

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПРИ ОДНОКРАТНОЙ И МНОГОКРАТНОЙ ИСТОЩАЮЩЕЙ НАГРУЗКЕ

Фатеев И.В., Юдин М.А., Кузьмин А.А., Курпякова А.Ф., Ефремов В.Г.

Научно-исследовательский испытательный институт (военной медицины) Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая д.4, тел. +7 (812) 527-79-11, ivvf@mail.ru

Резюме. В экспериментах на крысах исследовано влияние различных схем принудительного плавания с грузом 5 % от массы тела на параметры фермент-субстрат-рецепторного взаимодействия холинергической системы. Показано, что двукратное плавание крыс до утомления приводит к снижению активности ацетилхолинэстеразы головного мозга и мозжечка и бутирилхолинэстеразы плазмы крови, увеличивает время наступления ареколинового тремора и никотиновых судорог, а также период нормализации состояния после проведения фармакологического зондирования (ареколином и никотином) по сравнению с интактными животными и группой с однократным плаванием. В ходе проведения электронейромиографии выявлено, что двукратная физическая нагрузка вызывает снижение амплитуды и увеличение длительности М-ответа, а также увеличение площади под кривой по сравнению с моделью однократной нагрузки до утомления и интактными животными.

Ключевые слова: физическая нагрузка, холинергическая регуляция, принудительное плавание

COMPARATIVE ANALYSIS OF CHANGES IN CHOLINERGIC REGULATION UNDER CONDITIONS OF SINGLE AND MULTIPLE EXHAUSTING PHYSICAL EXERCISE

Fateev I.V., Yudin M.A., Kuzmin A.A., Kurpyakova A.F., Efremov V.G.

Scientific Research Test Institute (of Military Medicine) of Military Medical Academy in the name of S.M. Kirov, Lesoparkovaya str. 4, S-Petersburg

Resume. Using experiments in rats the effect of different regimens of forced swimming with a load of 5% of body weight on the parameters of the enzyme-substrate-receptor interaction in the cholinergic system was investigated. Two-fold swimming of rats to exhaustion was shown to reduce activity of acetylcholinesterase in brain and cerebellum, and of butyrylcholinesterase in blood plasma, and also to increase the onset time of arecholinic tremor and nicotinic seizures, as well as the period of state normalization after the pharmacological probing (with arecholine and nicotine), compared to intact animals and to the group of single swimming. Electroneuromyography has revealed that the two-fold physical exercise decreased an amplitude of the M-response and increased its duration, as well as the area under the curve compared to model of a single exhausting load and intact animals.

Keywords: physical activity, cholinergic regulation, forced swimming

Введение

В настоящее время достаточно подробно изучены биохимические и физиологические изменения, развивающиеся на фоне выполнения истощающих физических нагрузок. Известно, что холинергическая система обеспечивает нейромышечную передачу и принимает непосредственное участие в реализации движения [Волков Н.И., Несен Э.Н., Осипенко А.А., Корсун С.Н. Биохимия спорта, М., 2000., Maughan R., Gleeson M. The Biochemical Basis of Sports Performance, Oxford University Press, USA Sports Medicine, 2004.]. Вместе с тем, данные о влиянии интенсивных физических нагрузок на эту систему достаточно скудны и зачастую противоречат друг другу.

Противоречивость данных может быть обусловлена вариабельностью ответа холинергической системы на уровне центральной и периферической нервной системы (ЦНС и ПНС) при различных вариантах физической нагрузки. В опытах на крысах показано, что однократная физическая нагрузка вызывает повышение активности холинэстеразы (ХЭ) в плазме крови [Spodaryk K.K., Berger L., Hanke S. Infusion of physical training on the functional changes of young and old red blood cells // Mech. Agency Dev., 1990, V. 55, №2 P 199-206., Somani S.M., Dube S.N., Endurance training changes central and peripheral responses to physostigmine // Pharmacol. Biochem. Behav., 1992, V. 41, P. 773-781.] и эритроцитах [Dube S.N., Somani S.M., Babu S.R. Concurrent acute exercise alters central and peripheral responses to physostigmine Concurrent acute exercise alters central and peripheral responses to physostigmine // Pharmacol. Biochem. Behav., 1993, V. 46, P. 827-834.], тогда как в ткани сердца и головного мозга этот показатель снижается [Somani S.M., Babu S.R., Arneric S.P., Dube S.N. Effect of cholinesterase inhibitor and exercise on choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities in rat brain regions // Pharmacol. Biochem. Behav., 1991, V. 39, P. 337-343., Somani S.M., Dube S.N.,

Endurance training changes central and peripheral responses to physostigmine // Pharmacol. Biochem. Behav., 1992, V. 41, P. 773-781.]. Физическая нагрузка (тест «однократное плавание») приводит к дефициту ацетилхолина в гиппокампе и коре головного мозга крыс. Обращает внимание факт отсутствия изменений активности ХЭ в скелетной мускулатуре животных при выполнении однократной нагрузки [Dube S.N., Somani S.M., Babu S.R. Concurrent acute exercise alters central and peripheral responses to physostigmine Concurrent acute exercise alters central and peripheral responses to physostigmine // Pharmacol. Biochem. Behav., 1993, V. 46, P. 827-834.].

В противоположность однократной – хроническая физическая нагрузка вызывает снижение активности ХЭ в эритроцитах, сердце, диафрагме и скелетной мышце животных [Somani S.M., Dube S.N., Endurance training changes central and peripheral responses to physostigmine // Pharmacol. Biochem. Behav., 1992, V. 41, P. 773-781.]. Выявлено снижение содержания холина в гомогенатах головного мозга крыс и ацетилхолина в нейромышечных синапсах у тренированных атлетов после марафонского бега [Conlay L.A., Sabounjian L.A., Wurtman R.J. Exercise and neuromodulators: Choline and acetylcholine in marathon runners // Int. J. Sports Med., 1992, V. 13, № 1, P. 141—142.]. Очевидно, что в ответ на различные варианты физических нагрузок реакция холинергической системы характеризуется бимодальным действием. Данные литературы позволяют сделать отдельные выводы о характере изменений в фермент-субстратной составляющей нейромышечной передачи и не объясняют изменения, происходящие на холинорецепторном уровне. Вместе с тем, именно оценка всех звеньев холинергической регуляции нейромышечной передачи позволяет выявить особенности ее изменений, возникающих при однократных и многократных физических нагрузках. Зачастую предъявление однократной нагрузки в течение суток является недостаточным для развития критического напряжения регуляторных систем у животных. Это обстоятельство, а также противоречивость данных литературы, определило цель настоящего исследования.

Цель исследования: изучение особенностей изменений холинергической регуляции при однократной и двукратной истощающей физической нагрузке.

Методика исследования

Эксперименты выполнены на 144 белых беспородных крысах-самцах массой 180±20 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. На моделях однократного и двукратного плавания с 5 % (от массы тела) грузом до отказа исследованы изменения холинергической регуляции. Нагрузку плаванием осуществляли в сосудах из оргстекла размером 20×20×60 см с температурой и величиной слоя воды 29-30°C и 50 см, соответственно. При моделировании двукратного плавания второй заплыв проводили через

10 мин после первого. Регистрировали время каждого заплыва. Критерием утомления считали: погружение на дно сосуда и развитие адинамии более 10 с, невозможность достичь поверхности воды в течение 60 с, нарушение координации, вращение вокруг своей оси и пускание пузырей. Через 5 мин после окончания заплывов животных выводили из эксперимента и изучали особенности холинергической регуляции. Было сформировано 12 экспериментальных групп (по 12 животных в каждой группе) по 3 группы в каждой серии: 1-я группа – интактные; 2-я группа – однократное плавание; 3-я группа – двукратное плавание. У животных первой серии исследовали активность ХЭ в тест-тканях, 2-й серии – проводили ареколиновый тест; 3-й серии – проводили никотиновый тест; 4-й серии – выполняли электронейромиографическое исследование.

Изменение активности ХЭ в тест-тканях (плазма крови, эритроциты, гомогенаты коры головного мозга, мозжечка и передней большеберцовой мышцы) исследовали методом Элмана по скорости ферментативного гидролиза ацетил- и бутирилтиохолин йодида (субстанции Sigma) при температуре 37,0°C в среде 0,04 М фосфатного буфера (pH=7,5). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Hitachi U-2900 при длине волны 412 нм.

Расчет активности ХЭ производили по формуле:

$$E = \frac{D \cdot 1000 \cdot N \cdot V}{\varepsilon \cdot t \cdot V_{\text{кр}}} \quad \text{мкмоль/мл} \cdot \text{мин},$$

где: D – оптическая плотность пробы (ед.), N – разбавление образца, V – объем пробы (мл), ε – коэффициент молярного поглощения (13600), t – время инкубации (мин), $V_{\text{кр}}$ – объем эритроцитов, плазмы или гомогената (мл).

Методом фармакологического зондирования исследовали ответ М- и Нхолинорецепторов. Через 5 мин после окончания заплывов крысам внутривенно (в/б) вводили ареколин в дозе 10 мг/кг или никотин в дозе 12 мг/кг. Отмечали латентный период развития ареколинового тремора и никотиновых судорог и время нормализации общего состояния животных.

Методом электронейромиографии (ЭНМГ) оценивали влияние физической нагрузки на электрические свойства нервных проводников. Для проведения прямой ЭНМГ выделяли седалищный нерв от места его выхода из полости малого таза до раздвоения на малоберцовый и большеберцовые нервы в нижней трети бедра. Определяли порог двигательной реакции (мА), амплитуду (мВ), площадь под кривой (мВ*мс) и длительность М-ответа (мс), рассчитывали скорость проведения импульса по нерву (м/с) [Николаев С.Г. Практикум по клинической электромиографии, Иваново, 2003.].

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием

непараметрического теста Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

В среднем длительность первого заплыва животных находилась в диапазоне 7-10 мин. Выполнение двукратного плавания крыс с 5 % грузом до отказа приводило к развитию утомления у животных, что подтверждалось длительностью плавания - $9,7 \pm 1,03$ мин и $5,1 \pm 0,15$ мин в первом и втором заплывах, соответственно.

При оценке активности ХЭ крыс после выполнения однократной нагрузки регистрировали снижение активности ХЭ в головном мозге и мозжечке в 1,23 и 1,09 раза, соответственно (таблица 1).

Таблица 1 - Влияние физической нагрузки на активность ХЭ крыс в тест-тканях ($M \pm m_m$, $n=12$)

Показатель	Интактная группа	Однократное плавание	Двукратное плавание
Ацетилхолинэстераза эритроцитов	$0,177 \pm 0,0064$	$0,164 \pm 0,0099$	$0,144 \pm 0,0110^*$
Ацетилхолинэстераза плазмы крови	$0,055 \pm 0,0046$	$0,050 \pm 0,0027$	$0,046 \pm 0,0038$
Бутирилхолинэстераза плазмы крови	$0,033 \pm 0,0025$	$0,028 \pm 0,0018$	$0,023 \pm 0,0018^{* \#}$
Ацетилхолинэстераза передней большеберцовой мышцы	$0,106 \pm 0,0072$	$0,108 \pm 0,005$	$0,099 \pm 0,0049$
Ацетилхолинэстераза коры головного мозга	$0,374 \pm 0,0141$	$0,303 \pm 0,0096^*$	$0,259 \pm 0,0153^{* \#}$
Ацетилхолинэстераза мозжечка	$0,337 \pm 0,0095$	$0,308 \pm 0,0086^*$	$0,274 \pm 0,0128^{* \#}$
* различия с интактной группой достоверны при $p \leq 0,05$; # различия с группой однократного плавания, достоверны при $p \leq 0,05$.			

При исследовании активности ацетил-ХЭ эритроцитов, плазмы крови, большеберцовой мышцы и бутирил-ХЭ плазмы крови после однократной нагрузки значения достоверно не отличались от показателей интактной группы.

На модели двукратного плавания отмечали снижение активности ХЭ крыс, как в крови, так и структурах ЦНС (таблица 1). Регистрировали снижение скорости ферментации ацетилтиохолина в эритроцитах (в 1,22 раза по сравнению с интактными крысами) и бутирилтиохолина в плазме крови (в 1,43 по сравнению с интактными крысами и в 1,21 раза по сравнению с группой однократного плавания (при $p \leq 0,05$)). На фоне изменения активности ХЭ в крови после двукратной нагрузки также отмечали достоверное (при $p \leq 0,05$) снижение активности ацетил-ХЭ головного мозга и мозжечка как по

сравнению с интактными животными (в 1,44 и 1,22 раза, соответственно), так и по сравнению с крысами, выполнявшими однократное плавание (в 1,17 и 1,12 раза, соответственно). При исследовании активности ацетил-ХЭ в передней большеберцовой мышце и в плазме крови достоверных отличий от показателя интактной группы и животных выполнявших однократную нагрузку не отмечали.

Снижение скорости гидролиза ацетилтиохолина в головном мозге могло быть следствием как адаптации к нагрузке, направленной на восполнение ацетилхолинового дефицита, так и стрессовой реакции крыс при помещении в сосуд с водой, а также нарушений кислотно-щелочного равновесия с развитием выраженного ацидоза. Доказательство последнего предположения требует проведения дополнительных исследований.

После выполнения однократной нагрузки и введения фармакологических зондов у животных регистрировали незначительное увеличение времени наступления генерализованного тремора и судорог. Отмечали достоверное (при $p \leq 0,05$) удлинение периода нормализации состояния животных после введения ареколина (в 2,1 раза) и никотина (в 1,42 раза) по сравнению с интактными животными (таблица 2). На фоне двукратной физической нагрузки время наступления ареколинового тремора и никотиновых судорог увеличивалось в 1,58 раза (при $p \leq 0,05$) и в 1,98 раза (при $p \leq 0,05$), соответственно, по сравнению с показателями интактных животных. Нормализация общего состояния животных после физической нагрузки и введения ареколина достоверно замедлялась более чем в 3,5 раза. Период восстановления общего состояния крыс в группе с введением никотина увеличивался в 2,5 раза. Выполнение двукратной физической нагрузки, в сравнении с моделью однократного плавания, сопровождалось достоверным увеличением как времени развития тремора в 1,32 раза (ареколиновый тест) и судорог в 1,46 раза (никотиновый тест), так и периода нормализации состояния в 1,87 (ареколиновый тест) и 1,55 раза (никотиновый тест).

Таблица 2 Влияние физической нагрузки на чувствительность М- и Н-холинорецепторов (ареколиновый и никотиновый тест) ($M \pm m_m$, $n=12$)

Группа	Ареколиновый тест	Никотиновый тест		
	Генерализованный тремор, с	Нормализация состояния, мин	Судороги, с	Нормализация состояния, мин
Интактная	129,8 $\pm$ 13,71	13,7 $\pm$ 1,63	188,5 $\pm$ 23,63	38,8 $\pm$ 4,65
Однократное плавание	155,0 $\pm$ 17,43	28,8 $\pm$ 3,10*	255,0 $\pm$ 28,29	55,3 $\pm$ 5,70*

Двукратное плавание	205,9±13,78*#	54,0±4,35*#	373,6±36,23*#	85,8±8,81*#
* различия с интактной группой достоверны при $p \leq 0,05$; # различия с группой, выполнявших однократное плавание, достоверны при $p \leq 0,05$.				

Результаты развития целевых состояний при проведении фармакологического зондирования позволили предположить о десенсибилизации М- и Нхолинорецепторов после выполнения двукратного плавания. Увеличение длительности тремора и судорог, а также нормализации общего состояния, развивающиеся после интенсивных физических нагрузок, указывали на дискоординацию механизмов холинорецепторной передачи и подтверждались результатами анализа ЭНМГ (таблица 3).

Таблица 3 – Влияние физической нагрузки на параметры электронейромиографии седалищного нерва крыс ($M \pm m_m$, $n=12$)

Группа	Порог раздражения нерва, мА	Амплитуда Мответа, мВ	Длительность Мответа, мс	Площадь под кривой М-ответа, мВ*мс	Скорость проведения импульса, м/с
Интактная	0,58±0,026	26,4±0,32	2,9±0,14	38,1±1,69	71,7±1,44
Однократное плавание	0,58±0,019	24,7±1,08	3,4±0,15*	44,4±1,8*	69,7±0,69
Двукратное плавание	0,55±0,018	21,5±0,89*#	3,9±0,19*#	50,9±2,36*#	71,2±1,24
* различия с интактной группой достоверны при $p \leq 0,05$; # различия с группой однократного плавания достоверны при $p \leq 0,05$.					

При проведении прямой ЭНМГ у крыс, выполнявших двукратное плавание, отмечали снижение амплитуды М-ответа в среднем в 1,22 и 1,14 раза (при $p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой и группой с моделью однократной нагрузки, соответственно. Снижение этого показателя на фоне двукратного плавания сопровождалось увеличением длительности М-ответа и показателя площади под кривой в 1,34 и 1,33 раза (при $p \leq 0,05$), соответственно, по сравнению с данными интактных животных. После выполнения однократной нагрузки увеличение длительности М-ответа и площади под кривой М-ответа было менее выражено, чем после двукратного плавания. В группе животных после выполнения однократного плавания регистрировали достоверное (при $p \leq 0,05$) увеличение длительности М-ответа (в 1,17 раза) и площади под кривой М-ответа (в 1,16 раза) по сравнению с интактными животными. При анализе результатов порога раздражения нерва и скорости проведения импульса по нерву после выполнения однократной и двукратной физической нагрузки достоверных отличий по сравнению с интактными животными выявлено не было. Выявленные изменения показателей ЭНМГ у

крыс после выполнения двукратной физической нагрузки до утомления свидетельствуют о развитии функциональных нарушений нейромышечной передачи и могут быть рассмотрены в качестве маркера развития мышечного утомления.

Таким образом, двукратная физическая нагрузка до утомления, по сравнению с моделью однократного плавания до отказа, вызывает более выраженные изменения регуляции холинергической системы и нарушение фермент-субстрат-рецепторного взаимодействия на всех уровнях ее функционирования. Снижение более чем в 1,4 раза активности ацетил-ХЭ головного мозга и бутирил-ХЭ плазмы крови крыс этой группы, по-видимому, имеет временный характер и может рассматриваться как один из механизмов запуска адаптационных реакций организма на выполнение многократной физической нагрузки. Выявленные изменения, возможно, направлены на восполнение медиаторного (ацетилхолинового) дефицита, развивающегося в холинергической системе при выполнении двукратной физической нагрузки до отказа. Уменьшение активности фермента может быть опосредовано другими механизмами, в том числе стрессовой реакцией (двукратное помещение в сосуд с водой), нарушениями кислотно-щелочного равновесия и развитием компенсированного ацидоза [Fatranska M., Budai D., Oprsalova L., Kyetnansky R., Acetylcholine and its enzymes in some brain areas of the rat under stress // *Brain Res.*, V. 424, № 1, p 109—114, 1987., Gottesfeld, Z., Kvetnansky, R., Kopin, I.J., and Jacobowitz, D.M., Effects of repeated immobilization stress on glutamate decarboxylase and choline acetyltransferase in discrete brain regions // *Brain Res.*, 1978, V. 152, № 2, P. 374-378.].

Результаты фармакологического зондирования (ареколиновый и никотиновый тесты) позволили сделать предположение о десенситилизации М- и Нхолинорецепторов у крыс, возникающих после двукратной физической нагрузки до отказа. Достоверное увеличение длительности тремора и судорог и периода нормализации общего состояния указывало на дискоординацию механизмов холинорецепторной передачи. Эти результаты согласуются с данными ЭНМГ (уменьшение амплитуды и увеличение длительности Мответа по сравнению с интактными животными и группой однократного плавания) и подтверждают теорию утомления мышц.

Многообразие адаптационных реакций холинергической системы в ответ на выполнение многократных физических нагрузок до утомления, по всей видимости, не ограничивается изменениями исследованных показателей и требует проведения дополнительных серий экспериментов. Холинергическая система обеспечивает не только функционирование нейромышечной передачи, но и работу внутренних органов организма, в том числе эндокринных желез. Ацетилхолин способствует выбросу в кровь инсулина, который увеличивает скорость обмена веществ в клетке, что в конечном итоге приводит к

увеличению толерантности к физической нагрузке [Maughan R., Gleeson M. The Biochemical Basis of Sports Performance, Oxford University Press, USA Sports Medicine, 2004.] . Усиление холинергической передачи в нейромышечных синапсах вызывает пропорциональное повышение силы мышечных сокращений и двигательной активности [Волков Н.И., Несен Э.Н., Осипенко А.А., Корсун С.Н. Биохимия спорта, М., 2000.], а положительная стимуляция активности центральных холинопозитивных структур лежит в основе запуска адренергических механизмов повышения выносливости.

Выводы

1. Двукратное плавание крыс с грузом 5 % до утомления приводит к снижению активности ацетил-ХЭ головного мозга и мозжечка и бутирил-ХЭ плазмы крови крыс по сравнению с интактными животными и группой после однократного плавания. Активность ацетил-ХЭ передней большеберцовой мышцы и плазмы крови на фоне выполнения однократного и двукратного плавания не изменяется.
2. Двукратное плавание крыс способствует увеличению времени наступления ареколинового тремора, никотиновых судорог по сравнению с интактными животными и крысами, выполнявшими однократную нагрузку, а также удлиняет период восстановления после введения фармакологических зондов.
3. Двукратное плавание крыс приводит к снижению амплитуды М-ответа и увеличению длительности М-ответа, а также показателя площади под кривой по сравнению с моделью однократной нагрузки и интактными животными. Скорость проведения импульса по седалищному нерву на фоне выполнения различных видов нагрузки до утомления не изменяется.

Литература

1. Волков Н.И., Несен Э.Н., Осипенко А.А., Корсун С.Н. Биохимия спорта, М., 2000.
2. Николаев С.Г. Практикум по клинической электромиографии, Иваново, 2003.
3. Conlay L.A., Sabounjian L.A., Wurtman R.J. Exercise and neuromodulators: Choline and acetylcholine in marathon runners // Int. J. Sports Med., 1992, V. 13, № 1, P. 141—142.
4. Dube S.N., Somani S.M., Babu S.R. Concurrent acute exercise alters central and peripheral responses to physostigmine // Pharmacol. Biochem. Behav., 1993, V. 46, P. 827-834.
5. Fatranska M., Budai D., Oprsalova L., Kyetnansky R., Acetylcholine and its enzymes in some brain areas of the rat under stress // Brain Res., V. 424, № 1, p 109—114, 1987.
6. Gottesfeld, Z., Kvetnansky, R., Kopin, I.J., and Jacobowitz, D.M., Effects of repeated immobilization stress on glutamate decarboxylase and choline acetyltransferase in discrete brain regions // Brain Res., 1978, V. 152, № 2, P. 374-378.
7. Maughan R., Gleeson M. The Biochemical Basis of Sports Performance, Oxford University Press, USA Sports Medicine, 2004.

8. Spodaryk K.K., Berger L., Hanke S. Infusion of physical training on the functional changes of young and old red blood cells // Mech. Agency Dev., 1990, V. 55, №2 P 199-206.
9. Somani S.M., Babu S.R., Arneric S.P., Dube S.N. Effect of cholinesterase inhibitor and exercise on choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities in rat brain regions // Pharmacol. Biochem. Behav., 1991, V. 39, P. 337-343.

Somani S.M., Dube S.N., Endurance training changes central and peripheral responses to physostigmine // Pharmacol. Biochem. Behav., 1992, V. 41, P. 773-781.