

**Влияния обратимого ингибитора холинэстераз на
морфофункциональное состояние скелетной мышечной ткани крыс при
выполнении интенсивных физических нагрузок**

¹О.В. Ветряков, ²И.В. Фатеев, ¹А.Я. Фисун, ²О.О. Владимирова,

²И.И. Алексеева, ²В.П. Федонюк, ²Н.А. Егорова

¹*Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург*

²*Государственный научно-исследовательский испытательный
институт военной медицины МО РФ, г. Санкт-Петербург*

o.v.vetryakov@mail.ru

Резюме. В эксперименте на белых беспородных крысах-самцах исследовано влияние пятидневного курсового введения обратимого ингибитора холинэстераз ипидакрина в дозах 1 и 2 мг/кг на морфологические и электрофизиологические характеристики скелетной мышцы при выполнении интенсивных физических нагрузок на фоне депривации сна. Показано, что курсовое внутрижелудочное введение ипидакрина в дозе 1 мг/кг приводило к уменьшению выраженности повреждения мышечной ткани и снижению степени функциональных нарушений нервно-мышечной передачи. На фоне введения ипидакрина в дозе 2 мг/кг выявлено уменьшение выраженности повреждения мышечной ткани и восстановление показателей, характеризующих эффективность нервно-мышечной передачи, до уровня интактных животных, также было отмечено повышение силы мышечного сокращения у лабораторных животных.

Полученные данные позволяют рассматривать ипидакрин в качестве перспективного средства в составе схем фармакологической коррекции физической работоспособности в условиях выполнения интенсивных физических нагрузок.

Ключевые слова. Ипидакрин, физическая работоспособность, морфофункциональное состояние скелетной мышцы.

The effect of reversible cholinesterase inhibitor on morphofunctional state of skeletal muscular tissue of rats performing intensive physical work

O.V. Vetryakov, I.V. Fateev, A.Y. Fisun, O.O. Vladimirova, I.I. Alekseeva,

V.P. Fedonyk, N.A. Egorova

1 Military Medical Academy. CM. Kirova, St. Petersburg

*2 State Scientific Research Institute of Military Medicine, RF Ministry of Defense,
St. Petersburg*

Abstract. In experiments on white outbred male rats the effect of reversible cholinesterase inhibitor ipidacrine in 5-day course administration of 1 and 2 mg/kg on morphological and electrophysiological characteristics of skeletal muscle when performing intensive physical work on the background of sleep deprivation was studied. It was shown that a course intraventricular administration of ipidacrine in a dose 1 mg/kg led to minimization of intensity of muscle tissue damage and decrease of a degree of functional disorders in neuromuscular transmission. On the background the administration of ipidacrine in a dose 2 mg/kg led to decrease of intensity of muscle tissue damage and recovery of factors characterizing the effectiveness of neuromuscular transmission up to a level of intact animals, the enhancement of muscular contraction intensity in laboratory animals was also noted.

Findings allow to consider ipidacrine as a perspective candidate in a composition of pharmacological correction circuits for physical work capacity in case of a highly intensive physical activity.

Key words: Ipidacrine, physical working capacity, morphofunctional state of skeletal muscle

Введение.

Выполнение интенсивных физических нагрузок на пределе адаптивных возможностей организма, приводит к негативным структурно-функциональным изменениям скелетных мышц [1, 2, 3]. Возникшие повреждения мышечных волокон восстанавливаются либо по происшествию определённого времени за счёт собственных регенеративных потенциалов мышечной ткани, либо нуждаются в применении средств и методов фармакологических и немедикаментозного воздействия.

Одним из направлений медикаментозной терапии при различной патологии скелетных мышц (миастения, мистенический синдром, нарушения опорно-двигательного аппарата после органических поражений ЦНС, синдром длительного сдавления) является применения холинотропных средств, в частности, обратимые ингибиторы холинэстераз [4]. Показано, что активация холинергических влияний вызывает значительный сосудо-расширяющий эффект в скелетных мышцах и изменение метаболизма поперечнополосатых мышечных волокон. Установлено, что изменение реактивности холинергической системы влечёт модуляцию парасимпатической регуляции функции органов, которые обеспечивают адаптационные возможности при выполнении интенсивных ФН [5]. Симпатотоническое холинергическое действие приводит к увеличению силы сокращения скелетных мышц в результате инициации ряда метаболических изменений [6]. Прямое или опосредованное восстановление пула ацетилхолина в синаптической щели способствует повышению проводимости в нервно-мышечных синапсах скелетных мышц и улучшению показателей работоспособности [7]. При этом отсутствуют данные влияния обратимых ингибиторов холинэстераз структурно-функциональное состояние скелетных мышц при выполнении предельных физических нагрузок.

Цель исследования. Изучение морфологических и электрофизиологических изменений, характеризующих

морфофункциональное состояние скелетных мышц при выполнении интенсивных физических нагрузок на фоне введения обратимого ингибитора холинэстераз ипидакрина.

Материалы и методы исследования.

Эксперименты выполнены на 96 беспородных белых крысах-самцах одного привоза с начальной массой 180-250 г, полученных из питомника РАН «Рапполово» (Санкт-Петербург). Животных содержали в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе со свободным доступом к воде и карантинном содержании в течение 14 дней.

Из животных, отобранных в эксперимент, было сформировано 4 группы по 12 особей в каждой: 1 группа – интактные животные; 2 группа – контрольная (выполнение физических нагрузок животными и введение внутривенно (в/в) воды для инъекций); 3 группа – выполнение физических нагрузок и курсовое введение в течение пяти суток ипидакрина в дозе 1 мг/кг в/ж; 4 группа – выполнение физических нагрузок и курсовое введение в течение пяти суток ипидакрина в дозе 2 мг/кг в/ж. Физические нагрузки для животных 2, 3 и 4-й групп представляли собой ежедневное в течение пяти суток выполнение трёхкратного «плавания с грузом» (груз 7 % от массы животного) до полного «отказа» (утомления). Перерыв между первой и второй физической нагрузкой составлял 5 минут, между второй и третьей нагрузкой – 40 минут. Во всех заплывах регистрировали максимальное время плавания животных. Выполнение нагрузки проводили на фоне депривации сна. Через 2 часа после окончания трёхкратного «плавания с грузом» животных помещали в специализированную клетку для депривации сна, из которой их извлекали непосредственно перед очередным введением исследуемых соединений. Субстанцию ипидакрин растворяли в воде для инъекций и вводили в/ж из расчёта 0,1 мл на 100 г животного. Контрольной группе животных осуществляли введение воды для инъекций в эквивалентном объёме.

У 12 животных каждой группы изучали морфологические изменения скелетной мышечной ткани, у других 12 животных проводили электронейромиографию (ЭНМГ). Морфофункциональную оценку состояния скелетной мускулатуры проводили на 6-е сутки исследования (через 1 сутки после выполнения заключительных физических нагрузок) по результатам изучения препаратов передней большеберцовой мышцы задней конечности. Изготавливали микроскопические препараты толщиной 4-5 мкм с последующей окраской гематоксилин-эозином по методу Караци (обзорные препараты), фосфорновольфрамовым гематоксилином по методу Маллори в модификации для выявления миофибрилярных структур, а также метиленовым зелёным пиронином по методу Браше для выявления тучных клеток. Электрические свойства нервных проводников и степень изменения потенциала действия при применении препаратов определяли по величине порога двигательной реакции седалищного нерва при его прямом раздражении в результате проведения ЭНМГ [8]. ЭНМГ проводили через 5 минут после окончания трехкратного «плавания с грузом» на 5-е сутки исследования. В ходе проведения прямой ЭНМГ определяли и рассчитывали следующие показатели: порог двигательной реакции, амплитуда, площадь, длительность регистрируемого мышечного ответа на стимуляцию седалищного нерва (М-ответ), скорость проведения нервного импульса (СПИ).

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием ПО Statistica 10.0. Нормальность распределения данных проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка, гомогенность дисперсий – с помощью критерия Барлетта, статистическую значимость различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Стьюденту-Ньюмену-Кейлсу [9]. Критический уровень значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. На микроскопических препаратах передней большеберцовой мышцы у интактных животных чётко наблюдали

поперечную исчерченность миоцитов (рисунок 1 А). Мышечные волокна сохраняли свою целостность, строгую продольную ориентацию, имели стандартную площадь поперечного сечения. Ядра мышечных волокон располагались субсарколеммально, имели овальную форму и отчётливо выраженный хроматин. Популяция тучных клеток, сопровождающая сосудистые элементы мышцы, состояла из крупных клеток, насыщенных гранулами, без признаков заметной дегрануляции.

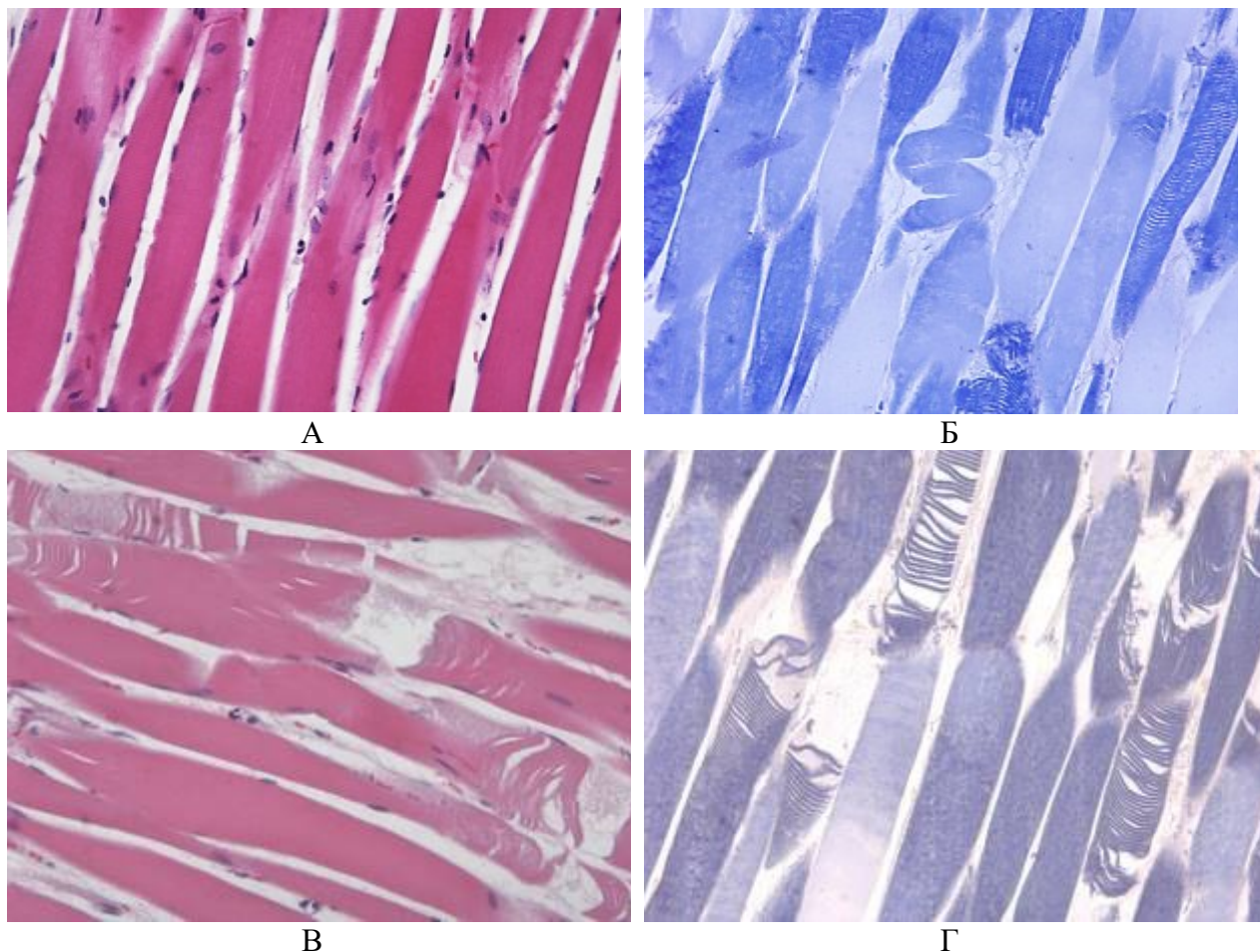
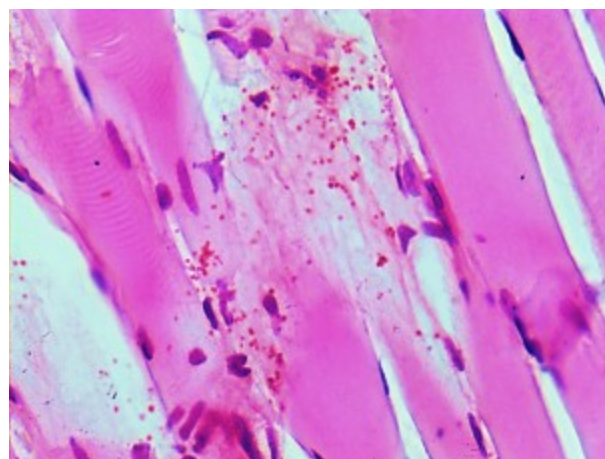
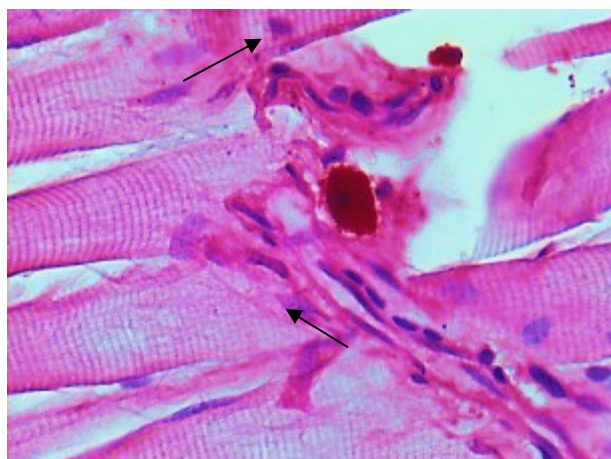


Рисунок 1 – Варианты структурных патологий мышечной ткани. А – Интактное животное. Продольное расположение волокон без признаков внутриклеточной патологии. Визуализация поперечной исчерченности. $\times 400$. Б – Контрольная группа. Мышечные волокна с глыбчатым распадом сократительного аппарата и увеличенным поперечным сечением, волновая деформация одного из волокон, изменённые тинкториальные свойства. $\times 400$. В – Контрольная группа. Фокус волокон с множественным поперечно-целевыми миолизом. $\times 400$. Г – Контрольная группа. Разрыв сарколеммы отдельных волокон. Контрактурные изменения участков. $\times 400$. Окраска А, В - гематоксилином и эозином по Карацци, В, Г – по методу Маллори.

У животных контрольной группы (интенсивная физическая нагрузка без приёма препарата) выявляли значительное количество зон, неравномерно распределённых по образцу, с признаками грубых нарушений структурной организации. Наиболее частыми были наблюдения крупных участков глыбчатого распада сократительного аппарата волокон и волокон в состоянии мутного набухания примерно с ослаблением или исчезновением окрашивания внутренних структур (рисунки 1 Б-Г). Местами появлялись единичные волокна в состоянии волновой деформации (косвенный показатель снижения функциональной возможности мышечной ткани). У животных этой группы также были обнаружены узкие множественные фокусы волокон в состоянии поперечно-щелевого миолиза внутренних структур без разрушения сарколеммы, чаще расположенные в брюшной области мышцы (рисунок 1 В). Выявляли отдельные волокна с полным разрывом сарколеммы (рисунок 1). Также визуализировались волокна с участками контруктурных изменений. Ядра практически всех мышечных волокон сохраняли структурные особенности, свойственные интактным животным. Отмечали умеренную отечность эндо- и перимизия, более заметную у сухожильного крепления. Имела место выраженная дегрануляция почти всех визуализируемых тучных клеток популяции с широким распространением секреторного компонента по окружающему интерстицию и сокращением объёма их цитоплазмы вплоть до оголения ядра (рисунок 2 Б).



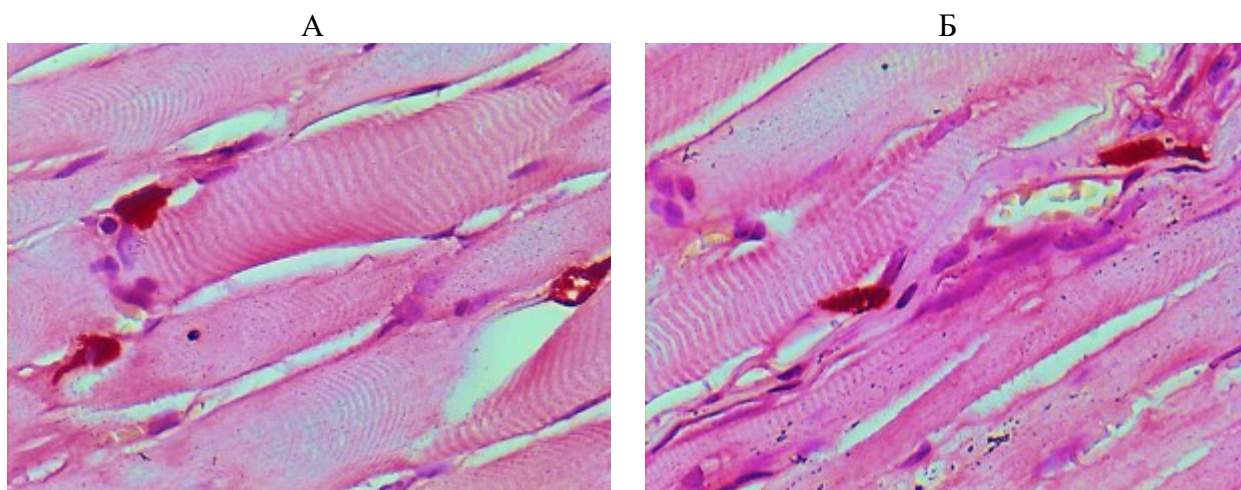
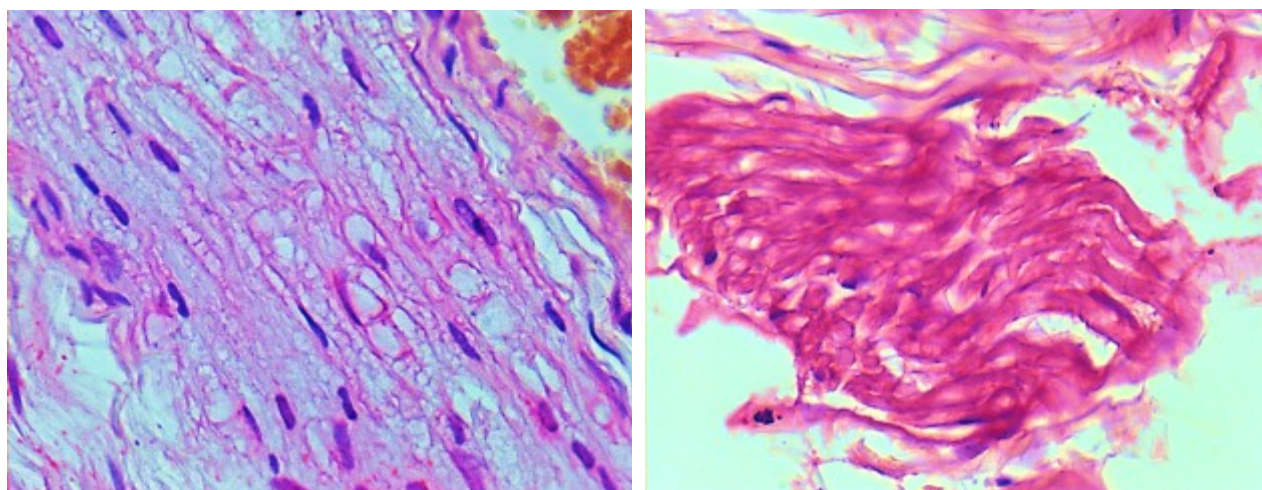


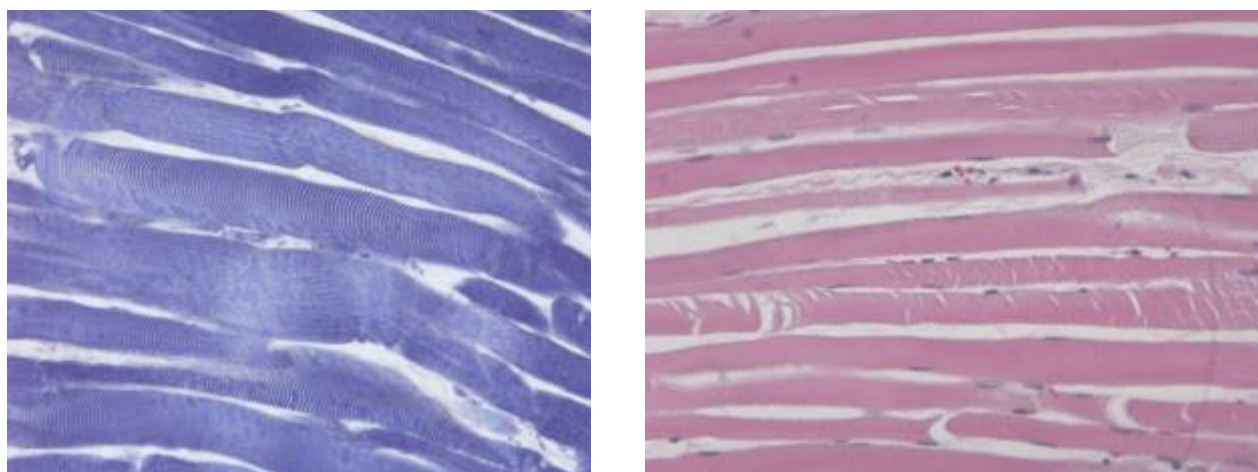
Рисунок 2 – Тучные клетки. А – Интактное животное. Крупная тучная клетка с широкой цитоплазмой, плотно заполненной гранулами. $\times 600$. Б – Контрольная группа. Дегранулированные тучные клетки (стрелка), секреторный компонент в интерстиции. Гомогенизация цитоплазмы отдельных мышечных волокон. $\times 600$. В – Опытная группа, доза ипидакрина 1 мг/кг. Умеренный объем цитоплазмы тучных клеток. $\times 600$. Г – Опытная группа, доза ипидакрина 2 мг/кг. Тоже. $\times 600$. Окраска по методу Браше.

В перемизии пучков мышечных волокон наблюдали значительное полнокровие сосудов венозного звена, единичные зоны капиллярного полнокровия со стазом эритроцитов. В нервных проводниках, замеченных на срезах, отмечали состояние выраженного набухания миелинового каркаса, что визуализировалось как крупные полости в перехватах Ранвье и множественные расширенные насечки при заметной дегидратации аксонов (рисунок 3 А).



А

Б



В

Г

Рисунок 3 – Нервные проводники и элементы сосудистого русла у крыс. А – Контрольная группа. Нервные волокна в проводнике с элементами набухания миелиновой оболочки. Визуализация конусов насечек и пустоты в области перехватов Ранвье. $\times 400$. Б – Опытная группа, доза ипидакрина 2 мг/кг. Нервные волокна в проводнике без проявлений отека миелиновой оболочки. $\times 400$. В – – Опытная группа, доза ипидакрина 1 мг/кг. Мышечные волокна с проявлением миолиза. $\times 400$. Г – Опытная группа, доза ипидакрина 2 мг/кг. Отдельные волокна с проявлением щелевого миолиза. $\times 400$. А, Б – окраска по методу Браше, В, Г – окраска гепатоксилином и эозином по Карацци.

У животных, получавших параллельно с ФН ипидакрин в течение пяти суток независимо от его дозы по завершении эксперимента количество деструктивных проявлений было значительно меньше чем у животных группы контроля. Соотношение их вариантов изменялось в сторону преобладания участков с глыбчатым распадом с окрашиванием гранул цитоплазматического компонента, которые можно отнести к одной из наиболее ранних стадий повреждения мышечной ткани (рисунок 3 В). Изменения типа поперечно-щелевого миолиза с опустошением цитоплазматического каркаса, разрыв волокон и волновой деформации в обеих группах выявляли крайне редко (рисунок 3 Г). Во всех участках мышцы наблюдали умеренное кровенаполнение капиллярного звена, сопоставимое с интактной группой без признаков стаза (рисунок 2 В). Количественно паравазальных тучных клеток была выше, чем у животных контрольной группы (рисунок 2 Г). При этом большинство тучных клеток находилось в состоянии слабой дегрануляции или её отсутствия с

сохранением объемов цитоплазмы, что, вероятно, отразилось на некотором снижении отежности интерстиция по отношению к контролю. Отмечали структурную сохранность миелинового каркаса нервных проводников на уровне интактных животных.

Результаты исследований действия ипидакрина на электрофизиологические показатели седалищного нерва при прямой электронейромиографии (ЭНМГ) крыс представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Изменение электрофизиологических показателей крыс после выполнения трёхкратного плавания и применения обратимого ингибитора холинэстеразы ипидакрина в течение пяти суток, $n=12$, $M \pm \sigma$

Группа, доза мг/кг	Порог раздражения нерва, мА	Амплитуда М-ответа, мВ	Длительность М-ответа, мс	Площадь М-ответа, мс*мВ	Скорость проведения, м/с
Интактная группа	0,517±0,041	26,1±0,5	3,02±0,26	39,3±10,2	72,3±9
Контрольная группа	0,533±0,052	21,1±4,8*	3,71±0,5*	51,1±7,1*	71,7±4,6
Ипидакрин, 1	0,517±0,041	24,5±2,5	3,18±0,36	43,3±2,9#	71±5,7
Ипидакрин, 2	0,517±0,041	25,7±1,6#	3,04±0,28#	40,5±2,6#	74,4±5,8
Примечания: * – различия с интактной группой значимы, $p<0,05$; # – различия с контрольной группой значимы, $p<0,05$.					

Выполнение интенсивной нагрузки животными контрольной группы приводило к снижению амплитуды М-ответа (уменьшение силы мышечного сокращения), увеличению его длительности и площади М-ответа (увеличение времени активации двигательных единиц), при сохранении скорости проведения импульса и порога раздражения по сравнению с интактными животными. Данные изменения свидетельствовали о неполном восстановлении мышечных волокон двигательных единиц и снижении эффективности нервно-мышечной передачи, что приводило к развитию утомления мышц вследствие выполнения ФН.

В группе животных, которым вводили ипидакрин в дозе 1 мг/кг, после ФН отмечали значительного уменьшение площади М-ответа в (1,18 раза). Увеличение дозы ипидакрина приводило к еще более выраженным

изменениям. Регистрировали значимое повышение амплитуды (в 1,21 раза), снижение площади (в 1,26 раза) и уменьшения продолжительности (в 1,22 раза) М-ответа по сравнению с контролем. Эти данные свидетельствуют о том, что введение ипидакрина закономерно снижало выраженность нарушений нервно-мышечной передачи, развивающихся при выполнении интенсивных ФН и способствовало повышению силы мышечного сокращения (увеличение амплитуды в 1,21 раза).

Заключение. Показано, что выполнение интенсивных ФН на фоне депривации сна в течение 5-ти суток приводило к развитию выраженных структурно-функциональных нарушений мышечной ткани и утомлению, морфологическими эквивалентами которых характеризовались рядом проявлений различным по интенсивности глыбчатым распадом мышечных волокон; появлением зон поперечно-щелевого миолиза; разрывами сарколеммы единичных волокон и контрактурными изменениями. Курсовое введение ипидакрина в дозах 1 и 2 мг/кг снижало выраженность процессов повреждения мышечной ткани. По данным электрофизиологических исследований отмечали уменьшение степени функциональных нарушений нервно-мышечной передачи, утомления мышечных волокон двигательных единиц и повышало силу мышечного сокращения. Наибольший эффект был достигнут при введении ипидакрина в дозе 2 мг/кг.

Полученные данные позволяют рассматривать ипидакрин как перспективное средство в составе схем фармакологической коррекции физической работоспособности в условиях выполнения интенсивных ФН.

Список литературы

1. Byrne, C. Neuromuscular function after exercise-induced muscle damage: theoretical and applied implications / C. Byrne, C. Twist, R. Eston // Sports Med. – 2004. – V.34. – P. 49–69.
2. Cooper, R.N. In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle / R.N. Cooper, S. Tajbakhsh, V. Mouly et al. // J. Cell Sci. – 1999. – V. 112. – P. 2895–2901.
3. Coudreuse, J.M. Delayed post effort muscle soreness / J.M. Coudreuse, P. Dupont, C. Nicol // Ann. Readapt. Med. Phys. – 2004. – V. 47. – P. 290–298.
4. Пейдж, К. Фармакология: клинический подход / К. Пейдж [и др.]; пер. с англ. под ред. Б. К. Романова. – М.: «Логосфера», 2012. – 744 с.
5. Androne, A. S. Acetylcholinesterase inhibition with pyridostigmine improves heart rate recovery after maximal exercise in patients with chronic heart failure / A. S. Androne [et al.] // Heart. – 2003. – Vol. 89. – № 8. – P. 854-858.
6. Медведева, Н. А. Симпатические холинергические влияния на работоспособность и кровоснабжение скелетных мышц: автореф. дис. ... доктора биологических наук: 03.00.13 / Н. А. Медведева; МГУ им. М.В. Ломоносова. Биол. фак. – М., 1989. – 289 с.
7. Jäger, R. Phospholipids and sports performance / R. Jäger, M. Purpura, M. Kingsley // J. International Society Sports Nutrition. – 2007. – Vol. 4. – № 5. – P. 1-8.
8. Николаев, С. Г. Практикум по клинической электромиографии / С. Г. Николаев. – Издание 2-е, перераб. и доп. – Иваново, 2003. – 264 с.
9. Гланс, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланс. – М.: «Практика», 1998. – 459 с.