

КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
УНИВЕРСИТЕТ ВОСТОЧНОЙ ФИНЛЯНДИИ

*На правах рукописи*



Королёва Ксения Сергеевна

**МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ АТФ И СЕРОВОДОРОДА  
В ТРИГЕМИНАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ КРЫСЫ И МЫШИ**

03.03.01 – Физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань – 2020

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета (г. Казань) и в Институте Молекулярных наук им. А.И. Виртанена Университета Восточной Финляндии (г. Куопио) в рамках программы двойной аспирантуры.

- Научный руководитель: **Ситдикова Гузель Фаритовна**  
доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии человека и животных ИФМиБ ФГАОУ ВО КФУ
- Научный консультант: **Гиниатуллин Рашид Асхатович**  
доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник НИЛ OpenLab Нейробиологии ИФМиБ ФГАОУ ВО КФУ  
профессор Института Молекулярных наук им. А.И. Виртанена Университета Восточной Финляндии (г. Куопио)
- Официальные оппоненты: **Маслюков Петр Михайлович**  
доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии с биофизикой федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Ярославль)
- Гайдуков Александр Евгеньевич**  
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (г. Москва)
- Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова» Российской академии наук (г. Санкт-Петербург)

Защита диссертации состоится «23» сентября 2020 года в 13:00 часов на заседании диссертационного совета КФУ.03.06 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420015, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 76, ауд. 208 (актовый зал).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском федеральном университете.

Автореферат разослан «8» апреля 2020 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета КФУ.03.06,  
д.б.н., профессор



Т.А. Аникина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Мигрень – хроническое заболевание, характеризующееся комплексом симптомов, включающих одностороннюю пульсирующую и продолжительную головную боль, часто сопровождающуюся тошнотой или рвотой, а также повышенной реакцией на световые или звуковые раздражители [Ettlin, 2013]. Согласно международной оценке *Global Burden of Disease*, проведенной в 2015 году, мигрень была признана третьим наиболее распространенным заболеванием и седьмой по величине причиной инвалидности во всем мире [Steiner *et al.*, 2016]. Мигрень с ее сложным патогенезом, включающим изменения со стороны нервной, иммунной и сердечно-сосудистой систем и ограниченной эффективностью медикаментозного лечения, представляет собой одну из актуальнейших проблем современной медицины.

Клинические и экспериментальные наблюдения свидетельствуют о ведущем вкладе тройничного нерва и сосудов оболочек головного мозга в формировании ноцицептивного сигнала при мигрени [Olesen *et al.*, 2009; Schueler *et al.*, 2014]. Окончания тройничного нерва и сосуды образуют так называемую тригемино-вазкулярную систему, в которой формируется исходный болевой сигнал в афферентных окончаниях, передающийся в вышестоящие отделы ноцицептивной системы [Nosedá & Burstein, 2013]. Согласно пуринергической теории мигрени, предложенной Бернстоком [Burnstock, 1996; Nosedá & Burstein, 2013], экстраклеточный АТФ вызывает вазодилатацию сосудов и таким образом провоцирует приступ мигрени. Кроме того, АТФ непосредственно стимулирует первичные нервные окончания, расположенные в твердой оболочке головного мозга, что приводит к повышению частоты генерации потенциалов действия в тройничном нерве, оказывая, таким образом, проноцицептивное действие [Burnstock, 1996; 2009]. Однако, рецепторные механизмы действия АТФ в афферентах тройничного нерва и его влияние на тучные клетки в менингеальных оболочках недостаточно изучены. Поэтому актуальным является исследование механизмов действия АТФ в тригемино-вазкулярной системе, что позволит идентифицировать новые первичные мишени для терапевтического воздействия при мигрени и ее профилактики.

В научной литературе появляется все больше данных об участии эндогенного газообразного посредника сероводорода ( $H_2S$ ) в процессах ноцицепции [Kawabata *et al.*, 2007; Okubo *et al.*, 2012]. Иммуногистохимическими методами была показана экспрессия фермента синтеза  $H_2S$  – цистатионин- $\beta$ -синтазы (ЦБС) в нейронах сенсорных ганглиев (спинномозговых и ганглиях тройничного нерва) [Xu *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2013]. Более того, уровень экспрессии ЦБС повышается при развитии воспалительного процесса [Bhatia, 2015], а  $H_2S$  способен модулировать нейрональную возбудимость [Kimura, 2002]. Однако, данные о роли  $H_2S$  в ноцицептивной системе противоречивы [Bhatia *et al.*, 2005; Cunha & Verri, 2007]. С одной стороны, показано, что  $H_2S$  способен активировать ряд ионных каналов, участвующих в восприятии болевых стимулов, таких как TRPV1 и TRPA1 рецепторы [Trevisani *et al.*, 2016], а также  $Ca^{2+}$ -каналы Т-типа. С другой стороны,  $H_2S$  вызывает активацию АТФ-зависимых калиевых или  $Ca^{2+}$ -активируемых калиевых каналов большой проводимости, что приводит к гиперполяризации и снижению нейрональной возбудимости, а

также стабилизирует тучные клетки [Sitdikova *et al.*, 2009, Mustafina *et al.*, 2015, Matsui *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2017]. Кроме того, недавние исследования указывают на антиоксидантный и противовоспалительный потенциал H<sub>2</sub>S [Mannelli *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2019]. Ко-экспрессия ЦБС и АТФ активируемых P2X рецепторов была обнаружена в сенсорных ганглиях [Xu *et al.*, 2009]. Этот факт указывает на возможное взаимодействие между сигнальными каскадами, активируемыми H<sub>2</sub>S и АТФ через P2X рецепторы. Однако, данные о влиянии H<sub>2</sub>S на пуриnergические механизмы ноцицепции и, в частности, при мигрени отсутствуют.

**Цель исследования** – анализ рецепторных механизмов влияния АТФ в периферических окончаниях тройничного нерва, а также выявление эффектов H<sub>2</sub>S на АТФ-зависимые мишени, опосредующие генерацию ноцицептивного сигнала.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать влияние АТФ на электрическую активность тройничного нерва крысы и мышцы и выявить роль P2X<sub>3</sub> рецепторов в про-ноцицептивном действии АТФ;
2. Оценить влияние АТФ и агониста P2X<sub>7</sub> рецепторов на дегрануляцию тучных клеток в менингеальных оболочках крысы;
3. Проанализировать роль тучных клеток и медиатора тучных клеток серотонина в эффектах АТФ на электрическую активность тройничного нерва с использованием генномодифицированных мышей с дефицитом тучных клеток (C57BL/6J-Kit<sup>W-v/J</sup>);
4. Определить роль TRPV1 и P2X<sub>3</sub> рецепторов в эффектах H<sub>2</sub>S на про-ноцицептивное действие АТФ в тройничном нерве крысы;
5. Проанализировать влияние донора H<sub>2</sub>S на входящие токи и кальциевые сигналы, вызванные активацией P2X<sub>3</sub> рецепторов в изолированных нейронах тройничного ганглия;
6. Оценить влияние H<sub>2</sub>S на базальный уровень внеклеточного АТФ и АТФ-вызванную дегрануляцию тучных клеток в менингеальных оболочках мозга крысы.

### **Научная новизна работы**

Впервые показано, что про-ноцицептивное действие АТФ в тройничном нерве связано не только с прямой активацией P2X<sub>3</sub> рецепторов периферических афферентов, но также и с дегрануляцией тучных клеток с последующим высвобождением серотонина, усиливающего ноцицептивный сигнал. Этот механизм был раскрыт благодаря использованию генномодифицированных мышей с дефицитом тучных клеток (C57BL/6J-Kit<sup>W-v/J</sup>). Впервые нами было показано, что газомедиатор H<sub>2</sub>S ингибирует про-ноцицептивное действие АТФ, предотвращая усиление электрической активности тройничного нерва. Механизмы анти-ноцицептивного действия H<sub>2</sub>S включают угнетение кальциевых сигналов, вызванных активацией P2X<sub>3</sub> рецепторов в нейронах тройничного ганглия. Получены новые данные о том, что H<sub>2</sub>S снижает уровень внеклеточного АТФ и предотвращает АТФ-вызванную дегрануляцию тучных клеток в менингеальных оболочках. Таким образом, сероводород может рассматриваться как эндогенный анти-ноцицептивный агент, препятствующий пуриnergической активации системы тройничного нерва, ответственной за генерацию болевых сигналов при мигрени.

### **Научно-практическая значимость работы**

Полученные данные вносят вклад в развитие фундаментальных знаний о пуринергических механизмах ноцицепции в системе тройничного нерва в мозговых оболочках, генерирующих болевую сигнализацию при мигрени. Выявлены прямые и опосредованные механизмы влияния АТФ на периферические афферентные окончания, в частности, роль активации ионотропных  $P2X_3$  рецепторов, дегрануляции тучных клеток, в результате чего высвобождаются другие агенты, обладающие собственными проноцицептивными эффектами. Кроме того, проанализированы механизмы антиноцицептивного действия сероводорода, что расширяет представления о роли  $H_2S$  в восприятии и передаче болевого стимула в системе тройничного нерва. Этот периферический отдел ноцицептивной системы является основной мишенью для фармакологического воздействия при головной боли. Поэтому полученные результаты, оказывающие вклад в понимание патогенеза мигрени, в частности, установление роли  $P2X_3$ ,  $P2X_7$  и  $5-HT_3$  рецепторов, могут быть использованы для разработки новых подходов для создания антиноцицептивных препаратов для лечения и профилактики.

### **Методология и достоверность полученных данных.**

Эксперименты проводились на самцах крыс *Wistar* возраста 4-5 недель (Р 35-40) и мышах (дикого типа и линии  $C57BL/6J$ -Kit<sup>W-v/J</sup> с выраженным дефицитом тучных клеток). Были использованы животные из вивария Казанского федерального университета и Университета Восточной Финляндии (г. Куопио). Экспериментальные протоколы соответствовали этическим нормам по гуманному обращению с животными, принятым в Казанском федеральном университете и одобрены Локальным этическим комитетом КФУ (протокол № 8 от 05.05.2015) и Университетом Восточной Финляндии (лицензия EKS-002-2017). Все меры были предприняты для минимизации числа используемых в экспериментах животных (общее количество используемых животных – 57).

В качестве методов исследования использовали:

1. электрофизиологический метод регистрации потенциалов действия от афферентов тройничного нерва;
2. регистрация ионных токов в изолированных нейронах тройничного ганглия методом патч-кламп;
3. флуоресцентный метод регистрации изменения уровня внутриклеточного кальция в изолированных нейронах тройничного ганглия;
4. гистологический метод окрашивания тучных клеток твердой оболочки мозга крыс;
5. люминесцентный метод анализа концентрации АТФ.

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментальных данных и статистическими методами анализа.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. АТФ обладает про-ноцицептивной активностью в системе тройничного нерва за счет прямой активации P2X<sub>3</sub> рецепторов афферентных окончаний, а также за счет дегрануляции менингеальных тучных клеток с последующим высвобождением серотонина, обладающего собственным про-ноцицептивным действием через 5-HT<sub>3</sub> рецепторы.
2. Сероводород снижает про-ноцицептивное действие АТФ в результате угнетения входящих токов и кальциевых сигналов, вызванных активацией P2X<sub>3</sub> рецепторов, а также за счет стабилизирующего действия на менингеальные тучные клетки.

### **Апробация результатов**

Материалы работы представлены на XII Международной конференции Немецкого общества нейробиологов (г. Гёттинген, Германия, 2017); XII научной конференции «Winter School» (г. Куопио, Финляндия, 2018); Международной конференции «Mitochondria and ROS Signaling» (г. Куопио, Финляндия, 2018); XI Международном нейробиологическом форуме FENS (г. Берлин, Германия, 2018); III международной научной конференции «Современные проблемы нейробиологии» (г. Ярославль, Россия, 2018); 53й международной конференции, посвященной клиническим исследованиям ESCI (г. Коимбра, Португалия, 2019).

По материалам диссертации опубликовано 17 печатных работ, в том числе 6 в журналах из перечня ВАК, 11 – в тезисах докладов конференций.

### **Личный вклад диссертанта в исследовании**

Данная научная работа была выполнена при личном участии диссертанта в анализе литературных данных, формулировке цели и задач исследования, проведении экспериментов, анализе и обсуждении результатов и подготовке публикаций.

### **Структура диссертации**

Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания методик исследования, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 310 источников. Диссертация иллюстрирована 17 рисунками и 1 таблицей.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Регистрация потенциалов действия в тройничном нерве крысы и мыши

Эксперименты проводились на самцах крыс *Wistar* возраста 9-12 дней (P 9-12) для культуры нейронов тройничного ганглия и 4-6 недель (P 28-42) для препарата изолированного черепа, на мышах дикого типа (линия JAXC57BL/6J) и мышах с дефицитом тучных клеток (линия C57BL/6J-Kit<sup>W-v/J</sup>) в возрасте 3х месяцев. В качестве объекта исследования *ex vivo*, использовали препарат изолированного черепа крысы [De Col *et al.*, 2012], который представляет собой половину черепной коробки с сохраненной твердой оболочкой мозга (гемискальный препарат), в которой проходят сосуды и нервные волокна. Перед началом эксперимента периферический отросток тройничного нерва выделялся из твердой оболочки мозга и засасывался в стеклянный электрод. Препарат постоянно находился в физиологическом растворе следующего состава (в мМ): 120 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 11 глюкоза, 24 NaHPO<sub>4</sub>, 30 NaHCO<sub>3</sub> с оксигенацией 95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>. Электрические сигналы записывались с использованием усилителя DAM 80 (Полоса пропускания 0.1 Гц-1 кГц; коэффициент усиления 10000; WPI, США). Сигналы были оцифрованы на ПК с использованием платы NI PCI6221 (National Instruments, США) и программного обеспечения WinEDR v.3.2.7 (Strathclyde University, Великобритания).

### Регистрация P2X<sub>3</sub> токов и Ca<sup>2+</sup>-сигналов в культуре изолированных нейронов тройничного ганглия

Для регистрации токов P2X<sub>3</sub> рецепторов использовали первичную культуру нейронов тройничного ганглия 9-12 дневных крыс *Wistar*. Животные подвергались декапитации, ганглии тройничного нерва после извлечения помещались в холодный раствор F12 (Ham's F12 Nutrient Mixtur) и измельчались. Для диссоциации нейронов использовали ферментативный коктейль, содержащий 0.25 мг/мл трипсина, 1 мг/мл коллагеназы и 0.2 мг/мл ДНКазы. Диссоциированные нейроны помещались на стекла, покрытые поли-L-лизинном, и находились в инкубаторе при температуре 37°C, 5%CO<sub>2</sub> в течение 24 ч до начала эксперимента. В ходе эксперимента клетки постоянно перфузировались раствором, содержащим (мМ): 148 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 Hepes, 10 D-Glucose, pH=7.2. Внутриклеточный раствор содержал (мМ): 145 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 Hepes, 5 EGTA, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 2 Mg-ATP, 0.5 Na-GTP, 5 KCl, pH=7.2.

Регистрация P2X<sub>3</sub> токов осуществлялась с помощью метода патч-кламп в режиме «целая клетка» (whole cell) с использованием усилителей Axopatch-200B (Axon Instruments/Molecular Devices, США) и патч-пипеток из боросиликатного стекла (Havard Apparatus, США) с сопротивлением 3-10 МОм. P2X<sub>3</sub> токи вызывались локальной аппликацией агониста  $\alpha,\beta$ -meATP в концентрации 20 мкМ в течение 2 сек с использованием системы быстрой перфузии (RSC200, BioLogic Science Instruments, Франция) со временем подачи раствора ~20 мс. Для предотвращения десенситизации P2X<sub>3</sub> рецепторов  $\alpha,\beta$ -meATP апплицировали с интервалом в 5 мин. Данные патч-кламп регистрации были проанализированы с помощью программного обеспечения Clampfit (Axon Instruments/Molecular Devices, США). Анализировали изменение амплитуды P2X<sub>3</sub>-токов в контроле и при воздействии донора H<sub>2</sub>S.

Для визуализации кальциевых сигналов в изолированных нейронах использовали флуоресцентный маркер Fluo4-AM (2 мкМ). Клетки помещались во внеклеточный раствор,

содержащий краситель, и инкубировались в течение 30-40 минут при 37°C в темноте. Затем клетки помещались на 10 минут в стандартный внеклеточный раствор с целью обеспечения полной дезтерификации сложных эфиров. Далее проводилась флуоресцентная визуализация окрашенных клеток при помощи микроскопа Axio Observer.D1 (Carl Zeiss, Германия). Были использованы фильтр возбуждения (BP 450-490 нм), светоделитель (FT 510 нм) и фильтр эмиссии (LP 555 нм). Флуоресцентные изображения записывались с помощью высокоскоростной камеры AxioCam MRm (Carl Zeiss, Германия). Исследуемые вещества апплицировали с помощью гравитационно-управляемой перфузионной системы (ALA Scientific Instruments, США). Для дифференциации нейрональных клеток использовался раствор 100 мМ KCl, который подавался в течение 2 сек. Для обработки флуоресцентных изображений и оценки интенсивности флуоресценции (в относительных единицах, о.е.) была использована программа ImageJ (НИН, США), подсчет амплитуды пиков проводился с использованием математического пакета MATLAB (MathWorks, США).

### **Исследование дегрануляции тучных клеток**

Исследование осуществлялось с помощью гистологического метода окрашивания твердой оболочки мозга крыс (P 35-40) Толуидиновым Синим [Гусельникова *и др.*, 2014]. Черепа были помещены в базовый раствор с исследуемыми растворами на 20 мин, после чего помещались в параформальдегид (4%) на 12 часов. Перед выделением мозговых оболочек черепа промывали в фосфатно-солевом буферном растворе следующего состава (мМ): 137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Выделенные оболочки фиксировали на предметном стекле. Окрашивание Толуидиновым Синим длилось 10 мин, затем фиксированные препараты промывались дистиллированной водой и обезвоживались этиловым спиртом (95-99%). Съемка осуществлялась при 20x увеличении. Степень дегрануляции оценивали визуально, расчет велся в % от общего количества клеток (не менее 100).

### **Определение уровня внеклеточного АТФ**

Оценку концентрации АТФ, выделяющегося из тканей твердой оболочки мозга крысы (P 35-45), осуществляли с помощью набора для анализа люминесценции АТФ (Cat № 6016941; PerkinElmer, США). Изолированные половинки черепа крыс наполняли базовым раствором. После 20 минутной инкубации осуществлялся забор раствора. Анализ выполняли в соответствии с инструкциями протокола набора для анализа ATPlite, используя 96-луночные планшеты Costar (Corning, США). Люминесценцию измеряли с помощью считывающего устройства для микропланшетов POLARstar Optima (BMG Labtech GmbH, Германия).

### **Статистическая обработка**

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью программного обеспечения MATLAB (MathWorks, США) и Origin Pro 2015 (OriginLab, США). Для оценки достоверности использовали t-критерий Стьюдента (для зависимых - парных и независимых выборок). Различия считались статистически достоверными при  $p < 0.05$ . Все значения указаны как среднее ± ошибка средней ( $M \pm SEM$ ).

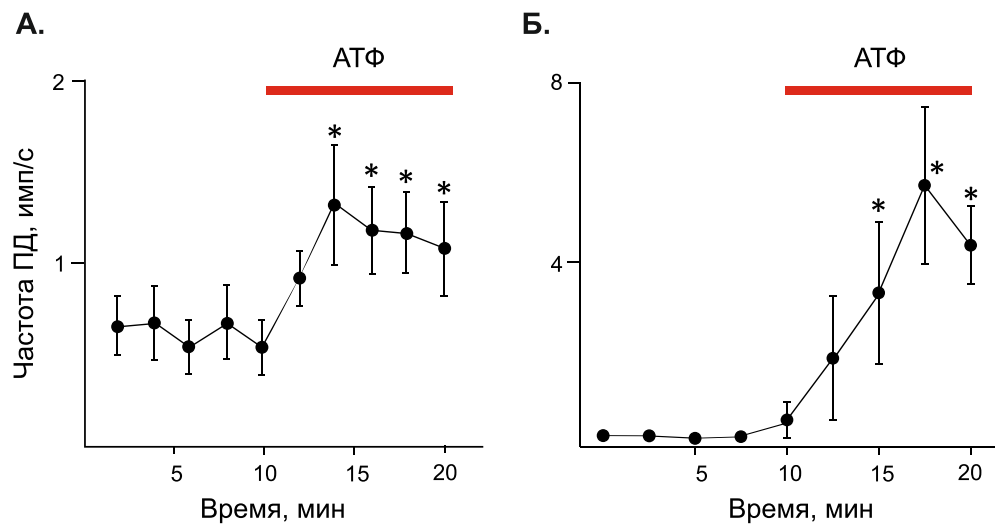


## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Исследование эффектов и механизмов влияния АТФ на частоту потенциалов действия тройничного нерва крысы и мыши

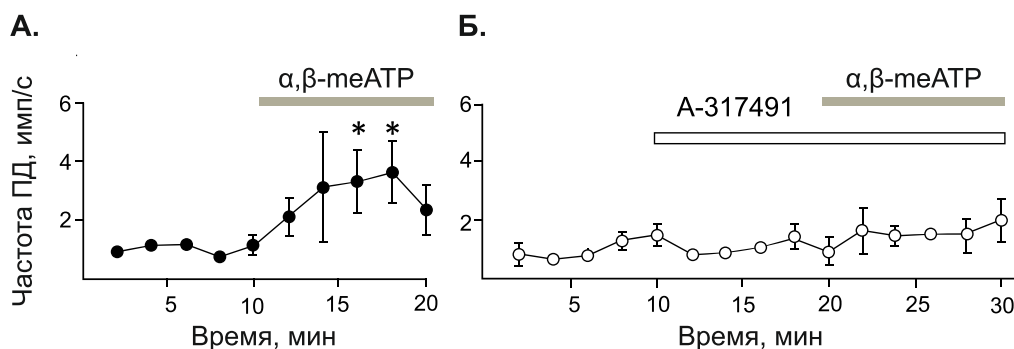
Периферическая часть тройничного нерва в менингеальной оболочке обладает спонтанной активностью. У крысы частота потенциалов действия (ПД) в контроле составила  $0.54 \pm 0.13$  имп/с; у мыши базовая частота ПД –  $0.23 \pm 0.13$  имп/с.

Аппликация АТФ приводила к увеличению частоты ПД в тройничном нерве крысы и мыши (Рисунок 1). Пик частоты ПД в присутствии АТФ (100 мкМ) у крыс составил  $1.33 \pm 0.32$  имп/с ( $n=12$ ;  $p<0.05$ ; Рисунок 1 А); у мышей АТФ обладал более выраженным действием, максимальная частота ПД составила  $5.66 \pm 1.69$  имп/с ( $n=6$ ;  $p<0.05$ ; Рисунок 1 Б).



**Рисунок 1.** Влияние АТФ на частоту потенциалов действия (ПД) тройничного нерва, иннервирующего твердую оболочку мозга крысы и мыши. А. Изменение частоты ПД у крысы во времени при аппликации АТФ (100 мкМ); Б. Изменение частоты ПД у мыши во времени при аппликации АТФ (100 мкМ). Горизонтальные линии указывают на продолжительность аппликации АТФ (10 мин). \*  $p < 0.05$ .

Для выявления подтипа ионотропных рецепторов, опосредующих эффекты АТФ, использовали агонист  $P2X_3$  рецепторов  $\alpha, \beta$ -meATP в концентрации 20 мкМ.  $\alpha, \beta$ -meATP вызывал увеличение частоты ПД в тройничном нерве крысы до  $3.22 \pm 1.05$  имп/с ( $n=5$ ;  $p < 0.05$ ), тогда как в контроле частота ПД варьировала в пределах  $0.9 \pm 0.12$  имп/с ( $n=5$ ; Рисунок 2). Селективный блокатор  $P2X_3$  рецепторов А-317491 (10 мкМ) не приводил к изменению базовой частоты ПД, последующее добавление  $\alpha, \beta$ -meATP не вызывало увеличения частоты ПД. В контроле частота ПД составила –  $1.31 \pm 0.25$  имп/с ( $n=5$ ); в присутствии А-317491 –  $1.31 \pm 0.38$  имп/с; во время аппликации  $\alpha, \beta$ -meATP  $2.05 \pm 0.78$  имп/с ( $n=5$ ).



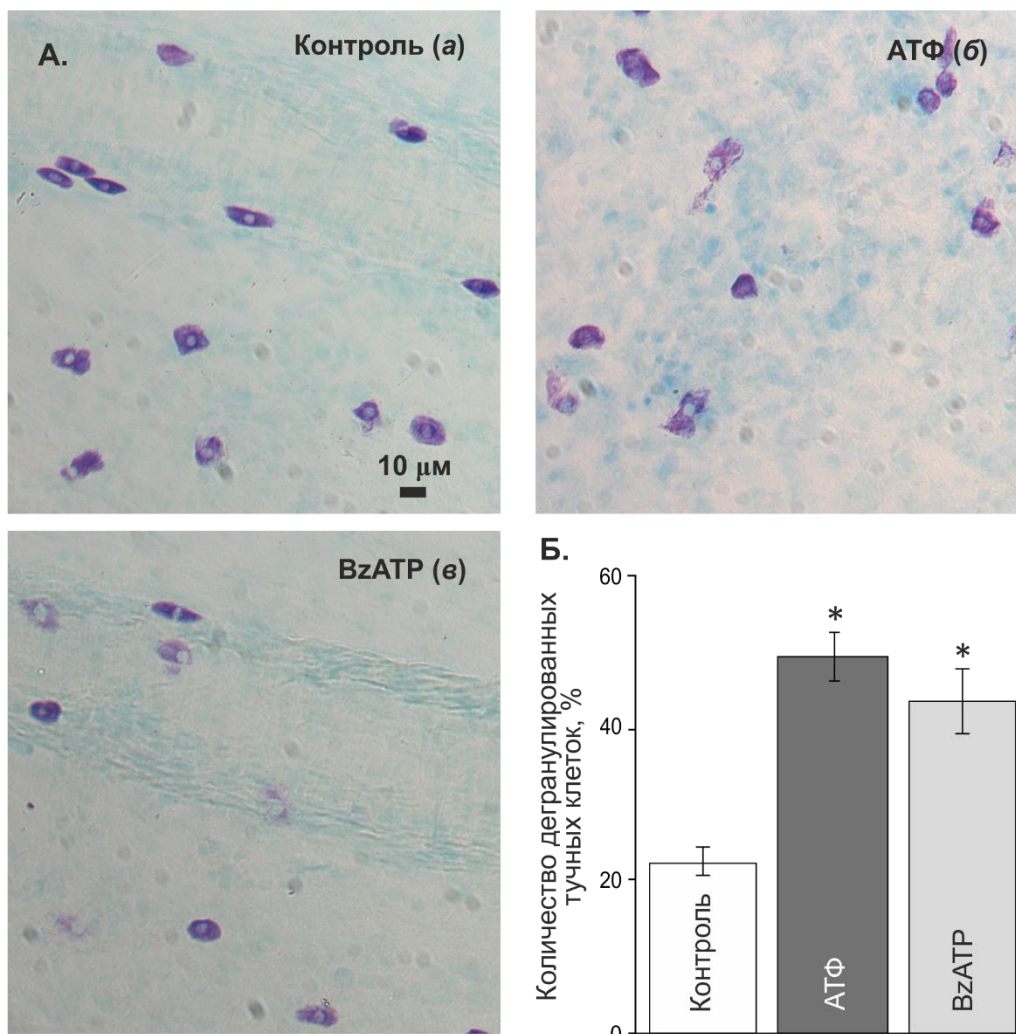
**Рисунок 2.** Роль  $P2X_3$  рецепторов в эффекте АТФ на частоту ПД тройничного нерва крысы. А. Изменение частоты ПД при аппликации  $\alpha,\beta$ -meATP в контроле; Б. Изменение частоты ПД при аппликации  $\alpha,\beta$ -meATP на фоне блокатора  $P2X_3$  рецепторов – А-317491. \*  $p < 0.05$ .

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что АТФ усиливает частоту ПД в тройничном нерве, как у крыс, так и у мышей, что приводит к проведению ноцицептивного сигнала и активации центральных структур нервной системы, ответственных за восприятие болевой информации. Это про-ноцицептивное АТФ связано с активацией  $P2X_3$  рецепторов афферентных окончаний тройничного нерва.

#### ***Влияние АТФ на дегрануляцию тучных клеток в менингеальных оболочках крысы.***

Тучные клетки в оболочках головного мозга образуют скопления вокруг сосудов и нервных волокон. Помимо прямой активации  $P2X_3$  рецепторов окончаний тройничного нерва АТФ может вызывать дегрануляцию тучных клеток, путем активации  $P2X$  рецепторов [Radley & Grounds, 2006; Nurkhametova *et al.*, 2018]. При этом из везикул тучных клеток происходит выделение нейровоспалительных агентов, оказывающих собственное возбуждающее действие на нервные окончания. Для исследования влияния АТФ на дегрануляцию тучных клеток твердой оболочки мозга крыс гистологические препараты были окрашены красителем Толуидиновый Синий. Интактные клетки имели четко очерченные границы, округлую форму и характеризовались плотным окрашиванием. Клетки определялись как дегранулированные, если их мембрана была разрушена, содержимое клетки частично или полностью высвобождалось в окружающее пространство в виде «россыпи» окрашенных гранул.

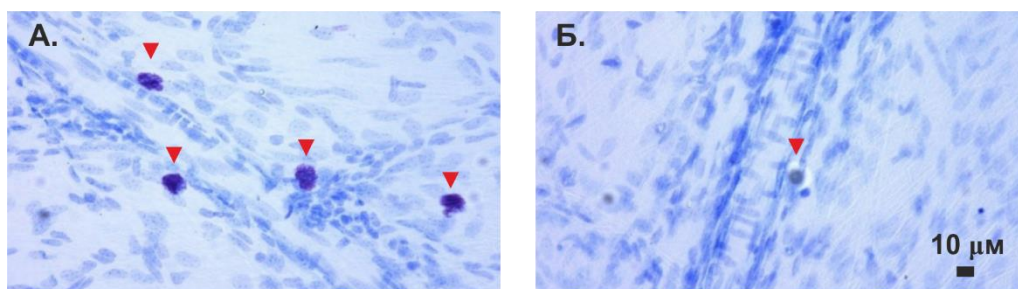
В интактных оболочках головного мозга крыс было обнаружено, что из всех детектированных случайным образом клеток (100%) только  $22.4 \pm 1.8\%$  ( $n=4$ ;  $p < 0.05$ ) были дегранулированными (Рисунок 3). Инкубация препаратов в растворе, содержащем АТФ (100 мкМ), в течение 20 мин привела к увеличению количества дегранулированных клеток в два раза, что составило  $49.4 \pm 3.02\%$  ( $n=4$ ;  $p < 0.05$ ; Рисунок 3) от общего количества зафиксированных клеток. Поскольку  $P2X_7$  рецепторы экспрессируются в мембране тучных клеток, было предположено, что их активация может опосредовать эффекты АТФ. Инкубация препаратов в растворе, содержащем агонист  $P2X_7$  рецепторов – ВzАТР (30 мкМ), в течение 20 мин приводила к эффектам сходным с влиянием АТФ – число дегранулированных клеток составило  $43.5 \pm 4.2\%$  ( $n=4$ ;  $p < 0.05$ ; Рисунок 3) по отношению к общему числу зафиксированных клеток.



**Рисунок 3.** Влияние АТФ на дегрануляцию тучных клеток в твердой оболочке мозга крысы. А. Примеры окрашенных на тучные клетки менингеальных оболочек в контроле (а), при инкубации в АТФ (100 мкМ, б) и в VzАТР (30 мкМ, в); Б. Процент дегранулированных тучных клеток крыс в контроле и после инкубации в растворе, содержащем АТФ и VzАТР по отношению к общему числу детектированных клеток. \*  $p < 0.05$ .

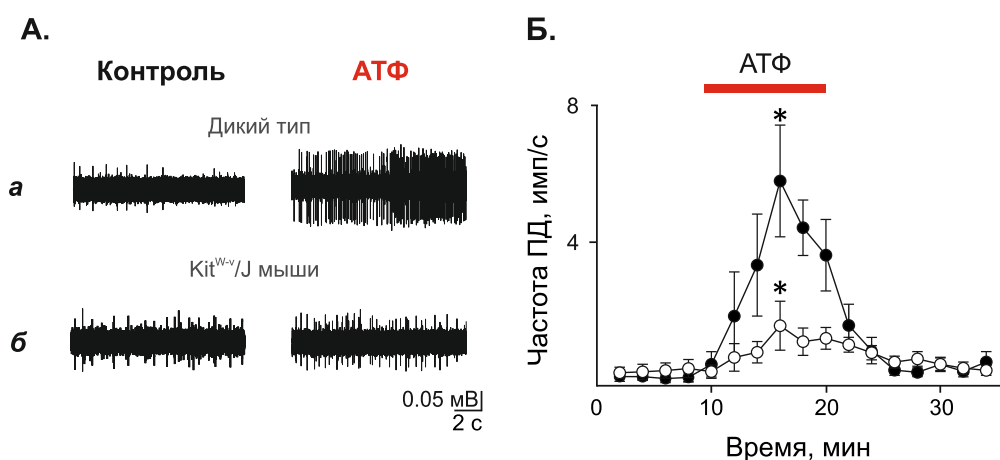
Таким образом, полученные данные указывают на то, что АТФ вызывает дегрануляцию тучных клеток путем активации  $P2X_7$  рецепторы.

**Исследование роли тучных клеток в эффекте АТФ на электрическую активность тройничного нерва.** Для исследования роли тучных клеток в эффектах АТФ на частоту ПД тройничного нерва была проведена серия экспериментов на генномодифицированных мышах с дефицитом тучных клеток (C57BL/6J-Kit<sup>W-v/J</sup> или Kit<sup>W-v/J</sup> мыши). Для подтверждения дефицита тучных клеток менингеальные оболочки окрашивали красителем. Было показано, что у животных дикого типа (линия JAXC57BL/6J) тучные клетки образуют скопления, тогда как в линии генномодифицированных мышей Kit<sup>W-v/J</sup> тучные клетки практически отсутствовали (Рисунок 4).



**Рисунок 4.** Гистологические препараты твердой мозговой оболочки, окрашенной Толуидиновым Синим. Стрелками указаны тучные клетки в оболочках головного мозга мышей дикого типа (линия JAXC57BL/6J) (А) и генномодифицированных мышей без тучных клеток (линия C57BL/6J-Kit<sup>W-v/J</sup>, Б).

Далее мы провели анализ электрической активности тройничного нерва генномодифицированных мышей (Рисунок 5). Базовая частота ПД тройничного нерва Kit<sup>W-v/J</sup> мышей составила  $0.21 \pm 0.08$  имп/с ( $n=7$ ,  $p>0.05$ ), что не отличалось от базовой частоты ПД тройничного нерва в контрольной группе мышей  $0.23 \pm 0.13$  имп/с ( $n=6$ ;  $p>0.05$ ). Однако, эффекты АТФ на частоту ПД существенно отличались у животных в контроле и с дефицитом тучных клеток (Рисунок 5). В контрольной группе мышей АТФ вызывал увеличение частоты ПД до  $5.65 \pm 1.69$  имп/с ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ), а в группе Kit<sup>W-v/J</sup> мышей - до  $1.01 \pm 0.36$  имп/с ( $n=7$ ;  $p<0.05$ ) (Рисунок 5). Было предположено, что различия в интенсивности ответа на аппликацию АТФ могут быть связаны с дегрануляцией тучных клеток и выделением проноцицептивных агентов, чего не происходит у мышей Kit<sup>W-v/J</sup> с дефицитом тучных клеток.



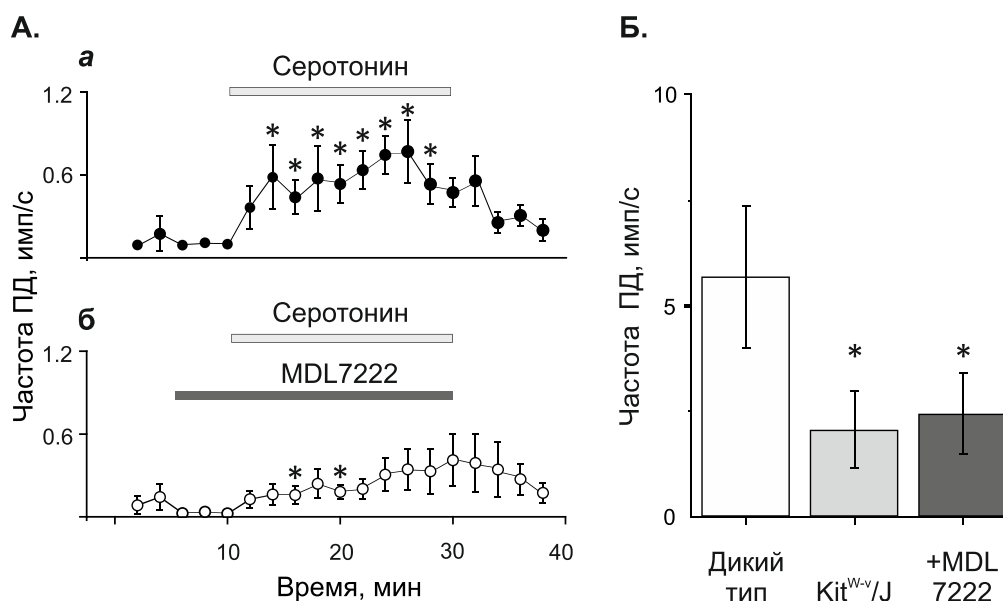
**Рисунок 5.** Влияние АТФ на частоту генерации потенциалов действия тройничного нерва у контрольных и Kit<sup>W-v/J</sup> мышей. А. Оригинальные записи частоты ПД в контроле и при аппликации АТФ у животных дикого типа (а) и у Kit<sup>W-v/J</sup> мышей (б); Б. Изменение частоты ПД во времени при аппликации АТФ (100 мкМ) у животных дикого типа (черные круги) и у мышей без тучных клеток (Kit<sup>W-v/J</sup>, белые круги). \*  $p<0.05$ .

#### ***Роль серотонина в эффектах АТФ на активность тройничного нерва мыши.***

Одними из про-воспалительных агентов, выделяющимся во время дегрануляции тучных клеток, является серотонин (5-НТ), который обладает ярко выраженной ноцицептивной активностью в периферическом звене тройничного нерва крысы [Kilinc *et al.*, 2017]. Было предположено, что освобождение серотонина из тучных клеток вносит вклад в активацию тройничного нерва при действии АТФ. Поэтому были проанализированы эффекты

серотонина на электрическую активность тройничного нерва мышцы. Серотонин в концентрации 2 мкМ вызывал увеличение частоты ПД с последующим выходом на плато и сохранением эффекта на протяжении всего времени подачи вещества в течение 20 мин (Рисунок 6Аа). В контроле частота ПД составила  $0.1 \pm 0.04$  имп/с. К 4 мин аппликации частота ПД увеличилась до  $0.36 \pm 0.15$  имп/с; к 6 мин частота достигла значения –  $0.58 \pm 0.23$  имп/с ( $n=7$ ;  $p<0.05$ ). В последующие интервалы времени частота ПД сохранялась на том же уровне и к 18 мин частота составила  $0.77 \pm 0.23$  имп/с ( $n=7$ ;  $p<0.05$ ) по сравнению с контролем.

Для выявления механизма действия серотонина использовали селективный блокатор 5-НТ<sub>3</sub> рецепторов MDL7222 (10 мкМ) [Kilinc *et al.*, 2017]. Инкубация препарата в растворе, содержащем MDL7222, не приводила к изменению базовой частоты ПД тройничного нерва, однако снижала влияние серотонина на частоту ПД по сравнению с его эффектом в контроле (Рисунок 6А). Частота ПД в контроле составила  $0.057 \pm 0.038$  имп/с, после аппликации MDL –  $0.014 \pm 0.008$  имп/с ( $n=7$ ,  $p>0.05$ ). На фоне действия MDL7222 частота ПД к 8 мин аппликации серотонина составила  $0.15 \pm 0.06$  имп/с ( $n=7$ ;  $p<0.05$ ), а к 18 мин –  $0.34 \pm 0.14$  имп/с ( $n=7$ ,  $p>0.05$ ) (Рисунок 6Аб).



**Рисунок 6.** Роль 5-НТ<sub>3</sub> рецепторов в про-ноцицептивном действии АТФ в тройничном нерве мышцы. А. Эффект серотонина (2 мкМ) на частоту ПД тройничного нерва мышцы в контроле (а) и на фоне селективного антагониста 5-НТ<sub>3</sub> рецепторов MDL7222 (10 мкМ, б); Б. Максимальное увеличение частоты ПД при действии АТФ у мышей дикого типа, мышей Kit<sup>W-v/J</sup> и эффектом АТФ у мышей дикого типа на фоне MDL7222. \*  $p<0.05$ .

Таким образом, MDL7222 достоверно снижал активирующий эффект серотонина ( $p<0.05$ ) по сравнению с его влиянием в контроле, что указывает на то, что 5-НТ<sub>3</sub> рецепторы являются основной мишенью действия серотонина в периферических афферентах тройничного нерва, иннервирующего мозговые оболочки.

Далее мы анализировали роль серотонина в про-ноцицептивном эффекте АТФ в менингеальных оболочках. АТФ апплицировался на фоне селективного блокатора 5-НТ<sub>3</sub>-рецепторов MDL7222. На фоне MDL7222 частота ПД составила  $0.06 \pm 0.03$  имп/с ( $n=5$ ). После аппликации АТФ на фоне MDL7222 максимальная частота ПД составила  $2.43 \pm 0.95$  имп/с к 10



мин, что меньше эффекта АТФ в контроле ( $n=5$ ;  $p<0.05$ ; Рисунок 6Б). Данные результаты сопоставимы с эффектами АТФ на генномодифицированных мышах, где максимальный эффект АТФ составил  $2.05\pm 0.92$  имп/с ( $n=8$ ;  $p>0.05$ ).

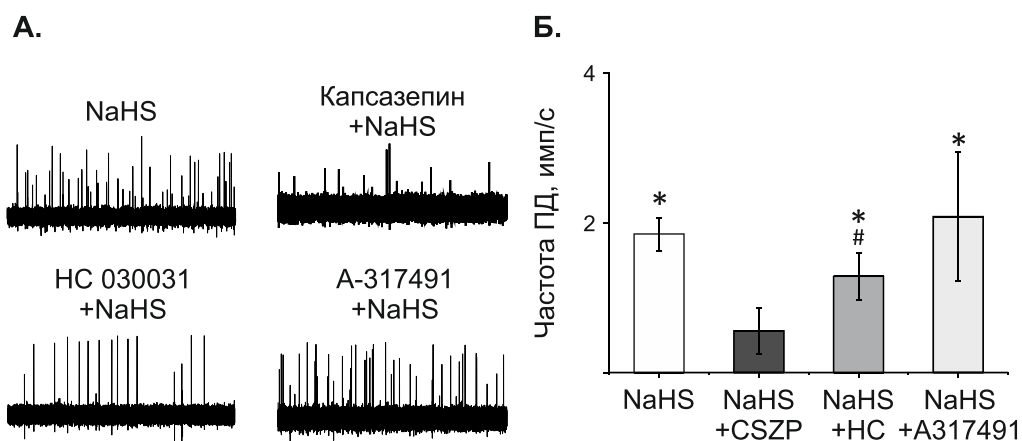
Таким образом, можно сделать вывод о том, что АТФ способствует дегрануляции тучных клеток путем активации  $P2X_7$  рецепторов с последующим высвобождением серотонина, который, в свою очередь, работает как усилитель ноцицептивного сигнала. При этом надо отметить, что возможны и другие механизмы действия АТФ при формировании ноцицептивного сигнала, включающие его взаимодействие с другими рецепторами.

### **Влияние сероводорода на про-ноцицептивное действие АТФ**

**Рецепторные механизмы влияния сероводорода на электрическую активность тройничного нерва крысы.** Донор сероводорода – гидросульфид натрия (NaHS) в концентрации 100 мкМ приводил к усилению активности тройничного нерва (Рисунок 7). Аппликация осуществлялась на протяжении 20 мин. К 10 мин аппликации NaHS частота ПД составила  $1.85\pm 0.2$  имп/с по сравнению с  $0.44\pm 0.06$  имп/с в контроле ( $p<0.05$ ;  $n=5$ ). После этого, к 20 мин действия NaHS частота снижалась до контрольного уровня ( $0.58\pm 0.05$  имп/с;  $n=5$ ).

Ряд исследований свидетельствует о том, что в различных тканях активирующее действие NaHS опосредовано активацией TRPV1 или TRPA1 рецепторов. Также было показано, что фермент синтеза  $H_2S$  ко-экспрессируется в сенсорных нейронах совместно с  $P2X_3$  рецепторами [Trevisani *et al.*, 2016]. Поэтому далее мы исследовали роль TRPV1, TRPA1 и  $P2X_3$  рецепторов в эффектах  $H_2S$  в тройничном нерве крысы. Для этого использовали блокаторы TRPV1, TRPA1 и  $P2X_3$  рецепторов. Результаты экспериментов показали, что селективный блокатор TRPV1 рецепторов – капсазепин (25 мкМ) полностью предотвращал стимулирующие эффекты NaHS на периферических нервных окончаниях тройничного нерва (Рисунок 7 А, Б). В контроле частота ПД составила  $0.40\pm 0.11$  имп/с, и достоверно не изменилась при инкубации в капсазепине –  $0.32\pm 0.13$  имп/с ( $n=6$ ;  $p>0.05$ ). Последующая аппликация NaHS не приводила к достоверному увеличению частоты ПД ( $n=6$ ;  $p>0.05$ ). Блокатор TRPA1 рецепторов – HC 030031 (50 мкМ) не влиял на базовую частоту импульсации ( $0.65\pm 0.09$  имп/с в контроле и  $0.59\pm 0.1$  имп/с при действии HC 030031;  $n=8$ ,  $p>0.05$ ). Частота ПД после аппликации NaHS на фоне HC 030031 составила  $1.28\pm 0.31$  имп/с ( $n=8$ ;  $p<0.05$ ; Рисунок 7А, Б), что достоверно ниже, чем частота ПД при действии NaHS в контрольных условиях.

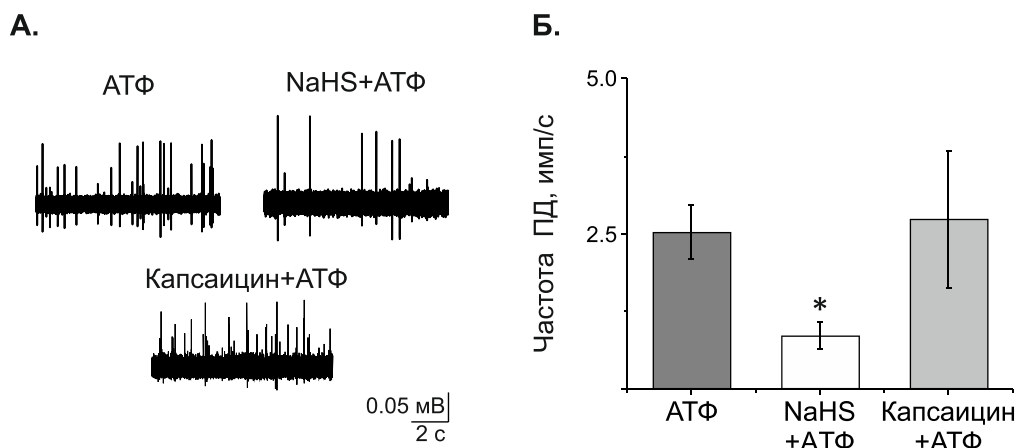
Для изучения роли  $P2X_3$  рецепторов в эффектах донора сероводорода использовали специфический антагонист  $P2X_3/P2X_{2/3}$  рецепторов А-317491. Аппликация А-317491 (10 мкМ) не приводила к изменениям частоты ПД тройничного нерва (частота в контроле –  $0.70\pm 0.21$  имп/с; во время подачи антагониста –  $0.84\pm 0.30$  имп/с). Последующая аппликация донора сероводорода привела к достоверному увеличению частоты ПД в тройничном нерве крысы до  $2.08\pm 0.86$  имп/с ( $n=4$ ;  $p<0.05$ ), что не отличалось от эффектов NaHS в контроле. Полученные данные указывают на то, что основным механизмом увеличения частоты ПД при действии  $H_2S$  является активация TRPV1 и в меньшей степени – TRPA1 рецепторов. В тоже время роль  $P2X_3$  рецепторов в про-ноцицептивном действии NaHS не выявлена.



**Рисунок 7.** Роль TRPV1, TRPA1 и P2X<sub>3</sub> рецепторов в эффектах NaHS на электрическую активность тройничного нерва. А. Примеры оригинальных записей ПД в тройничном нерве крысы при аппликации NaHS в контроле и на фоне блокаторов TRPV1, TRPA1 и P2X<sub>3</sub> рецепторов; Б. Максимальные значения частоты ПД при действии NaHS в контроле и на фоне блокаторов TRPV1 (CSZP), TRPA1 (HC) и P2X<sub>3</sub> (A-317494) рецепторов; \* $p < 0.05$  по сравнению с контролем; # $p < 0.05$  по сравнению с эффектом NaHS.

**Влияние NaHS на про-ноцицептивное действие АТФ в тройничном нерве крысы.**

**Роль активации TRPV1 рецепторов.** Далее мы проанализировали влияние H<sub>2</sub>S на про-ноцицептивное действие АТФ в тройничном нерве крысы. В контроле аппликация АТФ (100 мкМ) приводила к всплеску активности ПД в тройничном нерве крысы (увеличение частоты ПД до  $2.51 \pm 0.43$  имп/с к 10 мин аппликации АТФ по сравнению с контролем –  $0.75 \pm 0.12$  имп/с ( $n=5$ ;  $p < 0.05$ ). Однако, в условиях предварительной аппликации донора сероводорода NaHS (100 мкМ) на протяжении 20 мин, последующая аппликация АТФ не вызывала повышения частоты ПД, которая к 10 мин аппликации составила  $0.36 \pm 0.13$  имп/с. Таким образом, предварительная активация афферентов тройничного нерва H<sub>2</sub>S предотвращала про-ноцицептивное действие АТФ. В DRG нейронах показана ко-экспрессия P2X<sub>3</sub> и TRPV1 рецепторов и взаимовлияние двух типов рецепторов при их активации [Saloman *et al.*, 2013]. При этом предварительная активация TRPV1 рецепторов снижала активацию P2X<sub>3</sub> рецепторов [Saloman *et al.*, 2013; Ruan *et al.*, 2006; Stanchev *et al.*, 2009]. Поскольку по нашим данным активация TRPV1 рецепторов лежит в основе стимулирующего эффекта H<sub>2</sub>S, было предположено, что активация TRPV1 угнетает функцию P2X<sub>3</sub> рецепторов и предотвращает про-ноцицептивное действие АТФ. Поэтому влияние АТФ анализировалось в условиях предварительной активации TRPV1 капсаицином. В контроле частота ПД составила  $0.32 \pm 0.2$  имп/с; аппликация капсаицина (1 мкМ) резко увеличивала активность до  $3.3 \pm 0.98$  имп/с с последующим снижением частоты ПД до значений, близких к контрольным –  $0.31 \pm 0.11$  имп/с, что связано с развитием десенситизации TRPV1 рецепторов. Последующая аппликация АТФ (100 мкМ) приводила к повышению частоты ПД до  $1.32 \pm 0.53$  имп/с к 10 мин и 20 мин до –  $2.1 \pm 0.53$  имп/с ( $n=4$ ;  $p < 0.05$ ) (Рисунок 8).



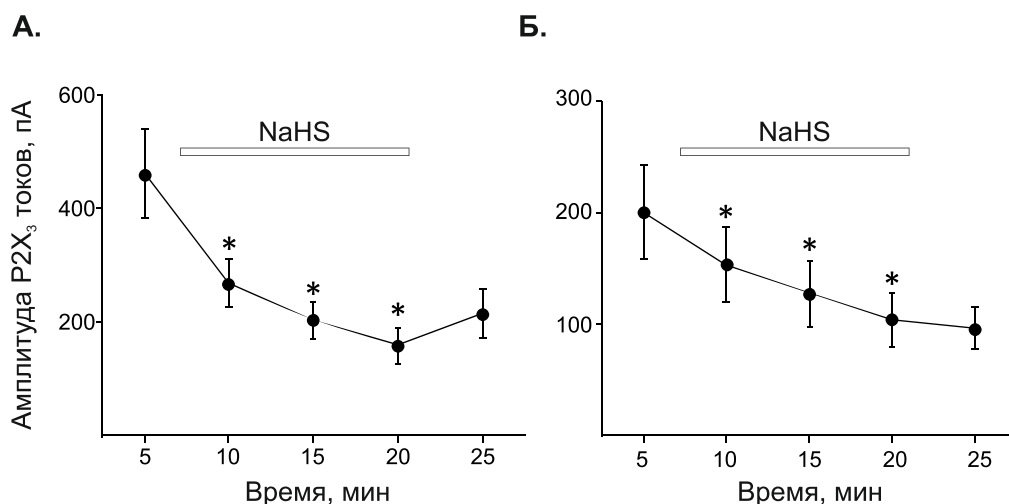
**Рисунок 8.** Влияние  $H_2S$  на про-ноцицептивный эффект АТФ в афферентах тройничного нерва. А. Примеры оригинальных записей ПД в тройничном нерве крысы при аппликации АТФ в контроле, в условиях предварительной инкубации препарата в NaHS и капсаицине; Б. Максимальные значения частоты ПД в тройничном нерве при аппликации АТФ в контроле и на фоне NaHS и капсаицина. \* $p < 0.05$ .

Полученные результаты свидетельствуют, что активация TRPV1 рецепторов не влияет на про-ноцицептивное действие АТФ. Этот факт исключает роль TRPV1 рецепторов в подавлении эффекта АТФ при действии  $H_2S$ .

**Влияние NaHS на входящие токи, опосредованные активацией  $P2X_3$  рецепторов, в нейронах тройничного ганглия крысы.** Дальнейшее исследование механизмов ингибирующего действия донора сероводорода на про-ноцицептивные свойства АТФ было проведено на культуре изолированных нейронов тройничного ганглия. Для этого в условиях патч-кламп регистрировали входящие токи в нейронах в ответ на аппликацию агониста  $P2X_3$  рецепторов –  $\alpha, \beta$ -meATP (30 мкМ). В контроле аппликация агониста  $P2X_3$  рецепторов  $\alpha, \beta$ -meATP (20 мкМ) вызывала входящие токи, различающиеся по кинетике активации и десенитизации: быстрые, медленные и двухфазные входящие токи, содержащие как быстрый, так и медленный компонент. Средняя амплитуда быстрых токов и быстрого компонента двухфазных токов составила –  $460.8 \pm 78$  пА ( $n=15$ ), тогда как амплитуда медленных токов и медленного компонента двухфазных токов –  $200.54 \pm 42.26$  пА ( $n=14$ ).

В условиях перфузии клеток раствором, содержащим NaHS в концентрации 100 мкМ, происходило снижение амплитуды ответов  $P2X_3$ -рецепторов в течение 15 мин аппликации. При этом наблюдали достоверное снижение амплитуды быстрого компонента тока через  $P2X_3$  рецепторы уже через 5 мин аппликации, которая составила –  $268.16 \pm 42.7$  пА ( $n=15$ ,  $p < 0.05$ ). К 10 й мин амплитуда быстрого компонента уменьшилась до  $203.52 \pm 32.8$  пА; и к третьей мин – до  $158.75 \pm 31.08$  пА ( $n=15$ ,  $p < 0.05$ ). Амплитуда медленного компонента ответов показала достоверное снижение до  $153.66 \pm 33.58$  пА ( $n=14$ ,  $p < 0.05$ ) к 5 й минуте аппликации. Смена раствора, содержащего NaHS, на контрольный приводила к небольшому восстановлению ответов, которое, однако, не достигало первоначальных значений.



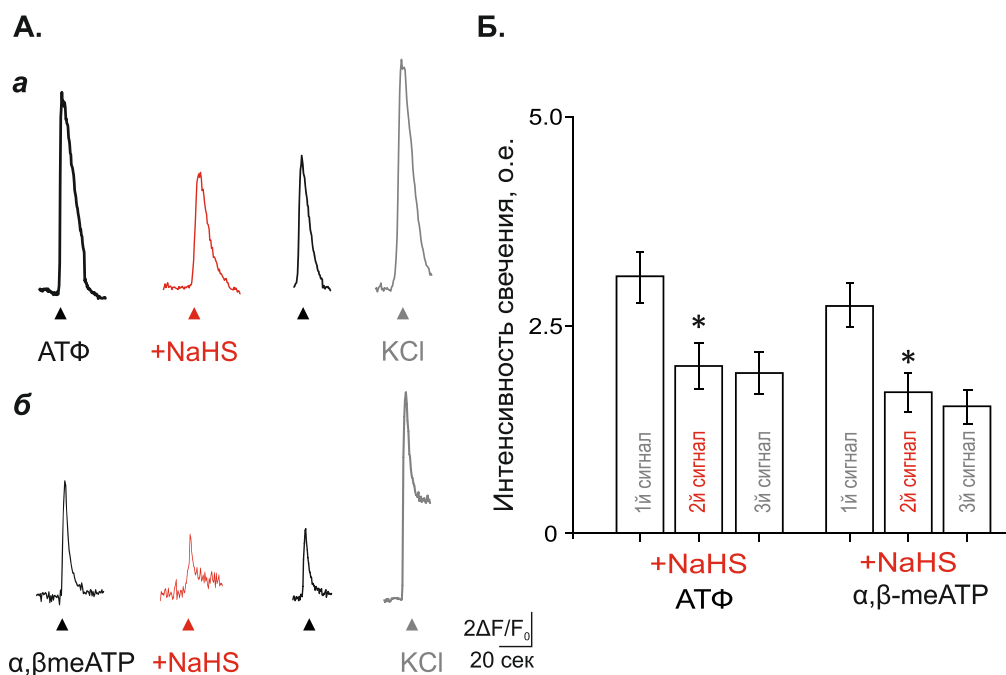


**Рисунок 9.** Влияние донора сероводорода NaHS (100 мкМ) на ответы P2X<sub>3</sub> рецепторов в нейронах тройничного ганглия. Изменения амплитуды быстрого компонента (А) и медленного компонента (Б) P2X<sub>3</sub> токов при действии NaHS. \*p<0.05.

Таким образом, было показано, что в условиях аппликации донора сероводорода уменьшаются ответы АТФ-зависимых P2X<sub>3</sub> рецепторов.

**Влияние NaHS на Ca<sup>2+</sup>-сигналы, вызванные активацией рецепторов АТФ в нейронах тройничного ганглия крысы.** Известно, что активация рецепторов P2X<sub>3</sub> рецепторов АТФ в нейронах тройничного ганглия вызывает кратковременное повышение внутриклеточного уровня ионов Ca<sup>2+</sup>, так называемые Ca<sup>2+</sup>-сигналы. В следующей серии экспериментов мы проанализировали эффекты NaHS на Ca<sup>2+</sup>-сигналы, вызванные АТФ и агонистом P2X<sub>3</sub> рецепторов α,β-meATP. Анализ всей популяции нейронов, исследованных в этих экспериментах, показал, что повышение уровня Ca<sup>2+</sup> в ответ на аппликацию АТФ наблюдалось в 70% клеток (61 из 87 клеток) и в ответ на α,β-meATP – 41.4% клеток (33 из 136 клеток).

Для анализа Ca<sup>2+</sup>-сигналов на нейронах тройничного ганглия, использовали систему быстрой перфузии, с помощью которой апплицировали внеклеточный раствор, содержащий АТФ или α,β-meATP, в течение 2 секунд, вызывая кальциевый ответ. Затем в течение 5 минут клетки перфузировали раствором, содержащим NaHS (100 мкМ) и повторно апплицировали агонисты рецепторов АТФ. Для дифференциации нейрональных и глиальных клеток использовался раствор с повышенным содержанием ионов K<sup>+</sup> (Рисунок 10 А)



**Рисунок 10.** Влияние NaHS на АТФ-вызванные  $Ca^{2+}$  сигналы в изолированных нейронах тройничного ганглия крысы. А. Примеры  $Ca^{2+}$  сигналов при аппликации АТФ (100 мкМ) в контроле, на фоне действия NaHS (100 мкМ) и при отмывке (а);  $Ca^{2+}$ -сигналов при аппликации  $\alpha, \beta$ -meATP (20 мкМ) в контроле, на фоне действия NaHS (100 мкМ) и при отмывке (б). Также показан сигнал в ответ на аппликацию раствора с повышенным содержанием ионов  $K^+$  для дифференциации нейрональных и глиальных клеток. Б. Амплитуда  $Ca^{2+}$ -сигналов в ответ на три повторных аппликации АТФ (100 мкМ) или  $\alpha, \beta$ -meATP (20 мкМ) в контроле (1й сигнал), на фоне действия NaHS (2й сигнал) и при отмывке (3й сигнал). \* $p < 0.05$  относительно амплитуды первого сигнала.

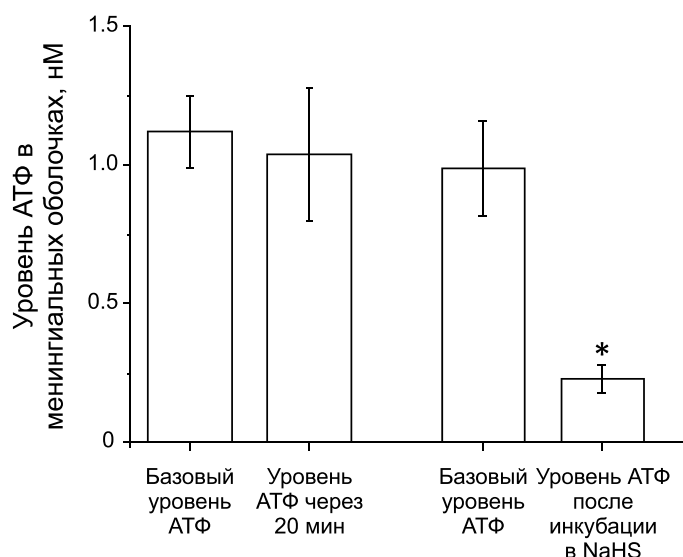
В контроле в ответ на аппликацию АТФ амплитуда  $Ca^{2+}$ -сигнала составила  $3.08 \pm 0.30$  о.е. ( $n=66$ ). На фоне действия NaHS наблюдали снижение интенсивности свечения клетки при повторной аппликации АТФ – до  $2.01 \pm 0.27$  о.е. ( $n=66$ ;  $p < 0.05$ ), замена раствора на контрольный не приводила к достоверному изменению амплитуды ответа, которая составила  $1.93 \pm 0.26$  о.е. ( $n=66$ ;  $p > 0.05$ ) (Рисунок 10 А, Б). Во время отмывки в 30% клеток мы наблюдали увеличение амплитуды  $Ca^{2+}$ -сигнала, в остальных случаях амплитуда сигнала не изменялась.

Аппликация  $\alpha, \beta$ -meATP в контроле вызывала  $Ca^{2+}$ -ответы амплитудой  $2.73 \pm 0.26$  о.е. ( $n=27$ ), и снижалась на фоне действия донора сероводорода до  $1.69 \pm 0.23$  о.е. ( $n=27$ ,  $p < 0.05$ ). Последующая смена раствора на базовый не приводила к дальнейшему изменению  $Ca^{2+}$ -ответа, амплитуда которого составила  $1.52 \pm 0.20$  о.е. ( $n=27$ ;  $p > 0.05$ ) (Рисунок 10 А, Б). В 50% случаев отмывка приводила к повышению амплитуды  $Ca^{2+}$ -ответа.

Таким образом, сероводород снижал амплитуду  $Ca^{2+}$ -сигналов, вызванных аппликацией АТФ или селективного агониста  $P2X_3$  рецепторов, в изолированных нейронах тройничного ганглия.

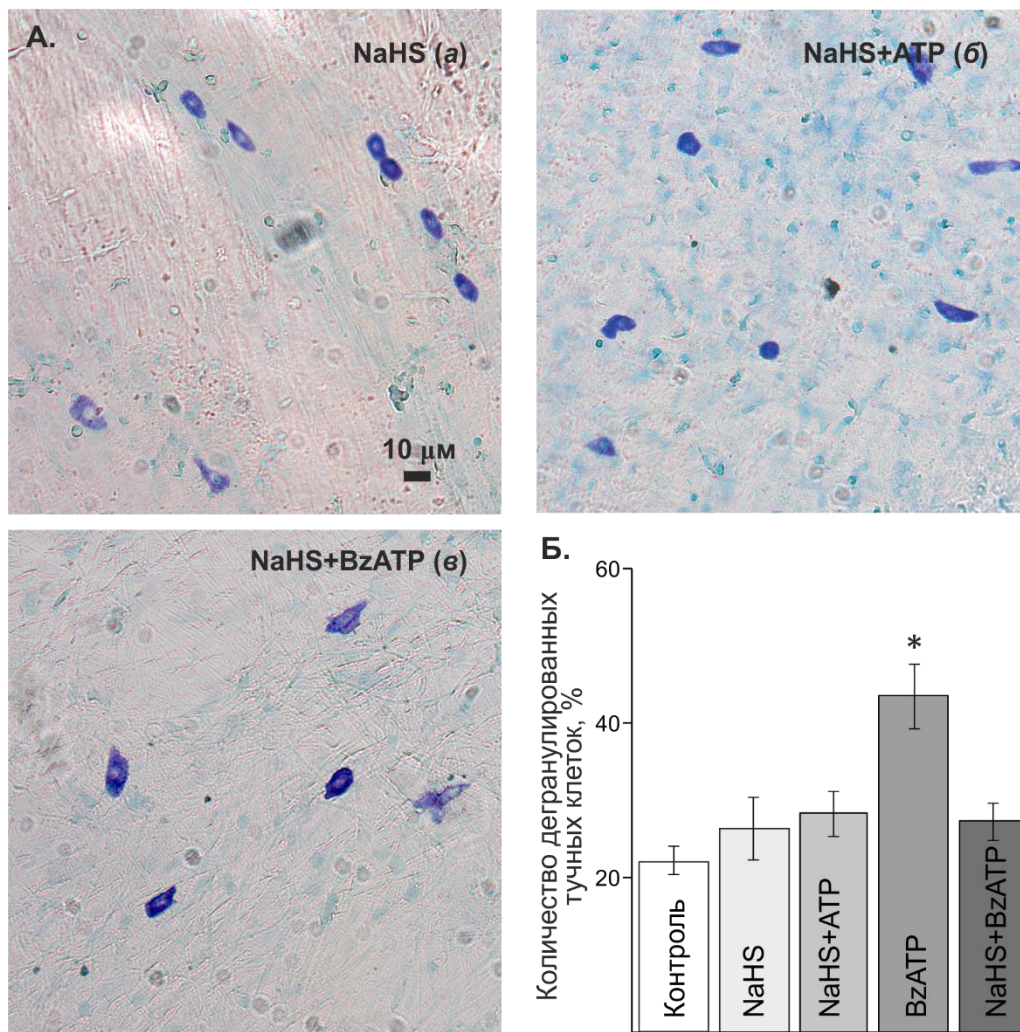
**Влияние NaHS на базовый уровень внеклеточного АТФ в менингеальных оболочках крыс.** В менингеальных оболочках уровень АТФ во внеклеточном пространстве находится в низких наномолярных концентрациях [Yegutkin *et al.*, 2016]. Выделение АТФ может происходить из нервных окончаний, астроцитов, тромбоцитов, эндотелиальных и тучных

клеток, посредством экзоцитоза или паннексин-1 каналов [Burnstock *et al.*, 2011; 2014]. Нами был проведен анализ уровня АТФ, выделяющегося из менингеальных оболочек крыс в контрольных условиях и при инкубации в доноре NaHS в течение 20 мин. Базовая концентрация АТФ в оболочках головного мозга крыс в контрольной группе составила  $1.12 \pm 0.13$  нМ, и через 20 минут это значение не изменилось ( $1.04 \pm 0.24$  нМ;  $n=8$ ). В экспериментальной группе начальное значение АТФ составляло  $0.99 \pm 0.17$  нМ, а после инкубации в растворе, содержащем 100 мкМ NaHS, уровень АТФ достоверно снижался до  $0.23 \pm 0.05$  нМ ( $n=8$ ;  $p<0.05$ ; Рисунок 11).



**Рисунок 11.** Влияние донора сероводорода на уровень внеклеточного АТФ в гемискальном препарате крысы. Эндогенный уровень АТФ определялся в контроле (2 измерения с интервалом в 20 мин) и после инкубации в NaHS 100 мкМ в течение 20 мин. \* $p<0.05$ .

**Влияние донора сероводорода на уровень дегрануляции менингеальных тучных клеток.** Модулирующее действие сероводорода на про-ноцицептивное действие АТФ в тройничном нерве может осуществляться и на уровне тучных клеток. Поэтому исследовали эффекты NaHS на дегрануляцию тучных клеток при действии АТФ. Как уже было показано ранее, АТФ вызывал достоверное увеличение числа дегранулированных клеток ( $49.4 \pm 3.02\%$ ;  $n=4$ ;  $p<0.05$ ) по сравнению с контрольной группой ( $22.4 \pm 1.8\%$ ;  $n=4$ ;  $p<0.05$ ). Инкубация менингеальных оболочек в растворе, содержащем 100 мкМ NaHS в течение 30 мин, не приводила к изменению морфологии тучных клеток, и количество дегранулированных клеток не превышало контрольные значения ( $26.4 \pm 4.1\%$ ;  $n=4$ ). Добавление АТФ на 20 мин в гемискальный препарат, предварительно проинкубированный в растворе, содержащем NaHS в течение 10 мин, не вызывало дегрануляции тучных клеток ( $28.4 \pm 2.9\%$ ;  $n=4$ ). Таким образом, донор  $H_2S$  предотвращал дегрануляцию тучных клеток при действии АТФ (Рисунок 12).

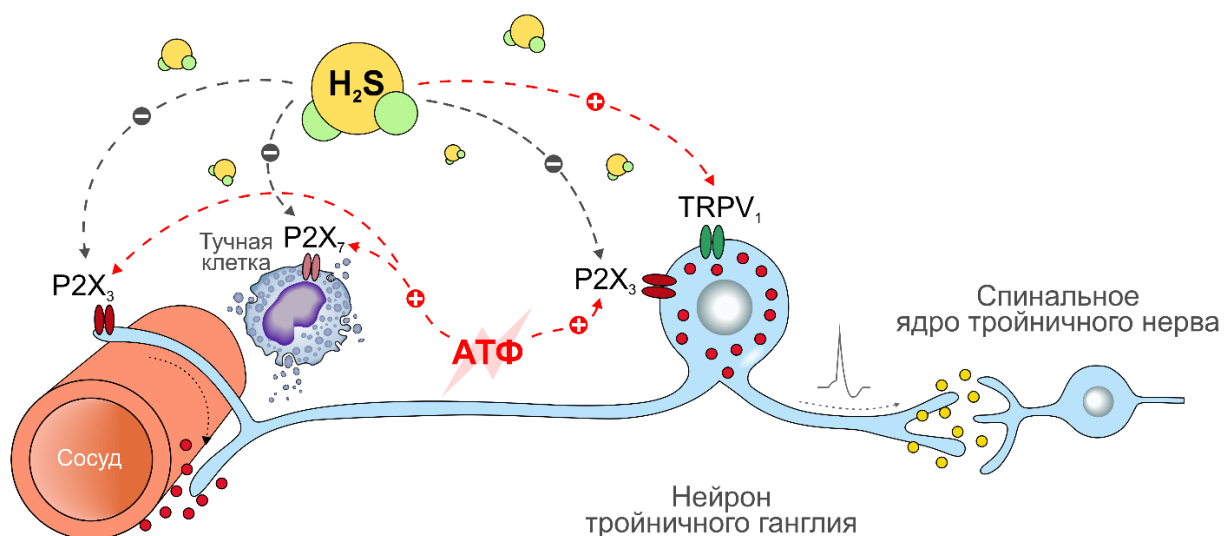


**Рисунок 12.** Влияние донора NaHS на АТФ-вызванную дегрануляцию тучных клеток. А. Оригинальные снимки окрашенных оболочек головного мозга крыс Толуидиновым Синим после инкубации в NaHS (а); NaHS+АТФ (б); NaHS+BzATP (в); Б. Уровень дегрануляции тучных клеток в менингеальных оболочках в контроле и проинкубированных в NaHS, NaHS+АТФ, BzATP, NaHS+BzATP (n=4 для каждой группы; \* p<0.05 относительно контроля).

Известно, что дегрануляция тучных клеток при действии АТФ опосредуется активацией P2X<sub>7</sub> рецепторов, которые участвуют в транспорте АТФ через мембрану и в модуляции активности паннексин-1 каналов [Wareham & Seward, 2016; Kurashima *et al.*, 2012; Iglesias *et al.*, 2006]. Поэтому в последующих экспериментах мы проанализировали способность агониста P2X<sub>7</sub> рецепторов (BzATP) активировать тучные клетки. Оказалось, что 30 мкМ BzATP приводил к увеличению числа дегранулированных клеток до 43.5±4.2% (n=4, p<0.05; Рисунок 12 Б). Предварительная инкубация в NaHS (100 мкМ) в течение 10 мин предотвратила P2X<sub>7</sub> опосредованную дегрануляцию тучных клеток оболочки головного мозга крысы, и количество дегранулированных тучных клеток составило 27.4±2.4% (n=4; Рисунок 12). Таким образом, донор H<sub>2</sub>S предотвращает дегрануляцию тучных клеток при действии АТФ, что, по-видимому, опосредовано снижением активности P2X<sub>7</sub>-рецепторов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашем исследовании мы детально исследовали про-ноцицептивную роль АТФ в механизмах мигрени и выявили новые механизмы действия АТФ в периферических окончаниях тройничного нерва. Было показано, что эффекты АТФ связаны с прямой активацией  $P2X_3$  рецепторов, а также включают дегрануляцию тучных клеток и высвобождение про-воспалительных медиаторов, таких как АТФ и серотонин. Представленный каскад реакций может поддерживать высокий уровень АТФ, а также активировать рецепторы серотонина в периферических афферентах, и, как следствие обеспечивать длительную болевую импульсацию в тройничном нерве. Мы также проанализировали взаимодействие между АТФ и газомедиатором  $H_2S$ , который может синтезироваться в тройничных нейронах и оказывать собственные эффекты. Оказалось, что донор  $H_2S$  вызывает активацию электрической активности тройничного нерва за счет преимущественно активации  $TRPV_1$  рецепторов. Однако, при этом донор  $H_2S$  полностью предотвращал АТФ-вызванное увеличение импульсации в тройничном нерве крысы. В основе этого эффекта лежит снижение амплитуды входящих токов через  $P2X_3$  рецепторы и подавление АТФ вызванных кальциевых сигналов в нейронах тройничного ганглия. Кроме того,  $H_2S$  снижал базовый уровень АТФ в оболочках головного мозга и предотвращал АТФ-вызванную дегрануляцию тучных клеток. Полученные данные свидетельствуют о возможной анти-ноцицептивной роли  $H_2S$ , особенно в случае развития хронического воспалительного процесса, оказывающего вклад в патогенез мигрени. Выявленные нами молекулярные механизмы прямого и непрямого про-ноцицептивного действия АТФ, также анти-ноцицептивное действие  $H_2S$  могут быть использованы в качестве терапевтических мишеней для разработки препаратов для лечения и/или профилактики мигрени.



**Рисунок 13.** Схематическое изображение механизма действия АТФ и  $H_2S$  в тройничном нерве крысы. Красные линии – активирующее, серые линии – ингибирующее действие.

## ВЫВОДЫ

1. АТФ вызывает увеличение частоты потенциалов действия в тройничном нерве крысы и мышцы, и этот эффект опосредуется активацией P2X<sub>3</sub> рецепторов;
2. АТФ вызывает дегрануляцию тучных клеток твердой оболочки головного мозга крыс посредством активации P2X<sub>7</sub> рецепторов;
3. У генномодифицированных мышей с дефицитом тучных клеток (C57BL/6J-Kit<sup>W<sup>v</sup>/J</sup>) повышение частоты ПД тройничного нерва при действии АТФ было выражено в меньшей степени, чем у животных дикого типа. Ингибирование 5-HT<sub>3</sub> рецепторов снижало АТФ-вызванную активность тройничного нерва по сравнению с контрольной группой, что указывает на вклад серотонина, высвобождающегося из тучных клеток, в про-ноцицептивное действие АТФ.
4. Донор H<sub>2</sub>S предотвращает АТФ-вызванное усиление импульсации тройничного нерва крысы, и этот эффект не связан с предварительной активацией TRPV1 рецепторов.
5. Донор H<sub>2</sub>S снижает амплитуду АТФ-вызванных токов и кальциевых сигналов в нейронах тройничного ганглия;
6. В менингеальных оболочках крысы, донор H<sub>2</sub>S снижает базальный уровень внеклеточного АТФ и предотвращает дегрануляцию тучных клеток, опосредованную активацией P2X<sub>7</sub> рецепторов.

**СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ  
ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Статьи рецензируемых научных журналах**

1. **Koroleva K.** Meningeal Mast Cells Contribute to ATP-Induced Nociceptive Firing in Trigeminal Nerve Terminals: Direct and Indirect Purinergic Mechanisms Triggering Migraine Pain / Koroleva K., Gafurov O., Gusel'nikova, V., Nurkhametova D., Giniatullina R., Sitdikova G., Matilla O., Perttu J. Lindsberg, Malm T., Giniatullin R. // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2019. – Т. 13. – № 195. (ВАК и WoS, Scopus, личный вклад 70%).  
DOI: 10.3389/fncel.2019.00195
2. **Koroleva K.** Receptor mechanisms mediating the pro-nociceptive action of hydrogen sulfide in rat trigeminal neurons and meningeal afferents / Koroleva K., Mustafina A., Yakovlev A., Hermann A., Giniatullin R., Sitdikova G. // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2017. – Т. 11. – № 226. (ВАК и WoS, Scopus, личный вклад 50%).  
DOI: 10.3389/fncel.2017.00226
3. Zakharov A. Clustering analysis for sorting ATP-induced nociceptive firing in rat meninges / Zakharov A., **Koroleva K.**, Giniatullin R. // *BioNanoScience*. – 2016. – Т. 6. – №. 4. – С. 508-512. (ВАК и WoS, Scopus, личный вклад 50%).  
DOI: 10.1007/s12668-016-0276-z
4. Yegutkin G. Nucleotide homeostasis and purinergic nociceptive signaling in rat meninges in migraine-like conditions / Yegutkin G., Guerrero-Toro C., Kilinc E., **Koroleva K.**, Ishchenko Y., Abushik P., Giniatullina R., Fayuk D., Giniatullin R. // *Purinergic Signalling*. – 2016. – Т. 12. – №. 3. – С. 561-574. (ВАК и WoS, Scopus, личный вклад 30%).  
DOI: 10.1007/s11302-016-9521-8
5. **Королёва К.С.** Роль TRPV1 и TRPA1 рецепторов в проноцицептивных эффектах сероводорода в тригемино-васкулярной системе крысы / Королёва К.С., Мустафина А.Н., Яковлев А.В., Гиниатуллин Р.А., Ситдикова Г.Ф. // *Российский журнал боли*. – 2018. – №2 (56) – С. 10-11. (ВАК, личный вклад 70%).
6. **Королева К.С.** Базовые механизмы периферической ноцицепции / Королева К.С., Гиниатуллина Р.Р., Гиниатуллин Р.А. // *Неврологический вестник*. – 2014. – Т. XLVI. – №. 3. – С. 22-27. (ВАК, личный вклад 35%).



**Тезисы докладов в сборниках материалов конференций**

1. **Королёва К. С.** Регистрация изменения электрической активности в тригеминальном нерве твердой оболочки мозга *dura mater* в присутствии гомоцистеина и донора сероводорода NaHS / Вестник РГМУ. Периодическое медицинское издание. – М.: ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. – 2015, № 2. С. 292-293.
2. Мустафина А. Н. Роль К-каналов в эффектах сероводорода в тригеминальном ганглии крысы / Мустафина А.Н., **Королёва К.С.**, Ситдикова Г.Ф. // Адаптация развивающегося организма: материалы XIII Международной научной школы-конференции. 9-13 июня 2016 г. – Казань: Вестфалика, 2016. – С. 76-77.
3. Sitdikova G. Hydrogen sulfide activates TRPV1 receptors in rat trigeminal neurons and increases the activity of trigeminal nerve / G. Sitdikova, A. Mustafina, **K. Koroleva**, A. Yakovlev, R. Giniatullin // 12th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society: proceedings (March 22-25, 2017) – Göttingen, 2017. – P. 333.
4. **Koroleva K.** Orthodromic and antidromic spike prorogation and dissimilar expression of ATP-gated and capsaicin-sensitive channels in trigeminal sensory fibers in meninges / K. Koroleva, A. Zakharov, E. Kilinc, R. Giniatullin // 12th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society: proceedings (March 22-25, 2017) – Göttingen, 2017. – P. 880.
5. Мустафина А. Н., **Королёва К.С.** Исследование роли потенциал-нечувствительных катионных каналов в эффектах сероводорода тройничного нерва крыс / Сборник тезисов XIII Международной (XXII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. Москва: ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова / М., 2018. С.255-256.
6. Nurkhametova D. The role of acetylcholine in P2X<sub>7</sub>-gated mast cells activation / D. Nurkhametova, **K. Koroleva**, A. Sinyavin, V. Tsetlin, R. Giniatullin // International Conference 1–5 October 2018 Book of Abstracts «Biomembranes 2018». – Moscow. – 2018. – V. 50. No. 6. P. 567. (WoS).
7. **Королёва К. С.**, Конышев Я. Г. Роль сероводорода в проноцицептивном действии АТФ / Сборник тезисов III Международной школы – конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 29-31 октября 2018). – Казань, 2018. – С. 47.
8. **Королёва К. С.** Нейрохимическая характеристика ответов нервных волокон тройничного нерва менингеальных оболочек мыши на потенциальные медиаторы мигрени ацетилхолин, серотонин и АТФ / Королёва К.С., Гафуров О.Ш., Ситдикова Г.Ф., Цейтлин В. и Гиниатуллин Р.А. // Современные проблемы нейробиологии. Материалы III международной научной конференции, посвященной памяти заслуженного деятеля науки РФ, профессора Шилкина Валентина Викторовича. – Ярославль: ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России, 2018. – С.35.



9. **Королёва К. С.** Роль P2X<sub>3</sub> рецепторов в эффектах сероводорода в тройничном нерве крысы / Королёва К.С., Мустафина А.Н., Ситдикова Г.Ф // Современные проблемы нейробиологии. Материалы III международной научной конференции, посвященной памяти заслуженного деятеля науки РФ, профессора Шилкина Валентина Викторовича. – Ярославль: ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России, 2018. – С.36.
10. Mustafina A. The role of P2X<sub>3</sub> receptors of hydrogen sulfide in rat trigeminal nerve / Mustafina A., **Koroleva K.**, Sitdikova G. // International Conference 1–5 October 2018 Book of Abstracts «Biomembranes 2018». – Moscow. – 2018 – V. 50. No. 6. P. 564. (WoS).
11. **Koroleva K.** Hydrogen Sulfide prevented pro-nociceptive effects of ATP in the trigeminovascular system of rats / Koroleva K., Giniatullina R., Konshev Y., Sitdikova G. // European Journal of Clinical Investigation. – 2019. – Vol.49, Supp.1 – P.98. (WoS).

Эл. почта автора: k.s.koroleva@yandex.ru

Адрес для отзывов на автореферат: 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18, Казанский (Приволжский) федеральный университет, отдел аттестации научно-педагогических кадров, ученому секретарю Диссертационного совета КФУ.03.06 Аникиной Татьяне Андреевне, факс: +7 (843) 238-76-01

эл. почта: tania57vgl@rambler.ru