УДК 612.17

Пуринергическая регуляция сердца в онтогенезе

Т.А. Аникина, Ф.Г. Ситдиков, А.А. Зверев, И.Н. Анисимова
Институт фундаментальной медицины и биологии
Казанский (Приволжский) федеральный университет
Tania57vg1@rambler.ru, Fgsirdikov@mail.ru, Irina171185@rambler.ru

На ранних этапах развития организма обнаружена высокая чувствительность миокарда к агонистам P2X- и P2Y-пуринорецепторов. Показано гетерохронное проявление функциональной активности разных подтипов P2X-рецепторов в разных отделах сердца. В раннем постнатальном онтогенезе в условиях незрелости симпатических и парасимпатических регуляторных влияний на сердце, разных этапов биологического созревания организма возможным регулятором сердечной деятельности являются АТФ и УТФ.

Ключевые слова: пуринорецепторы, АТФ, УТФ, сердце, крысы, онтогенез.

Онтогенетические исследования
требуют несоизмеримо большего
материала, чем исследования на взрослых...

Б.С. Кулаев

В 60-е г. 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 хорошо знакомая АТФ, известная в биохимии как «энергетическая валюта» клетки. В начале 1970-х г. было установлено, что АТФ выделяется из нервных окончаний и взаимодействует 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 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, целого сердца, выполненные на разных животных. АТФ обладает дозо-зависимым эффектом: небольшие дозы вызывают тахикардию, а более высокие концентрации АТФ замед-

ляют 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 неонатального 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. 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 [1; 2; 3].

О возрастных особенностях локализации Р2Х- и Р2Y-рецепторов в сердце имеются следующие данные. Иммуногистохимический анализ тканей сердца крысы показал присутствие $P2X_{1,2,4,5}$-подтипов пуриноцепторов на сарколемме рабочих кардиомиоцитов [4]. В сердце крысы были описаны $P2У_{1,2,4,6,11}$-рецепторы. Эти рецепторы были выявлены в целом неонатальном сердце, неонатальных сердечных фибробластах и неонатальных сердечных миоцитах, где преимущественно содержались $P2У_1$ -пуринорецепторы. Интересно, что $P2У_1$-, $P2У_2$- и $P2У_6$ -рецепторы были найдены на миоцитах взрослых животных, в то время как $P2У_4$- рецепторов обнаружено не было [5; 6; 7]. Таким образом, экспрессия Р2У-рецепторов меняется в онтогенезе и усиливается для $P2У_{1,2,6}$-рецепторов, а экспрессия $P2У_4$-рецептора вовсе прекращается во взрослых кардиомиоцитах.

Меньше известно о том, как меняется распространение Р2Х-рецепторов в сердце и кардиомиоцитах в онтогенезе. Так, $P2X_3$- рецепторы найдены в эмбриональном сердце человека, где показано обилие подтипов Р2Х-пуриноцепторов [7; 8].

При исследовании миокарда взрослых людей выявили присутствие $P2X_1$-, $P2У_1$-, $P2У_2$-, $P2У_6$- и $P2У_{11}$-рецепторов в правом и левом предсердиях и желудочках при отсутствии $P2У_4$-рецепторов [8]. $P2У_2$-, $P2У_4$- и $P2У_6$-пуринорецепторы были недавно клонированы из эмбрионального сердца человека. При сердечной недостаточности наблюдаются выраженные изменения: уровень рецепторной мРНК $P2X_1$- и $P2У_2$-пуринорецепторов увеличивается до 2,7 и 4,7 раз соответственно.

Показано также, что неонатальные миокардиальные клетки больше чувствительны к стимуляции Р1-рецепторов аденозином, чем кардиомиоциты взрослых крыс. Роль Р2-рецепторов в ингибировании Ca^{2+}-токов в неонатальных клетках относительно мала. Высокая чувствительность к аденозину с его

кардиопротекторным действием определяет ишемическую толерантность новорожденных сердец [10].

Вышесказанное свидетельствуют о важной физиологической роли Р2-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 [1; 5; 7]. Многие аспекты функционирования Р2-рецепторов на важнейших этапах раннего постнатального онтогенеза остаются малоизученными, а постсинаптические эффекты АТФ отличаются 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.

Организация и методы исследования

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.

При исследования роли Р2-пуриноцепторов в регуляции сердца крыс в раннем постнатальном онтогенезе мы изучали эффекты экзогенной АТФ и ее стойких аналогов на хронотропную и инотропную активность сердца. Нами выбраны животные возрастных групп: 7-, 14-, 21-, 56- и 100-суточного возраста. 7-суточные крысята считаются новорожденными, это ранний молочный период. 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 зафиксированы максимальные значения ЧСС [11], что соответствует результатам других авторов. По данным других авторов у крыс с 3 по 6 неделю происходит становление симпатической регуляции сердца [12]. Возраст 7–8 недель (56-суточные крысы) соответствует пубертатному периоду развития, сопровождающемуся выраженными изменениями эндокринной системы, оказывающей активное влияние на регуляцию сердечной деятельности. На этом этапе онтогенеза нарушается возрастное урежение ЧСС и вновь наблюдается ее увеличение [13]. Многие авторы подчеркивают возрастную зависимость влияния эндокринной системы на механизмы, регулирующие хронотропную и инотропную функции сердца [14]. В литературе имеются данные, что парасимпатическая нервная система в онтогенезе крыс начинает функционировать раньше симпатической [11; 15].

Следует отметить, что на данном этапе постнатального развития белых крыс максимальные среднесуточные приросты массы сердца установлены с 21 по 30 день [16]. Деление кардиомиоцитов у крыс полностью прекращается

к 21 суткам жизни и в период с 21 по 30 день идет усиленный рост образовавшихся кардиомиоцитов [17].

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

Методика регистрации сократимости полосок миокарда

Исследования проведены на лабораторных белых крысах стадного разведения. Сократительную активность миокарда в эксперименте *in vitro* изучали на полосках предсердий и желудочков. Определение реакции сократительной функции миокарда на действие агонистов проводили на установке «PowerLab» («ADInstruments») с датчиком силы «MLT 050/D» («ADInstruments»). Запись кривой регистрировали на персональном компьютере при помощи программного обеспечения «Chart 5.0». Рассчитывали абсолютные значения силы сокращения в граммах и общую длительность изометрического сокращения полосок миокарда в секундах, а также оценивали изменение на действие агониста в процентах от исходных показателей, которые принимали за 100%.

Из правого желудочка и предсердия при помощи специальных ножниц и пинцетов препарировали полоски. Длина полосок составляла 1,5–2 мм, ширина не превышала 1 мм. 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 Кребса. Раствор постоянно аэрировали карбогеном 95% O_2 и 5% CO_2, pH поддерживали в пределах 7,3–7,4

После погружения препаратов в резервуары следовал «период приработки» в течение 40–60 мин, в ходе которой мышечным полоскам постепенно придавалось оптимальное натяжение (такая точка растяжения, после преодоления которой начиналось снижение силы сокращения препарата). По окончании приработки 10 мин регистрировали исходные параметры сокращения, затем в течение 20 мин с добавлением в рабочий раствор агониста одной из концентраций. Агонисты Р2-рецепторов: – АТФ, 2-метилтиоАТФ, 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. Для изучения совместного влияния 2-метилтиоАТФ-карбахолина и изопротеренола записывали влияние карбахолина или изопротеренола в контроле, затем полоски отмывали, записывали исходную сократимость в течение 10 мин, вновь добавляли карбахолин или изопротеренол и на 10 мин добавляли 2-метилтиоАТФ. Также проводили эксперименты с обратной последовательностью подачи веществ, когда карбахолин или изопротеренол добавляли на фоне действия 2-метилтиоАТФ.

Методика регистрации электрокардиограммы и реограммы

В экспериментах *in vivo* регистрировали электрокардиограмму и реограмму. ЭКГ регистрировали на электрокардиографе ЭК1Т-04, с которого сигналы через аналогово-цифровой преобразователь передавались на память ЭВМ и для визуального контроля параллельно поступали в осциллограф С1-83. Для определения величины ударного объема крови сердца растущих крыс применяли метод тетраполярной импедансной реоплетизмографии, разработанный Кубичеком с соавторами [18] в модификации Б.С. Кулаева и Р.А. Абзалова. Регистрация дифференцированной реограммы осуществлялась при естественном дыхании параллельно с электрокардиограммой с помощью реоплетизмографа РПГ-204. Статистической обработке подвергались ЧСС, УОК и 2 параметра вариационной пульсограммы – амплитуда моды (АМо) и вариационный размах ($_{\Delta}X$), отражающие активность симпатической и парасимпатической нервной системы.

Фармакологические препараты в условиях *in vivo* вводили в яремную или бедренную вену. В экспериментах использовали следующие вещества: агонисты P2X-пуринорецепторов аденозинтрифосфорную кислоту (АТФ) 10^{-4}М (0,02 мг/кг); α, β-метилен АТФ 10^{-4}М (0,02 мг/кг); β, γ-метилен АТФ; сурамин (20мг/кг); реактив голубой-2 (5 мг/кг); TNP-ATP (0,8 мг/кг); ацетилхолин хлорид 10^{-4}М (20 мкг/кг); норадреналин битартрат (3,2 мкг/кг). Препараты АТФ, α, β-метилен АТФ, сурамин, реактив голубой-2, PPADS, TNP-ATP, β, γ-метилен АТФ, ацетилхолин, карбахолин, изопротеренол производства фирмы «Sigma». Все остальные вещества отечественного производства.

Достоверность различий в экспериментах в условиях *in vitro* определяли с использованием непараметрического парного и непарного критерия Стьюдента. В экспериментах *in vivo* достоверность различий в связанных группах устанавливали с использованием непараметрического критерия Вилкоксона. Достоверными считались результаты при $p<0,05$.

P2X-пуринорецепторы в регуляции сердечной деятельности крыс в постнатальном онтогенезе. Влияние экзогенной АТФ и ее аналогов на сердечную деятельность крыс

Для определения влияния АТФ в зависимости доза-эффект животным внутривенно вводили растворы АТФ в концентрации 10^{-3} –10^{-6}М объемом 0,075 мл (Рис. 1). Введение раствора АТФ в концентрации 10^{-6}М не оказало действия. АТФ в концентрации 10^{-5}М в течение 1 мин вызывала небольшое, но достоверное увеличение ЧСС. 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 (0,02мг/кг) привело к усилению хронотропного эффекта с 387±10,5 уд./мин до 415± 13,4 уд./мин ($n=12$; $p<0,05$). Также определяли дозозависмый эффект на введение АТФ животным 14-, 21-, 56- и 100-суточного возраста. Внутривенное введение АТФ в концен-

трации 10^{-6}М вызывает увеличение частоты сердечных сокращений без изменения ударного объема крови у 14- и 21-суточных крыс, а в концентрации 10^{-4}М – у 56- и 100-суточных.

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. Введение аденозина в концентрации 10^{-4}М не привело к изменению основных показателей работы сердца. Следовательно, увеличение ЧСС было вызвано прямым действием экзогенного АТФ.

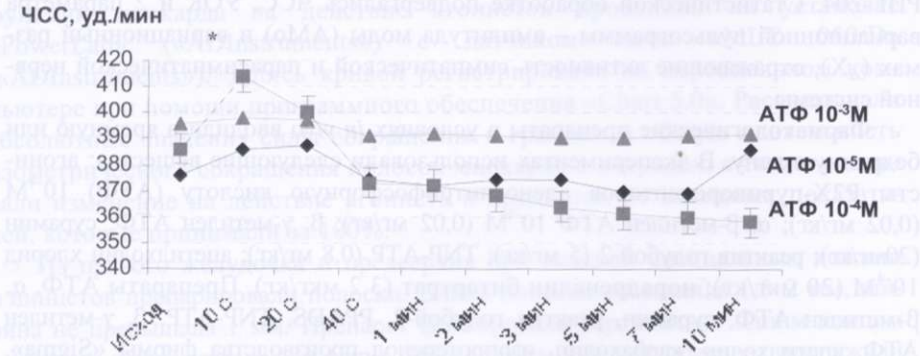

Рис. 1. Изменение ЧСС при внутривенном введении АТФ разных концентраций животным 100 – суточного возраста: * – $p \leq 0,05$

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 АТФ 10^{-4}М при блокаде β- адренорецепторов наблюдали такое же, как в контроле, увеличение ЧСС к 20 секунде ($p<0,05$) (рис.2). При воздействии АТФ на фоне блокады М-холинорецепторов атропином характер изменений ЧСС был таким же. Сохранение положительного эффекта АТФ на фоне блокады как β-адренорецепторов, так и М-холинорецепторов позволяет высказать предположение о прямом действии АТФ на сердце.

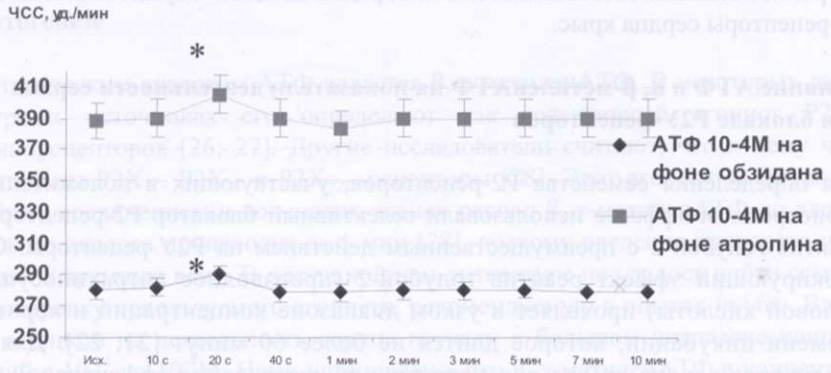

Рис. 2. Динамика ЧСС при введении АТФ на фоне блокады М-холинорецепторов и β-адренорецепторов сердца 100 – сут. животным

Влияние α, β-метиленАТФ на деятельность сердца крыс в онтогенезе

Известно, что АТФ является не стойким веществом и в присутствии экто-АТФазы быстро разрушается до аденозина при однократном прохождении через сердце [8]. Поэтому в следующей серии экспериментов был использован стойкий аналог АТФ α, β-метиленАТФ.

Устойчивый к энзиматическому распаду аналог АТФ – α, β-метиленАТФ является агонистом преимущественно для Р2Х-рецепторов. Для определения зависимости доза-эффект использовали растворы α, β-метиленАТФ в концентрации 10^{-11} –10^{-4}М. Стойкий аналог АТФ α, β-метиленАТФ увеличивает ЧСС в концентрациях 10^{-10}М у 14 -суточных крысят, 10^{-7}М – у 21- и 56-суточных и 10^{-4}М – у 100- суточных.

Эффект экзогенного α, β-метиленАТФ был кратковременным, таким же как действие АТФ, что, возможно, вызвано быстрой десенситизацией Р2-рецепторов сердца. Известно, что α, β-метиленАТФ селективно снижает чувствительность Р2Х-рецепторов к агонистам [19].

Влияние сурамина на показатели сердечной деятельности крыс

Для подтверждения влияния АТФ и ее 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 14μМ/кг (20 мг/кг) при внутривенном введении длится более часа [20]. Внутривенное введение экзогенных АТФ и α, β-метиленАТФ на фоне неселективного антагониста Р2-рецепторов сурамина не вызывает достоверных изменений ЧСС, УОК у крыс 14 – 100-суточного возраста. Следовательно, положительное хро-

нотропное влияние экзогенных АТФ и α, β-метиленАТФ осуществляется через Р2-рецепторы сердца крыс.

Влияние АТФ и α, β-метиленАТФ на показатели деятельности сердца при блокаде Р2У-рецепторов

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, которое длится не более 60 минут [21; 22]. Для Р2-рецепторов сердца крысы подтверждено существование эффективной блокады Р2У-рецепторов реактивом голубым-2 [23].

Введение АТФ в концентрации 10^{-6} –10^{-4}М, α, β-метиленАТФ в концентрации 10^{-10} – 10^{-4}М животным 14 – 100-суточного возраста на фоне реактива голубого-2 увеличивает ЧСС к 15–17 секунде после введения во всех возрастных группах. Введение α, β-метиленАТФ в концентрации 10^{-10}М на фоне реактива голубого-2 14-суточным крысятам увеличивает ЧСС с 357±3,6 уд./мин до 369 ± 4,1 уд/мин ($p<0,05$). У 21-суточных крысят положительный хронотропный эффект с 438 ±2,2 до 450 ±3,3 уд./мин ($p<0,05$) возникает при введении α, β-метиленАТФ в концентрации 10^{-7}М ($p<0,05$). Введение α, β-метиленАТФ в концентрации 10^{-4}М на фоне реактива голубого-2 у 56-суточных крыс увеличивает ЧСС с 394±2,8 уд./мин до 405±2,3 уд./мин ($p<0,05$) и 100-суточных с 354±3.0 уд./мин до 364±2,7 уд./мин ($p<0,05$). Таким образом, появление положительного хронотропного эффекта у крыс всех возрастных групп при введении АТФ и α, β-метиленАТФ на фоне блокады Р2У-рецепторов указывает на активацию Р2Х-рецепторов.

Влияние α, β-метиленАТФ на показатели сердечной деятельности крыс при блокаде $P2X_1$-рецепторов

Для определения подтипа Р2Х-рецепторов, участвующих в положительной хронотропной реакции при влиянии АТФ и ее аналогов использовали селективный блокатор TNP-АТФ (2′,3′-о-(2,4,6-тринитрофенил) аденозин-5-трифосфат), который является производным АТФ. Это сильный и неконкурентный антагонист $P2X_1$- пуриноцепторов сердца [8]. Он используется для характеристики нативных $P2X_1$-, $P2X_{2/3}$- и $P2X_3$-рецепторов в низкой наномолярной концентрации [24]. Длительность ингибирующего эффекта TNP-АТФ в концентрации 0,8 мг/кг составляет более 15 минут [25]. Внутривенное введение α, β-метиленАТФ в концентрации 10^{-10}М 14-суточным и в концентрации 10^{-7}М – 21-суточным крысятам на фоне TNP-АТФ не приводит к изменению основных показателей деятельности сердца. Введение α, β-метиленАТФ в концентрации 10^{-4}М 56- и 100- суточным крысам на фоне TNP-АТФ не вызывает изменений ЧСС, УОК, АМо и ΔХ .

Влияние агониста $P2X_1$ -рецепторов на деятельность сердца крыс в онтогенезе

Синтетическим аналогом АТФ является β, γ-метиленАТФ. В некоторых литературных источниках его определяют как селективный агонист $P2X_1$-пуринорецепторов [26; 27]. Другие исследователи считают, что к нему чувствительны $P2X_1$-, $P2X_3$- и $P2X_{2/3}$-рецепторы [28]. Этот агонист является нестойким соединением и во многих тканях распад β, γ-метиленАТФ до аденозинового аналога происходит за 1 мин [28], поэтому введение препарата проводили в яремную вену. В доступной нам литературе не удалось найти ссылок на дозировку используемого агониста, рекомендуемую в опытах *in vivo*. Влияние агониста на деятельность сердца изучали в большом диапазоне концентраций с 10^{-14} по 10^{-4}М. Нами установлено, что β, γ-метиленАТФ в концентрации 10^{-13}–10^{-8}М вызывает дозозависимое увеличение ЧСС в зависимости от возраста крыс. Внутривенное введение агониста к 15–17 секунде повышает ЧСС 14-сут. животным в концентрации 10^{-13}М, 21-суточным крысятам в концентрации 10^{-11}М, 56- и 100 -суточным – крысам в концентрации 10^{-8}М ($p<0,05$). Полученные результаты подтверждают участие $P2X_1$-пуриноцепторов в реализации положительного хронотропного эффекта.

Влияние АТФ и аденозина на сократимость миокарда крыс в раннем постнатальном онтогенезе

АТФ является агонистом всех подтипов Р2-рецепторов. Однако ее действие как агониста Р2-рецепторов очень кратковременно вследствие быстрого разрушения внеклеточными нуклеотидазами. АТФ в концентрации 10^{-7}М – 10^{-6}М вызывает увеличение силы сокращения миокарда желудочков (рис.3). Увеличение концентрации АТФ до 10^{-5}–10^{-4}М угнетает сократимость полосок миокарда. Чем же вызван отрицательный эффект высоких концентраций АТФ на сократимость миокарда? Долгое время влияние АТФ на сердце связывали с ее распадом до аденозина, который оказывает отрицательное хронотропное и инотропное действие через Р1-пуринорецепторы. Однако существует ряд экспериментальных доказательств прямого действия АТФ на сердце через свои собственные Р2-рецепторы независимо от ее превращения в аденозин. Поэтому в следующей серии экспериментов изучали влияние АТФ на сократимость полосок миокарда на фоне неселективного блокатора Р1-пуринорецепторов 8-фенилтеофелина в концентрации 10^{-3}М [29]. При блокаде Р1-рецепторов отрицательный инотропный эффект высоких концентраций АТФ не сохраняется (рис. 4). Следовательно, внеклеточная АТФ вызывает положительный инотропный эффект миокарда желудочков за счет активации Р2-пуринорецепторов.

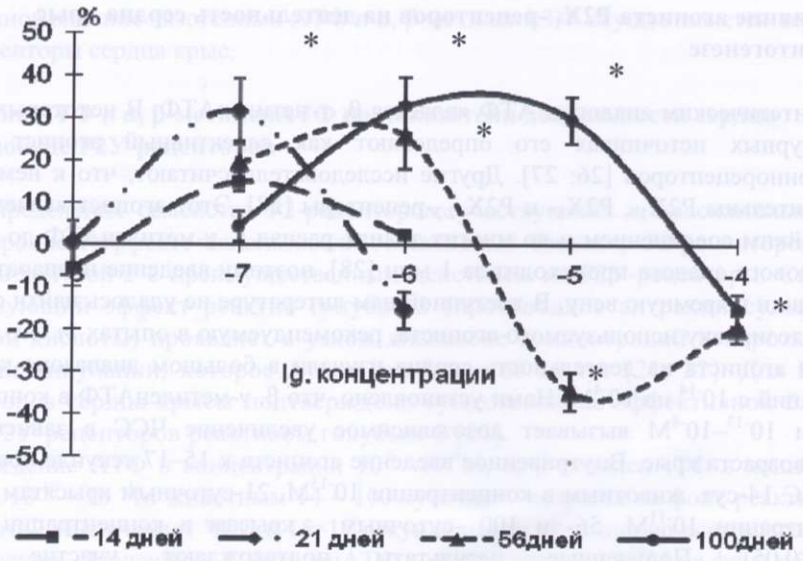

Рис. 3. Влияние АТФ на сократимость миокарда желудочков растущих крыс:
* – достоверно по сравнению с исходным значением: $p<0,05$

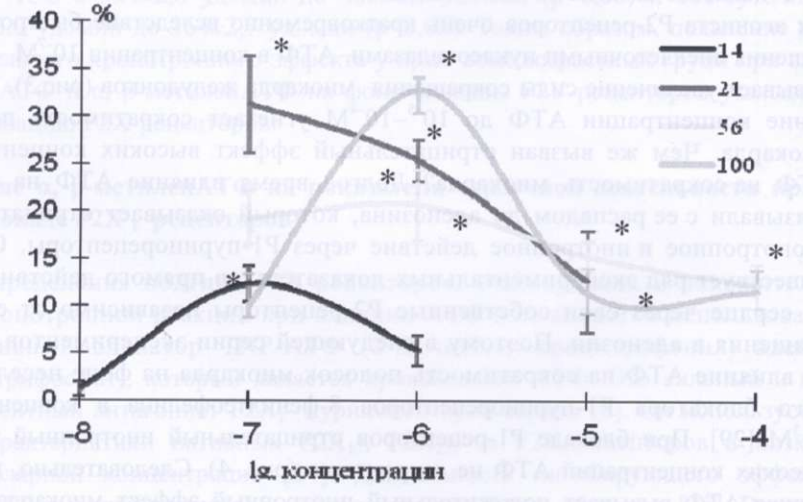

Рис. 4. Влияние АТФ на сократимость полосок желудочков миокарда крыс после блокады P1 пуринорецепторов 8-фенилтеофеллином:
*– достоверно по сравнению с исходным значением *$p<0,05$

Влияние 2-метилтиоАТФ на сократимость миокарда крыс в постнатальном онтогенезе

Подтипы Р2-рецепторов отличаются не только особенностями молекулярной структуры, но и чувствительностью к действию различных производных пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Выбор препарата 2-метилтиоАТФ определялся тем, что он является стойким аналогом АТФ, а также агонистом как Р2Х-, так и $P2Y_1$-рецепторов сердца.

Установлено, что 2-метилтиоАТФ в концентрации 10^{-10}М – 10^{-6}М вызывает дозозависимое увеличение силы сокращения полосок миокарда предсердий и желудочков 14–100 суточных крыс. У 14-суточных 2-метилтиоАТФ в концентрации 10^{-8}М увеличивает сократимость предсердий на 15,4±2,06% ($p<0,01$), желудочков – на 25,8±6,1% ($p<0,01$). У 21-дневных агонист в концентрации 10^{-7}М увеличивает силу сокращения предсердий и желудочков приблизительно на 31,3± 5,8 % ($p<0,01$). У 56-суточных при действии 2-метилтиоАТФ в концентрации 10^{-9}М сила сокращения миокарда предсердий и желудочков возрастает на 11,6±0,6% ($p<0,05$) и 13,3±0,8% ($p<0,05$). У 100-суточных крыс увеличение силы сокращения миокарда на 2-метилтиоАТФ в концентрации 10^{-6}М и 10^{-5}М у 100-суточных крыс составило всего 6,5±0,2%. Длительность сокращения увеличивается у 14- и 21-суточных крысят ($p<0,05$) (рис. 5).

Рис. 5. (Цв.) Влияние 2-метилтиоАТФ на силу сокращений миокарда желудочков сердца крыс: * – достоверно по сравнению с исходным значением *$p<0,05$

Влияние 2-метилтиоАТФ на сократительную активность миокарда при блокаде Р2У-рецепторов

Для определения семейства Р2-рецепторов, участвующих в положительном хронотропном и инотропном эффекте, использовали селективные блокаторы Р2Х и Р2У-рецепторов.

Реактив голубой-2 – антагонист с преимущественным действием на Р2Y-пуринорецепторы. В нашем случае 2-метилтиоАТФ является агонистом $Р2У_1$-рецепторов сердца, а реактив голубой -2 показывает стойкий ингибирующий эффект по отношению к этим рецепторам [22]. Блокатор добавляли в концентрации 1,5мМ [23].

При блокаде Р2У-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. В наших экспериментах на изолированных полосках предсердий и желудочков 2-метилтиоАТФ при блокаде Р2У-рецепторов проявил разную эффективность в зависимости от возраста животных. Так, в предсердиях у 21-суточных крысят сила и общая длительность сокращения полосок миокарда предсердий на действие агониста достоверно выше, чем у 100-суточных ($p<0,05$). У 56- и 100-суточных животных сила сокращения миокарда желудочков на действие агониста выше, чем у 14-суточных ($p<0,05$) (рис. 6). 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 [30].

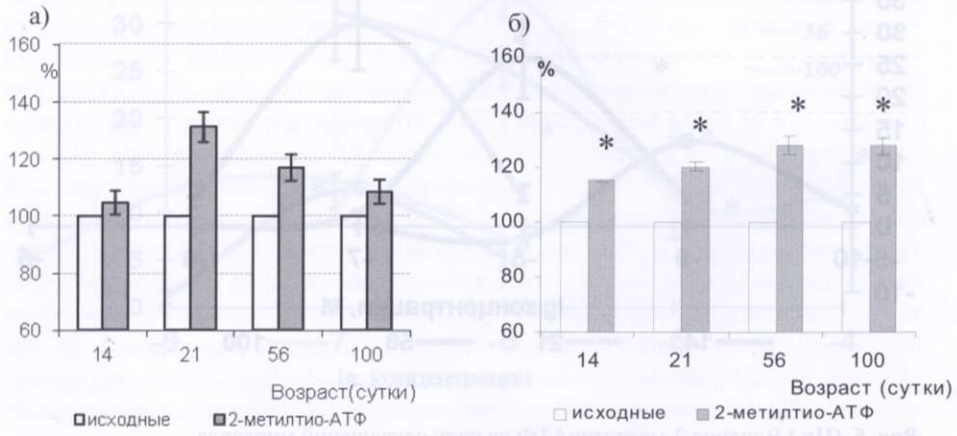

Рис. 6. Влияние 2-метилтиоАТФ на силу сокращений миокарда предсердий (а) и желудочков (б) сердца растущих крыс после блокады Р2Y рецепторов RB2:
* – достоверно по сравнению с исходным значением *$p<0,05$

Влияние 2-метилтиоАТФ на сократительную активность миокарда при блокаде Р2Х-рецепторов

В настоящее время установлено, что PPADS является антагонистом всех рецепторов семейства Р2Х, кроме $P2X_4$- и $P2X_6$-подтипов, а в больших концентрациях угнетает $P2У_1$-рецепторы [8]. Однако однозначного ответа о выраженности блокирующего эффекта PPADS по отношению к $P2У_1$-рецепторам не существует. Показано, что этот агонист бывает инертен по отношению $P2У_1$-опосредованному ответу [31; 32; 33].

В наших экспериментах PPADS, блокатор Р2Х-рецепторов в концентрации 30 мкрМ [29] 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 на 21%, что указывает на участие $P2X_4$-рецепторов ($p<0,05$) (рис. 7). Таким образом, наблюдается гетерохронное проявление функциональной активности разных подтипов Р2Х-рецепторов в предсердиях и желудочках сердца крыс.

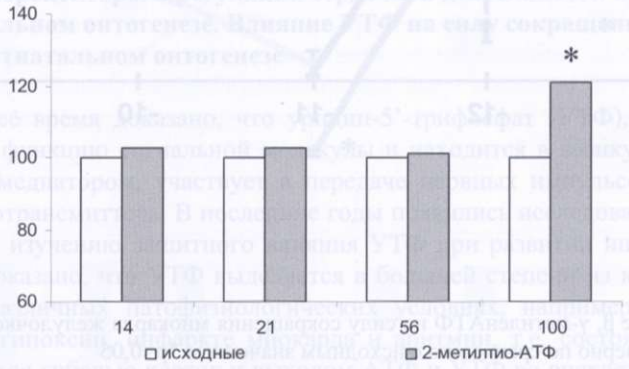

Рис. 7. Влияние 2-метилтиоАТФ на силу сокращения миокарда желудочков сердца растущих крыс после блокады Р2Х рецепторов PPADS:
* – достоверно по сравнению с исходным значением *$p<0,05$

Иммуногистохимический анализ тканей сердца крысы показал присутствие $P2X_{1,2,4,5}$-подтипов пуриноцепторов на сарколемме рабочих кардиомиоцитов [4]. Характер действия PPADS и ответы агониста могут также косвенно указывать на участие в повышении сократимости и $P2У_1$-рецепторов. Подтверждением выдвинутого предположения являются иммуногистохимические данные о возрастных особенностях локализации Р2У-рецепторов в сердце. Так, экспрессия Р2У-рецепторов в целом сердце и отдельных кардиомиоцитах меняется в онтогенезе, и для $P2У_1$-рецепторов она усиливается [5; 8].

Влияние агониста P2X $_1$-рецепторов на сократимость миокарда

Для определения подтипа P2X-рецепторов, участвующего в реализации положительного инотропного эффекта, использовали селективный агонист и антагонист этих рецепторов. Известно, что β, γ-метиленАТФ оказывает свое преимущественное действие на $P2X_1$-пуринорецепторы сердца. В экспериментах на полосках миокарда нами установлено, что β, γ-метиленАТФ в концентрации 10^{-13}–10^{-10}М вызывает дозозависимое увеличение силы сокращения миокарда предсердий и желудочков крыс в постнатальном онтогенезе.

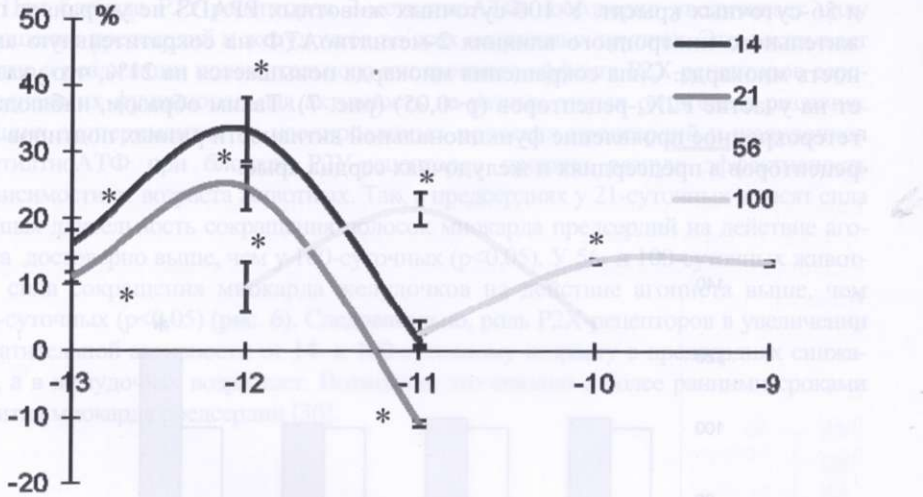

Рис. 8. Влияние β, γ-метиленАТФ на силу сокращения миокарда желудочков растущих крыс: *– достоверно по сравнению с исходным значением *p<0,05

При добавлении β,γ -метиленАТФ сила сокращения предсердий возрастает в концентрации 10^{-13}М на 12,1±1,7% у 14-суточных и в концентрации 10^{-12} - 10^{-11}М на 4,4±0,9% – у 21-суточных (p<0,05). У 56-суточных крысят при добавлении агониста в концентрации 10^{-12}М максимальная сократительная активность миокарда предсердий составляет 7,7± 1,5% (p<0,05). А у 100-суточных в концентрации на два порядка ниже – 10^{-10}М – сократимость увеличивается на 5,3±0,8% (p<0,05). Селективный агонист вызывает положительный инотропный эффект желудочков в каждом исследуемом возрасте в двух концентрациях. У 14- и 21-суточных крысят повышение сократительной активности происходит при действии β, γ-метиленАТФ в концентрации 10^{-12}–10^{-13}М. Максимальное увеличение силы сокращения желудочков при добавлении β, γ-метиленАТФ в концентрации 10^{-12}М составляет у 14-суточных 31,2±4,7%,

у 21-суточных – 24,5±3,3% ($p<0,01$). У 56-суточных животных оказываются эффективными концентрации β, γ-метиленАТФ 10^{-12} и 10^{-11}М. Наибольший сократительный эффект желудочков наблюдался в концентрации 10^{-11}М и составил 21,4±3,8% ($p<0,05$). У 100-суточных крыс максимальный эффект β, γ-метиленАТФ оказывает в концентрации 10^{-10}М, сократимость увеличивается на 13,6±1,8% ($p<0,05$) (рис. 8). Увеличение концентрации β, γ-метиленАТФ угнетает сократимость миокарда предсердий во всех исследуемых возрастных группах. Отрицательный эффект высоких концентраций β, γ-метиленАТФ на сократимость полосок миокарда вызван его распадом до аденозина, который оказывает эффект через Р1-рецепторы.

Полученные результаты повышения сократимости миокарда, опосредованные $P2X_1$-рецепторами, свидетельствуют о высокой чувствительности миокарда к агонистам Р2Х-рецепторов у 14- и 21-суточных крысят, особенно в желудочках.

Доказательством участия $P2X_1$-рецепторов служили эксперименты с селективным антагонистом $P2X_1$-, $P2X_{2/3}$-рецепторов TNP-АТФ. Добавление данного блокатора полностью предупреждает влияние β, γ-метиленАТФ на сократимость миокарда предсердий и желудочков всех возрастных групп, что подтверждает участие $P2X_1$-рецепторов в реализации положительного инотропного эффекта.

Р2Y-пуринорецепторы в регуляции сердечной деятельности крыс в постнатальном онтогенезе. 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 [34; 35]. Показано, что УТФ выделяется в большей степени из кардиомиоцитов, при различных патофизиологических условиях, например коронарной окклюзии, гипоксии, инфаркте миокарда и аритмии, т.е. 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 [36]. Известно, что содержание урациловых нуклеотидов в миокарде ниже по сравнению с адениновыми нуклеотидами, то есть с АТФ. Соотношение АТФ и УТФ в сердце соответствует 1:10 или 1:16 по мнению других авторов [8].

Присутствие внеклеточной УТФ считается доказанным, и урациловыми нуклеотидами активируются несколько подтипов Р2Y- рецепторов [8]. Р2Y-рецепторы – это метаботропные рецепторы, и в настоящее время известно 8 подтипов Р2Y- рецепторов.

В целом сердце, на отдельных кардиомиоцитах, сердечных миофибробластах [8; 37; 38] эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов [39] пока-

зано присутствие $P2Y_{1,2,4,6,11,12,13}$-подтипов рецепторов. $P2У_2$-, $P2У_4$- и $P2У_6$-рецепторы активируются УТФ.

Все Р2У-рецепторы фармакологически разделены на 3 группы по чувствительности к агонистам. Первая группа ($P2У_1$, $P2У_{11}$, $P2У_{12}$ и $P2У_{13}$) активируются адениннуклеотидами, то есть АТФ и АДФ. Вторая группа ($P2У_6$) стимулируются урацилнуклеотидами УТФ и УДФ, и третья группа ($P2У_2$ и $P2У_4$) отвечает на оба нуклеотида: урациловый и адениновый [38].

В последние годы был найден высокочувствительный метод, позволяющий определить концентрацию внеклеточной УТФ, содержание которой соответствует субнаномолярной концентрации [40]. 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 желудочках на 6–8% ($p<0,05$). 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% ($n=6$) ($p<0,05$) (рис. 9).

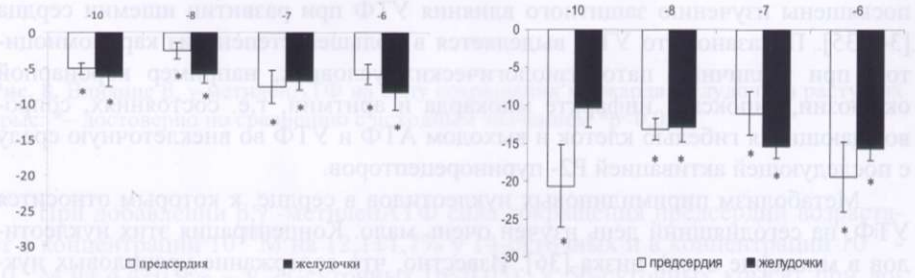

Рис. 9. Влияние УТФ на силу сокращения миокарда предсердий и желудочков крыс 7- (а) и 100-суточного возраста (б): * – достоверно по отношению к контролю (*$p<0,05$)

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 ($p<0.05$).

Роль $P2Y_4$-подтипа рецепторов в сократимости миокарда

В следующей серии экспериментов определяли подтип P2У рецепторов, участвующих в наблюдаемых эффектах. Для определения возможного участия $P2Y_4$-подтипа рецепторов в сократимости миокарда изучали влияние УТФ как агониста этого подтипа рецепторов на фоне блокады реактивом голубым-2 (RB2), (1,5 μM) [41]. Сурамин и PPADS не являются эффективными блокаторами по отношению к $P2Y_4$-подтипу пуринорецепторов [42].

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 $P2Y_4$-подтипа рецепторов добавление агониста не вызывает снижения сократимости миокарда.

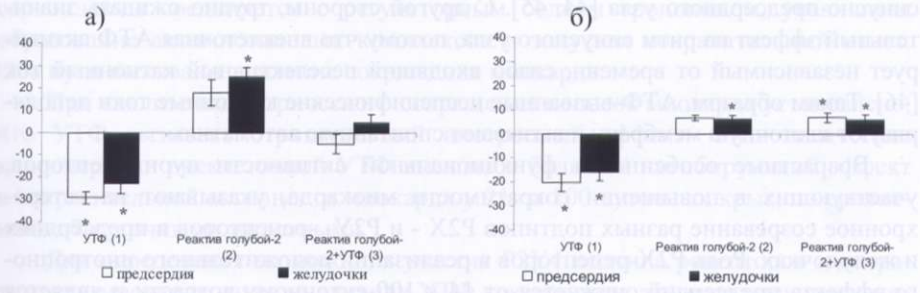

Рис. 10. Влияние УТФ в контроле и при блокаде реактивом голубым-2 у 21- (а) и 100- суточных животных (б)

Таким образом, на ранних этапах онтогенеза у 7-, 21- и 100-суточных крыс реализация ингибирующего эффекта, вызванного УТФ, осуществляется через $P2Y_4$-подтип рецепторов. В литературе показано разнонаправленное влияние УТФ на деятельность сердца. Так, УТФ в концентрации 10^{-6}–10^{-3}М вызывает снижение силы сокращения миокарда ушка правого предсердия на 7–10%. Увеличение сократимости миокарда крыс при действии УТФ наблюдали [8; 43]. Двойной эффект при добавлении УТФ на сократимость миокарда предсердий и желудочков крыс описывает Froldi. Большая часть P2У-рецепторов ($P2Y_{1,2,4,6,11}$) связаны с $G_{q/11}$-белком, который активирует фосфолипазу С с образованием инозитолтрифосфата, увеличением Ca^{2+} в клетке и последующим увеличением силы сокращения миокарда (рис. 10).

Таким образом, проведенные серии экспериментов с использованием разнообразных агонистов и блокаторов позволили получить новые данные о ве-

роятном вовлечении различных семейств и подтипов Р2-рецепторов в регуляцию сократимости миокарда в постнатальном онтогенезе.

Все используемые агонисты Р2-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 Р2Х-рецепторов на ранних этапах постнатального онтогенеза. Все агонисты Р2Х-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 Р2Х-рецепторов и активация неселективных катионных токов с преобладанием проницаемости для ионов кальция. Последующая деполяризация клетки является достаточной для активации потенциалзависимых Ca^{2+} каналов и дополнительному току Ca^{2+} внутрь клетки. В ряде работ показана значительная роль внеклеточной АТФ в появлении кальциевых токов и развитии ПД в клетках синусно-предсердного узла [44; 45]. С другой стороны, трудно ожидать значительный эффект на ритм синусного узла, потому что внеклеточная АТФ активирует независимый от времени, слабо входящий неселективный катионный ток [46]. Таким образом, АТФ-вызванные неспецифические катионные токи деполяризуют клеточную мембрану и вызывают спонтанную автоматию.

Возрастные особенности функциональной активности пуриноцепторов, участвующих в повышении сократимости миокарда, указывают на гетерохронное созревание разных подтипов Р2Х - и $P2У_1$ -рецепторов в предсердиях и желудочках. Роль Р2Х-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 $P2X_4$ и $P2Y_1$-рецепторов на действие 2-метилтиоАТФ в повышении сократимости миокарда предсердий и желудочков на ранних этапах онтогенеза незначительно и проявляется только у 100-суточных крыс.

Для определения подтипа Р2Х-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 $P2X_1$-пуринорецепторы сердца. Известно, что АТФ усиливает инотропизм и изменяет активность водителя ритма при взаимодействии с Р2Х-рецепторами через кальцийзависимый механизм. Поэтому выбор агониста β, γ-метиленАТФ не случаен. Проводимость Ca^{2+}-каналов у $P2X_1$-рецепторов самая высокая и превышает таковую у $P2X_2$-рецепторов (P_{Ca}/P_{Na} равна 3,9 и 2,2 соответственно). Этот подтип рецепторов располагается не только на кардиомиоцитах, но и вблизи контактов с симпатическими и парасимпатическими нервными окончаниями. Полученные результаты при введении β, γ-метиленАТФ в концентрации 10^{-13}–10^{-8}М и последующем увеличении ЧСС у крыс 14–100-суточного возраста подтверждают участие $P2X_1$-пуринорецепторов в положительном хронотропном эффекте.

В экспериментах на полосках миокарда нами установлено, что β, γ-метиленАТФ в концентрации 10^{-13}–10^{-10}М вызывает дозозависимое уве-личение силы сокращения миокарда предсердий и желудочков крыс в постна-тальном онтогенезе. Полученные результаты увеличения сократимости мио-карда, опосредованные $P2X_1$-рецепторами свидетельствуют о высокой чув-ствительности миокарда к агонистам и функциональной активности этих рецепторов у 14- и 21-суточных крысят. Доказательством участия $P2X_1$- рецепторов служили эксперименты с селективным антагонистом $P2X_1$-, $P2X_{2/3}$-рецепторов TNP-АТФ, который полностью предупреждает влияние β, γ-метиленАТФ на сократимость миокарда, что подтверждает участие $P2X_1$-рецепторов в положительном инотропном эффекте.

Стимуляция P2X-рецепторов экзогенной АТФ вызывает неселективный катионный ток. Вызванная деполяризация приводит к дополнительному току Ca^{2+} внутрь клетки через потенциалзависимые 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.

При анализе изометрического сокращения полосок миокарда установлено, что УТФ вызывает отрицательный инотропный эффект. Физиологические концентрации внеклеточной УТФ вызывают больший ингибирующий эффект в сократительной активности миокарда у 21- и 100-суточных крыс, по сравнению с 7-суточными животными.

Для определения возможного участия P2Y4 подтипа рецепторов в сократимости миокарда изучали влияние УТФ как агониста этого подтипа рецепторов на фоне блокады реактивом голубым-2. У 7-, 21- и 100- суточных животных после инкубации миокарда с реактивом голубым-2 отрицательный инотропный эффект УТФ не сохраняется. На фоне блокады $P2Y_4$-подтипа рецепторов добавление агониста не вызывает снижения сократимости миокарда. Таким образом, на ранних этапах онтогенеза, у 7-, 21- и 100-суточных крыс реализация ингибирующего эффекта, вызванного УТФ, осуществляется через $P2У_4$-подтип рецепторов.

В основе механизма ингибирующего инотропного эффекта УТФ лежит возбуждение метаботропных P2У-рецепторов. Отрицательный инотропный эффект может наблюдаться в ряде случаев при возбуждении и $P2У_2$-, $P2У_4$-подтипа рецепторов, которые активируются АТФ и УТФ и связаны с $G_{i/o}$ белком. УТФ через активацию $G_{i/o}$ белка ингибирует аденилатциклазу, снижает образование цАМФ и уменьшает поступление Ca^{2+} в клетку, вызывая уменьшение сократимости миокарда [38].

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, чувстви-

тельных к внеклеточной АТФ, и УТФ, дают возможность более детального исследования влияния пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов на основные функции сердца и возможном использовании агонистов этих рецепторов как кардиотонических средств при дисфункциях сердца.

Имеется большое число исследований, посвященных локализации пуринорецепторов в ЦНС, различных отделах головного мозга и возможного применения агонистов и блокаторов Р2-рецепторов в клинике при инсультах, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона.

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.

Литература

1. Liou JC., Fu WM. Additive effect of ADP and CGRP in modulation of the acetycholine receptor channel in Xenopus embryonic myocytes. Br J Pharmacol 115 (4): 563-8, 1995.
2. Sun L.S., Huber F., Robinson R.B., Bilezikian J.P., Steinbesg S.F., Vulliemoz Y. Muscarinic receptor heterogeneity in neonatal rat ventricular myocytes in culture. J. Cardiovasc. Pharmacol. 1996.- V.27.-P. 455–461.
3. Shacher J.B., Sromek S.M, Nicholas A.A., et al. Human embryonic kidney cells endogenously expess the $P2Y_1$ and $P2Y_2$ receptoss // Europharmacology. – V.36. – P. 1181-1187.- 1997.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Cheung K, Ryten M, Burnstock G. Abundant and dynamic expression of G protein-coupled P2Y receptors in mammalian development. Dev Dyn.- 2003.-V. 228:254′66.
8. Vassort G. Adenosine 5'-Triphosphate: a P2-Purinergic Agonist in the Myocardium / Vassort G. // Physiol. Rev. - V. 81. - No. 2. - P. 767-806. -2001.
9. 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 // Eur. J Pharmacol. - V. 15; 409 (3).- P. 213-221.- 2000.
10. Махинько В.И. Константы роста и функциональные периоды развития в постнатальной жизни белых крыс // Молекулярные и физиологические механизмы возрастного развития. – Киев: Наукова думка, 1975. – С.308 -325.
11. Ситдиков Ф.Г., Зефиров Т.Л. Лекции по возрастной физиологии сердца. Уч. пособие, Казань изд-во ТГГПУ 2006 102 с.
12. Xiao RP, Ji X, Lakatta EG. Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. Mol Pharmacol. – 1995. -47(2). P. 322–329
13. Зефиров Т.Л. Нервная регуляция сердечного ритма крыс в постнатальном онтогенезе: дисс. док. мед. наук / Зефиров Т.Л.- Казань. – 1999.- С.535.

14. MacGregor R., Klein R., Bansal D. Secretion of plasminogen activator activity from neonatal rat heart cell is regulated by hormones and growth factors. Ann. N.Y. Acad. Sci.- 1995.- V.752.- P. 331-342.
15. Кулаев Б.С., Анциферова Л.И. Онтогенез вегетативной нервной системы // Физиология вегетативной нервной системы. Л.: Наука, 1981. С. 496–510.
16. Нигматуллина Р.Р. Регуляция сердечного выброса крыс, развивающихся в условиях различных двигательных режимов. Дисс. на соис. уч. ст. канд.биол.наук. Казань, 1991.
17. Меерсон Ф.З. Феномен адаптационной стабилизации структур и защита сердца / Меерсон Ф.З., Малышев И.Ю. // М, 1993.- 159 с.
18. Kubicek W.G. The minnesoz impedance cardiograph-theory and applications.-Biomed. Eng. – 1974. – V.9. – P.410-416.
19. Ralevic V., Burnstock G. Receptors for Purines and Pyrimidines.- Pharmacol. Rev. – 1998. –V.50. - No 3. – P.413-492.
20. 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.
21. Зиганшин А.У., Зиганшина Л.Е., Бернсток Дж. Р2-рецепторы: теоретические предпосылки клинического воздействия.- Бюлл. экспер. биол. и мед. -2002. – Т.134.- №10. – С.365 – 369.
22. Hopwood A.M., Burnstock G. ATP mediates coronary vasoconstriction via P2X-purinoceptors and coronary vasodilatation via P2Y- purinoceptors in the isolated perfused rat heart.- Eur. J. Pharmacol. – 1987. V.136 (1). – P.49-54.
23. Burnstock G. Purinergic signaling.- Brit. J. Pharmacol. – 2006. –V.147.– P.172–187.
24. Burgard E.C., Niforatos W., van Biesen T., et al. Competitive antagonism of recombinant P2X (2/3) receptors by 2', 3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate (TNP-ATP). Mol. Pharmacol. – 2000. - Vol. 58 (6). - P. 1502-1510.
25. King B., Knowles I., Burnstock G., Ramage A. Investigation of the effects of P2 purinoceptor ligands on the micturition reflex in female urethane-anaesthetized rats. Br. J. Pharmacol.- 2004. –V.142. - P.519 - 530.
26. Bo Hu., Chiang C., Hu J., Dostrovsky J., Sessle B. P2X Receptors in Trigeminal Subnucleus Caudalis Modulate Central Sensitization in Trigeminal Subnucleus Oralis.- J. Neurophysiol. - 2002. - V.88. - № 4. – P.1614 – 1624.
27. Hu, B., Senkler, C., Yang, A., Soto, F., Liang, B. T. P2X4 receptor is a glycosylated cardiac receptor mediating a positive inotropic response to ATP. J. Biol. 2002
28. North A. Molecular Physiology of P2X Receptors.-Physiol.Rev.–2002.V.82.P.1013-1067.
29. Rubino A; Amerini S; Ledda F; Mantelli L // ATP modulates the efferent function of capsaicin-sensitive neurones in guinea-pig isolated atria. Br J Pharmacol 1992 Mar; 105(3): p516-20.
30. Швалев В.Н. Морфологические основы иннервации сердца / Швалев В.Н., Сосунов А.А., Гуски Г. // - М: Наука, 1992.- С.366.
31. Зиганшин А.У., Хазиахметов Д.Ф., Зиганшина Л.Е. и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 2003. Т. 135, № 1. С. 29-32.
32. 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.
33. Burnstock G. Purines and Purinoceptors: Molecular Biolody Overview. Encyclopedia of Neuroscience. 2009.- v.7, P. 1253-1262.

34. Ninomiya H., Otani H., Lu K., Uchiyama T., Kido M. and Imamura H. Enhanced IPC by activation of pertussis toxin-sensitive and –insensitive G-protein-coupled purinoreceptors. Am J. Physiol.- 2002b.- V. 282.- P. 1933-1943.
35. Wee S., Peart JN., Headrick JP. P2 purinoceptor-mediated cardioprotection in ischemic-reperfused mouse heart. J Pharmacol Exp Ther.-2007.- V. 323 (3).- P. 861-867.
36. Rossi A. and Olivares J. Basis of pyrimidine nucleotide metabolism in the myocardium. Cardiovascular Druds and Therapy 12: 171-177, 1998.
37. Zheng JS., O' Neill L., Long X., Webb TE., Barnard EA., Lakatta EG. et al. Stimulation of P2Y receptors activates c-fos gene expression and inhibits DNA synthesis in cultured cardiac fibroblasts. Cardiovasc Res.- 1998.- V. 37.- P. 718-728.
38. Talasila A., Germack R. and Dickenson J. Characterization of P2Y receptor subtypes functionally expressed on neonatal rat cardiac myofibroblasts. Dritish jornal of pharmacology.- 2009.- V. 158.- P. 339-353.
39. Wang LW., Karlsson L., Moses S., Hultgardh-Nilsson A., Andersson M., Borna C., Gudbjartsson T., Jern S. and Erlinge D. P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells. J. Cardiovasc Pharmacol. - 2002. - V. 40.- P. 841-853.
40. Lazarowski ER, Shea DA, Boucher RC, Harden TK. Release of cellular UDP-glucose as a potential extracellular signaling molecule. Mol. Pharmacol. 2003. - V.63. - P. 1190–1197.
41. Burnstock G. Purines and Purinoceptors: Molecular Biology Overview. In: Squire LR. Encyclopedia of Neuroscience.- 2009.-V. 7.- P.1253-1262.
42. Von Kьgelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y- receptor subtypes. Pharmacol Ther. - 2006.- V. 110.- P. 415-432.
43. Froldi G., Ragazzi E. Do ATP and UTP involve cGMP in positive onotropism on rat atria? Comp biochem physiol c toxicol pharmacol.– 2001.-V.128.–P.265-274.
44. Scamps F, and Vassort G. Mechanism of extracellular ATP-induced depolarization in rat isolated ventricular cardiomyocytes. Pflügers Arch 417: 309-316, 1990.
45. 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.
46. Shoda M, Hagiwara N, Kasanuki H, and Hosoda S. ATP-activated cationic current in rabbit sino-atrial node cells. J Mol Cell Cardiol 29: 689-695, 1997.