс - максимальное изменение параметра после введения веществ;

достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$, ** $p<0,005$

3.1.9.2. Влияние совместного введения ацетилхолина и α, β-метилен-АТФ на показатели деятельности сердца крыс в постнатальном онтогенезе

Агонист холинорецепторов ацетилхолин вводили в яремную вену в концентрации 10^{-4} М (Р. Гильмутдинова, 1991). АХ является не стойким веществом и быстро разрушается холинэстеразой плазмы крови. Поэтому предварительно вводили прозерин, блокирующий холинэстеразу. В качестве контроля вводили физиологический раствор, который не изменял регистрируемых показателей сердечной деятельности.

Введение АХ 10^{-4} М 14-сут. крысятам приводит к возникновению положительного хронотропного эффекта, ЧСС увеличивается с $358 \pm 4,4$ уд/мин до $385 \pm 6,2$ уд/мин ($p < 0,005$). УОК снижается на 12% (Табл. 13). Совместное введение АХ и α, β-метилен-АТФ вызывает лишь небольшое увеличение ЧСС с $346 \pm 5,7$ уд/мин до $360 \pm 8,9$ уд/мин. УОК снижается на 17%. (Рис. 18).

Введение АХ 21-сут крысам снижает ЧСС с $456 \pm 7,0$ уд/мин до $402 \pm 10,2$ уд/мин ($p < 0,005$). УОК снижается на 16% с $0,0143 \pm 0,0007$ до $0,0121 \pm 0,0008$ мл (Табл. 14). Совместное введение АХ и α, β-метилен-АТФ уменьшает ЧСС с $458 \pm 5,4$ уд/мин до $441 \pm 7,3$ уд/мин ($p < 0,05$), УОК не изменяются (Рис. 19).

Внутривенное введение АХ 56-суточным крысам снижает ЧСС с $421 \pm 9,3$ до $404 \pm 10,4$ уд/мин ($p < 0,05$). УОК уменьшается на 18% с $0,0597 \pm 0,003$ мл до $0,0492 \pm 0,003$ ($p < 0,005$) (Табл. 17). Совместное введение АХ и α, β-метилен-АТФ приводит к увеличению ЧСС с $415 \pm 12,1$ до $436 \pm 11,6$ уд/мин ($p < 0,05$) и снижению УОК на 13% ($p < 0,05$) (Рис. 20).

Введение АХ 100-суточным крысам снижает ЧСС с $366 \pm 7,0$ до $346 \pm 6,8$ уд/мин ($p < 0,05$) (табл.19). УОК снижается на 13%. ($p < 0,05$). Совместное введение АХ и α, β-метилен-АТФ уменьшает ЧСС с $341 \pm 4,4$ до $295 \pm 9,2$ уд/мин ($p < 0,05$). УОК увеличивается на 17% ($p < 0,05$). (Рис. 21).

В наших экспериментах АХ оказывает разное влияние на реакцию ЧСС и УОК в онтогенезе. Так у 14-суточных крысят АХ увеличивает ЧСС на 8%. Максимальная реакция ЧСС на введение АХ наблюдается у 21-сут. и составляет 12%, затем снижается и у 56- и 100-сут животных составляет 4% и 5% соответственно. Следовательно, реакция М-холинорецепторов, определяющая хронотропную функцию сердца, снижается от 14 - к 100-суточному возрасту. На показатели УОК АХ оказывает однонаправленное влияние: у 14сут. снижается на 12%, к 21-сут. – на 16%, у 56 сут. – на 18% и у 100-сут. на 13%.

Совместное введение АХ и α, β –метилен-АТФ уменьшает положительный хронотропный эффект у 14-суточных крысят на 4% и отрицательный хронотропный эффект на 8% у 21-суточных крысят. У 100-суточных животных совместное действие агонистов увеличивает эффект АХ на 8%

($p<0,05$). У 56-суточных при совместном действии агонистов отрицательный хронотропный эффект АХ меняется на положительный: с -5% на +4% ($p<0,05$).

Следовательно, у 21-суточных крысят при высокой чувствительности и функциональной активности P2X-рецепторов совместное введение АХ и α, β -метилен-АТФ приводит к появлению кардиотропного эффекта АТФ, ингибирующий эффект ацетилхолина уменьшается. У 56-суточных при совместном действии агонистов отрицательный хронотропный эффект АХ меняется на положительный ($p<0,05$). У 100-суточных животных совместное действие агонистов усиливает хронотропный эффект АХ и значительно повышает УОК ($p<0,05$).

Таблица 13

Показатели сердечной деятельности 14-суточных крыс при введении ацетилхолина 10^{-4} М (n=7)

Показ.сердечной деятельности	время								
	исх	17с	35с	1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин
ЧСС, уд/мин	358±4,4	385±6,2 **	377±3,3	363±4,6	359±5,3	359±4,7	358±4,7	358±4,5	358±4,1
УОК мл	исх	17с - 35с		1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин
	0,0139± 0,0009	0,0123±0,0008 *		0,0132± 0,0007	0,0139± 0,001	0,0151± 0,001	0,0143± 0,0007	0,0142± 0,0007	0,0139± 0,0006

Таблица 14

Показатели сердечной деятельности 14-суточных крыс при совместном введении ацетилхолина 10^{-4} М и α,β -метилен АТФ 10^{-10} М (n=7)

Показатели сердечной деятельности	время								
	исх	17с	35с	1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин
ЧСС, уд/мин	346±5,7	358±7,7	360±8,9	357±11,9	355±7,4	354±7,8	353±9,5	350±9,8	350±9,2
УОК мл	0,0121± 0,0004	0,0108± 0,0004 *	0,0115± 0,0003	0,0119± 0,0005	0,0119± 0,0006	0,0123 0,0004	0,0120± 0,0003	0,0116± 0,0002	0,0116± 0,0003

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением *p<0,05, ** p<0,005

Таблица 15

Показатели сердечной деятельности 21-суточных крыс при введении ацетилхолина 10^{-4} М (n=7)

Показатели сердечной деятельности	время									
	исх	15с	30с	45с	1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин
ЧСС, уд/мин	456±7,0	402±10,2 **	415±10,2	428±8,5	442±9,4	446±7,0	446±5,6	450±5,5	452±6,1	456±6,5
УОК мл	0,0143± 0,0007	0,0121± 0,0008 *	0,0147± 0,001	0,00144± 0,001	0,0145± 0,0008	0,0149± 0,0009	0,0154± 0,001	0,0150± 0,001	0,0149± 0,001	0,0147± 0,0009

Таблица 16

Показатели сердечной деятельности 21-суточных крыс при совместном введении ацетилхолина 10^{-4} М и α,β -метилен АТФ 10^{-7} М (n=7)

Показатели сердечной деятельности	время									
	исх	15с	30с	45с	1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин
ЧСС, уд/мин	458±5,4	441±7,3 *	448±7,2	451±6,3	461±7,8	454±10,1	460±6,0	457±3,6	455±3,5	456±3,7
УОК мл	0,0145± 0,0008	0,0141± 0,0008	0,0148± 0,0009	0,0150± 0,001	0,0150± 0,001	0,0152± 0,001	0,0149 0,001	0,0148± 0,001	0,0146± 0,001	0,0144± 0,003

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$, ** $p<0,005$

Таблица 17

Показатели сердечной деятельности 56-суточных крыс при введении ацетилхолина 10^{-4} М (n=7)

Показ.сердечной деятельности	время									
	исх	15с	30с	45с	1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин
ЧСС, уд/мин	421±9,3	404±10,4 *	427±14,4	416±9,4	419±8,9	419±9,5	420±9,6	424±10,7	423±10,3	425±10,7
УОК мл	0,0597± 0,003	0,0492± 0,003 **	0,0559± 0,003	0,0524± 0,003	0,0492± 0,003	0,0545± 0,003	0,0548± 0,004	0,0551± 0,005	0,0567± 0,004	0,0539± 0,003

Таблица 18

Показатели сердечной деятельности 56-суточных крыс при совместном введении ацетилхолина 10^{-4} М и α,β -метилен АТФ 10^{-4} М (n=6)

Показ.сердечной деятельности	время									
	исх	15с - 30с	45с	1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин	
ЧСС, уд/мин	415±12,1	436±11,5 *	418±14,8	413±16,3	407±16,7	410±13,0	410±14,9	417±14,6	408±14,5	
УОК мл	0,0557± 0,002	0,0486±0,002 *	0,0570± 0,004	0,0557± 0,002	0,0539± 0,003	0,0512± 0,002	0,0510± 0,001	0,0523± 0,002	0,0528± 0,002	

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением *p<0,05, ** p<0,005

Таблица 19

Показатели сердечной деятельности 100-суточных крыс при введении ацетилхолина 10^{-4} М (n=7)

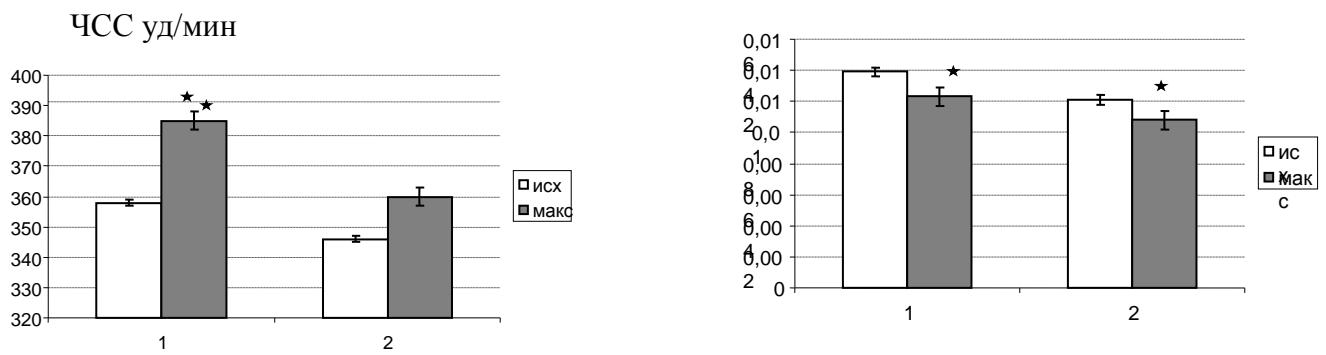
Показатели сердечной деятельности	время								
	исх	17с	35с	1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин
ЧСС, уд/мин	366±7,0	346±6,8 *	365±9,5	359±7,7	358±8,4	360±9,3	361±10,4	363±12,6	360±11,6
УОК мл	0,0993± 0,006	0,0860 ± 0,006 **	0,0969± 0,013	0,1054± 0,009	0,1105± 0,01	0,1048± 0,009	0,1057± 0,009	0,1075± 0,009	0,1088± 0,009

Таблица 20

Показатели сердечной деятельности 100-суточных крыс при совместном введении ацетилхолина 10^{-4} М и α,β -метилен АТФ 10^{-4} М (n=7)

Показ.сердечной деятельности	время								
	исх	17с	35с	1мин	2мин	3мин	5мин	7мин	10мин
ЧСС, уд/мин	341±4,4	295±9,2 *	306±9,5	317±10,5	321±9,8	324±8,1	330±4,8	333±4,8	334±5,3
УОК мл	0,1004± 0,004	0,1178± 0,004 *	0,1034± 0,008	0,1082± 0,009	0,1027± 0,006	0,1057± 0,006	0,1099± 0,006	0,1124± 0,005	0,1104± 0,006

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$, ** $p<0,005$



УОК мл

Рис. 18. Изменение показателей сердечной деятельности 14-суточных крыс при внутривенном введении растворов AX 10^{-4} М и AX с α,β -метилен АТФ 10^{-10} М.

Примечание: по оси абсцисс: 1- введение AX 10^{-4} М, 2 – совместное введение AX 10^{-4} М и α,β -метилен АТФ 10^{-10} М; исх. – исходное значение, макс - максимальное изменение параметра после введения веществ; достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$, ** $p<0,005$

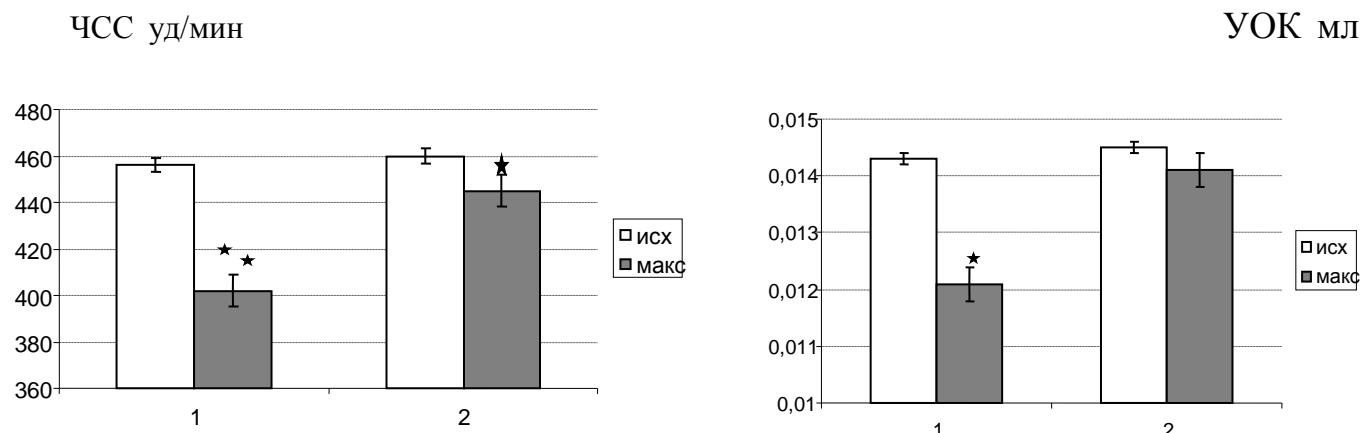
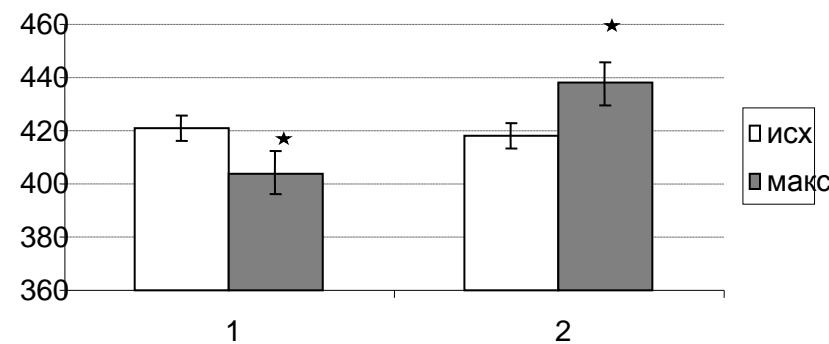


Рис. 19. Изменение показателей сердечной деятельности 21-суточных крыс при внутривенном введении растворов AX 10^{-4} М и AX с α,β -метилен АТФ 10^{-7} М.

Примечание: по оси абсцисс: 1- введение AX 10^{-4} М, 2 – совместное введение AX 10^{-4} М и α,β -метилен АТФ 10^{-7} М; исх. – исходное значение, макс - максимальное изменение параметра после введения веществ;

достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$, ** $p<0,005$

ЧСС уд/мин



УОК мл

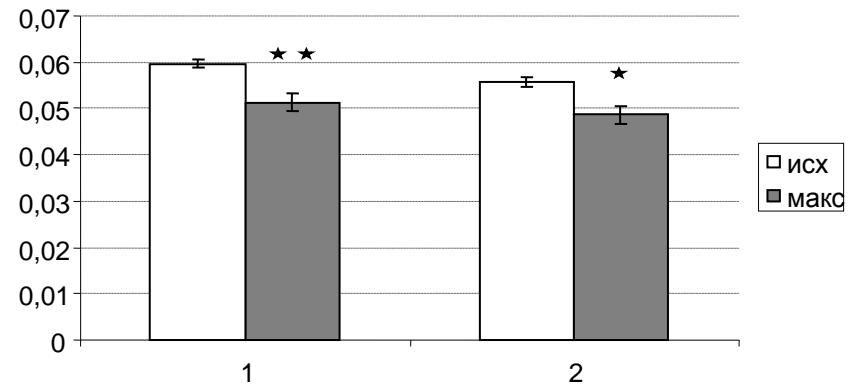
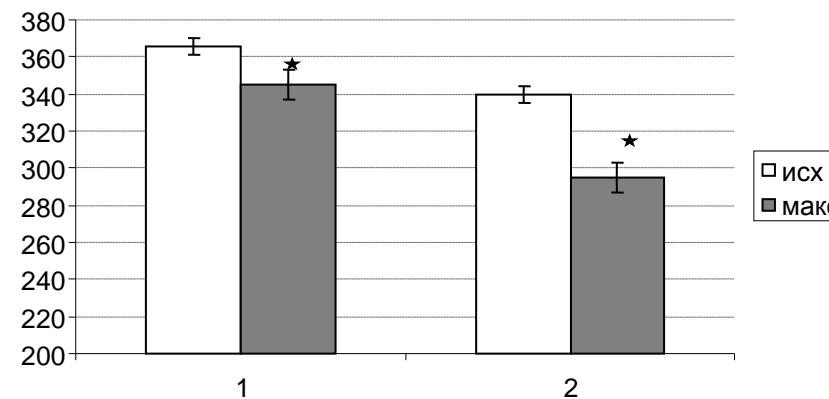


Рис. 20. Изменение показателей сердечной деятельности 56-суточных крыс при внутривенном введении растворов AX 10^{-4} М и AX с α,β -метилен АТФ 10^{-4} М.

ЧСС уд/мин



УОК мл

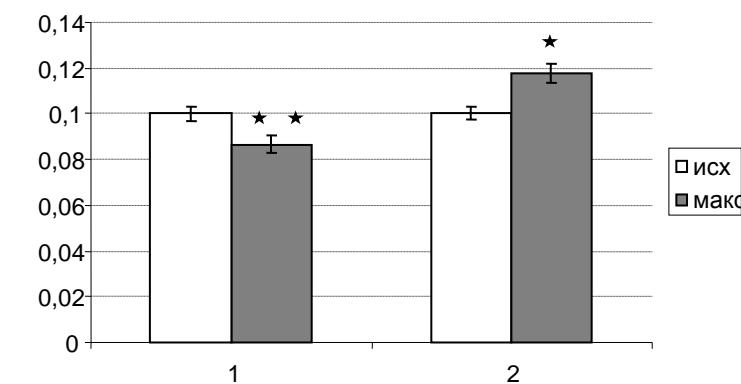


Рис. 21. Изменение показателей сердечной деятельности 100-суточных крыс при внутривенном введении растворов AX 10^{-4} М и AX с α,β -метилен АТФ 10^{-4} М. Примечание: по оси абсцисс: 1- введение AX 10^{-4} М, 2 – совместное введение AX 10^{-4} М и α,β -метилен АТФ 10^{-4} М; исх – исходное значение, макс - максимальное изменение параметра после введения веществ; достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$, ** $p<0,005$

3.2. Влияние АТФ и ее аналогов на сократимость миокарда крыс в постнатальном онтогенезе

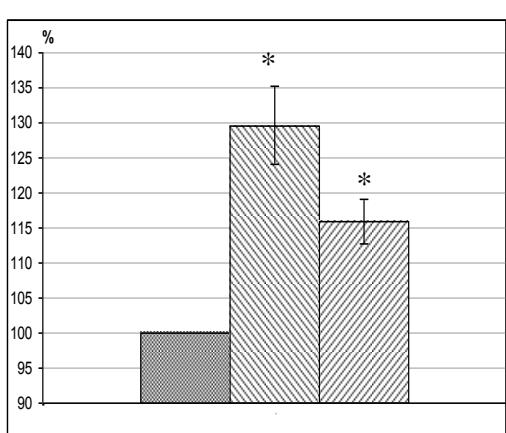
У каждого подтипа P2-рецепторов существуют наиболее и наименее чувствительные к нему агонисты, поэтому, определив чувствительность ткани к ряду агонистов, можно сделать предположение о наличии тех или иных подтипов P2-рецепторов в миокарде и их селективной чувствительности к агонистам. Известно, что АТФ и 2-метилтио-АТФ являются агонистами всех подтипов P2-рецепторов. Однако действие АТФ как агониста P2-рецепторов очень кратковременно вследствие быстрого разрушения внеклеточными нуклеотидазами. АТФ в концентрации 10^{-8}M – 10^{-4}M вызывает дозозависимое сокращение полосок желудочков миокарда (Рис. 23).

У 14-суточных крыс максимальный сократительный эффект препаратов желудочков наблюдался при действии АТФ в концентрации 10^{-7}M . Сила сокращения желудочков увеличивается на $14,9\pm2,27\%$ ($p<0,01$; $n=10$). У 21-дневных крыс АТФ в концентрации 10^{-6}M увеличивает силу сокращения желудочков на $15,5\pm5,2\%$ ($p<0,05$; $n=10$) и в концентрации 10^{-7}M на $31,4\pm3,6\%$ ($p<0,01$; $n=10$).

У 56 - и 100- дневных крыс максимальный сократительный эффект наблюдался при действии АТФ в концентрации на порядок ниже - 10^{-6}M . Увеличение силы сокращения полосок желудочков составило $25,6\pm7,8\%$ и $32,8\pm6,5\%$ соответственно ($p<0,01$; $n=7$). При этом длительность сокращения снижалась на $17,2\pm2,2\%$ у 21-дневных ($p<0,01$), 7-10% у 56 и 14-суточных и не изменялась у 100-суточных крыс.

Увеличение концентрации АТФ угнетает сократимость полосок миокарда (Рис. 22). Так, АТФ в концентрации 10^{-5}M у 100-суточных крыс вызывает двухфазный эффект: сначала сила сокращения полосок миокарда желудочков повышается на $29,6\pm5,6\%$, а к 12 минуте снижается на $16\pm3,2\%$ ($n=10$). АТФ в концентрации 10^{-4}M уменьшает силу сокращения препаратов миокарда на $15,2\pm3,8\%$ ($p<0,01$; $n=7$). У 56-суточных крыс АТФ в концентрации 10^{-5}M и 10^{-4}M вызывает только снижение силы сокращения миокарда желудочков на $34,6\pm4,4\%$ и $19,5\pm3,4\%$ соответственно ($p<0,01$) и длительность сокращения на $10\pm1,9\%$ ($n=10$). У 21- и 14-дневных животных АТФ в концентрации 10^{-6}M и 10^{-8}M незначительно уменьшает или увеличивает силу сокращения желудочков (Табл. 29).

А



Б

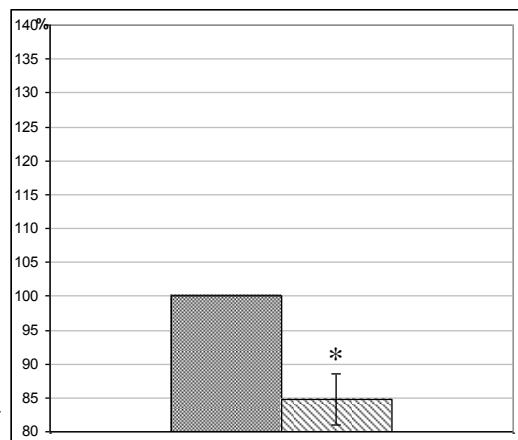


Рис. 22. Изменение сократимости миокарда желудочков крыс 100 суточного возраста на добавление АТФ 10^{-5} М (А) и 10^{-4} (Б)

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$

3.2.2. Влияние АТФ на фоне неселективной блокады Р1-рецепторов

Чем же вызван отрицательный эффект высоких концентраций АТФ на сократимость миокарда? При заболеваниях сердечно-сосудистой системы применение АТФ связывают с его распадом до аденоцина, который оказывает отрицательное хронотропное и инотропное действие (В.В. Елисеев, 2001). Известно, что АТФ является не стойким веществом, в течение короткого времени под действием экто- АТФазы гидролизуется до аденоцина, который оказывает эффект через свои собственные Р1-пуринорецепторы. Однако, существует ряд экспериментальных доказательств прямого действия АТФ на сердце через свои собственные Р2-рецепторы, независимо от его превращения в аденоцин. Было показано, что при блокаде Р1-рецепторов экзогенная АТФ вызывает положительный инотропный эффект левых предсердий морских свинок, который, вероятно определяется активацией Р2Y-рецепторов (A.Rubino et al., 1992).

Известно, что аденоцин действует как ингибитор функциональной активности клеток, в которых он образуется. Образование аденоцина свидетельствует о возникновении дисбаланса между потребностями ткани в кислороде и его поступлении. С другой стороны аденоцин стимулирует реакцию организма на восстановление кислорода и выходу организма из состояния гипоксии за счет вазодилатации, отрицательному хроно- и дромотропному действию. Аденоцин является модулятором потребности и расхода энергии, действующим по принципу обратной связи (В.Елисеев, 2000).

Таким образом, получены весьма противоречивые результаты о действии АТФ и аденоцина на сердце. Поэтому в следующей серии экспериментов изучалось влияние АТФ на сократимость полосок миокарда на фоне неселективного блокатора Р1-пуринорецепторов 8-фенилтеофелина.

Для блокады P1-рецепторов использовали 8-фенилтеофелин в концентрации 10^{-3} М (Rubino et al., 1992).

На фоне блокады P1-рецепторов 8-фенилтеофелином АТФ в концентрации 10^{-6} М увеличивает силу сокращения полосок желудочков у 100- и 56-суточных крыс на $32,8 \pm 1,4\%$ ($p < 0,01$; $n=5$) и $20,7 \pm 3,7\%$ ($p < 0,01$; $n=5$) соответственно, то есть эффект АТФ сохраняется (рис. 1Б). У животных этого же возраста АТФ в концентрации 10^{-5} М и 10^{-4} М при блокаде P1-рецепторов отрицательный инотропный эффект меняет на положительный ($11,4 \pm 2,55\%$, $n=6$ и $11,6 \pm 2,16\%$, $n=6$). У 14-суточных крыс при блокаде P1-рецепторов АТФ 10^{-7} М увеличивает силу сокращения препаратов желудочков до $12,3 \pm 1,87\%$ ($p < 0,05$; $n=10$), эффект АТФ также сохраняется. Следовательно, экзогенная АТФ вызывает положительный инотропный эффект миокарда желудочков за счет активации P2-пуринорецепторов. При блокаде P1-рецепторов отрицательный инотропный эффект вызванный АТФ 10^{-5} М и 10^{-4} М не сохраняется (Рис. 24). Функциональная активность P1-рецепторов в большей степени проявляется у 100-суточных крыс. Наблюдается гетерохронность созревания P1 и P2-рецепторов миокарда в онтогенезе, которая осуществляется на основе реорганизации структурных элементов.

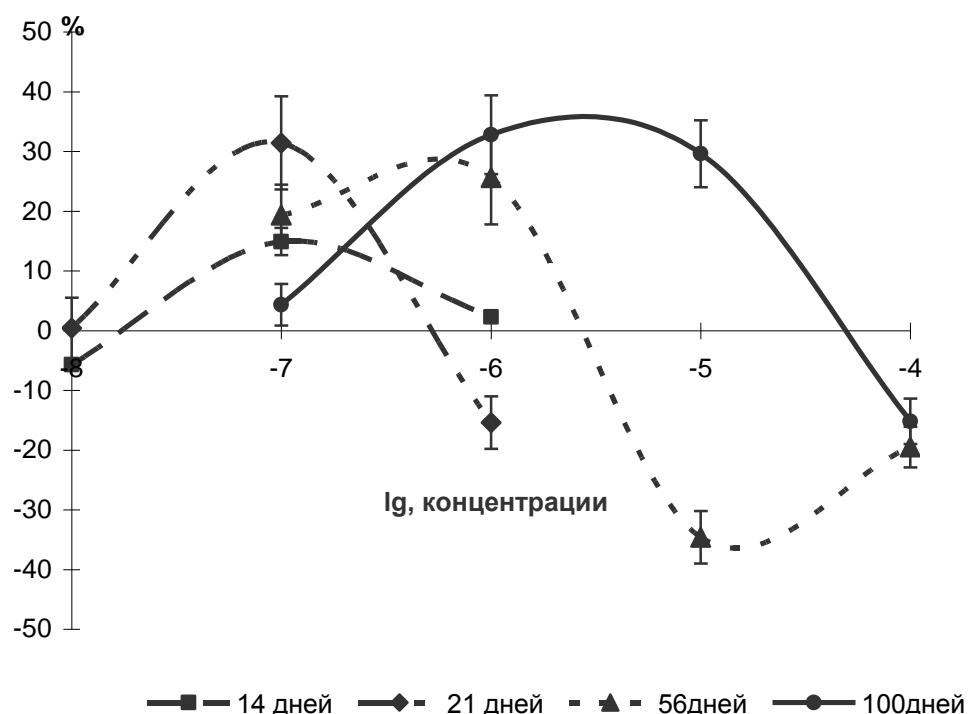


Рис. 23. Влияние АТФ на сократимость миокарда желудочков растущих крыс

Примечание: * - достоверность по сравнению с исходным значением: $p < 0,05$

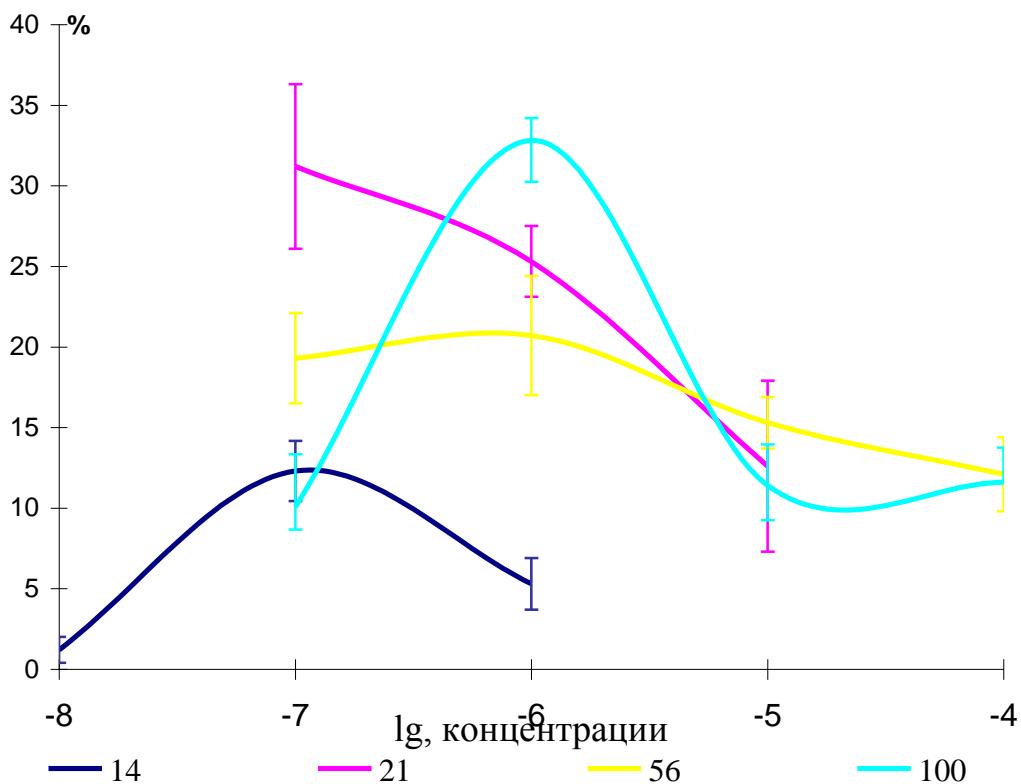


Рис. 24. Влияние АТФ на сократимость полосок желудочков миокарда крыс после блокады Р1 пуринорецепторов 8-фенилтеофелином.

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$

3.2.3. Влияние 2-метилтио-АТФ на сократимость миокарда крыс в онтогенезе

В некоторых экспериментах на изолированных органах и тканях АТФ не является самым эффективным агонистом. Агонист Р2-рецепторов – 2-метилтио-АТФ является стойким аналогом АТФ и агонистом как Р2Х так и Р2Y1-рецепторов сердца (Vassort G., 2001).

Аналог АТФ 2-метилтио-АТФ 10^{-6} М– 10^{-10} М вызывает дозозависимое сокращение полосок миокарда предсердий и желудочков (рис. 25). У 14-суточных крысят 2-метилтио-АТФ в концентрации 10^{-8} М вызывает больший эффект чем АТФ, увеличивая силу сокращения полосок предсердий на $15,4 \pm 2,06\%$ ($p<0,01$, $n=10$) и полосок желудочков до $25,8 \pm 6,1\%$ ($p<0,01$; $n=10$). У 21-дневных агонист в концентрации 10^{-7} М увеличивает силу сокращения предсердий и желудочков приблизительно на $31,3 \pm 5,8\%$ ($p<0,01$; $n=10$). У 56-суточных сила сокращения миокарда предсердий и желудочков возрастает на $11,6 \pm 0,6\%$ ($p<0,05$, $n=10$) и $13,3 \pm 0,89\%$ ($p<0,05$; $n=10$). Максимальный сократительный эффект наблюдается при действии 2-метилтио-АТФ в концентрации 10^{-9} М.

У 100-суточных крыс этот агонист вызывает достоверно меньшие изменения сокращения полосок миокарда, чем АТФ ($p<0.05$). Увеличение силы сокращения миокарда на 2-метилтио-АТФ в концентрации 10^{-6} М и 10^{-5} М у 100-суточных крыс составило всего $6,5\pm0,23\%$ ($n=10$). Длительность сокращения также достоверно не изменяется. У 100-суточных животных 2-метилтио-АТФ в концентрации 10^{-5} М и 10^{-8} М вызывает незначительное уменьшение силы сокращения желудочков на $4,5\pm0,3\%$ и $2,8\pm0,2\%$ ($n=10$), а также недостоверные изменения в сокращении предсердий. У 14-, 56- и 100-суточных крысят высокие и низкие концентрации 2-метилтио-АТФ также вызывают недостоверные изменения в силе и длительности сокращения полосок предсердий и желудочков.

Реакция сократимости миокарда предсердий и желудочков при действии 2-метилтио-АТФ снижается от 21 к 100-суточному возрасту. У 14-суточных крысят присутствует высокая чувствительность и реакция Р2-рецепторов на агонист.

В настоящем исследовании установлено, что агонисты Р2-рецепторов АТФ и 2-метилтио-АТФ вызывают дозозависимое увеличение сократимости миокарда предсердий и желудочков 14-100 суточных крыс. Определение дозозависимого эффекта у 100-суточных крыс показало, что увеличение сократимости миокарда вызываются АТФ в концентрации 10^{-6} М, тогда как 2-метилтио-АТФ достоверных изменений в исследуемых концентрациях не вызывает. У 56-суточных крыс АТФ увеличивает сократимость в концентрации 10^{-6} М, а 2-метилтио-АТФ в концентрации 10^{-9} М. У 14-суточных наиболее эффективными оказались концентрации АТФ 10^{-7} М и 2-метилтио-АТФ в концентрации 10^{-8} М. Таким образом, повышение концентрации агонистов при увеличении возраста крыс указывает на высокую чувствительность миокарда к агонистам Р2-рецепторов в раннем постнатальном онтогенезе. Эффективность влияния агонистов АТФ и 2-метилтио-АТФ на сократимость миокарда зависит от возраста. У 100-суточных крыс АТФ>>2-метилтио-АТФ. У 56- и 14-суточных АТФ=2-метилтио-АТФ.

Чувствительность Р2-пуринарепторов миокарда определяли величиной пороговой дозы действующего вещества, вызывающего эффект. Изменение чувствительности миокарда зависит от состояния мембранных рецепторов кардиомиоцитов и концентрации агониста в тканевой жидкости. Повышение чувствительности органа к вводимому веществу может быть вызвано повышением количества этого вещества и достаточно небольших его доз для того, чтобы создать нужную концентрацию и вызвать пороговую реакцию.

Реакция сократимости миокарда предсердий и желудочков 21-сут. крысят достоверно выше, чем у 56- и 100-суточных, что свидетельствует об уменьшении функциональной активности Р2-рецепторов от 14-к 100-сут. возрасту.

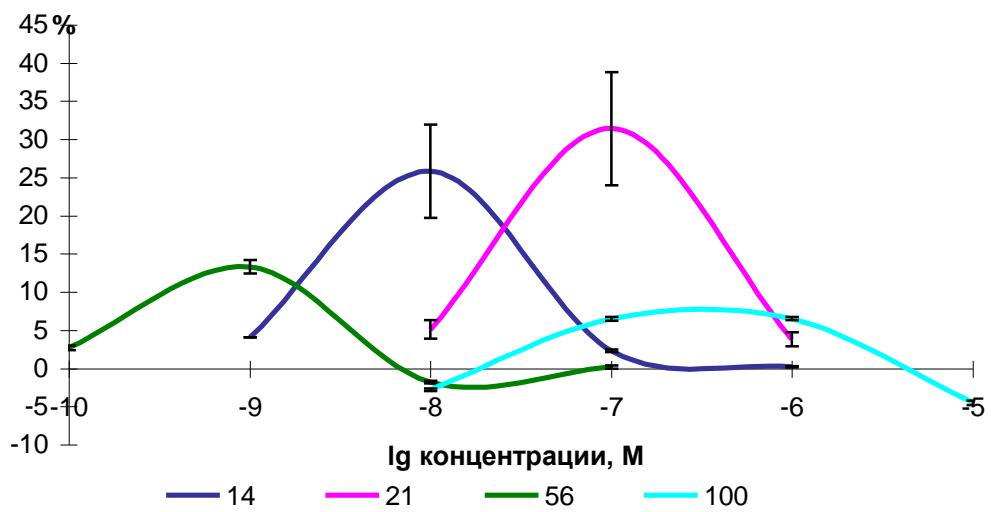
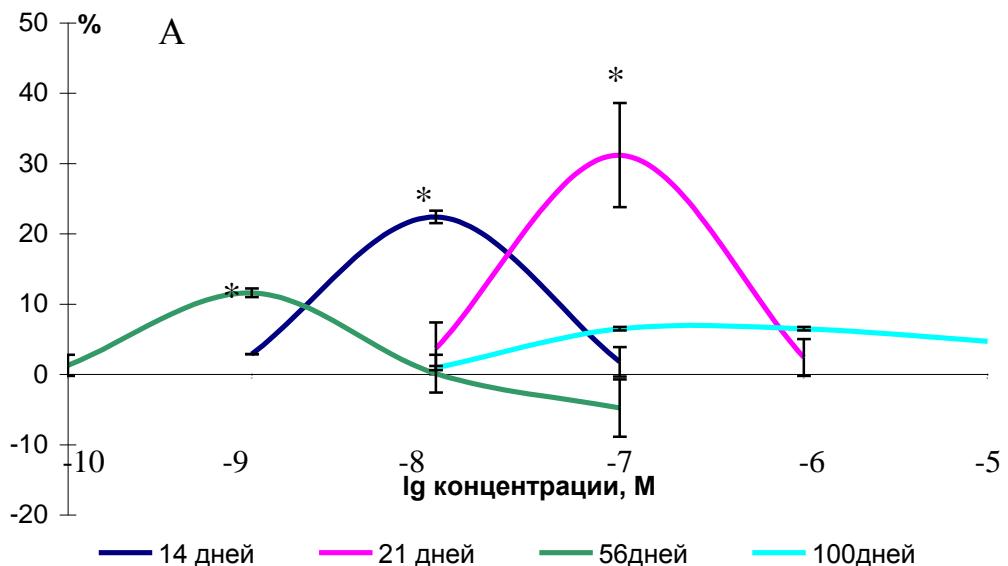


Рис. 25 Влияние 2-метилтио-АТФ на силу сокращений миокарда предсердий (А) и желудочков (Б) сердца крыс.

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$

3.2.4. Влияние 2-метилтиоАТФ на сократимость миокарда крыс в раннем постнатальном онтогенезе при блокаде P2X-рецепторов

Для определения семейства P2-рецепторов, участвующих в положительном сократительном эффекте, использовали селективные блокаторы P2X и P2Y-рецепторов. В этой серии экспериментов на фоне антагонистов исследовали влияние наиболее эффективных концентраций 2-метилтиоАТФ. Для 14-суточных крысят это 10^{-8} М, $21\text{-}10^{-7}$ М, $56\text{-}10^{-9}$ М, $100\text{-}10^{-6}$ М.

Одним из наиболее широко используемых препаратов в качестве антагониста P2-рецепторов является PPADS, который имеет выраженное блокирующее действие по отношению к P2X₁-, P2X₂, P2X₅-рецепторам сердца, не влияя на эффекты, опосредуемые P2X₄-, P2X₆- и P2Y₁-рецепторами сердца (G. Vassort, 2001; Burnstock, 2006). Отличительная особенность P2X₄-рецепторов - их нечувствительность к ныне используемым блокаторам P2-рецепторов сурамину, PPADS и реактиву голубому- 2 (Vassort 2001). Стойкий блокирующий эффект на P2X-рецепторы сердца PPADS оказывает в концентрации 30 микроМ (A. Rubino, 1992). Нет однозначного ответа о выраженности блокирующего эффекта PPADS по отношению к P2Y₁-рецепторам (A.У.Зиганшин, 2004; I. Chessel, 2001). Этот агонист был инертен по отношению P2Y₁-рецептор-опосредованному ответу слепой кишке морской свинки (А.В. Рычков, 2007). Стойкий блокирующий эффект на P2X-рецепторы сердца PPADS оказывает в концентрации 30 микроМ (A. Rubino, 1992).

Селективный антагонист P2X-рецепторов PPADS практически полностью предупреждает влияние 2-метилтиоАТФ на сократимость миокарда 14-, 21-, 56-суточных крысят. У 14-суточных эффект агониста в концентрации 10^{-8} М в предсердиях составляет $2,3\pm0,2\%$, в желудочках $4,1\pm0,3\%$. 2-метилтио-АТФ в концентрации 10^{-7} М у 21-суточных вызывает увеличение силы сокращения всех отделов миокарда на $3\pm0,1\%$. У 56-суточных на фоне блокатора реакция предсердий и желудочек на 2-метилтио-АТФ в концентрации 10^{-6} М исчезает. У 100-суточных реакция предсердий составляет $109,7\pm6,1\%$, длительность сокращения увеличивается до 113,5%. Сократимость миокарда желудочек увеличивается до $21\pm0,9\%$ ($p<0,05$) (табл. 32, 34). Следовательно, у 100-суточных крыс P2X₄- и возможно, P2Y₁-рецепторы участвуют в положительной инотропной реакции миокарда желудочек на действие 2-метилтио-АТФ. В наших экспериментах PPADS достоверно снижала эффекты 2-метилтио-АТФ у 14-, 21- и 56-суточных крысят. Можно утверждать, что на ранних этапах онтогенеза роль разных подтипов P2X-рецепторов, а также P2Y₁-рецепторов в сократимости миокарда предсердий и желудочек незначительна (Рис. 26).

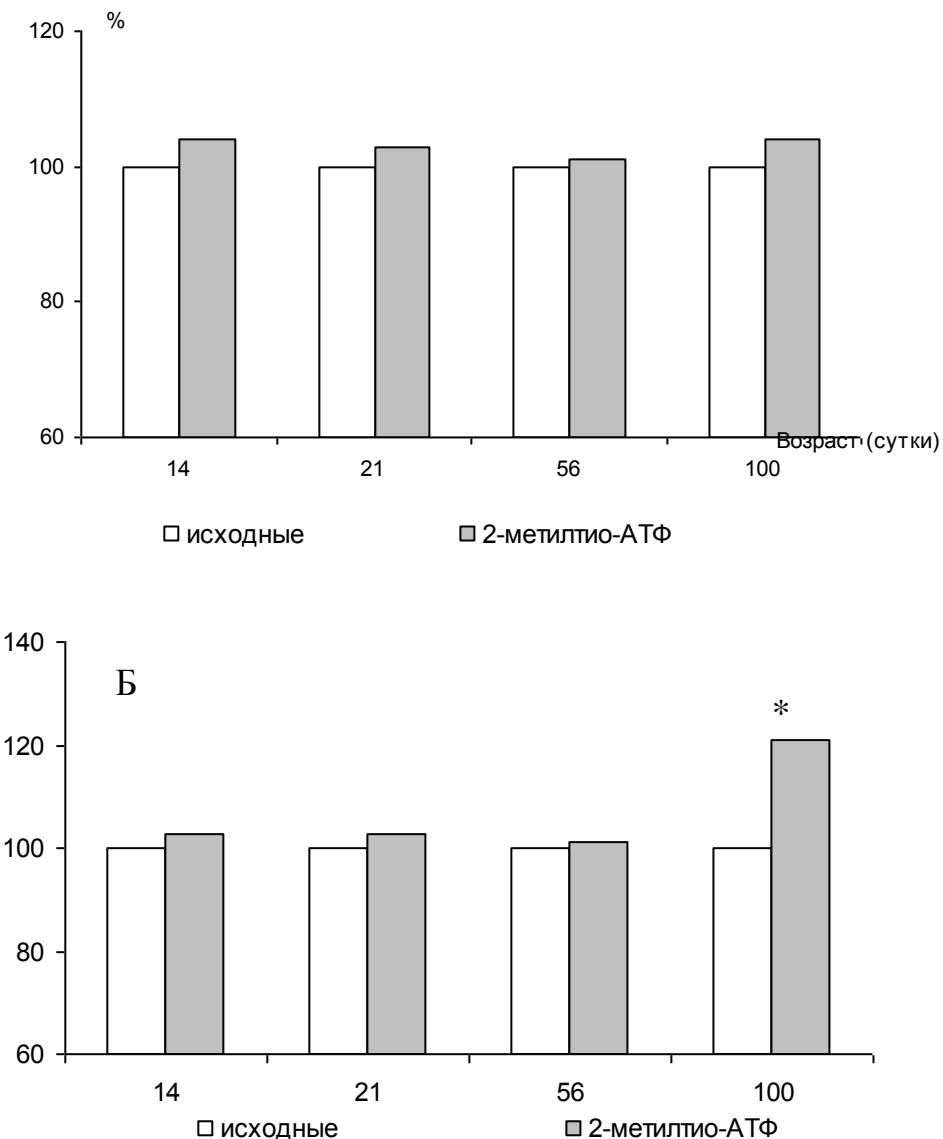


Рис. 26. Влияние 2-метилтио-АТФ на силу сокращения миокарда предсердий (А) и желудочков (Б) сердца растущих крыс после блокады P2X рецепторов PPADS

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$

3.2.5. Влияние 2-метилтиоАТФ на сократимость миокарда крыс при блокаде P2Y-рецепторов

Для определения функциональной активности P2X-рецепторов проводили блокаду P2Y-рецепторов реактивом голубым-2. Реактив голубой-2 (производное антрахинонсульфаниловой кислоты) - антагонист с преимущественным действием на P2Y-пуринорецепторы. Антагонистическое действие препарата проявляется в очень узком диапазоне концентраций и коротком времени инкубации (не более 60 мин), за пределами которых существенными становятся

его неспецифические эффекты (Abbracchio, 2001). Реактив голубой -2 добавляли в концентрации 1,5 микроМ (G. Burnstock, 2006).

При блокаде P2Y-рецепторов 2-метилтио-АТФ достоверно увеличивает силу сокращения предсердий и желудочков во всех возрастных группах. У 14-суточных крысят 2-метилтио-АТФ увеличивает силу сокращений предсердий на $10,4 \pm 0,4\%$ ($p < 0,05$; $n=10$), желудочков на $12,3 \pm 0,32\%$ ($p < 0,05$; $n=10$), длительность сокращения уменьшается на $11,5 \pm 0,52\%$ за счет уменьшения длительности расслабления ($p < 0,05$). У 21-суточных животных наибольший эффект на 2-метилтио-АТФ наблюдался в предсердиях и составил $40 \pm 2,3\%$ ($p < 0,01$), в желудочках $20,2 \pm 1,8\%$ ($p < 0,01$; $n=10$). У 56-и 100-суточных крыс на полосках желудочков сократимость повысилась на $28 \pm 3,6\%$ ($p < 0,01$; $n=10$), а предсердий на $17 \pm 1,4\%$ ($p < 0,05$) и 23% соответственно. Длительность сокращения достоверно не изменяется. При блокаде P2Y-рецепторов положительный эффект сохранялся во всех возрастных группах и в предсердиях и в желудочках. Это доказывает участие в реализации положительного инотропного эффекта P2X-рецепторов сердца однако, их функциональная активность на разных этапах онтогенеза различна. В наших экспериментах на изолированных полосках предсердий и желудочков 2-метилтиоАТФ при блокаде P2Y-рецепторов проявил разную эффективность в зависимости от возраста животных. Так, у 21-суточных крысят сила сокращения предсердий и общая длительность их сокращения на действие агониста при блокаде P2Y-рецепторов достоверно выше, чем у 100-суточных ($p < 0,05$; рис. 27). У 56- и 100-суточных животных сила сокращения желудочков на действие агониста при функционально активных P2X-рецепторах достоверно выше, чем у 14-суточных ($p < 0,05$). Следовательно, роль P2X-рецепторов в положительной сократительной реакции от 14-к 100-суточному возрасту в предсердиях снижается, а в желудочках возрастает.

Возрастные особенности функциональной активности P2X и P2Y-рецепторов, участвующих в сократимости миокарда, указывают на гетерохронное созревание рецепторного аппарата миокарда предсердий и желудочков, изменение плотности и чувствительности разных подтипов пуринорецепторов в онтогенезе. Наблюданная гетерохронность созревания P2X- и P2Y-рецепторов миокарда предсердий и желудочков в онтогенезе, осуществляется на основе реорганизации структурных элементов (В.В. Раевский, 2005).

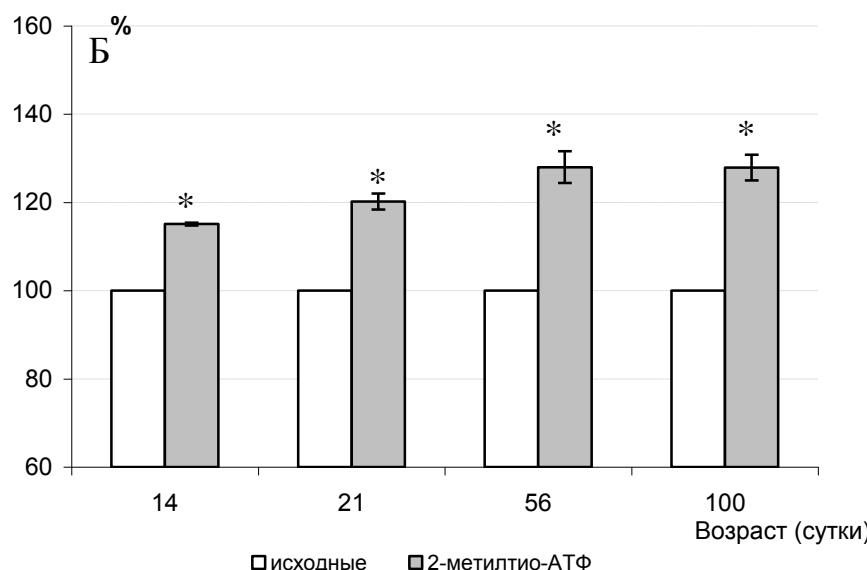
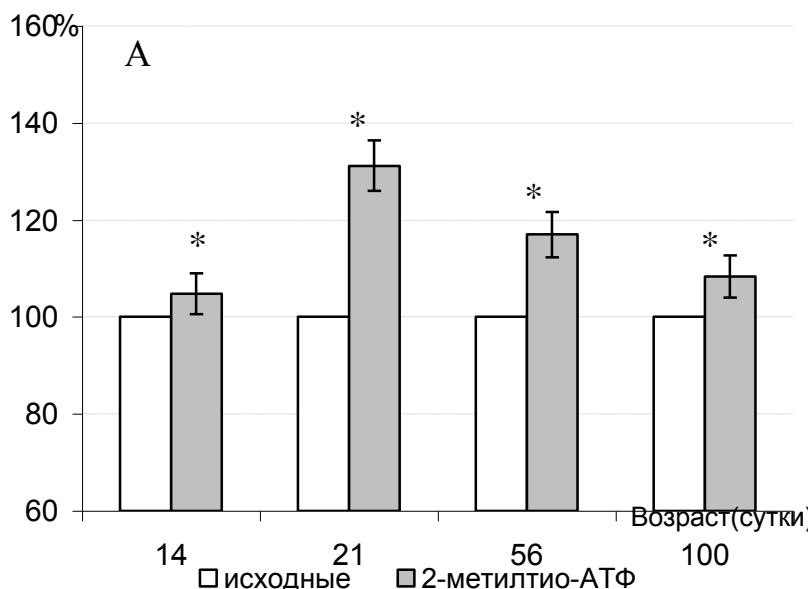


Рис. 27. Влияние 2-метилтио-АТФ на силу сокращений миокарда предсердий (А) и желудочков (Б) сердца растущих крыс после блокады P2Y рецепторов RB2

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$

3.2.6. Влияние агониста P2X-рецепторов β , γ метилен-АТФ на сократимость миокарда крыс в онтогенезе

В литературе описано семь подтипов P2X-рецепторов. В сердце крысы присутствуют P2X₁-P2X₅ –рецепторы. Их локализация в различных участках миокарда различна. Иммуногистохимический анализ сердца взрослых крыс показал присутствие на сарколемме кардиомиоцитов P2X₂, P2X₅, (Hansen M.A., Bennet M.R., Barden J.A., 1999). Вблизи синаптических

контактов нейронов с кардиомиоцитами присутствуют P2X₁, P2X₃-рецепторы. В предсердиях крысы в основном находятся P2X₁, P2X₂, P2X_{2/3}, P2X₄-рецепторы и в желудочках P2X₄ - рецепторы. Меньше известно о том, как меняется локализация этих рецепторов в сердце в онтогенезе. Так, P2X₃ - рецепторы найдены в эмбриональном сердце человека, где показано обилие подтипов P2X-пуринорецепторов (Vassort G., 2001). Известно также, что экспрессия P2Y рецепторов в онтогенезе изменяется (Mantelli L; Amerini S; Filippi S; Ledda F.; 1993).

Для определения подтипа P2X-рецепторов, участвующих в инотропной реакции миокарда использовали синтетический аналог АТФ - β , γ -метилен АТФ. В некоторых литературных источниках он определен как селективный агонист P2X₁ пуринорецепторов (Bo Hu, Chiang C., Hu J., Dostrovsky J., Sessle B.; 2002). A. North считает, что к нему чувствительны P2X₁, P2X₃ - и P2X_{2/3} - рецепторы. Этот агонист является нестойким соединением и разрушается до аденоzinового аналога во многих тканях за 1мин (North A.R, 2002).

Влияние селективного агониста P2X₁, P2X₃-рецепторов β , γ метилен-АТФ на сократимость миокарда изучалось в диапазоне концентраций 10^{-15} - 10^{-6} М. Нами установлено, что бета гамма метилен - АТФ в концентрации 10^{-13} М – 10^{-9} М вызывает дозозависимое сокращение миокарда предсердий и желудочков миокарда крыс в онтогенезе.

Селективный агонист вызывает положительный инотропный эффект желудочков в каждом исследуемом возрасте в двух концентрациях. У 14- и 21-суточных крысят сократительный эффект наблюдался при действии β , γ м-АТФ в концентрации 10^{-12} - 10^{-13} М. Максимальное увеличение силы сокращения желудочков наблюдается при добавлении β , γ м-АТФ в концентрации 10^{-12} М и составляет у 14-суточных $31,2\pm4,7\%$, у 21-суточных $24,5\pm3,3\%$ ($p <0,01$; $n=17$). Концентрация 10^{-13} М увеличивает сократимость на $16,1\pm8,1\%$ ($n=10$) и $14,9\pm4,1\%$ ($p <0,05$; $n=9$) соответственно. Увеличение концентрации препарата до 10^{-11} М вызывает достоверное снижение сокращения желудочков на $10,8\pm0,5\%$ 21-суточных крысят ($p <0,05$; $n=9$) и не изменяет у 14-суточных ($n=9$).

У 56 - суточных животных оказываются эффективными концентрации β , γ м-АТФ 10^{-12} и 10^{-11} М. Наибольший сократительный эффект желудочков наблюдался в концентрации 10^{-11} М и составил $21,4\pm3,8\%$ ($p <0,05$; $n=9$). Концентрация агониста в 10^{-12} М также оказывает действие и увеличивает сократимость желудочков на $9,6 \pm 1,5\%$ ($p <0,05$; $n=9$). У 100-суточных крыс максимальный эффект β , γ м-АТФ оказывает в концентрации 10^{-10} М, сократимость увеличивается на $13,6\pm1,8\%$ ($p <0,05$; $n=9$) (Рис. 28).

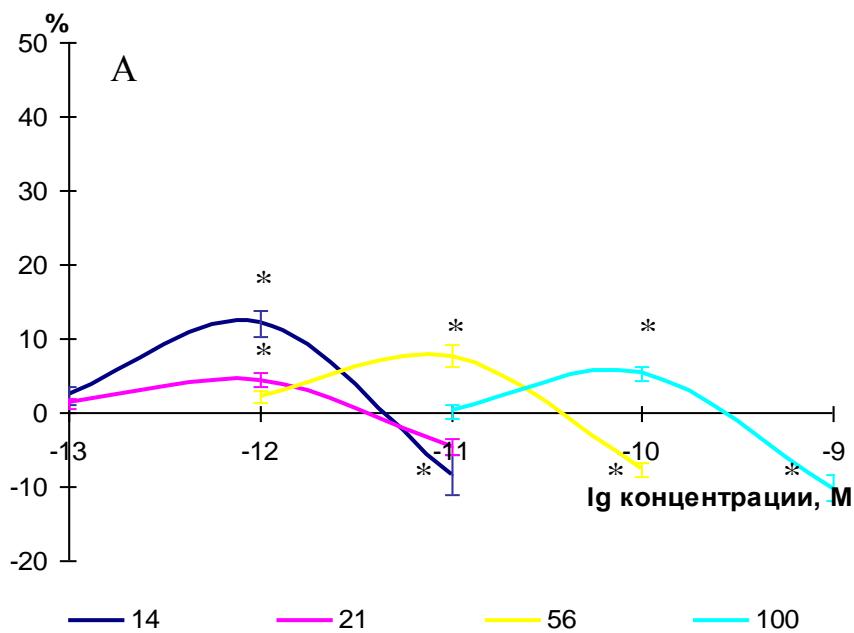
Реакция предсердий на действие агониста таких же концентраций отличается от реакции желудочков. Сила сокращения предсердий возрастает при добавлении β , γ м-АТФ в концентрации 10^{-12} М на $12,1\pm1,7\%$ у 14-суточных и на $4,4\pm0,9\%$ у 21-суточных ($p <0,05$; $n=20$). У 56-суточных максимальный сократительный эффект миокарда предсердий составляет $7,7\pm 1,5\%$ ($p <0,05$) и

является на порядок ниже – 10^{-11} М, а у 100-суточных на два порядка ниже – 10^{-10} М. Сократимость увеличивается на $5,3\% \pm 0,8\%$ ($p<0,05$).

Увеличение концентрации β, γ м-АТФ угнетает сократимость миокарда предсердий во всех исследуемых возрастных группах. У 14-суточных концентрация агониста 10^{-12} М уменьшает сократимость на $8,5\pm2,7\%$, у 21-суточных на $4,6\pm1\%$ ($p<0,05$). У 56 –суточных β, γ м-АТФ в концентрации 10^{-10} М уменьшает на $7,7\pm0,9\%$, у 100-суточных на $10,2\pm1,7\%$ в концентрации 10^{-9} М ($p<0,05$). Отрицательный эффект высоких концентраций β, γ м-АТФ на сократимость миокарда предсердий вызван его распадом до аденоцина, который оказывает эффект через свои Р1-рецепторы.

Определение дозозависимого эффекта селективного агониста P_{X1}-рецепторов подтверждает ранее полученные результаты о высокой чувствительности миокарда к агонисту P2X-рецепторов в раннем постнатальном онтогенезе.

Анализируя реакцию сократимости предсердий и желудочков на действие агониста, можно сделать вывод о высокой функциональной активности P_{X1}-рецепторов у 14-суточных крысят в предсердиях и ее последующем снижении. Сила сокращения желудочков на действие селективного агониста увеличивается от 14 - к 56- суточному возрасту.



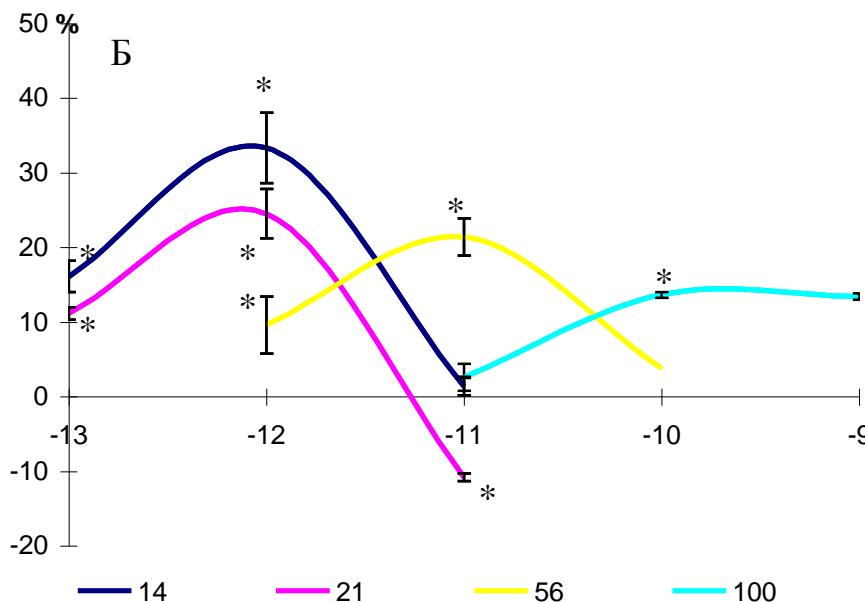


Рис. 28. Влияние бета, гамма- метилен АТФ на силу сокращения миокарда предсердий (А) и желудочков (Б) сердца растущих крыс

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$

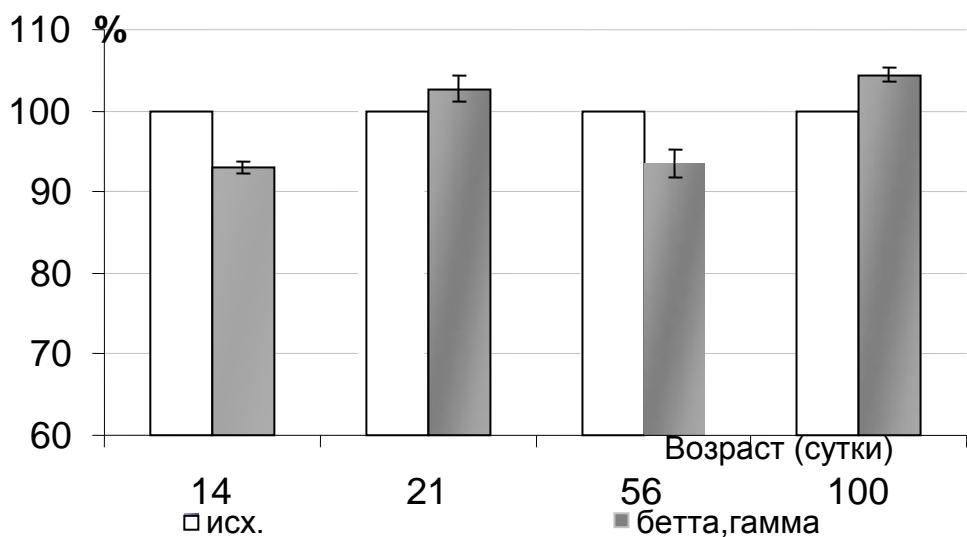
3.2.7. Влияние β , γ метил-АТФ на сократимость миокарда крыс при блокаде P2X₁-рецепторов

Для определения подтипа P2X-рецепторов на фоне селективного антагониста TNP-АТР исследовали влияние наиболее эффективных концентраций β , γ м-АТФ, которые для крысят в возрасте 14 сут. составили 10^{-12} , 21 сут. - 10^{-12} , 56 сут. - 10^{-11} , 100 сут. - 10^{-10} М. TNP-АТР ($2',3'$ -о-(2,4,6-тринитрофенил) аденоzin-5'-трифосфат) является производным АТФ. Это сильный блокатор P2X₁-, P2X_{2/3} - и P2X₃- пуринорецепторов сердца (Vassort G.;2001). Используется как неконкурентный антагонист для характеристики нативных P2X₁-, P2X_{2/3} - и P2X₃-пуринорецепторов в низкой наномолярной концентрации (Burgard et al; 2000). TNP-АТР использовали в концентрации 1 микроМ (J. Xu et al., 2004).

Селективный антагонист P2X₁-рецепторов TNP-АТР полностью предупреждает влияние β , γ м-АТФ на сократимость миокарда желудочков и предсердий во всех возрастных группах. На фоне блокады TNP-АТФ добавление агониста не вызывает достоверных изменений в сократимости полосок миокарда (Рис.29).

Таким образом, полученные нами результаты подтверждают, что реализация положительного инотропного эффекта, вызванного β , γ метил-АТФ, осуществляется через P2X₁, P2X_{2/3} рецепторы.

А



Б

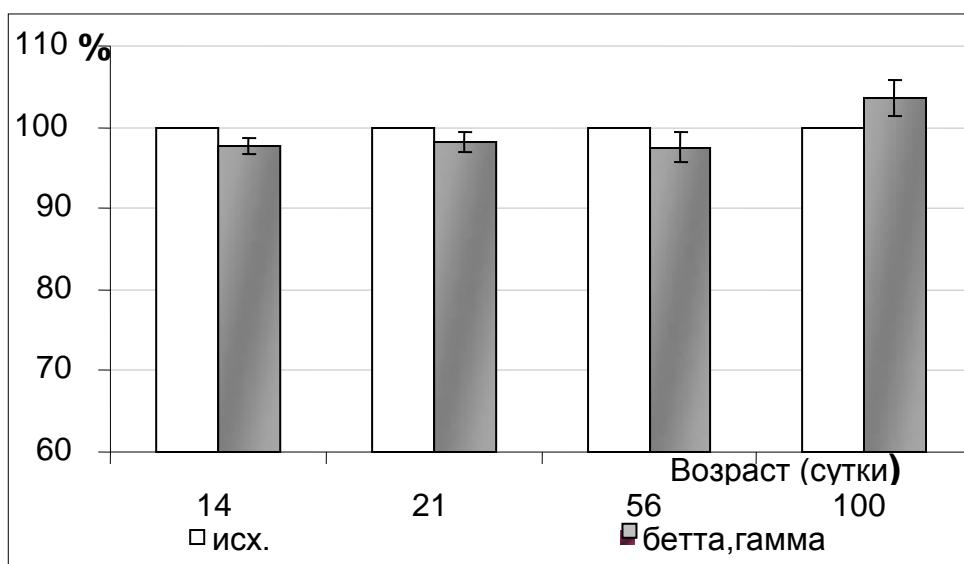


Рис. 29. Влияние бета, гамма- метилен АТФ на силу сокращения миокарда предсердий (А) желудочков (Б) сердца растущих крыс после блокады ТНР-АТР

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$.

3.3. Совместное влияние 2-м-АТФ и карбахолина и 2-м-АТФ и изопротеренола на сократительную активность миокарда крыс в онтогенезе

3.3.1. Влияние карбахолина на сократимость миокарда крыс 14-100-суточного возраста

Карбахолин является синтетическим аналогом АХ, не гидролизуется холинэстеразой, и в значительной степени повторяет его действие.

Влияние стойкого агониста преимущественно M2-холинорецепторов карбахолина на сократимость миокарда изучали в диапазоне концентраций 10^{-7} - 10^{-4} М. Установлено, что карбахолин в концентрации 10^{-5} М вызывает отрицательный инотропный эффект миокарда у крыс 14-, 21-, 56- и 100-суточного возраста. Активация M2-ХР, связанных с РТХ – чувствительными G - белками (Gi/Go) ведет к снижению уровня цАМФ внутри клетки, что приводит к снижению активности Ca^{2+} - тока и уменьшению силы сокращений. В основе наблюдаемого эффекта лежит также и увеличение K^+ токов за счет прямой связи β,γ субъединицы G-белка с каналом (Wickman K. and Clapman D.E.; 1995).

Чувствительность холинорецепторов к карбахолину оказалась одинаковой во все возрастных группах. В концентрации 10^{-4} М карбахолин снижает у 14 сут сократимость миокарда предсердий на $32,8\pm8,5\%$, желудочков на $30,6\pm6,4\%$ у 21 сут. – на $53,1\pm5,8\%$ и $49,6\pm6,4\%$, у 56сут. – на $51,0\pm6,9\%$ и $53,6\pm7,9\%$ соответственно. В концентрации 10^{-6} и 10^{-7} М карбахолин не вызывает достоверных изменений сократимости миокарда у 14-, 21- и 56-суточных крыс. У 100 сут. эти концентрации агониста снижают сократимость предсердий на $8,4\pm2,4\%$ и $25,4\%\pm4,9\%$ соответственно ($p <0,05$), а желудочков на $25,4\pm4,8\%$ ($p <0,05$). Определение дозозависимого эффекта карбахолина на сократимость миокарда указывает на повышенную чувствительность M-холинорецепторов к КХ у 100-суточных крыс.

Следует отметить, что концентрация карбахолина 10^{-6} М приводила и к появлению положительного инотропного эффекта в желудочках до $22,5\pm4,4\%$, а 10^{-7} М увеличивала сократимость предсердий на $16,5\pm6,1\%$, а желудочков на $11,4\pm4,6\%$.

В сердце у различных видов животных было показано, что агонисты M-холинорецепторов в больших концентрациях (больше 10^{-6} М) стимулировали положительный инотропный эффект (Brown, 1984; Webb, 1995; Yang et al., 1996). Этот эффект не чувствителен к РТХ-белку и связан с увеличением образования инозитол-3-фосфата (Caulfield, 1993).

По нашим данным, реакция сократимости миокарда предсердий и желудочков на КХ в концентрации 10^{-5} М меняется в постнатальном онтогенезе. У 14-сут. крысят сократимость предсердий уменьшилась на $15,4\pm4,3\%$ по сравнению с исходной. У 21-суточных животных

сократимость миокарда предсердий при добавлении КХ уменьшается на $39,1\pm5,2\%$, а у 56- и 100-сут-на $30,5\pm5,8\%$ и $25,0\pm5,7\%$ соответственно (рис. 30).

Карбахолин в этой же концентрации также снижает сократимость миокарда желудочков у 14-сут. на $19,4\pm4,3\%$, у 21-сут. на $37,0\pm4,2\%$, у 56- и 100-сут. на 36,0% по сравнению с исходной (Табл. 21).

В наших экспериментах на изолированных полосках предсердий и желудочков карбахолин проявляет разную эффективность в зависимости от возраста животных, что позволяет судить о функциональной активности M2-холинорецепторов в онтогенезе. Так, реакция M2-ХР, определяющих сократимость предсердий и желудочков при действии КХ снижается от 14 к 100-сут. возрасту и является наименьшей у 14-сут. крысят ($p<0,05$). У 21-суточных животных реакция сократимости выше по сравнению с 100-сут. ($p<0,05$). Таким образом, реакция сократимости миокарда предсердий и желудочков на КХ снижается от 21 к 100-суточному возрасту.

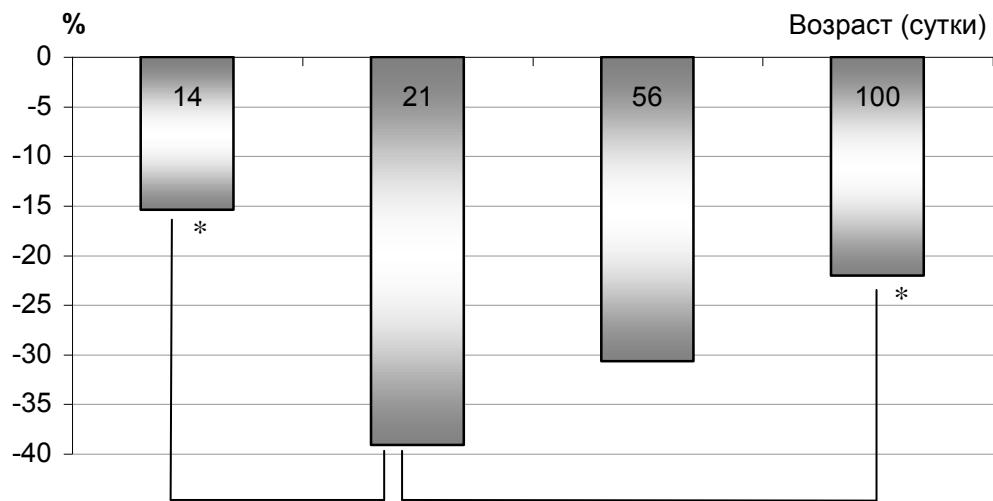
Многие исследователи считают, что парасимпатические влияния выражены у новорожденных животных слабо. Установлено отсутствие полноценной системы иннервации сердца не только у плодов крыс, но и у крысят первого месяца постэмбрионального развития. Некоторые исследователи считают, что парасимпатические влияния выражены у новорожденных крысят слабо и усиливаются с третьей по десятую неделю постнатального онтогенеза, что подтверждается экспериментальными данными нашей кафедры (Ф.Г. Ситдиков, Т.Л. Зефиров, 2006; Ф.Г. Ситдиков, Т.А. Аникина, Р.И. Гильмутдинова, 1998; Л.А.Александрова, 1982).

Согласно мнению многих исследователей с возрастом снижается не только количество, но и функциональная активность M2-холинорецепторов, что сопровождается уменьшением их плотности в сердце на протяжении постнатального онтогенеза (Brodde O.E., Konschak, 1998; Brodde O.E., Konschak, 1997). Известно, что плотность мускариновых рецепторов в миокарде зависит от концентрации ацетилхолина в тканевой жидкости. Подтверждением являются и данные об изменении количественного соотношения популяции разных подтипов M-холинорецепторов в разные периоды постнатального развития (Т.Л. Зефиров и др., 2007).

При изучении возрастных изменений M2-ХР в экспериментах на человеке и животных были получены результаты, указывающие на уменьшение плотности M2-ХР (Brodde O.E. et al; 1998; Hardouin S. and Moalic, 1997), которое сопровождалось снижением способности карбахолина к ингибированию аденилатциклазы (Giessler C. and Brodde O.E.; 1998).

Наши результаты по изменению сократимости миокарда на действие экзогенного КХ подтверждают положение о том, что с возрастом снижается функциональная активность M2-ХР.

А



Б

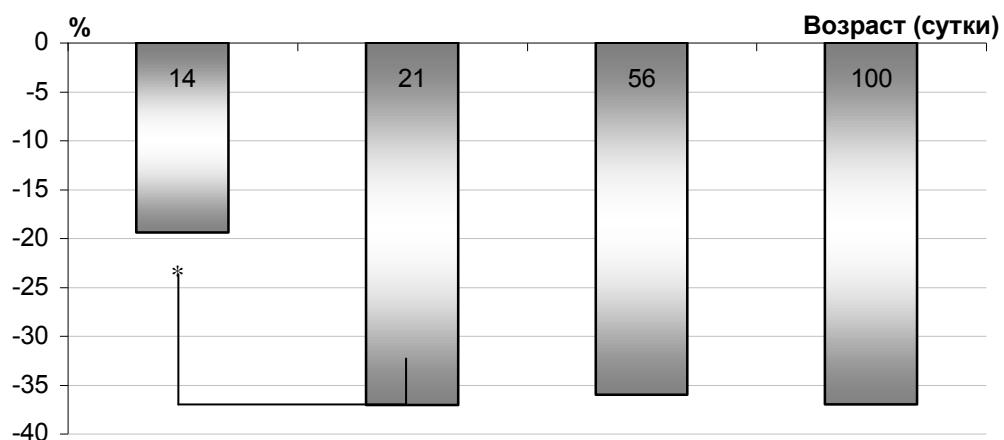


Рис. 30. Влияние карбахолина на силу сокращений миокарда предсердий (А) и желудочков (Б) при концентрации $10^{-5}M$

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$

Таблица 21
Влияние карбахолина на показатели сократимости миокарда крыс в онтогенезе

Возраст (n)	Концентрация карбахолина	Предсердия		Желудочки	
		Сила сокращения	Длительность сокращения	Сила сокращения	Длительность сокращения
14 дней (n = 6) (n = 7) (n = 6)	Карбахолин 10^{-6} М	97,1±3,4%	99,6±0,9%	94,6±3,6%	99,1±2,1%
	Карбахолин 10^{-5} М	84,6±4,3%*	101,6±2,5%	80,6±4,3%*	103,1±3,3%
	Карбахолин 10^{-4} М	67,4±8,5%*	102,1±5,2%	69,4±6,4%*	102,6±3,5%
21 день (n = 10) (n = 9) (n = 6)	Карбахолин 10^{-6} М	97,6±2,6%	101,8±2,6%	97,4±1,9%	100,5±1,4%
	Карбахолин 10^{-5} М	60,9±2,6%*	98,5±2,6%	63,0±4,2%*	96,8±3,1%
	Карбахолин 10^{-4} М	46,9±5,8%	97,8±1,7%	50,4±6,4%	98,5±0,7%
56 дней (n = 10) (n = 10) (n = 5)	Карбахолин 10^{-6} М	97,3±3,2%	99,9±1,7%	96,9±2,6%	95,5±0,9%
	Карбахолин 10^{-5} М	69,5±2,6%*	96,9±2,8%	64,0±8,1%*	96,5±3,6%
	Карбахолин 10^{-4} М	49,0±6,9%*	95,6±4,1%	46,4±7,9%*	95,2±4,1%
100 дней (n = 10) (n = 9) (n = 9)	Карбахолин 10^{-5} М	75,0±5,7%	102±0,9%	64,0±2,8%	86,8±3,2%
	Карбахолин 10^{-6} М (n = 4) (n = 5)	91,5±2,4%	119,52±17,10%	74,4±4,9%	97,28±13,27%
	Карбахолин 10^{-7} М (n = 4) (n = 5)	78,4±7,9%	97,4±1,5%	122,5±4,4%	110,53±6,72%
		116,5±6,1%	97,3±0,7%	111,7±4,6%	103,4±1,5%

3.3.2. Совместное влияние 2-метилтио-АТФ и карбахолина на сократимость миокарда крыс в постнатальном онтогенезе

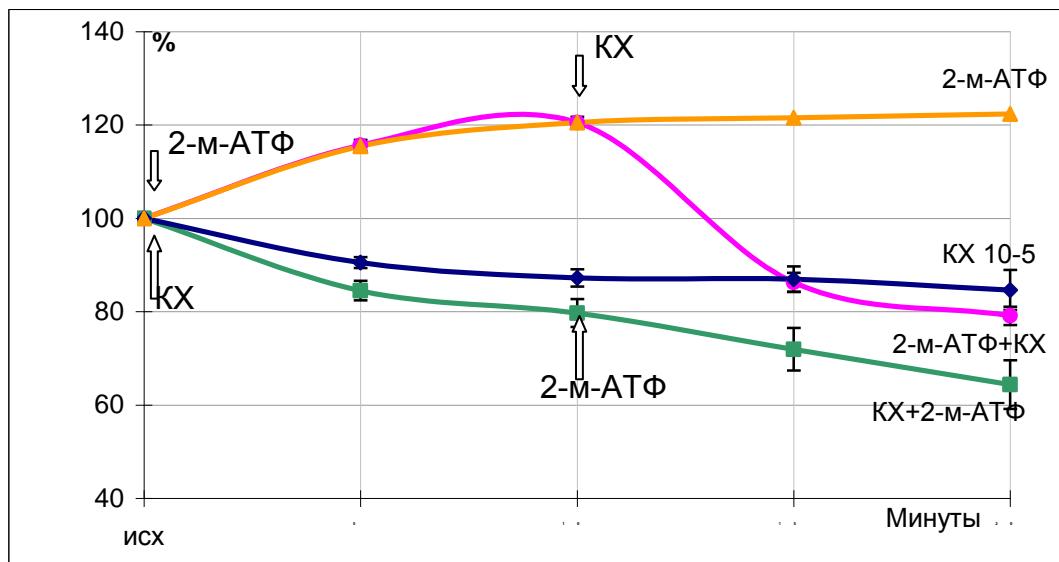
Первое предположение о модулирующей роли АТФ в холинергической передаче в сердце было высказано Турпаевым Т.М. в 1965 году. Он показал, что выделение АТФ-подобного вещества из сердечной мышцы снижает чувствительность холинорецепторов и является одним из физиологических механизмов выхода сердца из вагусного торможения.

Способны ли холинергические и пуринергические рецепторы кардиомиоцитов взаимодействовать между собой? В литературе имеются сведения, что пуриновые рецепторы в нервно-мышечном синапсе функционально связаны с холинорецепторами (Шакирзянова А.В. и др., 2005). Функциональное взаимодействие рецепторов проявляется во –первых, в неаддитивном действии их агонистов, а во –вторых, в устраниении эффектов агонистов одних рецепторов антагонистами других.

Для ответа на этот вопрос изучали влияние последовательного введения стойкого агониста P2X- и P2Y1-рецепторов- 2-метилтио-АТФ на фоне развивающегося угнетающего действия карбахолина – агониста M2-холинорецепторов. Также проводились эксперименты с обратной последовательностью подачи веществ, когда КХ добавляется на фоне развивающегося положительного сократительного эффекта агониста P2-пуринорецепторов.

У 14-суточных крысят в контроле КХ уменьшает сократимость предсердий на 15,4% и желудочков на 19,4%. Совместное действие КХ и 2-м-АТФ усиливает угнетающее действие КХ на сократимость предсердий и желудочков на $31,5 \pm 5,2$ и $43,6 \pm 5,3\%$ соответственно, что достоверно больше его эффекта в контроле ($p < 0,05$) (Рис. 31, 31А). Наблюдаемый эффект значительно превышает угнетающее действие одного КХ. При добавлении стойкого аналога АТФ эффект карбахолина усиливается приблизительно на 54%. В контроле 2-м-АТФ в концентрации 10^{-8} М увеличивает силу сокращения предсердий на $15,3 \pm 2,0\%$ и желудочков на $25,8 \pm 6,2\%$. Следует отметить, что при обратной последовательности подачи веществ, т.е., добавлении карбахолина, агонист P2-пуринорецепторов 2-м-АТФ утрачивает способность усиливать сократимость миокарда во всех возрастных группах. Развивается отрицательный инотропный эффект КХ, который на фоне 2-метилтио-АТФ у 14-сут. крысят составил $20,9 \pm 1,9\%$ в предсердиях и $19,3 \pm 2,3\%$ в желудочках, достигая контрольных значений.

А



Б

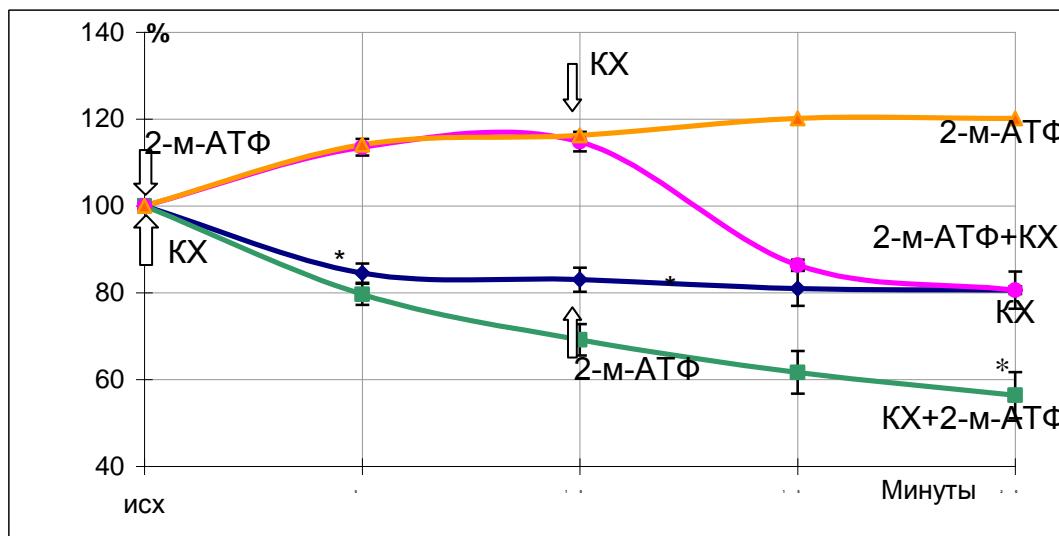
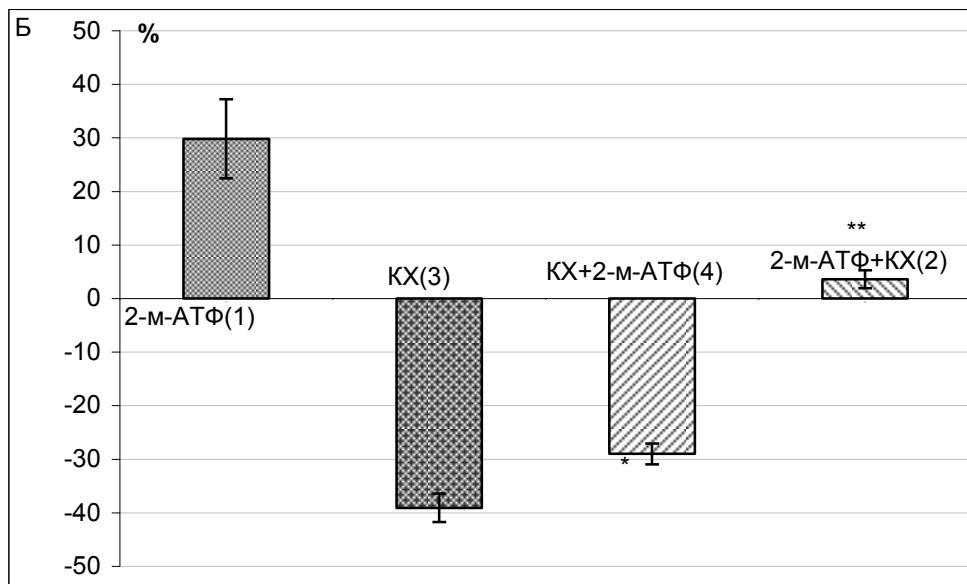


Рис. 31. Совместное влияние КХ и 2-м-АТФ на силу сокращения предсердий (А) и желудочков (Б) у крыс 14 дн. возраста

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$

А



Б

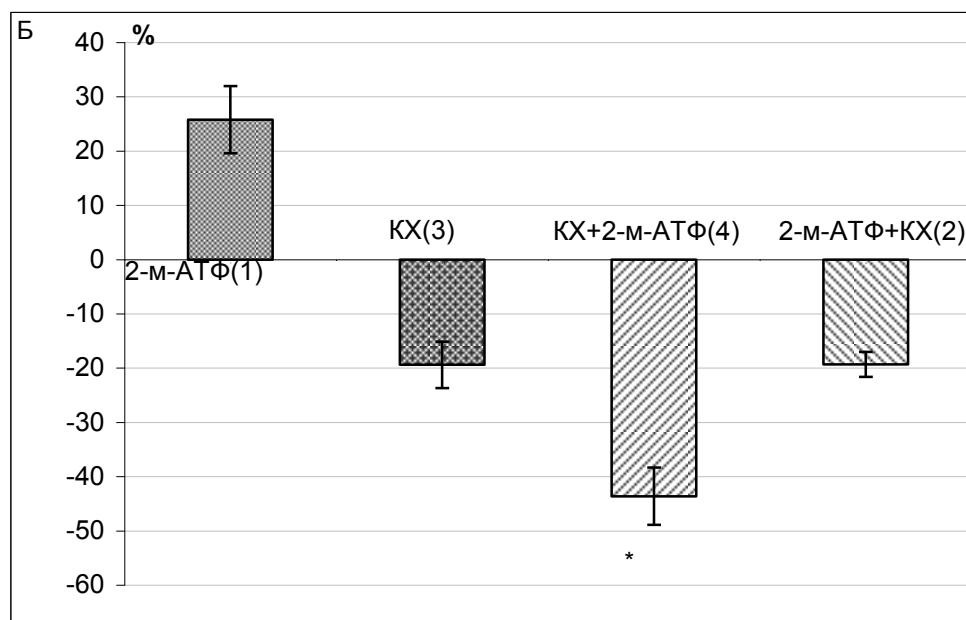


Рис. 31А. Совместное влияние 2-метилтио-АТФ и КХ на сократимость миокарда предсердий (А) 21 и желудочков у крыс 14- суточного возраста (Б).

У 21-суточных крыс в контроле КХ уменьшает сократимость предсердий на 39,1% и желудочков на 37,0%. Совместное действие КХ и 2-метилАТФ уменьшает эффект КХ в предсердиях на $29,0 \pm 1,2\%$ и в желудочках на $28,4 \pm 3,4\%$, что достоверно меньше его эффекта в контроле ($p < 0,05$; рис. 32). Эффект карбахолина при добавлении стойкого аналога АТФ снижается приблизительно на 21% в предсердиях и на 28% в желудочках. Агонист Р2-рецепторов в концентрации 10^{-7}M усиливает сократимость миокарда предсердий и желудочков в контроле приблизительно на 31,3% (Табл. 40, 40 А). При обратной последовательности подачи веществ на фоне агониста Р2-пуринорецепторов угнетающий эффект КХ на сократимость миокарда замедляется и составляет всего $3,6 \pm 1,7\%$ в предсердиях и $7,7 \pm 1,4\%$ в желудочках, что достоверно меньше эффекта КХ в контроле ($p < 0,001$; рис. 31А). Следует отметить появление фазы «плато» в сократимости миокарда желудочков после добавления КХ, что подтверждает «кардиотропный» эффект АТФ.

У 56-суточных крыс в контроле КХ уменьшает силу сокращений предсердий на 30,5% и желудочков на 36,0%. Активация Р2-рецепторов усиливает отрицательный инотропный эффект КХ на $35,0 \pm 2,6\%$ в предсердиях, на $41,3 \pm 3,6\%$ в желудочках соответственно. 2-метилтиоАТФ в концентрации 10^{-9}M увеличивает сократимость миокарда предсердий и желудочков в контроле на 12,6% (41, 41А). На фоне предварительной активации Р2-рецепторов добавление КХ действует угнетающе уже с первой минуты и в течение 5 минут достигает эффекта КХ в контроле (Рис. 33).

У 100-суточных животных в контроле КХ снижает сократимость миокарда предсердий и желудочков на 25,0% и 36% соответственно. Совместное действие КХ и 2-метилАТФ уменьшает силу сокращения на $30,9 \pm 1,7\%$ в предсердиях и на $25,7 \pm 2,25\%$ в желудочках, что достоверно меньше его эффекта в контроле ($p < 0,005$) (Табл. 42, 42 А). При обратной последовательности подачи веществ КХ уменьшает сократимость миокарда предсердий до $19,4 \pm 1,5\%$ и желудочков до $24,0 \pm 2,5\%$, что достоверно ниже эффекта КХ в контроле (Рис. 34).

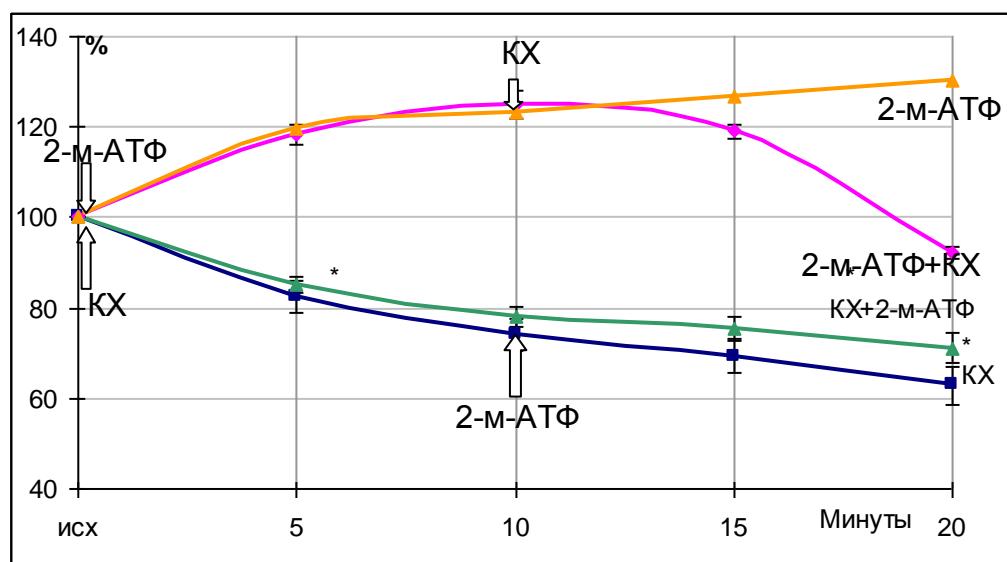
Таким образом, АТФ модулирует холинергическую регуляцию сократимости миокарда разнонаправленно на разных этапах раннего постнатального онтогенеза крыс. Эффект совместного влияния агонистов Р2-рецепторов 2-МАТФ и М2-холинорецепторов карбахолина на сократимость миокарда может быть усиливающим или ослабляющим в зависимости от возраста крыс. Активация Р2-рецепторов усиливает ингибирующий эффект КХ на сократимость миокарда предсердий и желудочков у 14-сут. крысят и сократимость желудочков у 100-суточных крыс. У 21-суточных крысят совместное действие КХ и 2-метилтио-АТФ уменьшает отрицательный эффект карбахолина на сократимость миокарда. Активация М2-ХР ингибирует положительный инотропный эффект пурина во всех возрастных группах.

Возможное усиление ингибирующего эффекта КХ связано с активацией K^+ -каналов. Подобно мускариновым холинергическим рецепторам и А1 аденоzinовым рецепторам, Р2-

рецепторы напрямую связаны с K^+ -каналом через разные субъединицы G- белка. Активация M-холинорецепторов и P2-рецепторов активирует наружу направленный K^+ -ток, что приводит к укорочению трансмембранныго потенциала и гиперполяризации с усилением отрицательного эффекта.

На мочевом пузыре показано, что электрическая стимулляция вызывает его двухфазное сокращение, однако эти фазы не отличаются четко друг от друга. Быстрый первичный кратковременный сократительный ответ вызван пуринергическим компонентом, который сменяется нерегулярными сократительными ответами, вызванными холинергическим компонентом (G.Burnstock, 1978).

А



Б

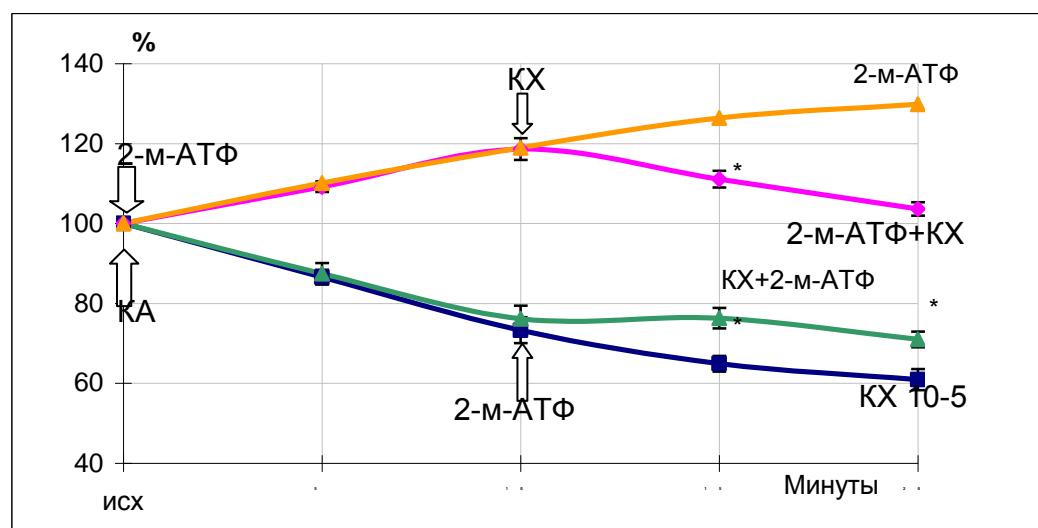
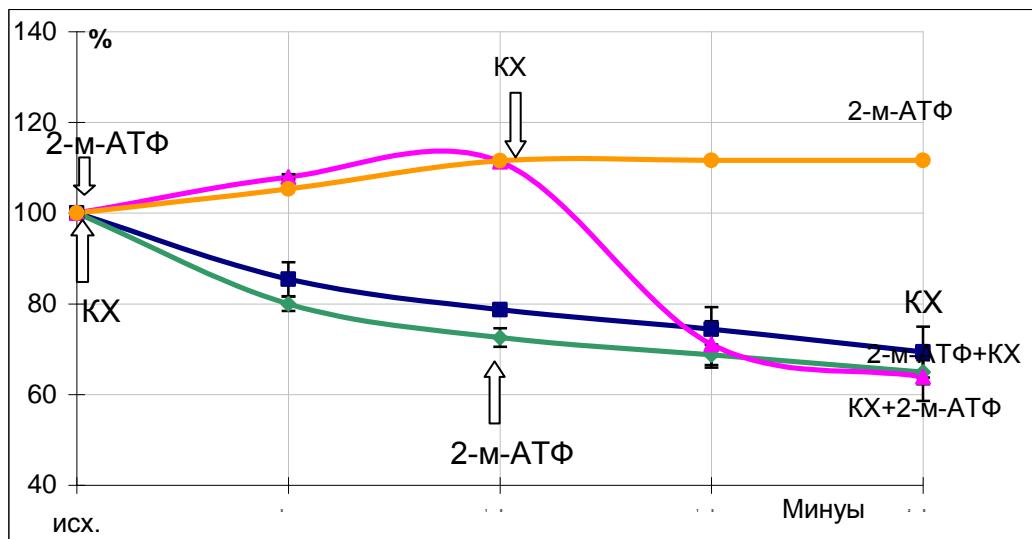


Рис. 32. Совместное влияние КХ и 2-м-АТФ на силу сокращений предсердий (А) и желудочек (Б) у крыс 21 сут. возраста

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением $*p < 0,05$

А



Б

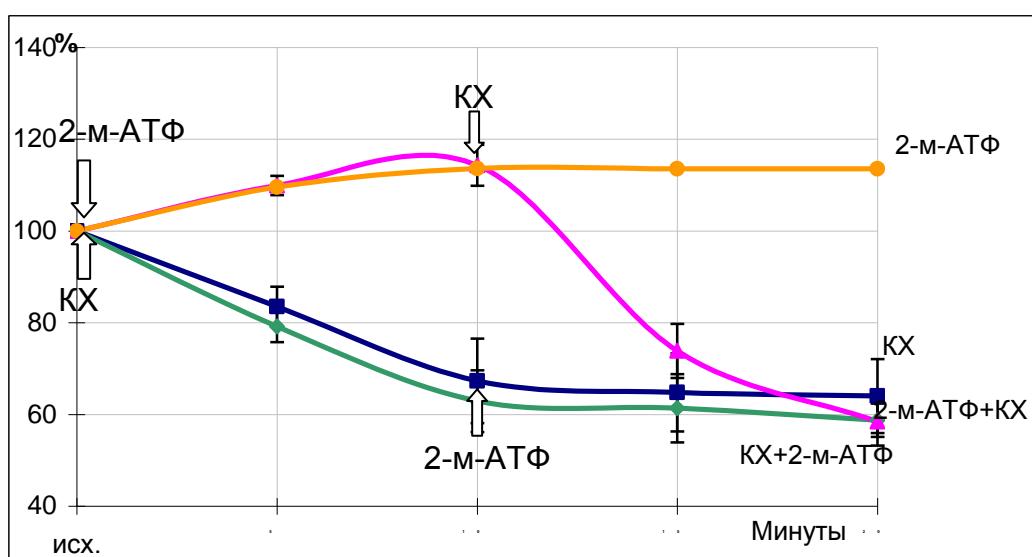
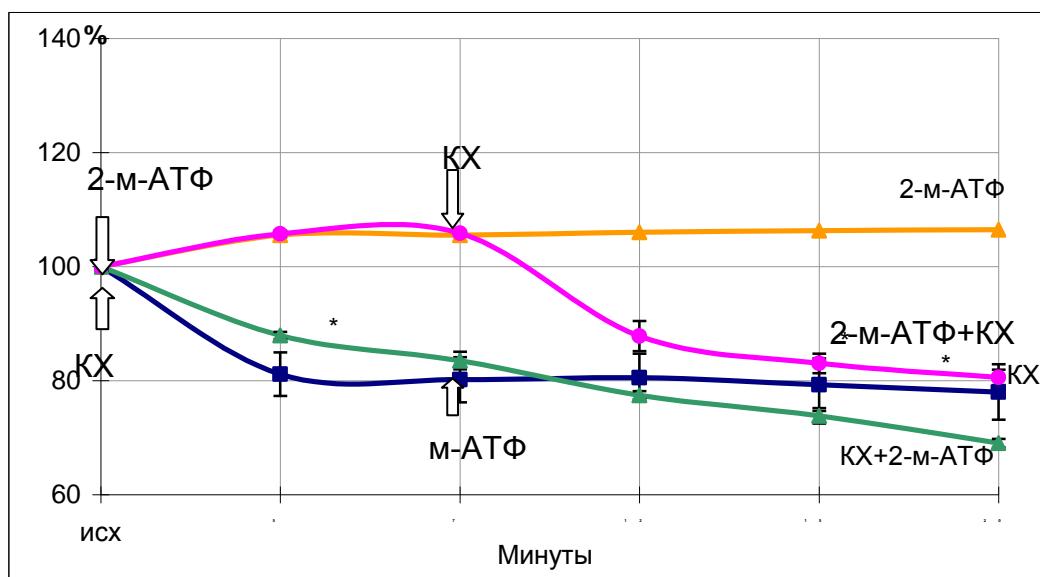


Рис. 33. Совместное влияние КХ и 2-м-АТФ на силу сокращений предсердий (А) и желудочков (Б) у крыс 56 сут. возраста

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$

А



Б

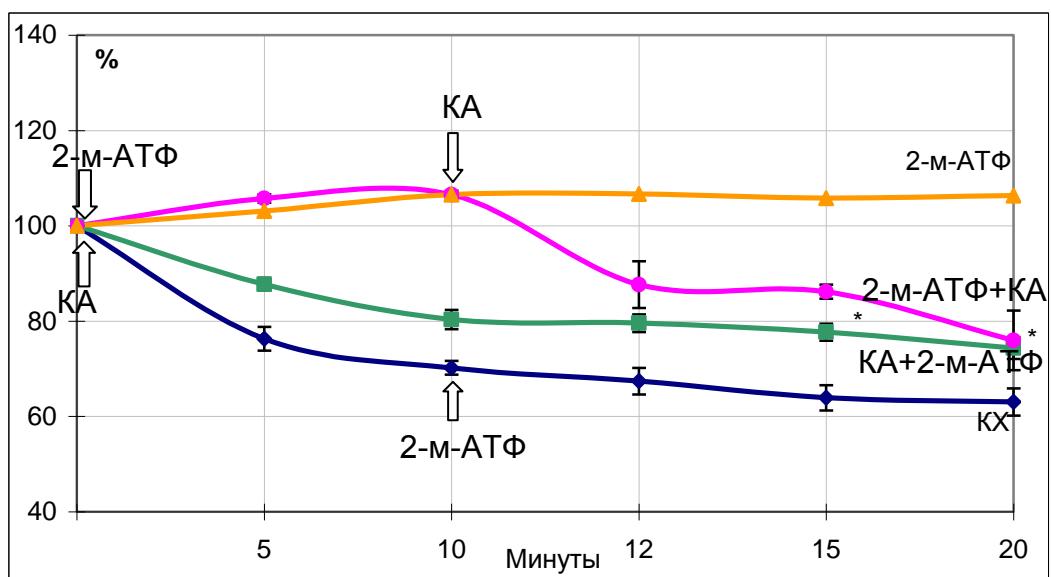


Рис. 34. Совместное влияние КХ и 2-м-АТФ на силу сокращений предсердий (А) и желудочков (Б) у крыс 100 сут. возраста

Примечание: достоверность по сравнению с исходным значением * $p<0,05$

3.3.3. Определение дозозависимого влияния изопротеренола на сократимость миокарда 14-100-суточных крыс

В настоящее время в сердце млекопитающих показано наличие трех типов β -адренорецепторов: β_1 , β_2 , β_3 - адренорецепторы. β_1 , β_2 -адренорецепторы являются постсинаптическими и располагаются на клеточной мемbrane кардиомиоцитов. Они взаимодействуют с норадреналином, высвобождающимся из постганглионарных симпатических волокон и с адреналином, который вырабатывается клетками мозгового слоя надпочечников. Неселективными антагонистами β -адренорецепторов являются норадреналин, адреналин, изопреналин.

При взаимодействии катехоламинов с β -адренорецепторами активируется Gs-белок, стимулирующий мембранный фермент аденилатциклазу, под влиянием которой АТФ превращается в циклический аденоzinмонофосфат (цАМФ). Повышение внутриклеточной концентрации цАМФ вызывает активацию цАМФ-зависимой протеинкиназы А, которая катализирует фосфорилирование белков. Реакции фосфорилирования приводят к возрастанию входящего межденного Ca^{2+} тока и увеличению продолжительности фазы «плато» потенциала действия кардиомиоцита. В результате сократимость миокарда повышается. Накопление цАМФ в цитозоле вызывает увеличение входящего кальциевого тока, вследствие этого повышается скорость спонтанной диастолической деполяризации в лягушках синусного узла и увеличивается частота сердечных сокращений. Продолжительность диастолы при этом уменьшается.

Для определения возрастных особенностей чувствительности и реактивности β -адренорецепторов миокарда изучали влияние стойкого агониста этих рецепторов - изопротеренола в диапазоне концентраций 10^{-2} - 10^{-13} М (Табл. 43, 43 А).

У 14-сут. крысят величина пороговой концентрации изопротеренола составила 10^{-3} М. Сократимость желудочков возрастает на $122,5\pm9,40\%$, предсердий на $96,96\pm25,5\%$. Агонист в концентрации 10^{-2} М увеличивает сократимость предсердий на $62,1\pm10,2\%$, желудочков на $56\pm23,1\%$. В концентрации 10^{-4} М сократимость миокарда достоверно не изменялась.

Определение дозозависимого эффекта у 21-сут. выявило пороговую концентрацию агониста, которая составила 10^{-12} М. Сократимость предсердий увеличивается на $43,9\pm4,7\%$, желудочков на $29,31\pm1,85\%$. Реакция на агонист в предсердиях достоверно больше, чем в желудочках ($p<0,05$). У животных этого возраста изопротеренол оказывал эффективное влияние на сократимость миокарда также в концентрациях 10^{-5} - 10^{-11} М.

У 56-сут. величина пороговой концентрации изопротеренола составила 10^{-11} М. Сила сокращения предсердий возрастает на $40,8\pm14,6\%$, желудочков на $44,95\pm1,85,0\%$. Концентрации агониста 10^{-6} , 10^{-8} и 10^{-10} М также оказывает положительный инотропный эффект.

У 100 сут. концентрация изопротеренола 10^{-6} М является пороговой величиной. Сократимость предсердий увеличивается на $23,10 \pm 3,20\%$, желудочков на $54,60 \pm 6,70\%$. Концентрация 10^{-7} М была не эффективной, а концентрация 10^{-5} М увеличивала сократимость миокарда предсердий и желудочков.

Следует отметить, что у 100-сут. крыс сократимость миокарда желудочков при действии изопротеренола достоверно выше, чем сократимость предсердий ($p < 0,05$). Сократимость желудочков на действие пороговой концентрации агониста увеличивается от 21 к 100-суточному возрасту и достигает достоверных величин ($p < 0,05$).

3.3.4. Возрастные особенности чувствительности и реактивности адренорецепторов, холинорецепторов и пуринорецепторов миокарда крыс 14-100-суточного возраста

Определить функциональное состояние мембранных рецепторов можно по величине пороговой концентрации. Пороговая доза характеризует «чувствительность» воспринимающих структур. Термин «чувствительность» клетки, ткани, органа является синонимом термина «воздбудимость» (А.Н. Батрак, Г.Е. Кудрин; 1979).

Ответ клетки на действие агониста зависит от плотности рецепторов на поверхности мембраны и степени сопряжения рецепторов с аденилатциклазой. Плотность β -адренорецепторов в клеточной мембране кардиомиоцитов зависит от различных факторов. Например, она находится в обратно-пропорциональной зависимости от количества катехоламинов. При усилении активности симпатического отдела вегетативной нервной системы, т.е. увеличении концентрации НА в сердце количество β -адернорецепторов снижается (Ф.Г. Ситдиков, Т.Л. Зефиров, 2006).

Чувствительность адрено-, холино- и пуринорецепторов миокарда определяли величиной пороговой дозы вводимых агонистов. Известно, что изменение чувствительности зависит от состояния мембранных рецепторов кардиомиоцитов. Повышение чувствительности органа к вводимому веществу может быть вызвано повышением эндогенного количества этого вещества и достаточно небольших его доз для того, чтобы создать нужную концентрацию и вызвать пороговую реакцию.

Хорошо известно, что чувствительность β -адренорецепторов сокращается с возрастом (Lakatta EG, 1993; Ferrara N., Davia K, Abete P, Rengo F, Harding SE. 1997). Плотность β -адернорецепторов в миокарде значительно уменьшается при высокой частоте сердечных сокращений. Относительно положения с М-холинорецепторами ситуация менее понятна и до конца не изучена. Исследования на животных показали, что отрицательный хронотропный эффект при стимуляции агонистами М-XР или активации вагуса может уменьшаться (Rothbaum D, Shaw DJ, Angell CS, Shock NW., 1974; Kelliher GJ, Conahan ST. 1980), увеличиваться (Ferrari A, Daffonchio

A, Gerosa S, Mancia G. 1991) или не изменяется (Elfellah MS, Johns A, Shepherd AMM. 1986) у крыс с возрастом. Поддерживая идею о снижении чувствительности (реактивности) мускариновых холинорецепторов, Narayanan и Tucker (1986) описали зависящее от возраста уменьшение способности карбахолина ингибировать аденилатцилазу, активированную изопротеренолом. Это согласуется с исследованиями, показавшими уменьшение плотности M2-ХР в сердце крыс с возрастом (Chevalier et al., 1991). С другой стороны, установлено, что мРНК M2-ХР- увеличивается с возрастом (Hardovin S., et al., 1997).

Самая низкая чувствительность адренорецепторов отмечается у 14-сут. крысят. Величина пороговой концентрации агониста β -адренорецепторов составляет 10^{-3} М. Такая низкая чувствительность β -адренорецепторов на изопротеренол подтверждает, что для этого возраста характерно минимальное присутствие симпатической иннервации.

У 21-сут. чувствительность миокарда к агонистам β -адренорецепторов самая высокая - 10^{-12} М. Такая высокая чувствительность связана с повышением активности симпатической нервной системы и присутствием большого количества норадреналина. У 56-сут. чувствительность β -адренорецепторов на порядок ниже – 10^{-11} М. В этом возрасте происходят изменения в эндокринной системе, оказывающие активное влияние на регуляцию сердечной деятельности.

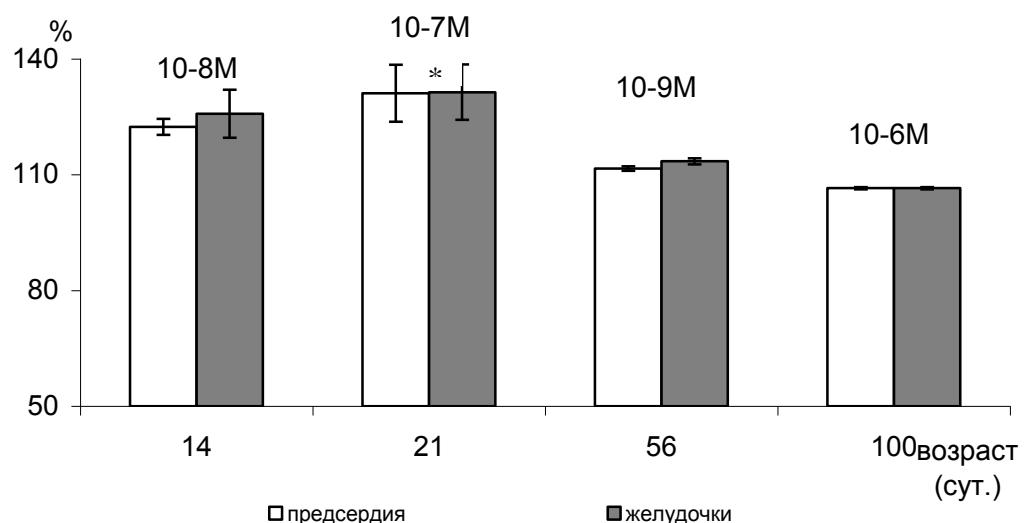
У 100-сут. чувствительность рецепторов к агонисту снижается до 10^{-6} М. Следовательно, чувствительность миокарда к агонисту β -адренорецепторов миокарда предсердий и желудочков от 21- к 100-сут. возрасту снижается. В исследуемых возрастных группах самая низкая чувствительность у 14-сут. крысят, а самая высокая у 21-суточных животных.

В наших экспериментах на изолированных полосках предсердий и желудочков изопротеренол проявляет разную эффективность в зависимости от возраста животных. Так, реакция β -адренорецепторов, определяющих сократимость предсердий при действии изопротеренола пороговых концентраций снижается от 21- к 100-сут. возрасту ($p<0,05$). Реакция сократимости желудочков, наоборот, от 21- к 100-сут. возрасту повышается ($p<0,05$). Таким образом, функциональная активность β -адренорецепторов в сократимости миокарда предсердий от 21- к 100-суточному возрасту снижается, а в желудочках повышается (рис. 36). Высокая реакция β -адренорецепторов на агонист у 14-суточных крысят по всей видимости объясняется влиянием субмаксимальной концентрации изопротеренола, которая не является физиологической.

Реакция M2-ХР, определяющая сократимость предсердий и желудочков при действии КХ пороговой концентрации является наименьшей у 14-сут. крысят ($p<0,05$). Далее, от 21- к 100 сут. возрасту, реакция сократимости миокарда предсердий снижается, а желудочков не меняется. Таким образом, функциональная активность M2-холинорецепторов в сократимости миокарда предсердий снижается от 21- к 100-суточному возрасту. У 21-суточных животных функциональная активность M2-холинорецепторов выше, чем в других возрастных группах.

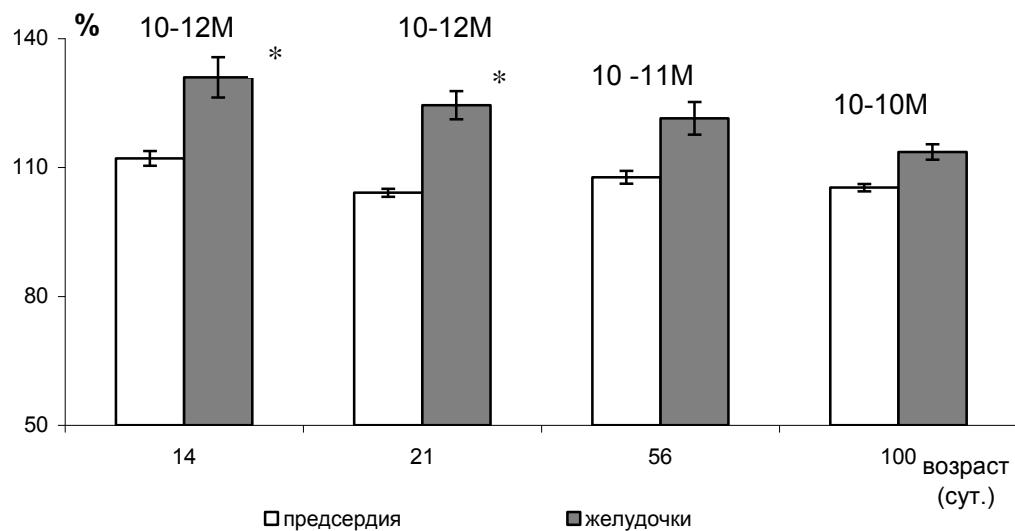
Повышение концентрации агонистов P2- purинорецепторов АТФ, 2-метилтио-АТФ, β,γ -метилен-АТФ, вызывающих положительный инотропный эффект при увеличении возраста крыс, указывает на высокую чувствительность P2-рецепторов миокарда в раннем постнатальном онтогенезе. Самая высокая чувствительность P2-рецепторов на действие агонистов отмечается у 14-суточных крысят. Значение пороговых концентраций в этом возрасте для АТФ составило 10^{-7} М, 2-метилтио-АТФ – 10^{-8} М, β,γ -метилен-АТФ – 10^{13} М. Реакция P2-пуринорецепторов в предсердиях и желудочках на 2-метилтио-АТФ у 14-суточных крысят ниже, чем в других возрастных группах. У 21-суточных крысят реакция P2X-рецепторов при влиянии агонистов выше, особенно в предсердиях. Следовательно, роль P2X-рецепторов в сократимости миокарда от 14-к 100-суточному возрасту в предсердиях снижается, а в желудочках возрастает (Рис. 35).

A



- * достоверно по сравнению со 100 сут. животными

Б



* достоверно по сравнению со 100 сут. животными

Рис. 35. Реакция сократимости миокарда предсердий и желудочков на 2-метилтио-АТФ (А) и β,γ -метиленАТФ (Б) у крыс 14-100-суточного возраста

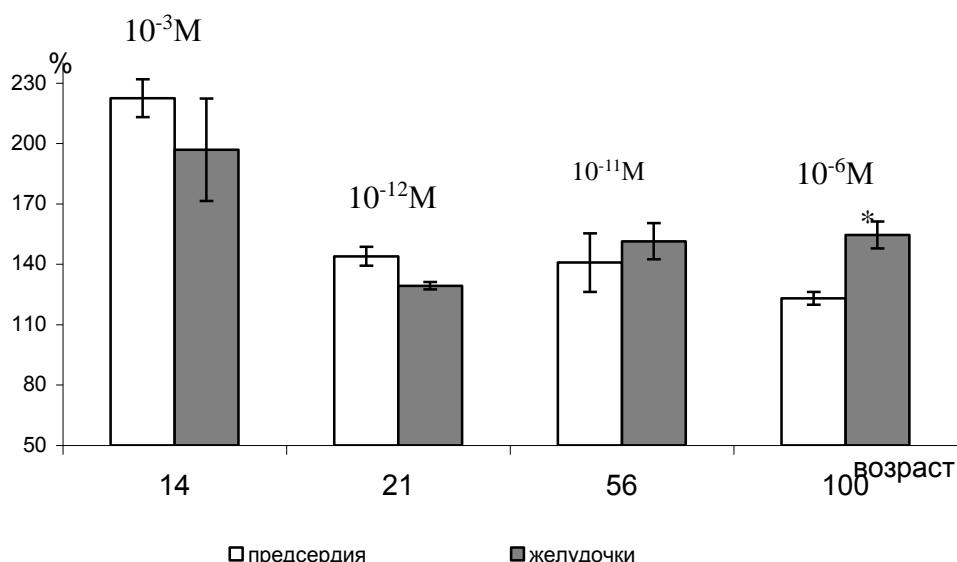


Рис. 36 Реакция сократимости миокарда крыс при активации β -адренорецепторов изопротеренолом в раннем постнатальном онтогенезе

Примечание: * - достоверно по сравнению с силой сокращения предсердий 100 суточных и силой сокращения желудочков 21 суточных ($p<0,05$).

3.3.5. Совместное влияние изопротеренола и 2-метилтио-АТФ на сократимость миокарда крыс 14-100-суточного возраста

Симпатическая нервная система играет важную роль в регуляции деятельности сердца. У многих млекопитающих созревание симпатической нервной системы происходит только после рождения, в раннем постнатальном периоде. В связи с этим необходимы механизмы, которые могли бы компенсировать недостаточность симпатической регуляции сердца.

Изопротеренол и АТФ обладают сходным (однонаправленным) положительным эффектом на сократимость миокарда. Эффект симпатических нервов опосредуется несколькими медиаторами: вместе с норадреналином секретируется АТФ и нейропептид Y (G.Burnstock, 1976 J.Lundberg et al., 1986). НА и АТФ, вызывая положительный инотропный и хронотропный эффект на сердце, одновременно влияют на действие друг друга (V.Ralevic, G.Burnstock, 1990; E.Bradley et al., 2003). Известно, что эффекты НА и АТФ существенно различаются по временным характеристикам. Из нервных окончаний АТФ секретируется раньше, чем НА (L.Todorov et al., 1994). Положение о том, что АТФ вызывает быстрый, а НА – более медленный эффект было получено при исследовании нейрогенных ответов, которые определялись секрецией медиаторов и их постсинаптическим действием (L.Todorov et al., 1994). Взаимодействуя с ионотропными P2X-рецепторами, АТФ оказывает быстрый и кратковременный эффект. При продолжительной активации P2X-рецепторы могут десенсилизироваться, а в условиях *in vivo* при длительной симпатической активации секреция АТФ снижается. При взаимодействии АТФ с метаботропными РУ-рецепторами наблюдаемый эффект будет более отсроченным и продолжительным при участии системы вторичных посредников (О.Тарасова, 2005).

Представляется важным определение совместного влияния изопротеренола и 2-метилтио-АТФ на сократимость миокарда и получения ответа на вопрос о наличии суммации эффектов изопротеренола и 2-метилтио-АТФ.

Для ответа на поставленный вопрос изучали влияние последовательного введения стойкого агониста P2X - и P2Y1-рецепторов - 2-метилтио-АТФ на фоне развивающегося действия изопротеренола – агониста β 1,2-адренорецепторов. Также проводились эксперименты с обратной последовательностью подачи веществ, когда изопротеренол добавляется на фоне положительного сократительного эффекта агониста Р2-пуринаректоров. При анализе результатов сравнивали общий эффект совместного влияния изопротеренола и 2-метилтио-АТФ с суммарным ответом, полученным при независимой активации рецепторов в контроле.

На сумму эффектов изопротеренола и 2-метилтио-АТФ будет указывать отсутствие разницы в конечном результате сократимости при прямой и обратной последовательности подачи веществ. Если разница значительна, то складывания эффектов не происходит.

У 14-сут. крысят при добавлении 2-МАТФ в концентрации 10^{-8} М на фоне развивающегося положительного действия изопротеренола (10^{-3} М), сила сокращения к 30 мин увеличивается на $241,96 \pm 14,58\%$, что больше эффекта изопротеренола в контроле ($217,65 \pm 12,45\%$; $p < 0,05$) и соответствует суммарному ответу обоих агонистов в контроле (240%) (табл. 22). При обратной последовательности подачи веществ, когда изопротеренол добавляется на фоне действия 2-МАТФ, сократимость предсердий увеличивается на $227,84 \pm 9,14\%$. Таким образом, в предсердиях общий эффект обоих агонистов при совместном влиянии составляет сумму влияний изопротеренола и 2-МАТФ.

У 14-сут. животных добавление 2-МАТФ уменьшает положительный инотропный эффект изопротеренола на 6,3%. Сократимость желудочков к 30 мин снижается и эффект обоих агонистов составляет $171,31 \pm 21,11\%$, что ниже положительного эффекта одного изопротеренола в контроле ($181,03 \pm 18,02\%$). Таким образом, усиливающие влияние 2-МАТФ на сократимость миокарда желудочков, которое в контроле составляло 25,8% не сохраняется. При обратной последовательности подачи веществ общее увеличение сократимости миокарда составило $173,56 \pm 13,46\%$. Следовательно, у 14-суточных крысят совместное влияние изопротеренола и 2-МАТФ на сократимость миокарда желудочков меньше суммарного ответа агонистов при независимой активации рецепторов, которое составляет 208,8%.

У 21-суточных животных изопротеренол увеличивает сократительную активность миокарда предсердий на $137,61 \pm 4,5\%$. При добавлении 2-МАТФ на фоне изопротеренола сила сокращения увеличивается на $156,89 \pm 8,44\%$, что превышает действие одного изопротеренола в контроле ($p < 0,05$), но не достигает суммарного ответа при независимой активации рецепторов в контроле, которое составляет 168,7%. Совместный эффект агонистов при добавлении в последовательности 2-МАТФ+изопротеренол составляет $162,90 \pm 10,14\%$.

У 21-суточных крыс добавление 2-МАТФ на фоне изопротеренола увеличивает сократимость желудочков на 139,26%, что достоверно больше действия изопротеренола в контроле ($124,84 \pm 1,72$; $p < 0,05$) (Табл. 23). При обратной последовательности подачи веществ общий эффект влияния обоих агонистов составляет $141,61 \pm 4,02\%$. Совместное влияние агонистов при прямой и обратной последовательности подачи веществ не достигает суммарного ответа агонистов в контроле, которое составляет 156%.

Результаты сократимости предсердий и желудочков между прямой и обратной последовательностью подачи веществ не отличаются, что указывает на сумму эффектов изопротеренола и 2-метилтиоАТФ. Необходимо отметить, что в этом возрасте совместное влияние агонистов в последовательности «изопротеренол+2-метилАТФ» не достигает суммарного ответа агонистов при независимой активации рецепторов. При обратной последовательности подачи веществ, т.е. предварительной активации Р2-рецепторов 2-МАТФ и последующим добавлением

изопротеренола общий эффект влияния агонистов усиливается и приближается к суммарному ответу, что наблюдается в предсердиях. Представленные результаты показывают, что у 21-суточных крысят проявляется высокая чувствительность и функциональная активность P2X и P2Y-пуриноцепторов, что позволяет аналогу АТФ усиливать эффекты изопротеренола. Полученная зависимость доза-эффект отражает способность адренорецепторов сердца в этом возрасте реагировать только на очень низкие концентрации изопротеренола (10^{-12} М). Возможно одновременная, а лучше предварительная активация P2-пурицепторов на фоне высокой чувствительности β -адренорецепторов и присутствии малых доз агониста, приводит к усилению сократительной функции миокарда.

Аналогичный эффект мы наблюдали при анализе сократимости миокарда предсердий и желудочков у 56-суточных крыс. При добавлении 2-мАТФ на фоне изопротеренола сила сокращения предсердий увеличилась на $143,14 \pm 2,63\%$, что превышает действие одного изопротеренола в контроле ($127,55 \pm 1,56$; $p < 0,05$) (Табл. 24). При обратной последовательности подачи веществ общий эффект сократимости при совместном влиянии обоих агонистов достигает $147,34 \pm 2,51\%$, что превышает суммарный ответ агонистов при независимой активации рецепторов (138,7%).

У 56-суточных животных изопротеренол увеличивает сократительную функцию миокарда желудочков на $139,27 \pm 3,95\%$. Совместное влияние 2-мАТФ на фоне изопротеренола увеличивает силу сокращения на $150,03 \pm 4,03\%$ и соответствует суммарному ответу агонистов в контроле (152,8 %). При обратной последовательности подачи веществ, на фоне 2-мАТФ изопротеренол увеличивает силу сокращения желудочков на $157,62 \pm 9,07\%$.

Следовательно, у 56-суточных крысят при добавлении 2-мАТФ на фоне изопротеренола совместное влияние агонистов на сократимость миокарда предсердий и желудочков соответствует суммарному ответу агонистов, полученного при независимой активации рецепторов. Результаты сократимости между прямой и обратной последовательностью подачи веществ не отличаются, что также указывает на сумму эффектов изопротеренола и 2-метилтиоАТФ.

У 100-сут. крыс общее увеличение сократимости миокарда предсердий и желудочков при действии обоих агонистов в условиях прямой и обратной последовательности подачи веществ совпадает и составляет в предсердиях $134,99 \pm 2,89\%$ и $132,79 \pm 3,58\%$, а в желудочках $144,64 \pm 6,61\%$ и $145,07 \pm 6,99\%$ соответственно (Табл. 25). Общий эффект совместного влияния агонистов на сократимость предсердий при добавлении 2-мАТФ и соответствует сумме влияний 2-мАТФ и изопротеренола. У 100 сут. крыс добавление 2-мАТФ в присутствии изопротеренола в предсердиях и желудочках мало изменяет его действие в контроле. В предсердиях составляет $134,99 \pm 4,26\%$ и $124,74 \pm 4,89\%$, а в желудочках $144,64 \pm 6,61\%$ и $141,95 \pm 9,64\%$. Усиление влияния изопротеренола

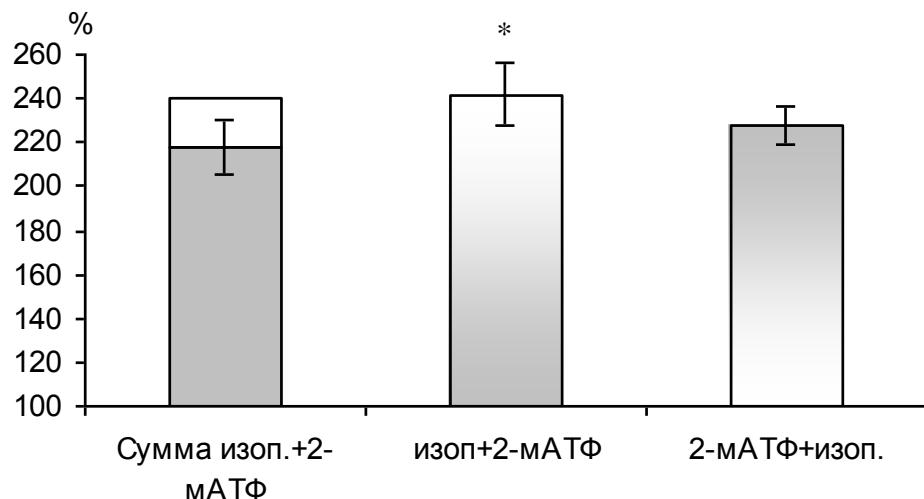
на сократимость миокарда в желудочках не наблюдается из-за отсутствия влияния 2-МАТФ на сократимость миокарда 100-сут. животных.

Общая длительность сокращений миокарда предсердий и желудочков при всех условиях эксперимента достоверно не изменялась.

Таким образом, у 21-суточных крыс в предсердиях и желудочках, у 56-суточных животных в предсердиях при совместном влиянии изопротеренола и 2-МАТФ наблюдается повышение силы сокращения миокарда, которое соответствует суммарному ответу агонистов, полученному при независимой активации рецепторов. Достоверных отличий в сократимости миокарда предсердий и желудочков при прямой и обратной последовательности подачи веществ не наблюдается, что указывает на сумму эффектов изопротеренола и 2-метилтиоАТФ. Наблюдаемые изменения силы сокращения миокарда при совместном влиянии агонистов были аддитивными, т.е. односторонними. Следовательно, увеличение сократимости миокарда агонистами β -адренорецепторов и P2-рецепторов осуществляется по собственным механизмам.

У 14-суточных крысят добавление 2-МАТФ снижает положительный инотропный эффект изопротеренола на сократимость желудочков, что характеризует (отражает) способность аналога АТФ ингибировать эффект изопротеренола. Использованная миллимолярная концентрация изопротеренола является пороговой для 14-суточных крысят, в то же время характеризуется как субмаксимальная, не физиологическая. Такая низкая чувствительность β -адренорецепторов подтверждает мнение многих исследователей, что в этом возрасте симпатическая иннервация сердца еще не сформирована. При низкой симпатической активности, незрелости рецепторных структур сердца, внеклеточная АТФ при участии P2-рецепторов ингибирует влияние изопротеренола.

A



Б

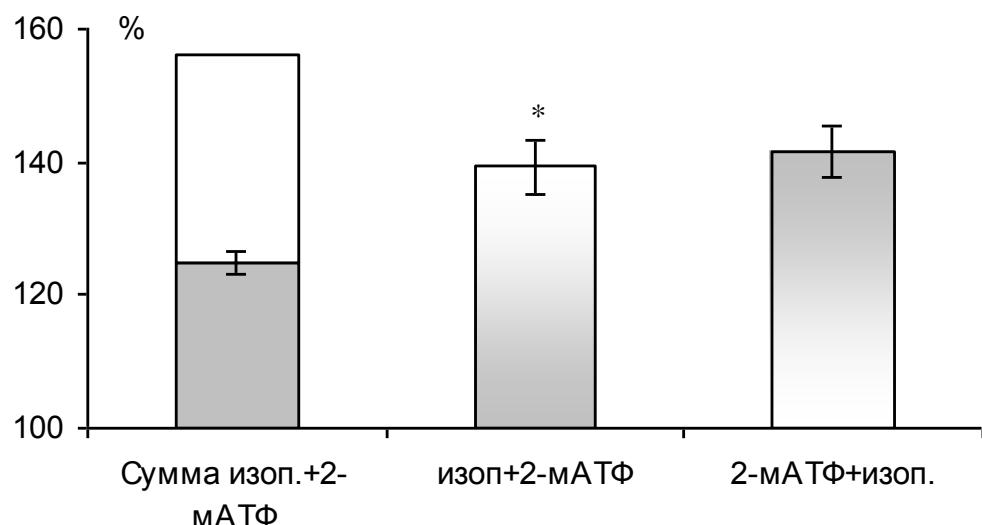


Рис. 37. Совместное влияние изопротеренола и 2-метилтиоАТФ на силу сокращения миокарда предсердий (А) 14-суточных крыс и и желудочков (Б) у 21- суточных крыс.

* достоверно по сравнению с влиянием изопротеренола в контроле ($p<0,05$).

Таблица 22

Сократимость миокарда 14-суточных крыс при совместном действии изопротеренола и 2-МАТФ
(в % от исх.)

Предсердия (n=9)	Сила сокращения			Длительность сокращения		
	10мин	20мин	30мин	10мин	20мин	30мин
Изопротеренол контроль	185,56±15,5	199,26±12,43	217,65±12,45	99,29±1,02	101,47±1,24	102,58±1,65
Изопротеренол+2-МАТФ	201,47±18,66	227,38±16,94	241,96±14,58*	101,80±0,48	102,07±0,93	103,46±1,40
2-МАТФ +изопротеренол	123,55±2,27	180,84±8,22	227,84±9,48	100,65±1,16	101,08±1,08	100,72±1,37
2-МАТФ контроль	120,54±1,40	122,40±2,10		86,3±1,1	84,3±0,3	
Желудочки(n =9)						
Изопротеренол контр.	165,27±15,66	174,47±15,74	183,02±18,21	99,29±1,02	99,64±0,95	102,21±3,57
Изопротеренол+2-МАТФ	181,62±24,07	177,78±24,34	171,31±21,11	100,07±0,79	99,64±0,95	98,54±1,62
2-МАТФ +изопротеренол	115,50±0,41	143,20±6,22	173,56±13,46	97,14±1,29	104,94±5,34	102,21±3,57
2-МАТФ контр.	116,25±2,61	125,80±6,20		86,9±4,1	85,2±4,7	

* достоверно по сравнению с влияние изопротеренола в контроле ($p<0,05$)

Таблица 23

Сократимость миокарда 21-суточных крыс при совместном действии изопротеренола и 2-МАТФ
(в % от исходного)

Предсердия (n=9)	Сила сокращения			Длительность сокращения		
	10мин	20мин	30мин	10мин	20мин	30мин
Изопротеренол контроль	112,19±1,60	124,87±3,07	135,61±4,50	99,87±0,045	99,47±0,70	100,01±0,54
Изопротеренол+2-МАТФ	112,11±1,69	137,61±5,81	156,89±8,44*	99,47±0,59	99,57±0,085	98,93±1,30
2-МАТФ+изопротеренол	121,37±0,71	143,26±4,57	162,40±10,14	99,83±0,53	100,40±0,30	100,01±0,24
2-МАТФ контроль	118,9±5,3%	131,1±7,4%		105,9±6,1	115,0±4,2	
Желудочки (n=9)						
Изопротеренол контр.	106,22±1,49	106,50±9,75	124,84±1,72	99,76±0,46	98,48±0,97	98,77±0,62
Изопротеренол+2-МАТФ	106,36±1,55	123,14±3,89	139,26±4,2*	100,07±0,49	99,53±0,55	100,42±0,58
2-МАТФ+изопротеренол	123,86±0,95	133,36±2,52	141,61±4,02	100,18±0,55	101,21±0,67	101,59±0,88
2-МАТФ контр.	123,4±6,6	131,4±7,2		108,7±6,6	112,4±6,0	

* достоверно по сравнению с влияние изопротеренола в контроле ($p<0,05$)

Таблица 24

Сократимость миокарда 56-суточных крыс при совместном действии изопротеренола и 2-МАТФ
(в % от исходного)

Предсердия (n=9)	Сила сокращения			Длительность сокращения		
	10мин	20мин	30мин	10мин	20мин	30мин
Изопротеренол контроль	107,72±0,79	117,15±1,11	127,55±1,56	100,15±0,21	99,06±0,78	99,59±0,58
Изопротеренол+2-МАТФ	108,37±0,84	128,89±2,10	143,14±2,63*	99,70±0,27	99,50±0,53	99,00±0,46
2-МАТФ +изопротеренол	113,17±1,49	132,87±1,99	147,34±2,51	99,90±0,72	99,64±1,36	98,45±1,22
2-МАТФ контроль	111,6±0,5	111,6±0,60		92,5±1,7	89,0±1,17	
Желудочки(n =9)						
Изопротеренол контр.	118,53±3,65	133,46±6,19	139,27±3,95	99,11±0,79	99,25±0,72	98,72±0,39
Изопротеренол+2-МАТФ	118,65±3,79	141,93±4,86	150,03±4,07	100,93±0,088	100,31±0,58	98,86±1,16
2-МАТФ +изопротеренол	114,47±0,30	139,95±6,54	157,62±9,07	96,78±1,50	98,11±4,33	100,40±5,48
2-МАТФ контр.	113,60±0,75	113,56±0,89		100,1±0,7	100,4±1,4	

* достоверно по сравнению с влияние изопротеренола в контроле ($p<0,05$)

Таблица 25

Сократимость миокарда 100-суточных крыс при совместном действии изопротеренола и 2-МАТФ
(в % от исходного)

Предсердия	Сила сокращения			Длительность сокращения		
	10мин	20мин	30мин	10мин	20мин	30мин
Изопротеренол контроль (n=9)	108,05±1,08	119,00±4,07	124,74±4,89	99,79±1,39	99,99±1,31	99,66±0,87
Изопротеренол+2-МАТФ (n=7)	115,48±4,87	126,61±5,25	134,99±4,26	99,31±1,66	100,81±1,59	99,66±0,68
2-МАТФ + изопротеренол (n=7)	107,47±0,907	128,20±5,40	135,36±3,58	97,86±1,97	98,97±2,52	98,44±2,84
2-МАТФ контр. (n=9)	106±4,9	106,3±5,1		99,5±0,8	100,02±0,9	
Желудочки						
Изопротеренол контроль (n=7)	116,92±5,11	130,59±7,59	141,95±9,64	96,54±2,53	95,11±3,26	87,42±7,04
Изопротеренол + 2-МАТФ (n=7)	117,56±4,35	132,68±4,97	144,64±6,61	97,86±1,97	98,97±2,52	98,44±2,84
2-МАТФ + изопротеренол(n=7)	107,01±0,32	126,99±3,97	145,07±6,99	99,41±0,68	100,05±0,85	99,96±1,09
2-МАТФ контр. (n=9)	106,7±4,1	106,8±3,9		100,06±0,81	100,04±0,9	

3.4. Участие Р2У-рецепторов в сократительной активности миокарда

3.4.1. Влияние УТФ на силу сокращения миокарда крыс в постнатальном онтогенезе

В настоящее время доказано, что уридин-5'-трифосфат (УТФ), как и АТФ выполняет функцию сигнальной молекулы и находится в везикулах вместе с основным медиатором, участвует в передаче нервных импульсов, выполняя функции котрансмиттера. В последние годы появились исследования, которые посвящены изучению защитного влияния УТФ при развитии ишемии сердца (Ninomiya H., Otani H., Lu K., Uchiyama T. et al., 2002; Wee S., Peart JN., Headrick JP., 2007). Показано, что УТФ выделяется в большей степени из кардиомиоцитов, при различных патофизиологических условиях, например, коронарная окклюзия, гипоксия, инфаркт миокарда и аритмия, то есть состояниях, сопровождающихся гибелью клеток и выходом АТФ и УТФ во внеклеточную среду с последующей активацией Р2- пуринорецепторов.

Метаболизм пиримидиновых нуклеотидов в сердце, к которым относится УТФ, на сегодняшний день, изучен очень мало. Концентрация этих нуклеотидов в миокарде очень низка (Rossi A. and Olivares J., 1998). Известно, что содержание урациловых нуклеотидов в миокарде ниже по сравнению с адениновыми нуклеотидами, т.е. с АТФ. Соотношение АТФ и УТФ в сердце соответствует 1:10 или 1:16 по мнению других авторов (Vassort G., 2001).

Присутствие внеклеточной УТФ считается доказанным, и урациловыми нуклеотидами активируются несколько подтипов Р2Y- рецепторов (Vassort G., 2001). Р2Y-рецепторы - это метаботропные рецепторы и в настоящее время известно 8 подтипов Р2Y- рецепторов.

В целом сердце, на сердечных миофибробластах, отдельных кардиомиоцитах (Zheng JS., 1998; Vassort G.; 2001; Talasila A., et al., 2009) эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов (Wang LW., Karlsson L., Moses S., et al., 2002) показано присутствие Р2Y_{1,2,4,6,11,12,13} подтипов рецепторов. Р2Y₂-, Р2Y₄ - и Р2Y₆ рецепторы активируются УТФ.

Целью данного исследования явилось изучение влияния УТФ разных концентраций на сократительную активность миокарда крыс в раннем постнатальном онтогенезе и определение подтипа Р2Y рецепторов, участвующих в сократительной активности миокарда крыс в раннем постнатальном онтогенезе.

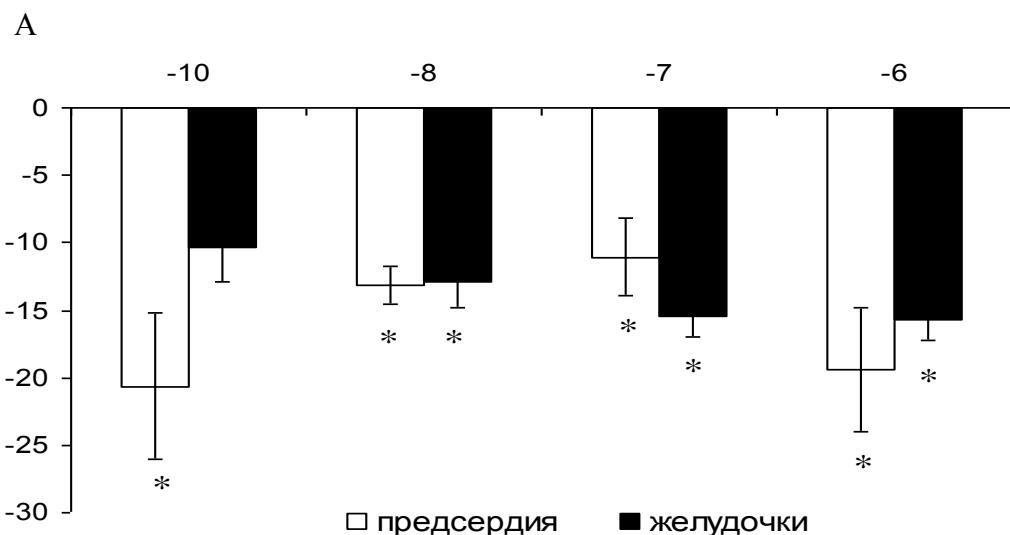
Все Р2Y - рецепторы фармакологически разделены на 3 группы по чувствительности к агонистам. Первая группа (Р2Y₁, Р2Y₁₁, Р2Y₁₂ и Р2Y₁₃) активируются адениннуклеотидами, т.е. АТФ и АДФ. Вторая группа (Р2Y₆) стимулируются урацилнуклеотидами УТФ и УДФ и третья группа (Р2Y₂ и Р2Y₄) отвечают на оба нуклеотида: урациловый и адениновый (Talasila A., et al., 2009).

В последние годы был найден высокочувствительный метод, позволяющий определить концентрацию внеклеточной УТФ, содержание которой соответствует субнаномолярной

концентрации (Lazarowski ER. et al., 2003). Поэтому для изучения дозозависимого эффекта мы выбрали диапазон концентраций агониста от 10^{-6} до 10^{-10} М. Экзогенная УТФ выше названных концентраций вызывает отрицательный инотропный эффект у 7-, 21- и 100- суточных животных как в предсердиях так и в желудочках.

У 7 – суточных крысят УТФ в концентрации 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-7} и 10^{-6} М оказывает приблизительно одинаковый эффект и уменьшает силу сокращения миокарда в предсердиях и в желудочках на 6-8% ($p<0,05$) (рис. 38). У 21-суточных крысят УТФ также уменьшает силу сокращения миокарда. Максимальный ингибирующий эффект сократительной активности миокарда предсердий наблюдается в концентрации 10^{-10} и 10^{-7} М и составляет приблизительно 19-22% ($n=8$) ($p<0,05$). В желудочках наиболее эффективными оказались концентрации 10^{-10} , 10^{-8} М, которые снижают сократительную активность миокарда на 18-22% ($n=8$) ($p<0,05$). У взрослых крыс максимальный эффект агониста наблюдается в концентрациях 10^{-10} и 10^{-6} М, сила сокращения предсердий и желудочков уменьшается на 18-21% ($n=6$) ($p<0,05$).

Следует отметить, что концентрации внеклеточной УТФ, близкие к физиологическим вызывают больший ингибирующий эффект инотропии сердца у 21 – и 100- суточных животных, по сравнению с 7-суточными ($p<0.05$).



Б.

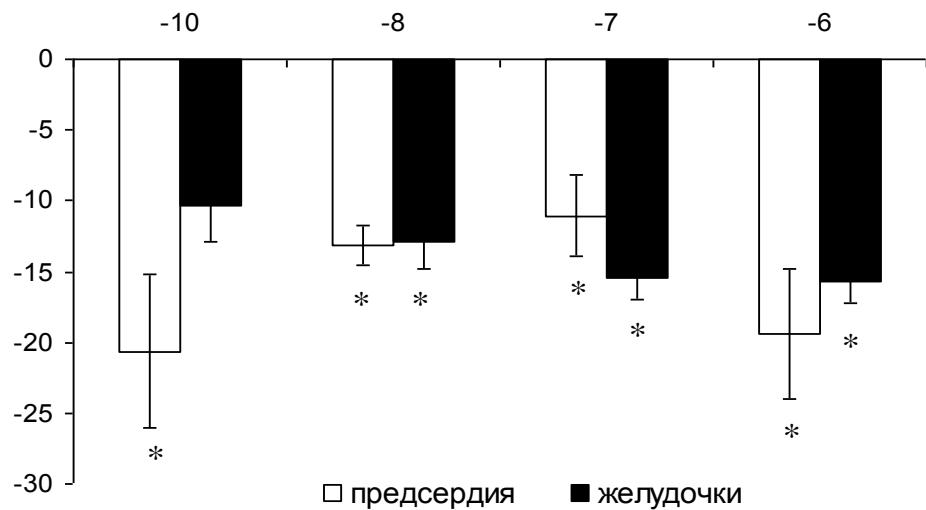


Рис.38. Влияние УТФ на силу сокращения миокарда предсердий и желудочков крыс 7- (А) и 100 - суточного возраста (Б);

*Примечание. ** - достоверно по отношению к контролю ($*p<0,05$)

3.4.2. Роль P2Y4 подтипа рецепторов в сократимости миокарда

В следующей серии экспериментов определяли подтип P2Y рецепторов, участвующих в наблюдаемых эффектах. Для определения возможного участия P2Y₄ подтипа рецепторов в сократимости миокарда, изучали влияние УТФ, как агониста этого подтипа рецепторов, на фоне блокады реактивом голубым-2 (RB2), (1,5 μ M) (Burnstock G. 2009). Сурамин и PPADS не являются эффективными блокаторами по отношению к P2Y₄ подтипу пуринорецепторов (Von Kugelgen I., 2006).

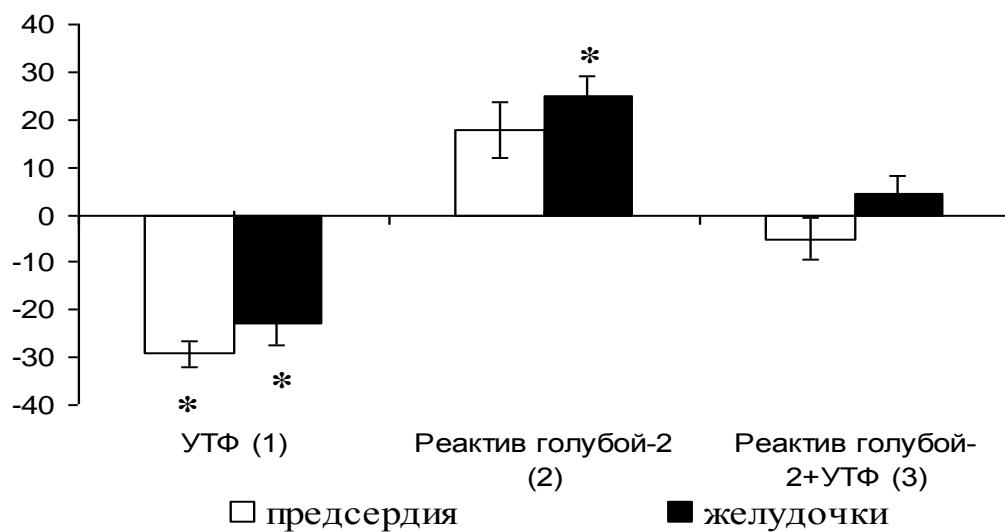
Реактив голубой-2 повышает силу сокращения миокарда предсердий и желудочков. УТФ добавляли после стабилизации эффекта антагониста, и регистрировали последующие 30 минут.

У 7-, 21-и 100- суточных животных после инкубации миокарда с реактивом голубым-2 отрицательный инотропный эффект УТФ не сохраняется. На фоне блокады P2Y₄ подтипа рецепторов добавление агониста не вызывает снижения сократимости миокарда (рис.39).

Таким образом, на ранних этапах онтогенеза, у 7 – и 21-и 100- суточных крыс реализация ингибирующего эффекта, вызванного УТФ, осуществляется через P2Y₄-подтип рецепторов. В литературе показано разнонаправленное влияние УТФ на деятельность сердца. Так, УТФ в концентрации 10⁻⁶-10⁻³М вызывает снижение силы сокращения миокарда правого предсердия

на 7-10%. Увеличение сократимости миокарда крыс при действии УТФ наблюдали (Froldi G. 2001; Vassort G., 2001). Двойной эффект при добавлении УТФ на сократимость миокарда предсердий и желудочков крыс описывает Froldi. Большая часть P2Y-рецепторов ($P2Y_{1,2,4,6,11}$) связаны с Gq/11-белком, который активирует фосфолипазу C, с образованием инозитолтрифосфата, увеличением Ca^{2+} в клетке и последующим увеличением силы сокращения миокарда. Отрицательный инотропный эффект может наблюдаться в ряде случаев при возбуждении $P2Y_2$ и $P2Y_4$ – подтипа рецепторов, которые активируются АТФ и УТФ и связаны с Gi/o белком. УТФ через активацию Gi/o белка ингибитирует аденилат циклазу, снижает образование цАМФ и уменьшает поступление Ca^{2+} в клетку, вызывая уменьшение сократимости миокарда (Talasila A., Germack R. and Dickenson 2009).

A



Б

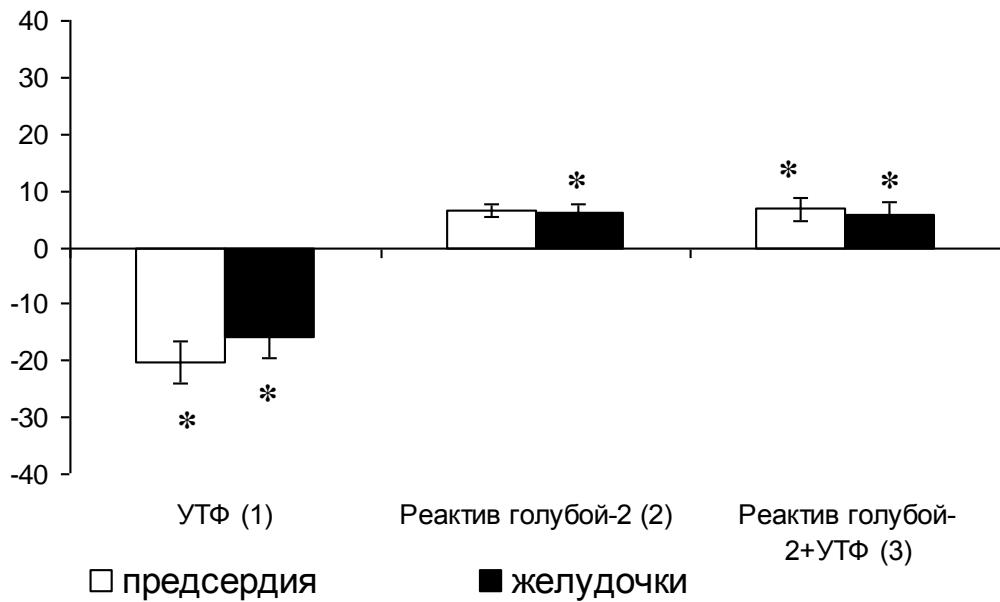


Рис. 39. Влияние УТФ в контроле и при блокаде реактивом голубым-2 у 21- (А) и 100-суточных животных (Б).

1- эффект УТФ (контроль)

2- действие реактива голубого-2 (контроль)

3- действие УТФ на фоне реактива голубого-2

*Примечание.** - достоверно по отношению к контролю ($*p<0,05$)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кроме хорошо известной роли аденоzinтрифосфорной кислоты, как внутриклеточного энергетического субстрата известно, что АТФ может регулировать многие внутриклеточные процессы через специфические Р2-пуриноцепторы. За последние три десятилетия накопился обширный фактический материал, свидетельствующий о важной роли АТФ в межклеточных взаимодействиях. Трудно найти клетку, в которой нет рецепторов для внеклеточной АТФ. А разнообразие и количество этих рецепторов превышает все известные подтипы рецепторов для «классических» нейромедиаторов и гормонов.

Одним из объектов, в котором пуриновые соединения могут играть важную роль является сердце. В литературе имеются убедительные данные о хронотропных, инотропных и аритмогенных воздействиях АТФ на сердце. Иммуногистохимический анализ тканей сердца показал широкое распространение чувствительных к внеклеточной АТФ Р2-рецепторов на сарколемме проводящих и рабочих кардиомиоцитах (T.Webb et al., 1996; M.Hansen et al., 1999). В сердце крысы обнаружены ионотропные Р2Х_{1,2,4,5} и метаботропные Р2У_{1,2,4,6,11} - подтипы пуринорецепторов (G.Vassort, 2001).

Интерес к изучению влияния АТФ на деятельность сердца основывается на различных, нередко противоположных результатах. По-прежнему остается нерешенным вопрос том, какое именно соединение оказывает эффект на пуринорецепторы сердца: АТФ или продукт ее гидролиза аденоzin? Результаты ранее проведенных исследований привели к убеждению, что механизм действия АТФ основан на непрямом эффекте, наступающем в результате гидролиза АТФ до активного аденоzина, действующего на собственные Р1-рецепторы (G. Burnstock and P. Meghji, 1983; G. Froldi et al., 1994, 1997; L.Ren et al., 2003). Согласно последним литературным данным вероятность собственного эффекта АТФ высока. Механизмы положительного хронотропного и инотропного влияния экзогенной АТФ при стимуляции Р2-рецепторов представлены в работах Benham et al., 1987; F.Scamps et al., 1990; J.Zheng et al., 1992; A. Qi and Y.Kwan, 1996; M.Pucéat and G.Vassort, 1996; M. Shoda et al., 1997; M.Jaconi et al., 2000; Q.Liu, R.Rosenberg, 2001; Q.Meи, B.Liang, 2001; J.Shen et al., 2007.

К настоящему времени накоплен обширный фактический материал, свидетельствующий о том, что пуриновые рецепторы могут представлять собой мишень для фармакологического воздействия и, следовательно, для создания лекарств принципиально нового механизма действия. Наличие синтезированных в последнее время агонистов и антагонистов для рецепторов, чувствительных к внеклеточной АТФ дают возможность более детального исследования влияния пуриновых нуклеотидов на основные функции сердца и возможном использовании агонистов этих рецепторов как кардиотонических средств при дисфункциях сердца. Эффекты АТФ при заболеваниях сердечно-сосудистой системы чаще всего связывают с продуктом ее гидролиза аденоzinом, который, активируя Р1-рецепторы, способен оказывать отрицательное ино - и

хронотропное влияние на сердце. Исследования показали, что использование аденоцина в дозе 70 мкг/кг/мин, в дополнение к реперфузионной терапии значительно (на 57%) уменьшает размеры инфаркта миокарда. Однако и сама АТФ способна оказывать антиаритмическое, гипотензивное и противосудорожное действие. Механизм действия больших доз экзогенной АТФ связывают с влиянием на АТФ-чувствительные калиевые каналы, активация которых вызывает гиперполяризацию клеток, вызывая вазодилатацию. Широкое применение АТФ как лекарственного препарата затруднено, потому что препарат быстро разрушается. Учитывая непродолжительность эффектов АТФ, сложности, связанные с путем введения, особый интерес для клинической практики представляют стабильные препараты АТФ, что достигается в присутствии ионов магния как ко-фактора. Применение стабильных аналогов АТФ (АТФ-форте) сопровождается модуляцией пуриновых рецепторов (В.М. Мороз, 2002), что представляет несомненный клинический интерес при ишемической болезни сердца, синдроме ишемии/реперфузии сердца (В.А. Козловский, 2008).

Хотелось бы остановиться на перспективах применения пуринергических веществ. Имеется большое число исследований, посвященных локализации пуринорецепторов в ЦНС, различных отделах головного мозга и возможному применения агонистов и блокаторов P2-рецепторов в клинике при инсультах, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона (M. Williams 1999 G. Burnstock 2000). В экспериментальных исследованиях доказано участие пуриновых рецепторов в ограничении зоны повреждения мозга, следовательно, агонисты этих рецепторов смогут выполнять нейропротекторную функцию.

Следующий аспект, где может оказаться перспективным применение стабильных аналогов – это акушерство и урология. Клинические испытания показали эффективность и безопасность одновременного использования АТФ и простагландинов для коррекции слабости родовой деятельности у женщин (Ю.Т., А.У. Зиганшин, 2006). Зефирова Выделяемая из нервных окончаниях АТФ вызывает сокращение гладкомышечные клетки семявыносящего протока и мочевого пузыря. Пуринергический компонент сократительного ответа мочевого пузыря у человека составляет не более 5%. При интерстициальном цистите (воспалении мочевого пузыря, сопровождающееся выделением из клеток большого количества АТФ) сокращение мочевого пузыря становится пуринергическим более чем на 50% (S. Palea 1993), при этом чувствительность ткани к агонистам P2X-рецепторов возрастает в несколько раз.

Интересные данные о физиологической функции экзогенной АТФ получены при изучении механизма возникновения боли. Выяснилось, что нервные окончания, отвечающие за формирование болевого сигнала чувствительны к низким концентрациям АТФ. Повреждение ткани сопровождается выходом АТФ из клеток и активацией P2X3-рецепторов, которые могут иметь большое значение в проведении болевой чувствительности. Имеются убедительные данные, что

они локализованы на ноцицептивных чувствительных нервных окончаниях и обнаружены в периферических чувствительных нейронах задних корешков спинного мозга (G.Burnstock, 2000, 2001; Cheh, 1995; Levis et al., 1995). Вещества, которые появляются при воспалении (гистамин, серотонин, брадикинин) усиливают ответы чувствительных нейронов на АТФ. Таким образом, появляется перспективная область для создания обезболивающих препаратов нового ненаркотического действия.

Перспективными направлениями вероятного клинического применения препаратов пуриновых соединений являются заболевания дыхательной системы, сахарного диабета, воспалительные и опухолевые процессы. Многие фармацевтические фирмы включаются в разработку пуринергических препаратов, поэтому можно ожидать появления на рынке новых лекарственных средств в ближайшее время.

Действие АТФ может быть реализовано ее прямым влиянием на кардиомиоциты и изменением активности регуляторных каналов сердца. Недавно установленное значение внеклеточной АТФ как нейротрансмиттера, регулирующего разнообразные функции организма, в настоящее время находит все новые подтверждения и общее признание. Исследования подтверждают наличие совместной секреции норадреналина, ацетилхолина и АТФ из симпатических и парасимпатических нервов и способность АТФ модулировать нервную передачу в сердце, увеличивая или ослабляя эффекты, производимые классическими медиаторами (G.Burnstock et al., 1989, 1999, 2006, 2009; L.Fieber et al., 1991; A.Pelleg et al., 1997; S.Ennion 2000; C.Sesti et al.; 2002; S.Boehm et al., 2003). Во всех синапсах вегетативной нервной системы вместе с НА медиаторами выступают АТФ и нейропептид Y, которые оказывают одновременное влияние на клетку. Но направленность, скорость развития и затухания эффекта значительно отличаются (О.С. Тарасова, 2005; В.А.Козловский, 2008). Самый быстрый медиатор – АТФ, затем идут норадреналин и нейропептид Y. Показано, что АТФ ингибирует освобождение НА через пресинаптические P2Y-рецепторы и ослабляет положительный инотропный эффект при стимуляции симпатических нервов в предсердиях крыс, (I. Kugelgen et al., 1996; B.Sperlagh et al., 2000; D.McKittrick, 2000). Известно, что внеклеточная АТФ вызывает депрессорные рефлексы и брадикардию сердца за счет стимуляции P2X-рецепторов, расположенных на вагусных афферентных волокнах, что имеет важное значение при ишемии и гипоксии сердца (G.Katchanov, 1996; A.Pelleg et al., 1997; Z.Xiang, 1998; J.Xu, 2005).

Представление о физиологической роли пуриновых рецепторов будет неполным, если не рассмотреть их взаимоотношения с рецепторами для других нейромедиаторов. В литературе имеются сведения о функциональном взаимодействии пуриновых рецепторов с холинорецепторами (А.Шакирзянова и др., 2005; E.Silinsky, R.Redman, 1996; R.Giniatullin, E.Sokolova, 1998; T.Searl, 1998). Исследования, проведенные на кардиомиоцитах предсердий,

показали, что экзогенная АТФ на фоне карбахолина двухфазно изменяет длительность потенциала действия, что подтверждает способность АТФ модулировать эффекты основного медиатора (Y.Hara, H.Nakaya, 1997). Взаимодействие между адренорецепторами и пуринорецепторами в сердце может проявляться и при активации внутриклеточных сигнальных путей (M.Pucéat et al., 1998).

Согласно гипотезе Д. Бернстока функцию медиатора АТФ начала выполнять еще на начальных этапах эволюции, задолго до появления основных медиаторов. АТФ считается одним из наиболее филогенетически древних нейромедиаторов. Возможно, ионотропные P2X-рецепторы, обнаруженные у примитивных организмов появились раньше метаботропных P1 и P2Y-рецепторов (G. Burnstock, A. Yerhatsky, 2009). Известно, что и в онтогенезе пуринорецепторы появляются одними из первых. Рецепторы к внеклеточной АТФ, наряду с М-холинорецепторами являются первыми функционально активными мембранными рецепторами, выявляемыми в период формирования зародыша (J.Liou, 1995; L.Sun et al., 1996; J.Shacher, 1997).

На сегодняшний день изучение пуринергической регуляции сердца в онтогенезе затрагивает только неонатальный период развития (T.Webb et al., 1996; Y.Bogdanov et al., 1998; M.Hansen et al., 1999; K.Cheung et al., 2003). Многие аспекты функционирования P2-рецепторов на важнейших этапах раннего постнатального онтогенеза остаются малоизученными, а постсинаптические эффекты АТФ отличаются в различных тканях и на разных этапах онтогенеза. (G.Vassort, 2001).

Различные подтипы P2-рецепторов имеют видовую и тканевую специфичность. АТФ является основным эндогенным лигандом P2-рецепторов, оказывая стимулирующее влияние практически на все подтипы пуринорецепторов. В настоящем исследовании было установлено, что агонист P2-рецепторов АТФ вызывает небольшое, но достоверное дозозависимое увеличение ЧСС у 14-100 суточных крыс. Литературные данные подтверждают, что пуринергически-вызванный ток не активируется АДФ, АМФ, ни аденоzinом, следовательно, действие АТФ опосредовано P2-пуринорецепторами.

Для доказательства того, что увеличение ЧСС было вызвано прямым действием экзогенного АТФ, вводили агонист P1-рецепторов аденоzin, которое оказалось неэффективным. Сохранение положительного эффекта АТФ на фоне блокады как β-адренорецепторов, так и М-холинорецепторов, позволяет высказать предположение о прямом действии АТФ на сердце.

Известно, что АТФ является нестойким веществом и в присутствии $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы быстро разрушается до аденоzина при однократном прохождении через сердце (Vassort G., 2001). Поэтому в следующей серии экспериментов был использован стойкий аналог АТФ α,β – метиленАТФ, являющийся агонистом преимущественно для P2X-рецепторов. Внутривенное введение α,β – метиленАТФ также вызывает положительный хронотропный эффект, однако он был кратковременным, что, возможно, вызвано быстрой десенситизацией P2-рецепторов сердца.

Известно, что α,β – метилен –АТФ селективно снижает чувствительность P2X₁- P2X₂- и P2X₃ -рецепторов сердца (Ralevic V. et al., 1991, 1998; Vassort G., 2001), поэтому данный фармакологический препарат в последующих экспериментах не использовался.

Таким образом, все используемые агонисты P2-пуриноцепторов: АТФ, α,β -метиленАТФ и β,γ -метиленАТФ вызывают дозозависимое от возраста увеличение ЧСС. От 14 к 100-суточному возрасту концентрации АТФ и ее аналогов, вызывающие положительную хронотропную реакцию снижаются. Полученные результаты указывают на более высокую чувствительность сердца к агонистам P2X - рецепторов на ранних этапах постнатального онтогенеза. Все агонисты P2X-рецепторов вызывают кратковременное, но достоверное увеличение ЧСС у 14-100 суточных крыс. Данный эффект развивается быстро и длится недолго. В основе механизма положительного хронотропного эффекта АТФ лежит возбуждение P2X-рецепторов, активация неселективных катионных каналов с преобладанием проницаемости для ионов кальция. Вызванная деполяризация клетки является достаточной для активации потенциалзависимых Ca^{2+} каналов L-типа и дополнительному току Ca^{2+} внутрь клетки. В ряде работ показана значительная роль внеклеточной АТФ в появлении кальциевых токов и развитии потенциала действия в клетках синусно-предсердного узла (F.Scamps and G. Vassort, 1990; A.Christie, 1992; Y.Qi and Y.Kwan, 1996). С другой стороны, трудно ожидать значительный эффект на ритм синусного узла, потому что внеклеточная АТФ активирует независимый от времени, слабо входящий неселективный катионный ток (M.Shoda et al., 1997). Таким образом, АТФ-вызванные неспецифические катионные токи деполяризуют клеточную мембрану и вызывают спонтанную автоматию.

При внутривенном введении АТФ и ее аналогов необходимо учитывать, что АТФ участвует в регуляции артериального давления, т.е. является вазоактивным. АТФ как котрансмиттер выделяется вместе с НА из периваскулярных симпатических нервов и активируя P2X-рецепторы, расположенные на гладкомышечных клетках сосудистой стенки вызывает вазоконстрикцию. АТФ выделяется из эндотелиальных клеток, например при гипоксии, агрегации тромбоцитов и, действуя, на P2Y-рецепторы приводит к вазоделатации (Burnstock, 1987). Кроме того, АТФ быстро гидролизуется до аденоцина, который активируя A1 и A2 рецепторы может вызывать как вазоконстрикцию, так и вазодилатацию (V. Ralevic , G. Burnstock , 1998; T. Nagatomo et al., 2004). Поэтому для более точного анализа пуринергической регуляции сократительной активности сердца была использована адекватная модель – регистрация сократительной активности полосок миокарда, позволяющей однозначно трактовать результаты наблюдений.

АТФ вызывает дозозависимое увеличение силы сокращения миокарда предсердий и желудочеков. АТФ в концентрации 10^{-7} и 10^{-6}M оказывает положительное действие, а при дальнейшем увеличении концентрации мы наблюдали уменьшение сократимости миокарда. Известно, что АТФ является нестойким веществом, в течение короткого времени под действием

экто-АТФазы она гидролизуется до аденозина, который оказывает влияние через свои собственные Р1-пуринорецепторы.

Поэтому в следующей серии экспериментов изучалось влияние АТФ на сократимость полосок миокарда на фоне неселективного блокатора Р1-пуринорецепторов 8-фенилтеофелина. В этих условиях положительный инотропный эффект высоких концентраций АТФ сохраняется.

Подтипы Р2-рецепторов отличаются не только особенностями молекулярной структуры, но и чувствительностью к действию различных производных пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Выбор препарата 2-метилтио-АТФ определялся тем, что во-первых, он являлся стойким аналогом АТФ, а также агонистом как Р2Х- так и Р2Ү1-рецепторов сердца.

Добавление 2-метилтио-АТФ увеличивает силу и изменяет длительность сокращения миокарда предсердий и желудочков. Концентрация агониста, вызывающая положительный инотропный эффект увеличивается, от 14-ти к 100-суточному возрасту, что подтверждает высокую чувствительность миокарда к агонисту Р2-рецепторов на ранних этапах онтогенеза. Реакция сократимости полосок миокарда при действии 2-метилтиоАТФ, отражающая функциональную активность Р2-рецепторов снижается от 21 к 100-суточному возрасту. Следовательно, и чувствительность Р2-рецепторов миокарда к агонисту и функциональная активность этих рецепторов особенно высока у животных на ранних этапах постнатального онтогенеза. Это 14- и 21- суточные животные. Затем активность рецепторов постепенно снижается.

Для определения семейства Р2-рецепторов, участвующих в положительном хронотропном и инотропном эффекте, использовали селективные блокаторы Р2Х и Р2Ү-рецепторов

Реактив голубой-2 - антагонист с преимущественным действием на Р2Ү-пуринорецепторы. В нашем случае 2-метилтиоАТФ является агонистом Р2Ү₁-рецепторов сердца, а реактив голубой -2 показывает стойкий ингибирующий эффект по отношению к этим рецепторам (A. Hopwood, 1987). Блокатор добавляли в концентрации 1,5 мМ (G.Burnstock, 2006).

При блокаде Р2Ү-рецепторов 2-метилтиоАТФ достоверно увеличивает силу сокращения предсердий и желудочков во всех возрастных группах. Это доказывает участие в реализации положительного инотропного эффекта Р2Х-рецепторов сердца, однако, их функциональная активность на разных этапах онтогенеза различна. Так, в предсердиях у 21-суточных крысят сила и общая длительность сокращения полосок миокарда предсердий на действие агониста достоверно выше, чем у 100-суточных. У 56- и 100-суточных животных сила сокращения миокарда желудочков на действие агониста выше, чем у 14-суточных. Следовательно, роль Р2Х-рецепторов в увеличении сократительной активности от 14-к 100-суточному возрасту в предсердиях снижается, а в желудочках возрастает. Возможно, это связано с более ранними сроками развития миокарда предсердий (В.Швалев и др.1992; 2001).

В настоящее время установлено, что PPADS (пиридоксальфосфат-6-азофенил-2'4'-дисульфоновая кислота) является антагонистом всех рецепторов семейства P2X, кроме P2X₄ – и P2X₆ – подтипов, а в больших концентрациях угнетает P2Y₁-рецепторы (G. Collo et al., 1996; M. Boarder et al., 2001; G. Vassort, 2001). Однако однозначного ответа о выраженности блокирующего эффекта PPADS по отношению к P2Y₁-рецепторам не существует. Показано, что этот агонист бывает инертен по отношению P2Y₁-опосредованному ответу (А. Зиганшин, 2004; Рычков, 2007; I. Chessel, 2001; G. Burnstock, 2009). В наших экспериментах PPADS, блокатор P2X-рецепторов в концентрации 30 микроМ (A. Rubino, 1992) достоверно снижала эффекты 2-метилтиоАТФ у 14-, 21-и 56-суточных крысят. У 100-суточных животных PPADS не устраняет положительного инотропного влияния 2-метилтиоАТФ на сократительную активность миокарда. Сила сокращения миокарда повышается, что указывает на участие P2X₄ – рецепторов. Таким образом, наблюдается гетерохронное проявление функциональной активности разных подтипов P2X-рецепторов в предсердиях и желудочках сердца крыс.

Иммуногистохимический анализ тканей сердца крысы показал присутствие P2X_{1,2,4,5} – подтипов пуринорецепторов на сарколемме рабочих кардиомиоцитов (M. Hansen et al., 1999). В доступной нам литературе мы не нашли данных о возрастных особенностях локализации или функциональной активности P2X-рецепторов в сердце. Наши результаты указывают на участие P2X₁, P2X₂ и P2X₅-рецепторов в сократимости миокарда предсердий и желудочков крыс 14, 21 и 56-суточного возраста. Характер действия PPADS и ответы агониста могут также косвенно указывать на участие в повышении сократимости и P2Y₁-рецепторов. Подтверждением выдвинутого предположения являются иммуногистохимические данные о возрастных особенностях локализации P2Y-рецепторов в сердце. Так, экспрессия P2Y-рецепторов в целом сердце и отдельных кардиомиоцитах меняется в онтогенезе и для P2Y₁-рецепторов она усиливается (T. Webb, 1996; G. Vassort, 2001).

Таким образом, проведенные серии экспериментов с использованием разнообразных агонистов и блокаторов позволили получить новые данные о вероятном вовлечении различных подтипов P2-рецепторов в регуляцию сократимости миокарда в постнатальном онтогенезе. Возрастные особенности функциональной активности пуринорецепторов, участвующих в повышении сократимости миокарда, указывают на гетерохронное созревание разных подтипов P2X - и P2Y₁ - рецепторов в предсердиях и желудочках. Роль P2X-рецепторов в реализации положительного инотропного эффекта предсердий снижается от 14 к 100-суточному возрасту, и является максимальной у 21- и 14-суточных крыс, а в желудочках, наоборот, возрастает. Участие P2X₄ и P2Y₁-рецепторов на действие 2-метилтио-АТФ в повышении сократимости миокарда предсердий и желудочков на ранних этапах онтогенеза незначительно и проявляется только у 100-суточных крыс.

Для определения подтипа P2X-рецепторов, участвующих в реализации положительного хронотропного и инотропного эффекта использовали селективный агонист и антагонист этих рецепторов. Известно, что β , γ -метиленАТФ оказывает свое преимущественное действие на P2X₁-пуринорецепторы сердца. Известно, что АТФ усиливает инотропизм и изменяет активность водителя ритма при взаимодействии с P2X-рецепторами через кальций-зависимый механизм. Поэтому выбор агониста β , γ -метиленАТФ не случаен. Проводимость Ca^{2+} -каналов у P2X₁-рецепторов самая высокая и превышает таковую у P2X₂ рецепторов (PCa/PNa равна 3,9 и 2,2 соответственно; R. Evans et al., 1996). Этот подтип рецепторов располагается не только на кардиомиоцитах, но и вблизи контактов с симпатическими и парасимпатическими нервными окончаниями. Полученные результаты при введении β , γ -метилен-АТФ в концентрации 10^{-13} – 10^{-8}M и последующем увеличении ЧСС у крыс 14-100-суточного возраста подтверждают участие P2X₁-пуринорецепторов в положительном хронотропном эффекте.

В экспериментах на полосках миокарда нами установлено, что β , γ метилен - АТФ в концентрации 10^{-13} – 10^{-10} M вызывает дозозависимое увеличение силы сокращения миокарда предсердий и желудочков крыс в постнатальном онтогенезе. Полученные результаты увеличения сократимости миокарда, опосредованные P2X₁-рецепторами свидетельствуют о высокой чувствительности миокарда к агонистам и функциональной активности этих рецепторов у 14- и 21-суточных крысят. Доказательством участия P2X₁-рецепторов служили эксперименты с селективным антагонистом P2X₁-P2X_{2/3}-рецепторов TNP-АТФ, который полностью предупреждает влияние β , γ -метиленАТФ на сократимость миокарда, что подтверждает участие P2X₁-рецепторов в положительном инотропном эффекте.

Формирование системы регуляции сердечной деятельности в онтогенезе связано с созреванием большого количества структурно-функциональных звеньев и является одним из условий обеспечения гомеостаза организма при изменяющихся условиях среды. Многие современные исследователи связывают возрастные изменения деятельности сердца с перестройкой системы рецепторных образований в сердце. Следовательно, изучение регуляции на рецепторном уровне имеет большое значение для раскрытия механизмов регуляторных влияний на уровне целого организма.

В жизненном цикле крыс выявлено три фазы, но наиболее важной и значительной является первая фаза - прогрессивного роста (от рождения до семи месяцев).. От рождения до 100-суточного возраста осуществляются значительные структурно-функциональные и регуляторные изменения сердечно-сосудистой системы, происходит созревание рецепторного аппарата сердца, перестраиваются симпато-адреналовая и эндокринная системы. Нами выбраны животные нескольких возрастных групп. Крысы в возрасте 14, 21, 56, 100 сут, соответствуют среднемолочному, молочному, пубертатному и половозрелому периодам развития и имеют разную

степень зрелости и активности регуляторных влияний на сердце. У 14-суточных крысят симпатическая иннервация сердца еще не сформирована. Для этого возраста характерно ее минимальное присутствие. 21-суточные крысята характеризуются повышением активности симпатической нервной системы. У 21 и 28 – суточных животных зафиксировано максимальные значения ЧСС (Т.Л.Зефиров и Ф.Г.Ситдиков, 2005), что соответствует результатам других авторов. По данным других авторов у крыс с 3 по 6 неделю происходит становление симпатической регуляции сердца (S.Rockson et al., 1981; R.Xiao et al., 1995). Возраст 7-8 недель (56-суточные крысы) соответствует пубертатному периоду развития, сопровождающему выраженными изменениями эндокринной системы, оказывающей активное влияние на регуляцию сердечной деятельности. На этом этапе онтогенеза нарушается возрастное урежение ЧСС и вновь наблюдается ее увеличение (Зефиров Т.Л., 1999). Многие авторы подчеркивают возрастную зависимость влияния эндокринной системы на механизмы, регулирующие хронотропную и инотропную функции сердца (Slavicova et al., 1993; Mac Gregor et al., 1995).

Изменения деятельности сердца с возрастом затрагивают, в первую очередь энергетический обмен. При этом замедляется использование жирных кислот в процессах биологического окисления в миокарде, уменьшается способность миокарда использовать в качестве энергетического субстрата молочную кислоту, уменьшается количество митохондрий, снижается активность ферментных систем клеточного дыхания, в результате количество потребляемого кислорода миокардом уменьшается. Уменьшение интенсивности окислительных процессов в стареющем сердце сопровождается также снижением концентрации АТФ и креатинфосфата в кардиомиоцитах и как следствие – сократительной функции миокарда (Б.И. Ткаченко, 1998). Надо отметить, что АТФ относится к митогенам (Fu, 1994).

Следует отметить, что на данном этапе постнатального развития белых крыс установлены максимальные среднесуточные приrostы массы сердца (с 21 по 30 день, Р.Нигматуллина, 1991). Деление кардиомиоцитов у крыс полностью прекращается к 21 суткам жизни и в период с 21 по 30 день идет усиленный рост образовавшихся кардиомиоцитов (Ф.Меерсон, 1968). Высокий уровень метаболизма в растущем организме сопровождается ускорением синтеза и распада АТФ, что приводит к увеличению АТФ во внеклеточной среде. Высокая чувствительность сердца к агонистам P2-рецепторов возможно, связана с высоким уровнем метаболизма в растущем организме, сопровождающаяся усилением синтеза и распада АТФ. В многочисленных работах показано, что при повышении метаболизма усиливается образование аденоцина, АДФ и АМФ (Bardenheuer et al., 1986; Deussen, 1988). Источниками внеклеточной АТФ может быть аденоцин, образующийся внутри и вне клеток и способный активно транспортироваться через клеточные мембранны путем облегченной диффузии. Роль переносчика выполняет специальный транспортный белок (Conant, Jarvis, 1994). При введении аденоцина в кровь происходит преимущественно его

фосфорилирование с образованием АТФ (Елисеев 2000). АТФ также освобождается путем трансмиссии и увеличение содержания АТФ как ко-медиатора возможно при усилении активности симпатических и парасимпатических влияний на сердце. Выход АТФ в межклеточное пространство может проходить не только путем контрансмиссии, но и через гемиканалы, что показано на сердечных фибробластах в условии механического напряжения (S. Soleymani et al., 2008).

Необходимо отметить отсутствие единого мнения о возникновении и становлении нервных влияний на сердце. По мнению многих исследователей, преимущественное влияние вегетативной регуляции на деятельность сердца наблюдается лишь на начальных этапах развития организма (M. Horowitz et al., 1993). В литературе показано, что парасимпатическая иннервация формируется к моменту рождения (W.Marvin et al., 1980). В литературе имеются данные, что парасимпатическая нервная система в онтогенезе крыс начинает функционировать раньше симпатической (Б.Кулаев, 1981, Ф.Г.Ситдиков, Т.Л.Зефиров , 2006). Некоторые исследователи утверждают, что парасимпатический контроль над ЧСС устанавливается после 11-12 дней жизни крысят (I. Slavikova, S. Tucek, 1982, D. Tuc, A.Jonson, 1984). По другим данным парасимпатическая иннервация формируется полностью к концу первого месяца постнатального развития. Другие исследователи подчеркивают, что иннервация сердца крысы приобретает черты, свойственные взрослому организму на 30-60 дни постнатального онтогенеза (Е. Крохина 1973; В. Швалев и др. 1992; В.Швалев и А.Сосунов. 2001).

Возрастные изменения основных функций сердца обусловлены несколькими факторами. Главными являются зрелость внутрисердечного нервного аппарата, функциональная активность определенных типов рецепторов, связанных с ними G-белков и готовность внутриклеточных сигнальных путей. Сердце начинает реагировать на нейромедиаторы значительно раньше установления влияний со стороны центральных механизмов регуляции его деятельности. В раннем постнатальном онтогенезе наблюдается определенная последовательность в формировании отдельных звеньев нейрогуморальных влияний на деятельность сердца (Я.И.Ажипа, 1990). Но, несмотря на раннюю готовность периферического аппарата вагуса к функционированию, он не используется, в связи с отсутствием рефлекторных влияний со стороны его центров.

Изучение взаимодействия адренорецепторов, холинорецепторов и пуриноцепторов сердца является необходимым, так как исследуемые системы функционируют одновременно и имеют ярко выраженные возрастные особенности на ранних этапах постнатального онтогенеза. Полученные данные по совместному влиянию агонистов позволяют лучше понять роль исследуемых рецепторных систем в регуляции сократимости миокарда.

При совместном действии изопротеренола и 2-метилтио-АТФ у 21 и 56-суточных крыс добавление 2-метилтио-АТФ на фоне положительного инотропного эффекта, вызванного изопротеренолом, происходит дальнейшее увеличение сокращения миокарда.

Положительный инотропный эффект совместного влияния изопротеренола и аналога АТФ являлись дополняющими т.е. аддитивными, что подтверждается отсутствием разницы в показателях сократимости между прямой и обратной последовательностью подачи веществ. Однонаправленность изменений в сократимости миокарда при совместном влиянии изопротеренола и 2-метил-АТФ позволяет говорить о вовлечении разнообразных механизмов реализации эффектов β -адренорецепторов и P2-пуриноцепторов.

При повышении симпатических регуляторных влияний на фоне высокой функциональной активности β – адренорецепторов и P2X-рецепторов сердца крыс 21-, 56- суточного возраста совместное действие агонистов приводит к развитию дополняющего друг друга эффекта в увеличении сократимости миокарда. Повышение сократимости миокарда при совместном влиянии агонистов является результатом активации β -адренорецепторов и P2X-, в частности P2X₁-рецепторов. При возбуждении β -адренорецепторов увеличивается уровень цАМФ и стимулируется протеинкиназа А. Происходит открытие Ca^{2+} -каналов L – типа и увеличивается вход Ca^{2+} в цитозоль клетки. Внеклеточная АТФ стимулирует входящий неселективный катионный ток. Вызванная деполяризация приводит к дополнительному току Ca^{2+} внутрь клетки через потенциал-зависимые кальциевые каналы L-типа и дополнительному поступлению Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума. Увеличивается внутриклеточная концентрация кальция. Свободный кальций саркоплазмы соединяется с регуляторным белком тропонином, увеличивая образование актомиозиновых комплексов и запуская сократительный ответ. Оба пути вызывают усиление сокращения миокарда.

У 14-суточных крысят совместное действие изопротеренола и 2-метилтио-АТФ уменьшает силу сокращения миокарда. Изопротеренол в миллимолярной концентрации является пороговой дозой для 14-суточных крысят, и относится к субмаксимальной, не физиологической. Такая низкая чувствительность миокарда к агонисту β -адренорецепторов подтверждает мнение многих исследователей, что в этом возрасте симпатическая иннервация сердца еще не сформирована. Возможным механизмом уменьшения сократимости является снижение содержания цитозольной АТФ в результате активации аденилатциклазы при взаимодействии β -адренергических рецепторов с изопротеренолом. Известно, что снижение концентрации внутриклеточной АТФ до микромолярных концентраций, например, при искусственном стрессе, вызванном большими дозами изопротеренола, вызывает появление КАТФ токов, приводящих к гиперполяризации (Nakashima M., 2005).

Пуринорецепторы и адренорецепторы имеют сходные внутриклеточные пути, поэтому возможен и второй путь увеличения сократимости миокарда при совместном влиянии изопротеренола и 2-метилтиоАТФ. Для Р2У₁-и Р2У₁₁ - рецепторов сердца активными являются только пуриновые соединения и 2-метилтиоАТФ в ряду эффективности агонистов стоит на втором месте. Следовательно, при совместном влиянии выбранных агонистов происходит активация β-адренорецепторов и Р2У - рецепторов, которые являются метаботропными рецепторами и имеют общий механизм внутриклеточной регуляции с участием цАМФ.

Роль этого вторичного посредника при взаимодействии классического нейромедиатора норадреналина с β-адренорецепторами считается общепризнанной. Данные о модулирующем влиянии АТФ на уровень внутриклеточного цАМФ в сердечных клетках, долгое время были весьма противоречивыми. Повторные изучения эффектов пуринергических агонистов в желудочках у крысят показали увеличение уровня цАМФ при активации Р2У₁₁-рецепторов (M. Pucéat et al., 1998; J. Balogh et al., 2005). И АТФ и изопротеренол увеличивают уровень цАМФ в кардиомиоцитах. Однако, в кардиомиоцитах крысы пуринергическая и бета-адренергическая стимуляция активируют разные изоформы циклазы. Для пуринергической стимуляции специфической мишенью является аденилатциклаза V, а бета-адренергической стимуляции аденилатциклаза других изоформ (M. Pucéat et al., 1998). Следовательно, изопротеренол и АТФ активируют одинаковый каскад внутриклеточных биохимических реакций, но осуществляются они через разные мембранные ферменты. Также при взаимодействии АТФ с Р2У_{1,2,3,4,6}-рецепторами происходит активация основного внутриклеточного сигнального пути с участием фосфолипазы С, которая гидролизует фосфоинозитиды с образованием инозитолтрифосфата и диацилглицерола, что приводит к увеличению концентрации кальция в цитозоле и сократимости миокарда.

У 21-суточных крысят при высокой функциональной активности М2-холинорецепторов и Р2-рецепторов сердца 2-метилтио-АТФ снижает угнетающий эффект КХ на сократимость миокарда. При предварительной активации Р2-рецепторов, добавление КХ приводит к появлению фазы «плато» в сократимости миокарда предсердий и желудочков что подтверждает «кардиотропный» эффект АТФ. В основе наблюданного явления лежит АТФ-вызванная стимуляция Р2Х-рецепторов, появление неспецифических катионных токов, которые деполяризуют клеточную мембрану и вызывают потенциалзависимые кальциевые токи L-типа. Кальциевый механизм, лежащий в основе физиологических ответов Р2Х-рецепторов увеличивает сократимость миокарда. На сегодняшний день установлено, что чувствительность холинорецепторов может регулироваться АТФ. При этом АТФ не только увеличивает сродство ацетилхолина к холинорецепторам, но и повышает вероятность открытия ионных каналов (Akasu, 1981).

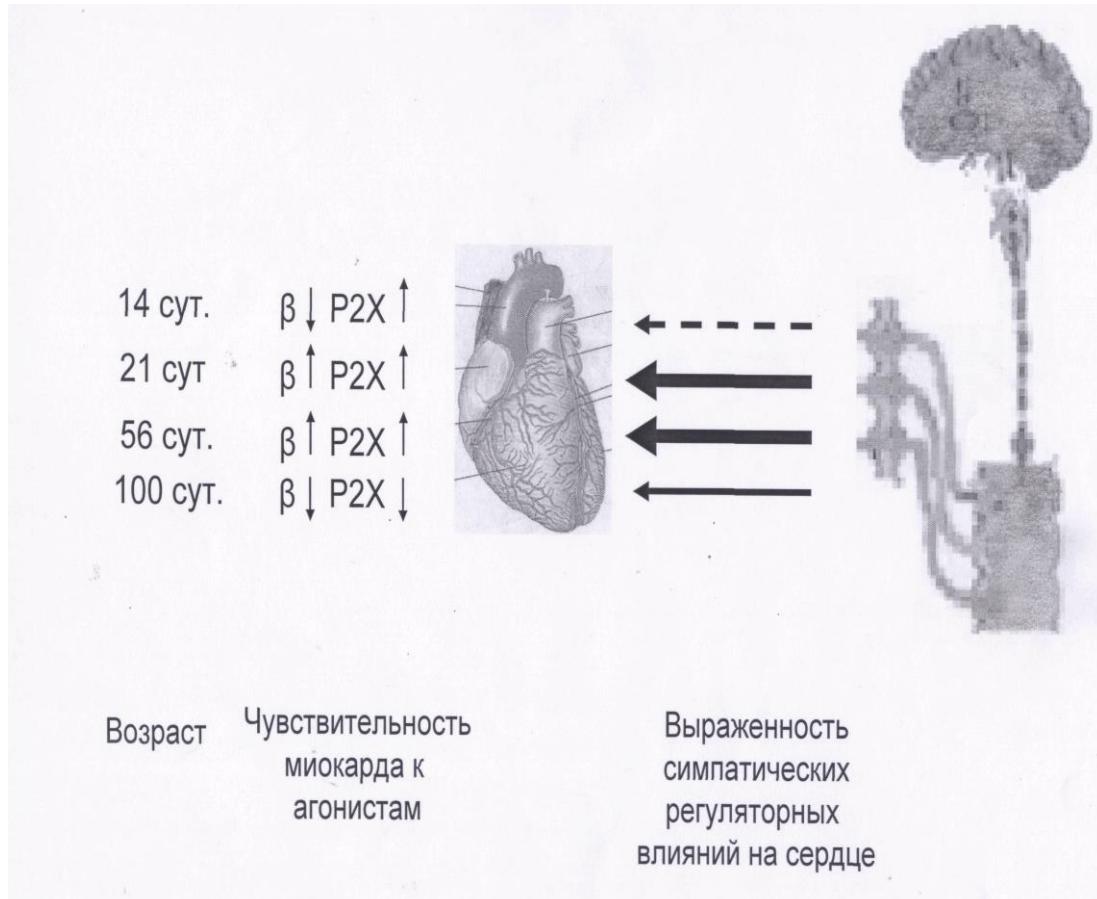
Исследования подтвердили, что на фоне активации М-холинорецепторов карбахолином, наблюдаются двухфазные изменения потенциала действия кардиомиоцитов при действии внеклеточной АТФ. Связывание агонистов с рецепторами вызывает усиление наружу направленного К⁺-тока через ацетилхолин-зависимые и АТФ-зависимые калиевые каналы, что приводит к укорочению длительности потенциала действия, которое затем отменяется. (Y.Hara, H.Nakaya, 1997).

В литературе также показан еще один путь активации АТФ-чувствительных калиевых каналов. Внеклеточная АТФ активируя аденилатциклазу, вызывает истощение цитозольной АТФ. Это является достаточным для усиления АТФ-чувствительного К⁺-тока, который развивается при низком уровне АТФ в миоцитах желудочков (A Babenko, G. Vassort, 1997).

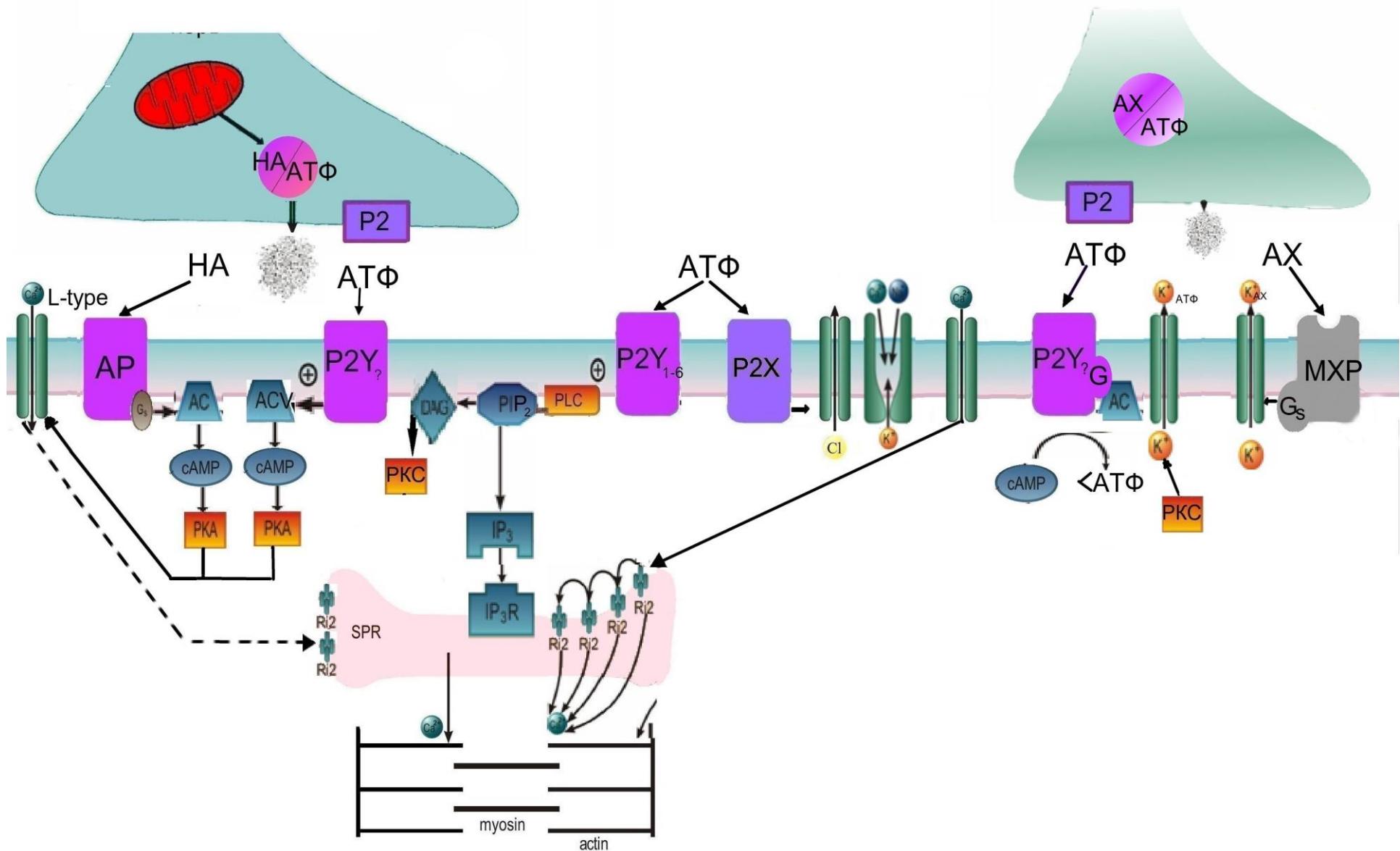
Диацилглицерол служит источником арахидоновой кислоты, активирующей гуанилатциклазу. Этот путь регуляции имеет особое значение для реализации эффектов холинергической импульсации и функции мускаринчувствительных холинорецепторов, для которых роль цГМФ общепризнанна. Следовательно, в системах вторичных посредников – цГМФ и фосфоинизитидной – существует функциональная взаимосвязь через стадию образования арахидоната, обеспечивающая интегральный характер регуляции биохимических процессов в клетке (И.П. Ашмарин, 1996). Увеличение количества арахидоновой кислоты может также опосредовать АТФ-вызванную активацию К⁺ тока в сердечных клетках крысы (F. Aimond et.al., 2001).

Таким образом, в раннем постнатальном онтогенезе, влияния АТФ на эффекты основных медиаторов определяются активностью симпатических и парасимпатических регуляторных влияний на сердце, функциональной активностью адрено - , холинорецепторов, пуриноцепторов и этапами биологического созревания организма.

СИМПАТИЧЕСКИЕ ВЛИЯНИЯ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ АДРЕНО - И
ПУРИНОРЕЦЕПТОРОВ МИОКАРДА К АГОНИСТАМ В ОНТОГЕНЕЗЕ



Возможные пути реализации пуринергической, адренергической и холинергической регуляции сердца



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абзалов Р.А. Развивающееся сердце и двигательный режим. / Абзалов Р.А., Ситдиков Ф.Г. // Казань: КГПУ, 1998.-96 с.
2. Абзалов Р.А. Регуляция функций сердца неполовозрелого организма при различных двигательных режимах / Абзалов Р.А. // Автореф. ...докт. биол. наук. – Казань, 1987. – 33с.
3. Адольф Э.Ф. Развитие физиологических функций / Адольф Э.Ф. – М.: Мир, 1971.- 192с.
4. Авакян О.М. Симпато-адреналовая система / Авакян О.М. // Л.: «Наука», 1977.-
5. Авакян О.М. Фармакологическая регуляция функций адренорецепторов. М.: «Медицина», 1988.- 256 с.
6. Адольф Э.Ф. Развитие физиологических функций / Адольф Э.Ф. – М.: Мир, 1971.- 192с.
7. Александрова Л.А. Чувствительность и реактивность сердца крыс к экзогенным катехоловым аминам и ацетилхолину в онтогенезе при адаптации к физическим нагрузкам: дисс. ... канд.биол.наук.- Казань: 1982.- 151 с.
8. Алипов Н.Н. Механизмы положительных инотропных и хронотропных влияний блуждающих нервов на сердце: Автореф. дисс. ...канд. мед. наук / Алипов Н.Н. – МГУ, 1985. – 35с.
9. Аршавский И.А. Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития / Аршавский И.А. – М.: Наука, 1982.- 270с.
10. Аухадеев Э.И. К вопросу о механизмах взаимоотношения между симпатическими и парасимпатическими нервами сердца: Автореф. канд. биол. наук / Аухадеев Э.И. – Казань, 1969. – 24с.
11. Баевский Р.М. Современное состояние исследований по вариабельности сердечного ритма в России (по материалам Международного симпозиума «Компьютерная электрокардиография на рубеже столетий», / Баевский Р.М., Иванов Г.Г., Рябыкина Г.В. // Вестник аритмологии, 1999.- № 14.- С. 71-75.
12. Батрак Г.Е. Дозирование лекарственных средств экспериментальным животным / Батрак Г.Е., Кудрин А.Н. – М.: Медицина, - 1979. – 167с.
13. Бернсток Дж. Основания для разграничения двух типов пуринергических рецепторов // рецепторы клеточных мембран для лекарств и гормонов: Междисциплинарный поход / Под ред. Р.У. Штрауба, Л. Болис. – М.: Медицина, 1983. –С.120 – 132.
14. Бернсток Дж. Пуринергические синапсы и эволюция /Бернсток Дж // Сравнительная фармакология синаптических рецепторов. Л.: Наука, 1977. – С.26 – 33.
15. Бернсток Дж. Адренергические нейроны: их организация, функция и развитие в периферической нервной системе / Бернсток Дж., Коста М. – Минск, 1979. – С.228

16. Билалова Г.А. Возрастные особенности чувствительности сердца крыс на стимуляцию симпатического ганглия: Автореф. дисс. канд. биол. наук / Билалова Г.А. – Казань, 2000. – 21с.
17. Гайнуллин А.А. Влияние электрической стимуляции блуждающих нервов на хронотропную функцию сердца крыс в онтогенезе: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук / Гайнуллин А.А. – Казань, 1995. – 18с.
18. Гильмутдинова Р.И. Влияние экзогенных норадреналина и ацетилхолина на сердце крысят, развивающихся при различных двигательных режимах: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук / Гильмутдинова Р.И. – Казань, 1991. – 18с
19. Гиниатуллин Р.А. Модулирующая роль АТФ в нервно – мышечном синапсе / Гиниатуллин Р.А, Соколова Е. М. // Рос. Физiol. Журн. им. И.М. Сеченова. -1998. – Т.84.- №10. – С.1132 – 1139.
20. Гиниатуллин Р.А. Вторая «профессия» АТФ. Природа.-2000.- №11. - С.12 – С.17.
21. Голубинская В.О.Вариабельность артериального давления у крыс: роль медиаторов симпатической нервной системы норадреналина и АТФ и локальных механизмов регуляции: Автореф. дис. ... канд. биол. наук / Голубинская В.О. – Москва, 2000. - 19с.
22. Гришин С.Н. механизмы действия АТФ на секрецию медиатора из двигательных нервных окончаний. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук / Гришин С.Н. – Казань, 2001.
23. Држевецкая А.И. Эндокринная система растущего организма / Држевецкая А.И. – М.: Высш. шк., 1987. – 207с.
24. Елисеев В.В. Роль аденоцина в регуляции сердечно – сосудистой системы / Елисеев В.В. // Хим.-фарм. журнал. – 1987. - №8. – С.910 – 919.
25. Елисеев В.В. Роль аденоцина в регуляции физиологических функций организма / Елисеев В.В., Полтавченко Г.М. – Санкт – Петербург: Наука, 1991.
26. Елисеев В.В. Аденозин и функции миокарда. / Елисеев В.В. // – Санкт – Петербург: Наука, 2000, 160с.
27. Западнюк И.П.. Лабораторные животные. Развитие содержание, использование в эксперименте. Учебное пособие для студентов биол. вузов/ Западнюк И.П., Западнюк И.В., Западнюк Б.В. - Киев, 1983. - 383с.
28. Зефиров А.Л., Ситдикова Г.Ф. Ионные каналы нервного окончания. Успехи физиологических наук. Том 33, №4, 2002.
29. Зефиров А.Л. Медиаторы, эволюция представлений. Вестник Российской АМН, № 1, 2005. – С.49-52.
30. Зефиров Т.Л. Нервная регуляция сердечного ритма крыс в постнатальном онтогенезе: дисс. док. мед. наук / Зефиров Т.Л.- Казань. – 1999.- С.535.

31. Зефиров Т.Л. Вегетативная система модулирует влияние аденоцина на сердце / Зефиров Т.Л., Зиятдинова Н.И., Гайнуллин А.А. // «Нейрогуморальные механизмы регуляции сердца». Материалы всероссийской конференции. - Казань, 2004. – С.59-66.
32. Зефиров Т.Л. Влияние аденоцина на сократительную активность миокарда крыс / Зефиров Т.Л., Мингалимов М.С., Зиятдинова Н.И., Гайнуллин А.А. // Сборник тезисов всероссийской конференции с международным участием «Достижения биологической функциологии и их место в практике образования», Самара, -2003, - С. 101.
33. Зефиров Т.Л. Становление парасимпатической регуляции сердца крыс / Зефиров Т.Л., Сайфутдинова Л.Р., Зиятдинова Н.И. // Науч. Труды 1 съезда физиологов СНГ.- 2005.- С. 76-77.
34. Зефиров Т.Л. Возрастные особенности сократительной активности миокарда крыс при блокаде токов, активируемые гиперполяризацией / Зефиров Т.Л., Гибина А.Е., Сергеева А.М., Зиятдинова Н.И., Зефиров А.Л. // Бюлл. эксперим. Биол. и мед. -2007. № 9. – С. 133-135
35. Зефирова Ю.Т. Взаимодействие АТФ с препаратами, используемыми для регуляции сократительной деятельности матки. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук /Зефирова Ю.Т.– Казань, 2007. – 20с.
36. Зиганшин А.У. Перспективы клинического применения средств, воздействующих на рецепторы АТФ – Р2-пуринорецепторы / Зиганшин А.У., Зиганшина Л.Е. // Каз. Мед. Журнал. – 1996. -№2. – С.134 – 136.
37. Зиганшин А.У. Фармакология рецепторов АТФ / Зиганшин А.У., Зиганшина Л.Е. - Гэотар медицина, Москва, 1999. – 209с.
38. Зиганшин А.У. Фармакологическая характеристика рецепторов АТФ / Зиганшин А.У., Зиганшина Л.Е., Бернсток Дж. // Хим. - Фарм. Журнал. - 1997а. - №1. – С.3-8.
39. Зиганшин А.У. Экто-АТФазы и рецепторы АТФ / Зиганшин А.У., Зиганшина Л.Е., Бернсток Дж. // Эксп. Клинич. Фармакол. – 1997б. - №3. – С.78-82.
40. Зиганшин А.У. Р2-рецепторы: теоретические предпосылки клинического воздействия / Зиганшин А.У., Зиганшина Л.Е., Бернсток Дж. // Бюлл. экспер. биол. и мед. -2002. – Т.134.- №10. – С.365 – 369.
41. Зиганшин А.У., Зефирова Ю.Т., Зайцев А.П. // Казан. медицинский журнал. 2003. № 4. С. 295-298.
42. Зиганшин А.У., Хазиахметов Д.Ф., Зиганшина Л.Е. и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 2003. Т. 135, № 1. С. 29-32.
43. Зиганшин А.У. Роль рецепторов АТФ (Р2-рецепторов) в нервной системе // Неврологический вестник.-2005.-т XXXV11, вып.1-2.-С.45-53.

44. Зиятдинова Н.И., Гайнуллин А.А., Зиганшин А.У., Зефиров Т.Л. Стимуляция блуждающего нерва изменяет отрицательное хронотропное и гипотензивное действие аденоцина. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2004, Т. 137, № 5. С. 486-488.
45. Капелько В.И. Насосная функция сердца и ее регуляция. // Современный курс классической физиологии (избранные лекции) с приложением на компакт-диске. Под ред. Ю.В. Наточина, В.А. Ткачука.-М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007.- С. 263-295.
46. Карпицкий В.В. Определение сердечного выброса у мелких лабораторных животных методом тетраполярной реографии / Карпицкий В.В, Словеснов С.В., Рерих Р.А // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 1986. – Вып.1. – С.74-77.
47. Ковалев Г.В. Возрастные особенности центральной гемодинамики у крыс в норме по данным реографического исследования / Ковалев Г.В., Грачева С.В., Никитин С.А. // Физиология и патология кровообращения. – Чебоксары, 1985. – С.48 - 51.
48. Косицкий Г.И. Афферентные системы сердца / Косицкий Г.И. – М.: Наука, 1975. – 207 с.
49. Косицкий Г.И. Регуляция деятельности сердца / Косицкий Г.И. - М.: МЗ РСФСР, 1980.– 24с.
50. Косицкий Г.И. Экстракардиальная и интракардиальная нервная регуляция сердца / Косицкий Г.И. // Вестн. АМН СССР. - 1984. - № 4.- С.29-32.
51. Крохина Е.М. Функциональная морфология и гистохимия вегетативной иннервации сердца / Крохина Е.М. // М.: Медицина, 1973. – 229с.
52. Курмаев О.Д. Механизмы нервной и гуморальной регуляции деятельности сердца / Курмаев О.Д – Казань, 1966. – 179с.
53. Марченко С.М. Ацетилхолин и АТФ гиперполаризуют эндотелий, активируя различные типы Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов / Марченко С.М. // Бюлл. экспер. биол. и мед. -2002. – Т.134.- №11. – С.490 – 493.
54. Махинько В.И. Константы роста и функциональные периоды развития в постнатальной жизни белых крыс / Махинько В.И., Никитин В.Н. // Молекулярные и физиологические механизмы возрастного развития. – Киев: Наукова думка, 1975. – С.308 -325.
55. Меерсон Ф.З. Феномен адаптационной стабилизации структур и защита сердца / Меерсон Ф.З., Малышев И.Ю. // М, 1993.- 159 с.
56. Нейрохимия: учебник для биологических медицинских вузов. Под ред. И.П. Ашмарина и др. Москва: Изд. Института биомедицинской химии РАМН, 1996,-470с.
57. Нигматуллина Р.Р. Клеточно - молекулярные механизмы функционирования и регуляции сердца / Р.Р. Нигматуллина - Казань: КГМУ, 2004.-100 с.

58. Нигматуллина Р.Р. Оксид азота в механизмах регуляции насосной функции сердца / Р.Р. Нигматуллина, А.Г. Насырова // Бюллетень сибирской медицины. – 2005.- Т.4, Приложение 1.- С. 7-8.
59. Нигматуллина Р.Р. Показатели сердечного выброса у крыс разного возраста при блокаде α_1 и α_2 адренорецепторов / Нигматуллина Р.Р., Абзолов Р.А., Миннибаев Э.Ш. // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 1999.- №6. -С.638-642.
60. Нигматуллина Р.Р. Регуляция сердечного выброса крыс, развивающихся в условиях различных двигательных режимов. Дисс. На соис. уч. ст. канд.биол.наук. Казань, 1991.
61. Новиков И.И. Сердце и сосуды: Онтогенез и восстановление нейрорегуляторной системы / И.И. Новиков - Минск: Наука и техника.- 1990.- 239 с.
62. Ноздрачев А.Д. Физиология вегетативной нервной системы / Ноздрачев А.Д. – Л., - 1983. – 296с.
63. Просер Л., Браун Ф. Сравнительная физиология животных. / Просер Л., Браун Ф. // Москва: 1967. 767с
64. Раевский В.В. Онтогенез функциональных систем / Раевский В.В. // Науч. труды I съезда физиол. СНГ. – 2005.- т.1. - С.165-166.
65. Раевский В.В. Онтогенез медиаторных систем мозга / Раевский В.В. // М., Наука, 1991.- 144 с.
66. Раевский В.В. Развитие теории системогенеза П.К. Анохина. / Раевский В.В.// Седьмые Анохинские чтения. М.: изд-во «Грааль», 2002.- С. 15-22.
67. Раевский В.В. Эндогенный дофамин модулирует кортикопаллидарные влияния при участии ГАМК. / Раевский В.В., Г.С. Доу, Дж. Д. Ст ивенсон // Российский физиологический журнал, 2002, Т. 88, №6.- С. 723-730.
68. Резник А.В., Федоров В.В, Розентшраух Л.В. Ионные каналы и токи в кардиомиоцитах. Кардиомиология. 2006.- № 2.- С.4-18.
69. Розанова В.Д. Очерки по экспериментальной и возрастной фармакологии / В.Д.Розанова – Л.: Медицина, 1968.- 223 с.
70. Рычков А.В. Влияние температуры на пуринорецептор-опосредуемые сократительные ответы гладкой и сердечной мышц. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук / Рычков А.В. – Казань, 2007. – 20с.
71. Савин В.Ф. Экстра- и интракардиальные механизмы регуляции частоты сердечного ритма в постнатальном онтогенезе: Автореф. дис. ... канд. биол. наук / Савин В.Ф. – Казань, 1988. - 19с.
72. Самойленкова Н.С. Защитный эффект прекондиционирования при фокальной ишемии мозга; Автореф. дисс. ... канд. биол. наук / Самойленкова Н.С. – Москва, 2008. – 149с.

73. Селизарова Н.О. Гемодинамические эффекты пуриновых нуклеозидов на локальную ишемию и реперфузию / Селизарова Н.О., Елисеев В.В. // Кардиология. – 1992. – Т.32. – С.84 – 87.
74. Сергеев П.В. Рецепторы / Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И. Москва – Волгоград, 1999. - 639с.
75. Ситдиков Ф.Г. Взаимоотношение адренергических и холинергических механизмов регуляции сердца при адаптации / Ситдиков Ф.Г. // Двигательная активность и симпатоадреналовая система в онтогенезе. – Казань, 1987. – С.137 – 140.
76. Ситдиков Ф.Г. Механизмы и возрастные особенности адаптации сердца к длительному симпатическому воздействию: Дисс. ... докт. биол. наук / Ситдиков Ф.Г. – Казань, 1974. – 312с.
77. Ситдиков Ф.Г. Адренергические и холинергические факторы регуляции сердца в онтогенезе у крыс /Ситдиков Ф.Г., Аникина Т.А., Гильмутдинова Р.И. // Бюлл. экспер. биол. и мед. -1998. №9. – С.318 – 320.
78. Ситдиков Ф.Г. Динамика статистических показателей сердечного ритма белых крыс в онтогенезе / Ситдиков Ф.Г., Савин В.Ф. // Вегетативные показатели адаптации организма к физическим нагрузкам. – Казань, 1984. – С.100 – 109.
79. Ситдиков Ф.Г., Зефиров Т.Л. Лекции по возрастной физиологии сердца. // Ситдиков Ф.Г., Зефиров Т.Л. // учебное пособие, Казань изд-во ТГГПУ 2006 102 с.
80. Ситдиков Ф.Г. Особенности адрен- и холинергической регуляции сердца крысят // Ситдиков Ф.Г., Гильмутдинова Р.И., Аникина Т.А.-Материалы XVII съезда физиологов России.- Ростов н/Дону, 1998.- С. 318.
81. Скок В.И. Физиология вегетативных ганглиев / Скок В.И. – Л, 1970. – 238с.
82. Смирнов В.М. Симпатическая нервная система не участвует в развитии ваготомической тахикардии / Смирнов В.М. // Бюл. экспер. биол. и мед. - 1995. - №8. – С.125-128.
83. Смиттен Н.А. Симпто-адреналовая система в филоонтогенезе позвоночных / Смиттен Н.А. // - Москва, 1972. – 347с
84. Современный курс классической физиологии (избранные лекции) с приложением на компакт-диске. Под ред.Ю.В. Наточина, В.А. Ткачука.-М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007.-384с.
85. Соколова Е.М. Пуринергическая регуляция нервно-мышечной передачи. Дисс. канд. биол. наук / Соколова Е.М. – Казань, 1999. – 140с.
86. Стропус Р.А. О влиянии медиаторов на контракtilность миокарда в зависимости от развития холинергической и адренергической иннервации сердца / Стропус Р.А., Абрайтис Р.И., Вайчекаускас В.С. // – В кн.: Нейромедиаторы в норме и патологии. – Казань, 1979. – С.335-337.
87. Сюткина Е.В. Влияние блокады холинорецепторов и β-адренорецепторов на вариабельность сердечного ритма плодов крыс / Сюткина Е.В. // Вест. АМН СССР. -1985. -№ 6. С.31-35.

88. Тарасова О.С. Влияние дезипрамина на нейрогенные ответы изолированной хвостовой артерии крысы / Тарасова О.С., Зотов А.В., Родионов И.М., Голубинская В.О., Боровик А.С. // Методология флюметрии. -2000. -№ 4. – с.121-138.
89. Тарасова О.С. Пуринергический компонент симпатической регуляции системного артериального давления: Автореф. дис. ... док. биол. наук / Тарасова О.С.- Москва, 2005 – 39с.
90. Турпаев Т.М. Медиаторная функция ацетилхолина и природа холинорецепторов / Турпаев Т.М. // –М., Изд-во АН СССР. – 1962. – 140с.
91. Удельнов М.Г. Физиология сердца. М.: Изд-во МГУ, 1975 / Удельнов М.Г. // -363с.
92. Физиология и патофизиология сердца: Пер. с англ./Под ред.Н. Сперелакиса: В 2-х т. Т. 2.- М.: Медицина, 1988.- 624с.
93. Фролькис В.В. Возрастные особенности нейрогуморальной регуляции // Возрастная физиология / Фролькис В.В. – Л.: Наука, 1975. – С.375-383.
94. Фундаментальная и клиническая физиология: Учебник для студ. высш. учеб. Заведений / Под ред.А.Г. Камкина и А.А. Каменского.- М.: Издательский центр «Академия», 2004.-1072с.
95. Чинкин А.С. О состоянии холинергических процессов в тренированном организме. – В кн.: Физиол. роль медиаторов / Чинкин А.С., Курмаев О.Д // – Казань, 1972. –С.252 – 253.
96. Шакирзянова А.В. Взаимодействие холинергических и пуринергических механизмов регуляции спонтанной квантовой секреции медиатора в нервно-мышечном соединении лягушки: Автореф. дис. ... канд. биол. наук / Шакирзянова А.В.- Казань, 2005. – 20с.
97. Швалев В.Н. Морфологические основы иннервации сердца / Швалев В.Н., Сосунов А.А., Гуски Г. // - М: Наука, 1992.- С.366.
98. Швалев В.Н. Этапы формирования вегетативной нервной системы в онтогенезе / Швалев В.Н., Рейдер Р.М., Мингазова И.В.// Арх. анат., 1972, т. 63, выпуск 8. С.508-548.
99. Хамзина Е.Ю. Роль P2X-пуринорецепторов в сердечной деятельности крыс в: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук / Хамзина Е.Ю. – Казань, 2006. – 149с.
100. Abbracchio M.P. Purinoceptors: Are there families of P2X and P2Y purinoceptor / Abbracchio M.P., Burnstock G. // Pharmacol. Ther. 1994.- Vol. 64.- P.445-475.
101. Abbracchio M.P. Purinoceptor nomenclature. A status report / Abbracchio M.P., Cattabeni F., Fredholm B.B., Williams M. // Drug Dev. Res. -1993. V.28 – P.207-213.
102. Abraham EH, Okunieff P, Scala S, Vos P, Oosterveld MJ, Chen AY, and Shrivastav B. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and adenosine triphosphate. Science 275: 1324-1326, 1997.
103. Abraham EH, Prat AG, Gerweck L, Seneveratne T, Arceci RJ, Kramer R, Guidotti G, and Cantiello HF. The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. Proc Natl Acad Sci USA 90: 312-316, 1993.

104. Aimond F, Rauzier JM, Bony C, and Vassort G. Simultaneous activation of p38 MAPK and p42/44 MAPK by ATP stimulates the K⁺ current ITREK in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 275: 39110-39116, 2000.
105. Alvarez JL, Mongo K, Scamps F, and Vassort G. Effects of purinergic stimulation on the Ca current in single frog cardiac cells. *Pflügers Arch* 416: 189-195, 1990.
106. Anning PB., Prendergast BD., MacCarthy PA., Shah AM., Buss DC., Lewis MJ., ATP is involved in myocardial and vascular effects of exogenous bradykinin in ejecting guinea pig heart. *Am J Physiol* 277 (2 Pt 2): 818-25, 1999.
107. Auchampach J.A. Adenosine receptor subtypes in the heart: therapeutic opportunities and challenges / Auchampach J.A., Bolli R. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* -1999. -V.276 (3). – P.1113 - 1116.
108. Babenko A. and Vassort G. Enhancement of the ATP-sensitive K⁺ current by extracellular ATP in rat ventricular myocytes. Involvement of adenylyl cyclase-induced subsarcolemmal ATP depletion. *Circ Res* 80: 589-600, 1997.
109. Babenko A. and Vassort G. Purinergic facilitation of ATP-sensitive potassium current in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 120 (4): 631-8, 1997.
110. Balogh J, Wihlborg A., Isackson H., Joshi B., Jacobson K., Arner A., Erlinge. Phospholipase C and cAMP-dependent positive inotropic effects of ATP in mouse cardiomyocytes via P2Y₁₁-like receptors. *J. of molecular and cellular cardiology*. Vol.39, issue 2, august 2005. P. 223-230.
111. Barnard EA, Burnstock G, and Webb TE. G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 15: 67-70, 1994.
112. Barzu T, Huerta F, and Pourrias B. The chronotropic effect of adenosine and ATP in dogs. The antagonism by theophylline. *J Pharmacol* 16: 197-211, 1985.
113. Bean B.P. ATP-activated channels in rat and bullfrog sensory neurons: concentration dependence and kinetics. *J of Neuroscience*.-1990.-V. 10.-P 1-10.
114. Belhassen B. and Pelleg A. Electrophysiologic effects of adenosine triphosphate and adenosine on the mammalian heart: clinical and experimental aspects. *J Am Coll Cardiol* 4: 414-424, 1984.
115. Bivalacqua T.J. Comparative responses to alpha ,beta -methylene-ATP in cat pulmonary, mesenteric, and hindquarter vascular beds / Bivalacqua T.J., Champion H.C., Shah M.K., De Witt B.J., Inscho E.W., Kadowitz P. // *J. Appl. Physiol.* - 2002. -V.93(4). –P.1287 - 1295.
116. Bjornsson O.G, Monck JR, and Williamson JR. Identification of P2Y purinoceptors associated with voltage-activated cation channels in cardiac ventricular myocytes of the rat. *Eur J Biochem* 186: 395-404, 1989.
117. Boarder M.R, Weisman G.A, Turner J.T, and Wilkinson G.F. G protein-coupled P2 purinoceptors: from molecular biology to functional responses. *Trends Pharmacol Sci* 16: 133-139, 1995.

118. Bodin P, Bailey D, and Burnstock G. Increased flow-induced ATP release from isolated vascular endothelial cells but not smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 103: 1203-1205, 1991.
119. Bo Hu. P2X Receptors in Trigeminal Subnucleus Caudalis Modulate Central Sensitization in Trigeminal Subnucleus Oralis / Bo Hu, Chiang C., Hu J., Dostrovsky J., Sessle B. // *J. Neurophysiol.* - 2002. - V.88. - № 4. – P.1614 – 1624.
120. Bodin P, Bailey D, and Burnstock G. Increased flow-induced ATP release from isolated vascular endothelial cells but not smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 103: 1203-1205, 1991
121. Boehm S. Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors / Boehm S., Kubista H. // *Pharmacol. Rev.* - 2002. - V. 54. - № 1. - P.43-99.
122. Boehm S. Fine Tuning of Sympathetic Transmitter Release via Ionotropic and Metabotropic Presynaptic Receptors / Boehm S., Kubista H. // *Pharmacol. Rev.* –2002. – V.54 (1). – P.43 - 99.
123. Bogdanov Y., Rubino A. and Burnstock G. Characterization of subtypes of the P2X and P2Y families of ATP receptors in the foetal human heart. *Life Sci* 62: 697-703, 1998.
124. Bogdanov Y., Wildman S., Clements M.P., King B.F. and Burnstock G. Molecular cloning and characterization of rat P2Y4 nucleotide receptor. *Br J Pharmacol.* 124^ 428-430, 1998.
125. Borst M.M. and Schrader J. Adenine nucleotide release from isolated perfused guinea pig hearts and extracellular formation of adenosine. *Circ Res* 68: 797-806, 1991.
126. Boué-Grabot E, Akimenko MA, and Séguéra P. Unique functional properties of a sensory neuronal P2X ATP-gated channel from zebrafish. *J Neurochem* 75: 1600-1605, 2000.
127. Boué-Grabot E, Archambault V, and Séguéra P. A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X2 ATP-gated channels. *J Biol Chem* 275: 10190-10195, 2000.
128. Boyer J.L Identification of competitive antagonists of the P2Y1 receptor. / Boyer J.L, Romero-Avila T, Schachter J.B, and Harden TK. // *Mol Pharmacol* 50: 1323-1329, 1989.
129. Boyer J.L, Romero-Avila T, Schachter JB, and Harden T.K. Identification of competitive antagonists of the P2Y1 receptor. *Mol Pharmacol* 50: 1323-1329, 1996.
130. Boyer J.L, Siddiqi S, Fischer B, Romero-Avila T, Jacobson KA, and Harden TK. Identification of potent P2Y-purinoceptor agonists that are derivatives of adenosine 5'-monophosphate. *Br. J. Pharmacol* 118: 1959-1964, 1996.
131. Bradley E. Effects of varying impulse number on cotransmitter contributions to sympathetic vasoconstriction in rat tail artery / Bradley E., Law A., Bell D., Johnson C. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*- 2003. – V.284. -№ 6.- P.2007-2014.
132. Brake AJ, and Julius D. Signaling by extracellular nucleotides. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 519-541, 1996.
133. Bao J.X. // *Acta physiol. Scand.* 1993.- Suppl. 610/ P. 1-58.

134. Brodde O.E., Konschak U., Becker K., Ruter F., Poller U., Jakubetz J., Radke J., Zerkowski H.R. / *J. Clin. Invest.* 1998. V.101(2) P.471-478
135. Brouns I. Intraepithelial vagal sensory nerve terminals in rat pulmonary neuroepithelial bodies express P2X3 receptors / Brouns I., Adriaensen D., Burnstock G., Timmermans J.P. // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* – 2000. – V.23. P.52-61.
136. Brown D.A., Chicco A.J., Jew K.N., Johnson M.S., Lynch J.M., Watson P.A., and Moore R.L. Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the KATP channel in the rat. *J. Physiol.*, December 15, 2005; 569(3): 913 - 924.
137. Browse D.J. The role of ATP and adenosine in the control of hepatic blood flow in the rabbit liver in vivo / Browse D.J., Mathie R., Benjamin I., Alexander B. // *Comp. Hepatol.* - 2003. –V. 2. – P.9-12.
138. Burke M. A., Mutharasan R. K., and Ardehali H.. The Sulfonylurea Receptor, an Atypical ATP-Binding Cassette Protein, and Its Regulation of the KATP Channel. *Circ. Res.*, February 1, 2008; 102(2): 164 – 176.
139. Burnstock G. Purinergic nerves / Burnstock G. // *Pharmacol. Rev.* - 1972. - V.24. – P.508 -581.
140. Burnstock G. Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience*, 1, 239–248. 1976.
141. Burnstock G. A basis for Distinguishing two types of purinergic receptors/ Burnstock G. // *Cell Membrane Receptors For Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach* / Eds. Straub R.W., Bolis L. - New York: Raven Press. - 1978. - P.107-118.
142. Burnstock G. Structure-activity relationships for derivatives of adenosine -5`-triphosphate as agonists at P2 purinoreceptors: heterogeneity within P2X and P2Y subtypes / Burnstock G., Fischer B., Hoyle C.H.V., Maillard M., Ziganshin A.U., Brizzolara A.L., von Isakovics A., Boyer J.L., Harden T.K., Jacobson K.A. // *Drug dev. Res.* – 1994. – P.206-219.
143. Burnstock G. Distribution and roles of purinoceptor subtypes / Burnstock G. // *Nucleos. Nucleot.* – 1991. – V.10. – P.917-930.
144. Burnstock G. Noradreline and ATP as cotransmitters in sympathetic nerves / Burnstock G. // *Neurochem. Int.* – 1990b. –V.17. – P.357 – 368.
145. Burnstock G. Classification and characterization of purinoceptors / Burnstock G. // *Purines in cellular Signalling – Targets for New Drug* / Eds. Jacobson K.A., Daly J.W., Manganiello V. – New York: Springer- Verlag, 1990. – P.241-253.
146. Burnstock G. P2X receptors on sensory neurones. *Br J Anaesth* 84: 476-488, 2000.
147. Burnstock G. Purinergic signaling / Burnstock G. // *Brit. J. Pharmacol.* – 2006. –V.147. – P.172–187.

148. Burnstock G. Numbering of cloned P2 purinoceptors / Burnstock G., Kind B.F. // Drug. Dev. Res. -1996. – V.38. –P.67-71.
149. Burnstock G. P2-purinoceptors of two subtypes in the rabbit mesenteric artery: reactive blue 2 selectively inhibits responses mediated via the P2y- but not P2x-purinoceptor / Burnstock G., Warland J.J.I. // Br. J. Pharmacol. – 1987. – V.90. –P.383–391.
150. Burnstock G. Vascular control by purines with emphasis on the coronary system / Burnstock G. // Eur. Heart J. 1989. – V.10. P.15-21.
151. Burnstock G. and Meghji P. The effect of adenyl compounds on the rat heart / Burnstock G. and Meghji P// Br J.Pharmacol, 1983 P. 211-218.
152. Burnstock G., Verkhratsky A. Evolutionary origins of the purinergic signaling system. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009 Apr; 195 (4): 415-47. Epub Feb 12.
153. Burnstock G. Purines and Purinoceptors: Molecular Biology Overview. *Encyclopedia of Neuroscience*. 2009.- v.7, P. 1253-1262.
154. Champe. Lippincott's Illustrated Reviews. / Champe //Biochemistry. Third edition, 2004, 127 p.
155. Chicco A. J., Johnson M. S., Armstrong C. J., Lynch J. M., Gardner R. T., Fasen G. S., Gillenwater C. P., and Moore R. L. Sex-specific and exercise-acquired cardioprotection is abolished by sarcolemmal KATP channel blockade in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, May 1, 2007; 292(5): H2432 - H2437
156. Chen Z.-P. Nucleotides as extracellular signaling molecules / Chen Z.-P., Levy A., Lightman S.L. // *J. Neuroendocrinol.* – 1995. – V.7. – P. 83-96.
157. Chen WC, and Chen CC. ATP-induced arachidonic acid release in cultured astrocytes is mediated by Gi protein coupled P2Y1 and P2Y2 receptors. *Glia* 22: 360-370, 1998.
158. Chessell IP, Michel AD, and Humphrey PP. Effects of antagonists at the human recombinant P2X7 receptor. *Br J Pharmacol* 124: 1314-1320, 1998
159. Chevalier B., Mansier P., Teiger E., Callens E., Amrani F. And Swynghedauw B. Alteration in β - adrenergic and muscarinic receptors in aged rat heart. Effects chronic administration of propranolol and atropine.- 1991.- P. 215-224.
160. Christie A, Sharma VK, and Sheu SS. Mechanism of extracellular ATP-induced increase of cytosolic Ca²⁺ concentration in isolated rat ventricular myocytes. / Christie A, Sharma VK, and Sheu SS. // *J Physiol (Lond)*: 369-388, 1992.
161. Chizh B. P2X Receptors and Nociception / Chizh B., Illes P. // *Mol. Pharmacol.* – 2001. – V.53. - P.553-568.
162. Chow Y.W., Wang H.L. Functional modulation of P2X2 receptors by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Neurochem* 70 (6): 2606-12, 1998.

163. Cifelli C., Boudreault L., Gong B., Bercier J.-P., and Renaud J.-M. Contractile dysfunctions in ATP-dependent K⁺ channel-deficient mouse muscle during fatigue involve excessive depolarization and Ca²⁺ influx through L-type Ca²⁺ channels. *Exp Physiol*, October 1, 2008; 93(10): 1126 - 1138.
164. Collo G. Cloning of P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. / Collo G, North RA, Kawashima E, Merlo-Pich E, Neidhart S, Surprenant A, and Buell G J // *Neurosci*: 2495-2507, 1996.
165. Communi D. and Boeynaems J.M. Receptors responsive to extracellular pyrimidine nucleotides. *Trends Pharmacol Sci* 18: 83-86, 1997.
166. Communi D, Govaerts C, Parmentier M, and Boeynaems JM. Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 272: 31969-31973, 1997.
167. Cui N., Li L., Wang X., Shi Y., Shi W., and Jiang C. Elimination of allosteric modulation of myocardial KATP channels by ATP and protons in two Kir6.2 polymorphisms found in sudden cardiac death. *Physiol Genomics*, March 13, 2006; 25(1): 105 - 115.
168. Cuiling L. Extracellular ATP facilitates flow-induced vasodilatation in rat small mesenteric arteries / Cuiling L., Mather S., Huang Y., Garland C., Xiaoqiang Ya // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* - 2004. -V.286. - P1688-1695.
169. Damron DS. and Bond M. Modulation of Ca²⁺ cycling in cardiac myocytes by arachidonic acid. *Circ Res* 72: 376-386, 1993.
170. Danziger RS. Extracellular ATP has a potent effect to enhance cytosolic calcium and contractility in single ventricular myocytes. / Danziger RS, Raffaeli S, Moreno-Sanchez R, Sakai M, Capogrossi MC, Spurgeon HA, Hansford RG, and Lakatta EG. // *Cell Calcium* : 193-199, 1988.
171. De Young M.B. ATP receptor-induced Ca²⁺ transients in cardiac myocytes: sources of mobilized Ca²⁺ / De Young M.B., Scarpa C. // *Am. J. Physiol.* - 1989. - V.257 (4). - P.750-8.
172. De Young MB, and Scarpa A. Extracellular ATP induces Ca²⁺ transients in cardiac myocytes which are potentiated by norepinephrine. *FEBS Lett* 223: 53-58, 1987.
173. De Young MB, and Scarpa A. Extracellular ATP activates coordinated Na⁺, Pi, and Ca²⁺ transport in cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 260: C1182-C1190, 1991.
174. Di Virgilio F, Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Sanz JM, Dal Susino M, Mutini C, Hanau S, and Baricordi OR. Purinoceptor in the immune system. *Drug Dev Res* 39: 319-329, 1996.
175. Dorigo P. Negative and positive influences exerted by purine compounds on isolated guinea pig atria. / Dorigo P, Gaion RM, and Maragno I. // *J. Auton Pharmacol*: 191-196, 1988.
176. Drury AB, and Szent-Gyorgy A. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol (Lond)* 68: 213-237, 1929.

177. Du XJ, Anderson KE, Jacobsen A, Woodcock EA, and Dart AM. Suppression of ventricular arrhythmias during ischemia-reperfusion by agents inhibiting Ins (1,4,5)P₃ release. *Circulation* 91: 2712-2716, 1995.
178. Dunn P.M. Diinosine pentaphosphate: An antagonist which discriminates between recombinant P2X3 and P2X2/3 receptors and between two P2X receptors in rat sensory neurons / Dunn P.M., Liu M., Zhong Y., King B.F., Burnstock G. // *Br. J. Pharmacol.* – 2000. –V. 130. –P.1378-1384.
179. Elfellah M., Johns A. and Shepherd A. Effects of age on responsiveness of isolated rat atria to carbachol and on binding characteristics of atrial muscarinic receptors.- 1986.- P. 873-877.
180. Endoh M., Kushida H., Norota I., Takanashi M. Pharmacological characteristics of adenosine-induced inhibition of dog ventricular contractility: dependence on the pre-existing level of beta-adrenoceptor activation.Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 344:1: 70-8, 1991.
181. Ennion S. The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X1 receptors / Ennion S., Hagan S., Evans R.J. // *J. Biol. Chem.* -2000. – V. 275. – P. 29361-29367.
182. Evans RJ., Derkach V., Surprenant A. ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature*. 1992 Jun 11;357(6378):503-5.
183. Evans RJ, Lewis C, Virginio C, Lundstrom K, Buell G, Surprenant A, and North RA. Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. *J Physiol (Lond)* 497: 413-422, 1996.
184. Fabiato A, and Fabiato F. Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiace and skeletal muscles. *J Physiol (Lond)* 276: 233-255, 1978.
185. Favale S. Effect of adenosine and adenosine-5'-triphosphate on atrioventricular conduction in patients / Favale S., Di Biase M., Rizzo U., Belardinelli L., Rizzon P // *J. Am. Coll. Cardiol.* – V. 5 (5). – P.1212-1219.
186. Ferrari A., Daffonchio A., Gerosa S. and Mancia G. Alteration in cardiac parasympathetic function in aged rats.- 1991.-P. 647-649.
187. Fieber LA., Adams DJ. Adenosine triphosphate-evoked currents in cultured neurons dissociated from rat parasympathetic cardiac ganglia. *J Physiol (Lond)*434: 239-56, 1991.
188. Fischer H, and Frohlicher R. Wiederherstellung des normalen Herzschlages nach elektrisch erteugtem Kammerflimmern durch Adenosintriphosphorsaure. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 3: 155-156, 1948.
189. Fleetwood G. Purinoceptors in the rat heart / Fleetwood G, Gordon J. // *Br. J. Pharmacol.*- 1987. –V.90 (1). P.219-227.
190. Fleetwood G. Kinetics of adenine nucleotide catabolism in coronary circulation of rats / Fleetwood G., Coade SB, Gordon JL, and Pearson JD. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*: P1565-1572, 1989.

191. Flitney F.W., and Singh J. Inotropic responses of the frog ventricle to adenosine triphosphate and related changes in endogenous cyclic nucleotides. *J Physiol (Lond)* 304: 21-42, 1980.
192. Forrester T., and Williams CA. Release of adenosine triphosphate from isolated adult heart cells in response to hypoxia. *J Physiol (Lond)* 268: 371-390, 1977.
193. Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Dubyak GR, Harden TK, Jacobson KA, Schwabe U, and Williams M. Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. *Trends Pharmacol Sci* 18: 79-82, 1997.
194. Freedholm B.B. Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors / Freedholm B.B., Abbracchio M.P., Burnstock G., Dubyak R.R., Harden T.K., Jacobson K.A., Schabe U., Williams M. // *Trends Pharmacol. Sci.* – 1997. - V.18. - P.79-82.
195. Freedholm B.B. Nomenclature and classification of purinoceptors / Freedholm B.B., Abbracchio M.P., Burnstock G., Daly J.W., Harden T.K., Jacobson K.A., Leff P., Williams M. // *Pharmacol. Rev.* -1994. V.46. P.143-156.
196. Fleetwood G, and Gordon JL. Purinoceptors in the rat heart. *Br J Pharmacol* 90: 219-227, 1987.
197. Fresco P.J. Release inhibitory receptors activation favours the A2A-adenosine receptor-mediated facilitation of noradrenaline release in isolated rat tail artery / Fresco P., Diniz C., Queiroz G., Gonçalves J. // *Br. J. Pharmacol.* - 2002. -V.136. - P.230 – 236.
198. Friel DD, and Bean BP. Two ATP-activated conductances in bullfrog atrial cells. *J Gen Physiol* 91: 1-27, 1988.
199. Froldi G, Pandolfo L, Chinellato A, Ragazzi E, Caparrotta L, and Fassina G. Dual effect of ATP and UTP on rat atria: which types of receptors are involved? *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 349: 381-386, 1994.
200. Froldi G, Varani K, Chinellato A, Ragazzi E, Caparrotta L, and Borea PA. P2X-purinoceptors in the heart: actions of ATP and UTP. *Life Sci* 60: 1419-1430, 1997.
201. Forrester T. Release of ATP from heart / Forrester T. // *Biological Actions of Extracellular ATP* / Eds. Dubyak G.R., Fedan J.S. - New York: N. Y. Acad. Sci. -1990. – P.335-352.
202. Fu C, Pleumsamran A, Oh U, and Kim D. Different properties of the atrial G protein-gated K⁺ channels activated by extracellular ATP and adenosine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 269: H1349-H1358, 1995.
203. Garcia-Guzman M, Soto F, Laube B, and Stuhmer W. Molecular cloning and functional expression of a novel rat heart P2X purinoceptor. *FEBS Lett* 388: 123-127, 1996.
204. Giessler C., Wangemann T., Zerkowski H.R. and Brodde O.E. Agedependent decrease in the negative inotropic effect of carbachol on isolated human right atrium.-1998.-P. 199-202.

205. Gomes P., Srinivas S.P., Driessche W.V., Vereecke J. and Himpens B. ATP release through Connexin Hemichannels in Corneal Endothelial Cells. *Investigative ophthalmology and Visial Science/* 2005;46:1208-1218.
206. Gordon J.L. Extracellular ATP: effects, Sources and fate / Gordon J.L // *Biochem. J.* -1986. V.233. – P.309-319.
207. Goto M, Yatani A, and Tsuda Y. An analysis of the action of ATP and related compounds on membrane current and tension components in bullfrog atrial muscle. *Jpn J Physiol* 27: 81-94, 1977.
208. Green HN, and Stoner HB. Biological Actions of the Adenine Nucleotides. London: Lewis, 1950.
209. Grosman C. Mapping the conformational wave of acetylcholine receptor channel gating / Grosman C., Zhou M., Auerbach A. // *Nature (Lond)* -2000. – V. 403. P.773-779.
210. Gross GJ, and Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* 70: 223-233, 1992.
211. Habermeier-Muth A., Muscholl E. Co-transmitter mediated facilitation by sympathetic nerve stimulation of evoked acetylcholine releace from the rabbit perfused atria preparation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 351 (2): 164-72, 1995.
212. Hamilton S.G. ATP as a peripheral mediator of pain / Hamilton S.G., McMahon S.B // *J. Auton. Nerv. Syst.* – 2000. V. 81. – P. 187-194.
213. Hanna R. L. α,β -Methylene ATP elicits a reflex pressor response arising from muscle in decerebrate cats / Hanna R. L., Hayes S.G., Kaufman M.C. // *J. Appl. Physiol.* – 2002. – V. 93. – P. 834-841.
214. Hansen MA., Bennett MR., Barden JA. Distribution of purinergic P2X receptors in the rat heart. *J. Auton. Nerv. Syst.-* 1999. V. 78:1. - P. 1-9.
215. Hansmann G. Characterization by antagonists of P2-receptors mediating endothelium-dependent relaxation in the rat aorta / Hansmann G., Bültmann R., Tuluc F., Starke K. // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* -1997. –V.356. - P.641-652.
216. Hara Y. and Nakaya H. Dual effects of extracellular ATP on the muscarinic acetylcholine receptor-operated K⁺ current in guinea pig atrial cells / Hara Y. and Nakaya H. // *Eur J Pharmacol*: 295-303, 1997.
217. Harden TK, Boyer JL, and Nicholas RA. P2-purinergic receptors: subtype-associated signaling responses and structure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 541-579, 1995.
218. Harding SE., Hopwood AM., Harris P. GTP-independent stimulation of rabbit heart adenylate cyclase by isoproterenol at physiological ATP concentrations. *Basic Res Cardiol* 84 (1): 30-41, 1989.
219. Hardovin S, Mansier P, Berth B, Dakhly T, Moalic JM. B-adrenergic and muscarinic receptor expression are regulated in opposite ways during senescense in rat left ventricle.- 1997.- P. 309-319.

220. Hescheler J, Kameyama M, and Trautwein W. On the mechanism of muscarinic inhibition of the cardiac Ca current. *Pflügers Arch* 407: 182-189, 1986.
221. Hirano Y, Abe S, Sawanobori T, and Hiraoka M. External ATP-induced changes in [Ca²⁺]i and membrane currents in mammalian atrial myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 260: C673-C680, 1991.
222. Hohl C.M. Vascular and contractile responses to extracellular ATP: studies in the isolated rat heart / Hohl C.M., Hearse D.J. // *Can. J. Cardiol.* – 1985. – V.1(3). – P.207-16.
223. Hollander PB, and Webb JL. Effects of adenine nucleotides on the contractility and membrane potentials of rat atrium. / Hollander PB, and Webb JL. // *Circ Res*: 349-353, 1957.
224. Hopkins SV. The action of ATP in the guinea pig heart. *Biochem Pharmacol* 22: 335-339, 1973.
225. Hopwood A.M. ATP mediates coronary vasoconstriction via P2X-purinoceptors and coronary vasodilatation via P2Y- purinoceptors in the isolated perfused rat heart / Hopwood A.M., Burnstock G. // *Eur. J. Pharmacol.* – 1987. V.136 (1). – P.49-54.
226. Horackova M, Huang MH, and Armour JA. Purinergic modulation of adult guinea pig cardiomyocytes in long term cultures and co-cultures with extracardiac or intrinsic cardiac neurones. *Cardiovasc Res* 28: 673-679, 1994.
227. Hou M, Malmsjo M, Moller S, Pantev E, Bergdahl A, Zhao XH, Sun XY, Hedner T, Edvinsson L, and Erlinge D. Increase in cardiac P2X1- and P2Y2-receptor mRNA levels in congestive heart failure. *Life Sci* 65: 1195-1206, 1999.
228. Hoyle C.H.V. A review of the pharmacological activity of adenine dinucleotides in the periphery: possible receptor classes and transmitter function / Hoyle C.H.V. // *Gen. Pharmacol.* – 1990. - V.21. – P.827 – 831.
229. Hoyle C.H.V. Transmission: Purines / Hoyle C.H.V. // *Autonomic Neuroeffector Mechanisms* / Eds. G. Burnstock, Hoyle C.H.V. - Chur: Harwood Academic Publishers, 1992. - P.367-407.
230. Hu X, Xu X., Huang Y., Fassett J., Flagg T.P., Zhang Y., Nichols C.G., Bache R.J., and Chen Y. Disruption of Sarcolemmal ATP-Sensitive Potassium Channel Activity Impairs the Cardiac Response to Systolic Overload. *Circ. Res.*, October 24, 2008; 103(9): 1009 – 1017.
231. Illes P. Signaling by extracellular nucleotides and nucleosides / Illes P., Klotz K.-N., Lohse M.J. // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* – 2000. – V. 362. – P.295-298.
232. Illes P. Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system / Illes P., Ribeiro J. // *Eur. J. Pharmacol.* - 2004. – V.483. – P.5-17.
233. Irnich D. ATP stimulates peripheral axons in human, rat and mouse-differential involvement of A(2B) adenosine and P2X purinergic receptors / Irnich D., Tracey D.J., Polten J., Burgstahler R., Grafe P.// *Neuroscience*. – 2002. – V.110(1). –P.123-129.

234. Ito H., Tung R., Sugimoto T., Kobayashi I., Takahashi K., Katada T., Ui M and Kurachi Y. On the mechanism of G protein beta gamma subunit activation of the muscarinic K⁺ channel in guinea pig atrial cell membrane. Comparison with the ATP-sensitive K⁺ channel. //The Rockefeller University Press.- 1992.
235. Jacobsen AN, Du XJ, Lambert KA, Dart AM, and Woodcock EA. Arrhythmogenic action of thrombin during myocardial reperfusion via release of inositol 1,4,5-triphosphate. Circulation 93: 23-26, 1996.
236. Jaconi M, Bony C, Richards S, Terzic A, Vassort G, and Pucéat M. Inositol 1,4,5-triphosphate and mitochondria co-regulate automatic Ca²⁺ spikes in cardiomyocytes. Mol Biol Cell 11: 1845-1858, 2000.
237. Jarvis M. Modulation of BzATP and formalin induced nociception: attenuation by the P2X receptor antagonist, TNP-ATP and enhancement by the P2X3 allosteric modulator, cibacron blue / Jarvis M., Wismer C., Schweitzer E., Yu H., Biesen T., Lynch K., Burgard E., Kowaluk E. // Br. J. Pharmacol.- 2001. -V.132. - P.259 – 269.
238. Johnson C.D. Roles of norepinephrine and ATP in sympathetically evoked vasoconstriction in rat tail and hindlimb in vivo / Johnson C.D., Coney A.M., Marshall J.M. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2001. V.281. – P.2432-2440
239. Jones C.A. Functional characterization of the P2X4 receptor orthologues / Jones C.A., Chessell I.P., Simon J., Barnard E.A., Miller K.J., Michel A.D., Humphrey P.P.A. // Br. J. Pharmacol. -2000. V. 129. –P.388-394.
240. Kane G.C., Behfar A., Yamada S., Perez-Terzic C., O'Cochlain F., Reyes S., Dzeja, P.P., Miki T., Seino S., Terzic A. (2004). ATP-Sensitive K⁺ Channel Knockout Compromises the Metabolic Benefit of Exercise Training, Resulting in Cardiac Deficits. Diabetes- 2004. V 53.- P. 169-S175
241. Katchanov G. Electrophysiological-anatomic correlates of ATP-triggered vagal reflex in the dog. / Role of cardiac afferents / Katchanov G., Xu J., Hurt C.M., Pelleg A. // Am. J. Physiol. – 1996. – P.1785-1790.
242. Katsuragi T., Tokunaga T., Ohba M. et al Implication of ATP released from atrial, but not papillary, muscle segments of guinea-pig by isoproterenol and forskolin // Life Sci. 1993. V.53. –P.361-367.
243. Katsuragi T. Neuro-transmitter-mediated ATP release from smooth muscle / Katsuragi T., Tokunaga T., Usune S., Sato C., Furucawa T. // Role of Adenosine and Adenine nucleotides in the Biological System / Eds. Imai S., Nacazawa M. – Amsterdam: Elsevier Science Publishers. -1991. P.407-414.
244. Kegel B, Braun N, Heine P, Maliszewski CR, and Zimmermann H. An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. Neuropharmacology 36: 1189-1200, 1997.

245. Kennedy C. P2-purinoceptors mediate both vasodilation (via the endothelium) and vasoconstriction of the isolated rat femoral artery / Kennedy C., Delbro D., Burnstock G. // Eur. J. Pharmacol. – 1985. –V. 107. –P.161-168.
246. Khakh B. ATP Receptor-Mediated Enhancement of Fast Excitatory Neurotransmitter Release in the Brain / Khakh B., Henderson G. // Mol. Pharmacol. –1998. - V. 54. - № 2. - P. 272-378.
247. Khakh B.S. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits / Khakh B.S., Burnstock G., Kennedy C., King B.F., North R.A., Seguela P., Voigt M., Humphrey P.P. // Pharmacol. Rev. – 2001. –V. 53. – P.107-118.
248. King BF, Townsend-Nicholson A, and Burnstock G. Metabotropic receptors for ATP and UTP: exploring the correspondence between native and recombinant nucleotide receptors. Trends Pharmacol Sci 19: 506-514, 1998.
249. Kirsch GE, Codina J, Birnbaumer L, and Brown AM. Coupling of ATP-sensitive K⁺ channels to A1 receptors by G-proteins in rat ventricular myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol 259: H820-H826, 1990.
250. Kitchen M. Mechanisms mediating NTS P2X receptor-evoked hypotension: cardiac output vs. total peripheral resistance / Kitchen M., Collins H., DiCarlo S., Scislo T., O'Leary D. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. -2001. – V. 281. – P. 2198 - 2203.
251. Knight G.E. The effects of purine compounds on the isolated aorta of the frog *Rana temporaria* / Knight G.E ., Burnstock G. // Br. J. Pharmacol. -1996. – V. 117. –P.873-878.
252. Kubicek W.G. The minnesoz impedance cardiograph-theory and applications / Kubicek W.G. // Biomed. Eng. – 1974. – V.9. – P.410-416.
253. Kugelgen I., Stoffel D., Starke K. P2-purinoceptor-mediated inhibition of noradrenaline release in rat atria. Br J Pharmacol 115 (2): 247-54, 1995.
254. Kurz A.K. Release of ATP in rat vas deferens: origin and role of calcium / Kurz A.K., Bultman R., Driessen b., von Kugelgen I., Starke K. // Naunyn-Schiedeberg`s Arch. Pharmacol. – 1994. V.350. P.491-498.
255. Kuzmin A.I, Lakomkin V.L, Kapelko V.I, and Vassort G. Interstitial ATP level and degradation in control and postmyocardial infarcted rats. Am. J. Physiol. Cell Physiol.275: C766-C771. 1998.
256. Lakatta E.G. Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age. 1993.- P. 413- 467.
257. Lazarowski E.R, Homolya L, Boucher RC, and Harden TK. Direct demonstration of mechanically induced release of cellular UTP and its implication for uridine nucleotide receptor activation. J. Biol. Chem. 272: 24348-24354, 1997.

258. Lazarowski ER, Homolya L, Boucher RC, and Harden TK. Identification of an ecto-nucleoside diphosphokinase and its contribution to interconversion of P2 receptor agonists. *J. Biol. Chem.* 272: 20402-20407, 1997.
259. Leff P. Suramin is a slowly-equilibrating but competitive antagonist at P2X-receptors in the rabbit isolated ear artery / Leff P., Wood B.E., O'Connor S.E. // *Br. J. Pharmacol.* -1990. – V.101. –P.645-649.
260. Lewis C.J. Lack of run-down of smooth muscle P2X receptor currents recorded with the amphotericin permeabilized patch technique, physiological and pharmacological characterization of the properties of mesenteric artery P2X receptor ion channels / Lewis C.J., Evans R.J. // *Br. J. Pharmacol.* – 2000. – V.131. – P.1659–1666.
261. Li P. P2X receptors and sensory synaptic transmission between primary afferent fibers and spinal dorsal horn neurons in rats / Li P., Calejesan A.A., Zhuo M. // *J. Neurophysiol.*- 1998. –V.80 (6). - P.3356-3360.
262. Li C, Peoples R.W, and Weight FF. Proton potentiation of ATP-gated ion channel responses to ATP and Zn²⁺ in rat nodose ganglion neurons. *J Neurophysiol* 76: 3048-3058, 1996.
263. Liou JC., Fu WM. Additive effect of ADP and CGRP in modulation of the acetylcholine receptor channel in Xenopus embryonic myocytes. *Br J Pharmacol* 115 (4): 563-8, 1995.
264. Liu C. Extracellular ATP facilitates flow-induced vasodilatation in rat small mesenteric arteries / Liu C., Mather S., Huang Y., Garland C., Yao X. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* -2004. –V. 286. –P.1688-1695.
265. Liu Qu-Yi. Stimulation of cardiac L-type calcium channels by extracellular ATP / Liu Qu-Yi, Rosenberg R. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2001. - V.280. - P.1107-1113
266. Liu WW, Mattingly RR, and Garrison JC. Transformation of Rat-1 fibroblasts with the v-src oncogene increases the tyrosine phosphorylation state and activity of the alpha subunit of Gq/G11. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8258-8263, 1996.
267. Liu X-K., Yamada S., Kane G., Alekseev A.E., Hodgson D.M., O, Cochlain F., Jahangir A., Miki T., Seino S., and Terzic A. Genetic disruption of Kir6.2, the pore-forming subunit of ATP-sensitive K⁺ channel, predisposes to catecholamine-induced ventricular dysrhythmia. *Diabetes* 53:S165-S168, 2004.
268. Mantelli L, Amerini S, Filippi S, and Ledda F. Blockade of adenosine receptors unmasks a stimulatory effect of ATP on cardiac contractility. *Br J Pharmacol* 109: 1268-1271, 1993.
269. Marvin W., Hersmeyek K., Mc Donald R., Roskoski L., Roskoski R. Ontogenesis of cholinergic innervation in the rat heart. *Circ. Reg.*- 1980.- V.46.- P. 690-695.

270. Matsubayashi T, Matsuura H, and Ehara T. On the mechanism of the enhancement of delayed rectifier K⁺ current by extracellular ATP in guinea pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 437: 635-642, 1999.
271. Matsuura H and Ehara T. Activation of chloride current by purinergic stimulation in guinea pig heart cells. *Circ Res* 70:4: 851-5, 1992.
272. Matsuura H. and Ehara T. Modulation of the muscarinic K⁺ channel by P2-purinoceptors in guinea pig atrial myocytes. *J Physiol (Lond)* 497: 379-393, 1996.
273. Matsuura H, Tsuruhara Y, Sakaguchi M, and Ehara T. Enhancement of delayed rectifier K⁺ current by P2-purinoceptor stimulation in guinea pig atrial cells. *J Physiol (Lond)* 490: 647-658, 1996.
274. M. Farias III. Plasma ATP during exercise: possible role in regulation of coronary blood flow / M. Farias III, Gorman M. W., Savage M. V., Feigl E. O // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2005. – V.288 (4). –P.1586 – 1590.
275. McKittrick D.J. Intrathecal injection of ATP decreases heart rate in anaesthetised rats / McKittrick D.J., Powers K., Arnolda L.F. // Br. J. Pharmacol. – 2000. – V.76. – P.118-126.
276. McLaren G.J. Evidence that ATP acts at two sites to evoke contraction in the rat isolated tail artery / McLaren G.J., Burke K.S., Buchanan K.J., Sneddon P., Kennedy C. // Br. J. Pharmacol. – 1998. – V. 124. P.5-12.
277. McQueen D.S. Activation of P2X receptors for adenosine triphosphate evokes cardiorespiratory reflexes in anaesthetized rats / McQueen D.S., Bond S. M., Moores C., Chessell I., Humphrey P.P.A., Dowd E. // J. Physiol. – 1998. – V.507. - No. 3. -P. 843-855.
278. Mei Q. P2 purinergic receptor activation enhances cardiac contractility in isolated rat and mouse heart / Mei Q., Liang B // Am. J. Heart Physiol. Circ. Physiol.- 2001. - V.281. – P.334-341.
279. Meghji P., Pearson J., Slakey L. Regulation of extracellular adenosine production by ectonucleotidases of adult rat ventricular myocytes/ AJP-Heart fnd Circulation physiology, Vol 263, Issue 1 40-H47, 1992.
280. Michailova A., Saucerman J., Belik M.E., McCulloch A.D. Modeling Regulation of Cardiac KATP and L-type Ca²⁺ Currents by ATP, ADP, and Mg²⁺. *Biophys. J* 88: 2234-2249.2005.
281. Miller R.J. Presinaptic receptors / Michel A.D., Lundstrom K, Buell G.N., Surprenant A., Valera S., Humphrey P.P. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 1998. V.38. –P.201-227.
282. Miyagi Y. {alpha}, {beta}-Methylene ATP enhances P2Y4 contraction of rabbit basilar artery / Miyagi Y., Zhang J.H. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2004.-V.286(4). – P.546 – 1551.
283. Murthy KS, and Makhlof GM. Coexpression of ligand-gated P2X and G protein-coupled P2Y receptors in smooth muscle. Preferential activation of P2Y receptors coupled to phospholipase C (PLC)- 1 via G q/11 and to PLC- 3 via G i3. *J Biol Chem* 273: 4695-4704, 1998.

284. Neumann J. Inotropic effects of diadenosine tetraphosphate in isolated canine cardiac preparations. / Neumann J., Meissner A, Boknik P, Gombosova I, Knapp J, Luss H, Muller FU, Schluter H, Zidek W, Rolf N, Van Aken H, Vahlensieck U, and Schmitz W. // J Cardiovasc Pharmacol: 151-156, 1999.
285. North A.R. The P2X3 subunit: A molecular target in pain therapeutics / North A.R. // Cur. Opinion Invest. Drugs. – 2003. – V.4 (7). P.833-840.
286. North A.R. Molecular Physiology of P2X Receptors / North A.R. // Physiol. Rev. – 2002. V. 82. P.1013-1067.
287. North R.A. Pharmacology of cloned P2X receptors / North R.A., Surprenant A. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. - 2000. –V.40. - P. 563-580.
288. O'Connor S.E. Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies / O'Connor S.E., Dainty I.A., Leff P // Trends. Pharmacol. Sci. – 1991. – V.12. – P.137-141.
289. Olearczyk J.J. Heterotrimeric G protein Gi is involved in a signal transduction pathway for ATP release from erythrocytes / Olearczyk J.J., Stephenson A.H., Lonigro A.J., Sprague R.S.// Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2004. – V.286(3). –P.940 – 945.
290. Olsson R.A, and Pearson J.D. Cardiovascular purinoceptors / Olsson RA, and Pearson JD. // Physiol Rev 70: 761-845, 1990.
291. Ostrom S. Cellular Release of and Response to ATP as Key Determinants of the Set-Point of Signal Transduction Pathways / Ostrom S., Gregorian C., Insel P.A. // J. Biol. Chem. – 2000. – V.275 (16). –P.11735 - 11739.
292. Paddle BM, and Burnstock G. Release of ATP from perfused heart during coronary vasodilatation. Blood Vessels 11: 110-119, 1974.
293. Parker KE, and Scarpa A. An ATP-activated nonselective cation channel in guinea pig ventricular myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol 269: H789-H797, 1995.
294. Pasik E.A, and Foskett JK. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ATP and adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate channels in endoplasmic reticulum and plasma membranes. J Biol Chem 272: 7746-7751, 1997.
295. Pearson J.D. Differential regulation of adenine nucleotide catabolism by ectonucleotidases of vascular endothelial and smooth muscle cells / Pearson J.D., Gordon E. L., Slakey L.L. // Role of Adenosine and Adenine nucleotides in the Biological system / Eds. Imai, Nacazawa M. – Amsterdam: Elsier Sciente Publishers. -1991. –P.313-320.
296. Pelleg A. Cardiac electrophysiology and pharmacology of adenosine and ATP: modulation by the autonomic nervous system. J Clin Pharmacol 27: 366-372, 1987.

297. Pelleg A, Belhassen B, Ilia R, and Laniado S. Comparative electrophysiologic effects of adenosine triphosphate and adenosine in the canine heart: influence of atropine, propranolol, vagotomy, dipyridamole and aminophylline. *Am J Cardiol* 55: 571-576, 1985.
298. Pelleg A, and Burnstock G. Physiological importance of ATP released from nerve terminals and its degradation to adenosine in humans. *Circulation* 82: 2269-2272, 1990.
299. Pelleg A, Hurt CM, and Hewlett EL. ATP shortens atrial action potential duration in the dog: role of adenosine, the vagus nerve, and G-protein. *Can J Physiol Pharmacol* 74: 15-22, 1996.
300. Pelleg A, Mitamura H, Michelson EL, and Dreifus LS. Evidence against prostaglandin mediation of the differential electrophysiologic effects of ATP versus adenosine in the canine heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 8: 534-538, 1986.
301. Pelleg A. Vagal component in the chronotropic and dromotropic actions of adenosine and ATP / Pelleg A., Mitsuoka T., Mazgalev T., Michelson. // *Prog. Clin. Biol. Res.* – 1987. – V.230. – P.375-384.
302. Pelleg A. Purinergic modulation of neural control of cardiac function / Pelleg A., Katchanov G., Xu J. // *J Auton Pharmacol.* – 1996. – V.16 (6). – P.401-405.
303. Pelleg A. Autonomic neural control of cardiac function: modulation by adenosine and adenosine 5` - triphosphate / Pelleg A., Katchanov G., Xu J. // *Am. J. Cardiol.* – 1997. V.79 (12A). – P.11-14.
304. Pelleg A. Electrophysiological-anatomic correlates of ATP-triggered vagal reflex in dogs / Pelleg A., Hurt J.M., Soler-Baillo., Polansky M. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1993. – V.265. – № 2. P.681-690.
305. Pelleg A. Mechanism of action ATP on canine pulmonary vagal C fibre nerve terminal / Pelleg A., Hurt C.M. // *J. Physiol.* -1996. V.490. – P.265-275.
306. Podrasky E, Xu D, and Liang BT. A novel phospholipase C- and cAMP-independent positive inotropic mechanism via a P2 purinoceptor. / Podrasky E, Xu D, and Liang BT // *Am J Physiol: H2380-H2387*, 1997.
307. Pucéat M, Bony C, Jaconi M, and Vassort G. Specific activation of adenylyl cyclase V by a purinergic agonist. *FEBS Lett* 431: 189-194, 1998.
308. Pucéat M, Clément O, Lechêne P, Pelosin JM, Ventura-Clapier R, and Vassort G. Neurohormonal control of calcium sensitivity of myofilaments in rat single heart cells. *Circ Res* 67: 517-524, 1990.
309. Pucéat M, Clément O, Scamps F, and Vassort G. Extracellular ATP-induced acidification leads to cytosolic calcium transient rise in single rat cardiac myocytes. *Biochem J* 274: 55-62, 1991.
310. Pucéat M, and Vassort G. Purinergic stimulation of rat cardiomyocytes induces tyrosine phosphorylation and membrane association of phospholipase C : a major mechanism for InsP3 generation. *Biochem J* 318: 723-728, 1996.

311. Pucéat M, Bony C, Jaconi M, and Vassort G. Specific activation of adenylyl cyclase V by a purinergic agonist. *FEBS Lett* 431: 189-194, 1998.
312. Qi AD, and Kwan YW. Modulation by extracellular ATP of L-type calcium channels in guinea pig single sinoatrial nodal cell. *Br J Pharmacol* 119: 1454-1462, 1996.
313. Qu Y, Campbell DL, and Strauss HC. Modulation of L-type Ca²⁺ current by extracellular ATP in ferret isolated right ventricular myocytes. *J Physiol (Lond)* 471: 295-317, 1993.
314. Qu Y, Himmel HM, Campbell DL, and Strauss HC. Effects of extracellular ATP on ICa, [Ca²⁺]i, and contraction in isolated ferret ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 264: C702-C708, 1993.
315. Ralevic R, Milner P, Kirkpatrick KA, and Burnstock G. Flow-induced release of adenosine 5'-triphosphate from endothelial cells of the rat mesenteric arterial bed. *Experientia* 48: 31-34, 1992.
316. Ralevic V. Receptors for Purines and Pyrimidines / Ralevic V., Burnstock G // *Pharmacol. Rev.* –1998. –V.50. - No 3. – P.413-492.
317. Ralevic V, and Burnstock G. Roles of P2-purinoceptors in the cardiovascular system. *Circulation* 84: 1-14, 1991
318. Rettinger J. The suramin analogue NF279 is a novel and potent antagonist selective for the P2X(1) receptor / Rettinger J., Schmalzing G., Damer S., Muller G., Nickel P., Lambrecht G. // *Neuropharmacol.* - 2000. –V.39 (11). –P.2044-2053.
319. Richardson P.J, and Brown SJ. ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals // *J Neurochem* 48: P.622-630. 1987.
320. Rockson S., Homsy C., Quinn P., manders W., Haber E. Cellular mechanisms of impaired adrenergic responsiveness in neonatal dogs// *J. Clin. Invest.* – 1981. – V.67.- P. 308-312.-1981
321. Rubino A. ATP modulates the efferent function of capsaicin-sensitive neurones in guinea-pig isolated atria/ Amerini S., Ledda F., Mantelli L. // *Br J Pharmacol.*- 105(3).- P. 516-20. -1992
322. Sadoshima J., Izumo S. The heterotrimeric Gq protein-coupled angiotensin II receptor activates p21 ras via the tyrosine kinase-Shc-Grb2-Sos pathway in cardiac myocytes// *EMBO J* 15.- P. 775-787.-1996.
323. Saiag B. Newly evidenced pyrimidinoceptors and the P2x purinoceptors are present on the vascular smooth muscle and respectively mediate the UTP- and ATP-induced contractions of the dog maxillary internal vein / Saiag B., Milon D., Shacoori V., Allain H., Rault B., Van Den Driessche J. // *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* – 1992. –V.76. –P.89-94.
324. Saito D, Ueeda M, Abe Y, Tani H, Nakatsu T, Yoshida H, Haraoka S, and Nagashima H. Treatment of paroxysmal supraventricular tachycardia with intravenous injection of adenosine triphosphate. *Br Heart J* 55: 291-294, 1986.

325. Sasaki N. ATP consumption by uncoupled mitochondria activates sarcolemmal KATP channels in cardiac myocytes / Sasaki N., Sato T., Marbán E., O'Rourke B. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2001. –V. 280. –P.1882-1888.
326. Scamps F. The mechanism of positive inotropy induced by adenosine triphosphate in rat heart. / Scamps F. Legssyer A, Mayoux E, and Vassort G. // Circ Res: 1007-1016.-1990.
327. Scamps F. Modulation of L-type Ca channel activity by P2-purinergic agonist in cardiac cells. / Scamps F, Nilius B, Alvarez J, and Vassort G. Pflügers // Arch: 465-471.- 1993.
328. Scamps F. A Gs protein couples P2-purinergic stimulation to cardiac Ca channels without cyclic AMP production. / Scamps F. Rybin V, Puceat M, Tkachuk V, and Vassort G // J Gen Physiol: 675-701, 1992.
329. Scamps F.. Mechanism of extracellular ATP-induced depolarization in rat isolated ventricular cardiomyocytes / Scamps F., Vassort G. // Pflügers Arch 417: 309-316, 1990.
330. Scamps F. and Vassort G. Effect of extracellular ATP on the Na⁺ current in rat ventricular myocytes. / Scamps F. and Vassort G // Circ Res: 710-717. - 1994.
331. Scamps F. Pharmacological profile of the ATP-mediated increase in L-type calcium current amplitude and activation of a non-specific cationic current in rat ventricular cells. / Scamps F. and Vassort G. // Br J Pharmacol: 982-986. - 1994.
332. Schachter J.B. Second messenger cascade specificity and pharmacological selectivity of the human P2Y1-purinoceptor / Schachter J.B, Li Q, Boyer J.L, Nicholas R.A, and Harden T.K. // Br. J Pharmacol. V. 118. P. 167-173 .. 1996.
333. Schackow T.E. Enhancement of ATP-sensitive potassium current in cat ventricular myocytes by -adrenoreceptor stimulation / Schackow T.E, and Ten Eick R.E. // J. Physiol. (Lond).- V. 474.- P. 131-145.- 1994.
334. Scislo T.J. Purinergic mechanisms of the nucleus of the solitary tract and neural cardiovascular control / Scislo T.J., O'Leary D.S. // Neurol. Res. – V.27 (2). – P.182-194.-2005.
335. Searl .T.J. Mutual occlusion of P2X ATP receptors and nicotinic receptors on sympathetic neurons of the guinea-pig / Searl .T.J., Redman R.S., Silinsky // Journal of Physiology.- V.510.3.- P.783-791. -1998.
336. Searl T.J, and Silinsky E.M. Cross-talk between apparently independent receptors / Searl T.J, and Silinsky E.M. // J Physiol 513: 629, 1998.
337. Sesti C. EctoNucleotidase in cardiac sympathetic nerve endings modulates ATP-mediated feedback of norepinephrine release / Sesti C., Broekman M.J., Drosopoulos J.H., Islam N., Marcus A.J., Levi R.// J. Pharmacol. Exp. Ther. – V.300 (2). - P.605-11.- 2002.
338. Shacher J.B., Sromek S.M, Nicholas A.A., et al Human embryonic kidney cells endogenously express the P2Y1 and P2Y2 receptors // Europharmacology. – V.36. – P. 1181-1187.- 1997.

339. Shah A. Effects of adenine nucleotides on contractility of normal and postischemic myocardium / Shah A. Kechejian S.J., Kavaler .F, and Fisher V.J. //Am Heart J 87: 740-749.-1974.
340. Sharma V.K. Micromolar extracellular ATP increases intracellular calcium concentration in isolated rat ventricular myocytes / Sharma V.K. and Sheu S.S.// Biophys J. - V. 49. – P. 351A.- 1986.
341. Shen J. Characterization and mechanism of P2X-receptors-mediated increase in cardiac myocyte contractility /Shen J., Shutt R., Papano A., Liang B. //Am. J Physiol Heart Circ Physiol. V. 293.- P.3056-3062.- 2007.
342. Soleymani S. ATP release via Connexin Hemichannels from Rat Venticular fibroblasts / Soleymani S., Aroonsakool N., Landeen L., Yokoyama U., Giles W.R., Insel P.A // The FASEB Journal. V. 22. – P. 1129.- 2008.
343. Shoda M. ATP-activated cationic current in rabbit sino-atrial node cells / Shoda M., Hagiwara N., Kasanuki H. and Hosoda S. // J Mol Cell Cardiol.- V. 29. – P. 689-695. - 1997.
344. Sillinsky E.M. ATP mediates excitatory synaptic transmission in mammalian neurons / Sillinsky E.M. Gtrzanich V. Vanner S. M. // Br. J. Pharmacol. - P. 762-763.- 1992.
345. Sillinsky E.M.. Synchronous release of ATP and neurotransmitter within milliseconds of a motor nerve impulse in the frog / Sillinsky E.M., Redman RS. //Journal of Physiology.- P. 815-822.- 1996.
346. Simonsen U. Involvement of ATP in the non-adrenergic non-cholinergic inhibitory neurotransmission of lamb isolated coronary small arteries / Simonsen U., García-Sacristàñ A., Prieto D. // Br. J. Pharmacol. – V.120. –P.411-420. – 1997.
347. Slavikowa I. Postnatal changes of the tonic influence of the vagus nerves on the rat heart, and of the activity of acetyltransferase in the heart atria of rat / Slavikowa I., Tucek S. // Phisiol. Bohemose. – 1982. – V.31. P.133-120.
348. Sneddon P. ATP as a co-transmitter in rat tail artery / Sneddon P., Burnstock G. // Eur. J. Pharmacol.–V. 106. - P.149-152.-1994.
349. Song Y. ATP promotes development of afterdepolarizations and triggered activity in cardiac myocytes/ Song Y. and Belardinelli L. // Am J Physiol Heart Circ Physiol . - V.267.-P.2005-2011. - 1994.
350. Stoner H.B. Experimental limb ischaemia in man with special reference to the role of adenosine triphosphate / Stoner H.B. and Green H.N. // Clin Sci (Lond) V. 159.- 1945.
351. Surprenant A P2X receptors bring new structure to ligand-gated ion channels. / Surprenant A, Buell G, and North RA. // Trends Neurosci. 224-229.- 1995.
352. Suto F; Habuchi Y; Yamamoto T.; Tanaka H.; Hamaoka K. Increased sensitivity of neonate atrial myocytes to adenosine A1 receptor stimulation in regulation of the L-type Ca 2+ current / Suto F., Habuchi Y., Yamamoto T., Tanaka H., Hamaoka K. // Eur. J Pharmacol. - V. 15; 409 (3).- P. 213-221.- 2000.

353. Takikawa R. Adenosine-5'-triphosphate-induced sinus tachycardia mediated by prostaglandin synthesis via phospholipase C in the rabbit heart. / Takikawa R Kurachi Y, Mashima S, and Sugimoto T. // Pflügers Arch: - P.13-20. - 1990.
354. Talasila A., Germack R. and Dickenson J. Characterization of P2Y receptor subtypes functionally expressed on neonatal rat cardiac myofibroblasts. British journal of pharmacology.- 2009.- V. 158.- P. 339-353.
355. Talukder M.A. Comparison of the vascular effects of adenosine in isolated mouse heart and aorta / Talukder M.A., Morrison R.R., Mustafa S.J. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.- V.282 (1). – P.49 - 57. – 2000.
356. Tarasova O.S. Rodionov I.M. The role of purinergic neurotransmission in various cardiovascular reflexes / Tarasova O.S. Rodionov I.M. // Acta Physiol. Scand. – V. 146.- P. 441-448.- 1992.
357. Tereza-Miras M. P2D Purinoceptors. / Tereza-Miras M. Enrique Castro, Jesus Mateo, Jesus Pintor // Ciba Foundation symposium 198-P2 Purinoceptors: Localization, Function and Transduction Mechanisms. 28 sep. 2007.
358. Terzic A. A. G-proteins activate ATP-sensitive K⁺- channels by antagonizing ATP- dependent gating / Terzic A., Tung R.T., // Neuron.-Vol.12. - P. 885-893. - 1994
359. Thapaliya S. ATP released from perivascular nerves hyperpolarizes smooth muscle cells by releasing an endothelium-derived factor in hamster mesenteric arteries / Thapaliya S., Matsuyama H., Takewaki T. // J. Physiol.– V.521 (1). – P.191 - 199. -1999.
360. Todorov L. Inhibitory and facilitatory effects of purines on transmitter release from sympathetic nerves / Todorov L., Bjur R.A., Westfall D.P. // J. Pharmacol. Exp. Ther.. –V.268. - P.985-989. – 1994.
361. Todorov L.D. Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation / Todorov L.D, Mihaylova-Todorova S., Westfall T.D, Sneddon P., Kennedy C., Bjur R.A, and Westfall D.P. // Nature - V.387. 76-79.- 1997.
362. Tong X. Consequences of cardiac myocyte-specific ablation of KATP channels in transgenic mice expressing dominant negative Kir6 subunits / Tong X., Porter L. M., Liu G., Dhar-Chowdhury P., Srivastava S., Pountney D.J., Yoshida H., Artman M., Fishman G. I., Yu C., et al. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.-V. 291(2).-P.543 - 551.- 2006.
363. Trezide D.J. Characterization of purinoceptors mediating depolarization of rat isolated vagus nerve / Trezide D.J., Kennedy I., Humphrey P.P. // Br. J. Pharmacol.- V.110 (3). - P.1055-60. -1993.
364. Trezide D.J. The use of antagonists to characterize the receptors mediating depolarization of the rat isolated vagus nerve by alpha, beta – methylene adenosine 5`-triphosphate / Trezide D.J., Kennedy I., Humphrey P.P. // Br. J. Pharmacol. –V.112 (1). - P.282 - 288. - 1994.

365. Tsuzuki K. TNP-ATP-resistant P2X ionic current on the central terminals and somata of rat primary sensory neurons / Tsuzuki K., Ase A., Séguéla P., Nakatsuka T., Wang C., She J., Gu J. // J. Neurophysiol.- V.89. -P. 3235-3242. -2003.
366. Valera S. Presinaptic receptors / Michel A.D., Lundstrom K, Buell G.N., Surprenant A., Humphrey P.P. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.. V.38. -P.201-227.-1998
367. Vassort G. Adenosine 5'-Triphosphate: a P2-Purinergic Agonist in the Myocardium / Vassort G. // Physiol. Rev. - V. 81. - No. 2. - P. 767-806. -2001.
368. Ventura S. Adenosine 5'-triphosphate (ATP) is an excitatory cotransmitter with noradrenaline to the smooth muscle of the rat prostate gland / Ventura S., Dewalagama R.K., Lau L. // Br. J. Pharmacol. -V.138 (7). - P.1277 – 1284. . - 2003.
369. Vial C., Owen P., Opie L.H, and Posel D. Significance of release of adenosine triphosphate and adenosine induced by hypoxia or adrenaline in perfused rat heart / Vial C., Owen P., Opie L.H, and Posel D. // J. Mol. Cell Cardiol.- V. 19. – P. 187-197.- 1987.
370. Von Kügelgen I. P2-purinoceptor-mediated inhibition of noradrenaline release in rat atria / Von Kügelgen I., Stoffel D., Starke K. // B.r J. Pharmacol. – V.115. –P.247-254. – 1995.
371. 9. Von Kęgelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y- receptor subtypes. Pharmacol Ther. - 2006.- V. 110.- P. 415-432.
372. 24. Von Kęgelgen I. Pharmacology of mammalian P2X- and P2Y-receptors. Review No.3 / 9-2008.
373. Vulchanova L. Differential distribution of two ATP-gated channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry/ Vulchanova L., Arvidsson U., Riedl M., Wang J., Buell G., Surprenant A., North R.A, and Elde R.// Proc. Natl/ Acad .Sci USA.- V. 93. P.8063-8067.- 1996.
374. Webb T.E. Molecular biology of P2Y purinoceptors: Expression in heart / Webb T.E., Boluyt M.O., Barnard E.A. // J. Auton. Pharmacol.. –V.16. – P.303-307. – 1996.
375. Wee S. P2 purinoceptor-mediated cardioprotection in ischemic-reperfused mouse heart / Wee S., Peart JN., Headrick J.P. / J. Pharmacol Exp.Ther. 323 (3): 861-7, 2007.
376. Williams C.A., and Forrester T. Possible source of adenosine triphosphate released from rat myocytes in response to hypoxia and acidosis // Williams C.A., Forrester T. // Cardiovasc. Res.- V. 17. – P. 301-312. – 1983.
377. Wu S.N. Activation of muscarinic K⁺ channels by extracellular ATP and UTP in rat atrial myocytes/ Wu S.N., Liu S.I., Hwang T.L. // J. Cardiovasc. Pharmacol. – V.31(2) - P.203-211. .-1998
378. Xiang Z., Bo X., Burnstock G. Localization of ATP-gated P2X reseptor immunoreactivity in rat sensory and sympathetic ganglia / Xiang Z., Bo X., Burnstock G. // Neurosci Lett. – V. 256 (2). – P. 105-108.- 1998.

379. Xu J. Electrophysiological-anatomic correlates of ATP-triggered vagal reflex in the dog. V. Role of purinergic receptors / Xu J., Kussmaul W., Kurnik P., Mohamad Al-Ahdav, Pelleg A. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. V. 288. – P.651-655. – 2005.
380. Yang S., Cheek D.J, Westfall D.P, and Buxton I.L. Agonist-mediated release of ATP from cardiac endothelial cells. Purinergic axis in cardiac blood vessels / Yang S., Cheek D.J, Westfall D.P, and Buxton I.L. // Circ. Res. –V. 74. – P. 401-417.- 1994.
381. Yamada M. P2-purinoceptor activation stimulates phosphoinositide hydrolysis and inhibits accumulation of cAMP in cultured ventricular myocytes // Yamada M., Hamamori Y. Akita H. and Yokoyama M.// Circ Res. – P.477-485. - 1992.
382. Yamamoto T. P2-purinoceptors contribute to ATP-induced inhibition of L-type Ca²⁺ current in rabbit atrial myocytes / Yamamoto T., Habuchi Y., Nishio M., Morikawa J., Tanaka H. // Cardiovasc. Res. – V. 41 (1). - P. 166-74. - 1999.
383. Yang A.A. Beneficial role of cardiac P2X4 receptors in heart failure: rescue of the calsequestrin overexpression model of cardiomyopathy / Yang A., Sonin D., Jones L., Barry W. H., Liang B. T. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.– V.287 (3). – P.1096 - 1103. – 2004.
384. Zheng J.S, Christie A., De Young M.B, Levy M.N, and Scarpa A. Synergism between cAMP and ATP in signal transduction in cardiac myocytes / Zheng J.S, Christie A., De Young M.B, Levy M.N, and Scarpa A. // Am J Physiol Cell Physiol.V. 262. – P. 128-C135. - 1992.
385. Zheng J.S. Modulation by extracellular ATP of two distinct currents in rat myocytes / Zheng J.S, Christie A., Levy M.N, and Scarpa A. // Am. J. Physiol. Cell Physiol.- V. 26 - : C1411-C1417.- 1993.
386. Zhong Y. Guinea-pig sympathetic neurons express varying proportions of two distinct P2X receptors / Zhong Y., Dunn P.M., Burnstock G. // J. Physiol. (Lond). -2000. –V. 523 –P.391-402.
387. Zimmermann H. Signaling via ATP in the nervous system / Zimmermann H. // Trends Neurosci. – 1994.-V.17. – P.420-426.
388. Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides / Zimmermann H. // Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. – V. 362. – P.299-309. – 2000.
389. Zingman L.V. A. ATP-sensitive potassium channels: metabolic sensing and cardioprotection / Zingman L.V., Alekseev A. E., Hodgson-Zingman D.M., and Terzic A. J Appl Physiol, November 1, 103(5): 1888 - 1893. 2007;