



Биолог. журн. Армении, 1 (62), 2010

**ИССЛЕДОВАНИЕ СОЧЕТАННОГО ДЕЙСТВИЯ
ХОЛИНОВОГО ЭФИРА N-(P-МЕТОКСИБЕНЗОИЛ)-DL-
ФЕНИЛАЛАНИНА И ХОЛИНОВОГО ЭФИРА N-БЕНЗОИЛ-
DL-ВАЛИНА НА ВНЕКЛЕТОЧНУЮ ФОНОВУЮ
ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ОДИНОЧНЫХ
ИНТЕРНЕЙРОНОВ И МОТОНЕЙРОНОВ СПИННОГО МОЗГА
КРЫС ПРИ ЛАТЕРАЛЬНОЙ ГЕМИСЕКЦИИ**

**И. Р. КАРАПЕТЯН, В. О. ТОПУЗЯН, Т. С. ХАЧАТРЯН,
Э. Ю. АРУТЮНЯН, Г. К. КИПРИЯН**

*Институт тонкой органической химии им. А. Л. Мнджояна НАН РА,
Ереванский базовый медицинский колледж № 1*

Обсуждается вопрос применения двух синтезированных производных холина: холинового эфира N-(p-метоксибензоил)-DL-фенилаланина и холинового эфира N-бензоил-DL-валина у крыс с левосторонней латеральной гемисекцией спинного мозга. Полученные результаты свидетельствуют о стойком протекторном эффекте данных соединений на изменение внеклеточной фоновой электрической активности одиночных нейронов спинного мозга крыс. Регистрация и анализ вызванной активности одиночных мотонейронов спинного мозга проводились посредством специальных математических программ в режиме on-line.

Спинной мозг – гемисекция – нейроны – фоновая активность – холин – эфиры

Ուսումնասիրվել է խոլինի երկու սինթեզված ածանցյալների՝ խոլինի եթերի N/(n/մեթօքսիբենզոիլ)/DL/ֆենիլալանինի և խոլինի եթերի N/բենզոիլ/DL/վալինի համակցված ազդեցությունը առնետների ողնուղեղի նեյրոնների էլակետային էլեկտրական ակտիվության վրա վերջինիս լատերալ կիսահատման դեպքում: Ստացված տվյալները վկայում են տվյալ միացությունները ստացող առնետների մոտ ողնուղեղի առանձին նեյրոնների էլակետային ակտիվության արտահայտված դրական արդյունքի մասին: Ողնուղեղի նեյրոնների արտաբջջային էլակետային ակտիվության գրանցումը և վերլուծությունը կատարվել են մաթեմատիկական հատուկ ծրագրերով՝ on/line ռեժիմում:

Ողնուղեղ (կիսահատում (նեյրոններ (էլակետային ակտիվություն (խոլին (եթերներ

In these series of investigations the issue of the influence of two synthetic choline derivatives like choline N-(p-methoxybenzoil)-DL-phenilalanyl ester and choline N-benzoil-DL-valin ester on extracellular background electrical activity of spinal cord single neurons in rats with the left – side lateral hemisection of spinal cord has been discussed. The obtained results showed the strong, protective effect of these chemical substances in rats. The registration and analysis of the extracellular background electrical activity of spinal cord single neurons has been done by means of special mathematical software in on-line mode.

Spinal cord – hemisection – neurons – background activity – choline – esters

Проблема восстановительных процессов при повреждениях спинного мозга у млекопитающих при воздействии различных веществ как натурального, так и синтетического происхождения, несомненно, является одним из актуальнейших вопросов современной биологии и медицины [1,2,3]. Компенсаторные приспособления в повреждённом организме осуществляются благодаря сложному синтезу многообразных взаимодействующих в организме и в особенности в нервной системе процессов, к которым относится, в частности, регенерация повреждённых структур, что неоднократно отмечает Асратян [4,5,6]. Между тем до недавнего времени считалось, что в процессе эволюции млекопитающие животные безвозвратно утратили ценную способность регенерации нервных волокон в месте повреждения спинного мозга (СМ). Изучение восстановительной способности спинного мозга млекопитающих проводилось многими исследователями на протяжении более 100 лет, и полученные результаты приводятся в ранних обзорных статьях и монографиях ряда авторов [15,16,18,24]. Достижения медицинской науки во второй половине 20-го века способствовали снижению смертности при травматической болезни СМ [13,24]. Однако стойкость соматических и вегетативных нейрогенных нарушений является причиной инвалидизации подавляющего большинства больных с поражениями СМ, во время которых нарушается проведение нервных импульсов. В ряде исследований [10,13,15,16] рассматриваются вопросы о состоянии восстановительных процессов при повреждении СМ у млекопитающих и при воздействиях в данных случаях разных препаратов. В наших работах, помимо обсуждения большого литературного материала по этой проблеме, центральное место занимают данные экспериментов, проведенных с помощью электрофизиологических, нейроморфологических, гистохимических методик и математической статистики по сравнительному изучению эффективности как отдельных препаратов натурального и синтетического происхождения, так и их разных сочетаний и способов воздействия при повреждениях СМ.

Известно, что холин (от греч. *choly* – жёлчь), гидроокись 2-оксиэтилтриметиламмония, $[(\text{CH}_3)_3\text{N}+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}] \text{OH}$. Это бесцветные кристаллы, хорошо растворимые в воде, этиловом спирте, нерастворимые в эфире, бензоле. Холин легко образует соли с сильными кислотами, его водные растворы обладают свойствами сильных щелочей. Впервые получен из жёлчи. Широко распространён в живых организмах. Особенно высоко содержание его в яичном желтке, мозге, печени, почках и мышце сердца. Холин обычно относят к витаминам группы В, хотя животные и микроорганизмы способны его синтезировать. Он входит в состав фосфолипидов (например, лецитина, сфингомиелина), служит источником метильных групп в синтезе метионина. Из холина в организме животных синтезируется ацетилхолин – один из важнейших химических передатчиков нервных импульсов. Холин является так называемым липотропным веществом, предотвращает тяжёлые заболевания печени, возникающие при её жировом перерождении. В медицине для лечения заболеваний печени применяют хлорид холина [14]. Его вводят также в состав комбикормов сельскохозяйственных животных. Для аналитических целей используют способность холина давать плохо растворимые соли с фосфорновольфрамовой, платинохлористоводородной и некоторыми другими гетерополикислотами [14,17,20–23].

Холин является аминспиртом, химическим веществом, близким по своему строению к фосфатидовым кислотам, наиболее простой форме фосфолипидов, которые, как известно, служат главными компонентами биологических мембран [9]. Отличительным признаком фосфатидовых кислот является наличие остатка фосфорной кислоты, который образует сложноэфирную связь с гидроксильной группой *sn*-С-3 глицерина. Поэтому фосфолипиды, по крайней мере в нейтральной области рН, несут отрицательный заряд. Наиболее простая форма фосфолипидов, фосфатидовые кислоты, являются фосфо- моноэфирами диацилглицерина. Фосфа-

тидовые кислоты – важнейшие предшественники в биосинтезе жиров и фосфолипидов. Фосфатидовые кислоты могут быть получены из фосфоглицеридов с помощью фосфолипаз. Фосфатидовая кислота (остаток фосфатидил –) служит исходным веществом для синтеза других фосфолипидов. Остаток фосфорной кислоты может образовывать сложноэфирную связь с гидроксильными группами аминок спиртов (холин, этаноламин или серин) или полиспиртов (миоинозит). Холин является предшественником ацетилхолина – одного из передатчиков нервных импульсов, или нейромедиаторов [17, 20, 22]. Для синтеза нейромедиатора ацетилхолина нервная ткань получает холин извне, поскольку он в мозге практически не синтезируется и поступает туда из крови через гематоэнцефалический барьер. Часть холина используется для ресинтеза лецитина и убихинона, другая часть в холинергических нейронах – для синтеза ацетилхолина. Внутриклеточное содержание холина в ткани мозга составляет больше 50 %, остальная часть захватывается терминалями из синаптической щели после гидролиза и используется повторно. Захваченный холинергическими терминалями холин (60–72 %) сразу превращается в ацетилхолин. Биосинтез холина осуществляется путём метилирования N-диметиламиноэтанола, синтезируемого из серина [23,28].

В корреировании нейрогенных нарушений невторостепенна роль эфиров холина, в частности ацетилхолина, заслуживающих существенного внимания с точки зрения особенностей его синтеза и биологической активности, являющегося составной частью системы нейроэндокринной регуляции организма [14,17,19,25–28]. Согласно результатам исследований последних лет [19,20,23,25–28], холиновыми эфирами осуществляется ряд важнейших функций в организме человека и животных. Вместе с тем продолжают отсутствовать сведения относительно применения эфиров холина при спинномозговых повреждениях различной степени выраженности и результатов их действия на интернейроны (ИН) и мотонейроны (МН) СМ.

Исходя из поиска оптимальных средств, стимулирующих и благоприятствующих росту волокон повреждённых путей СМ и с учётом вышеотмеченных особенностей холиновых эфиров, нами предпринята попытка исследовать сочетанное действие двух эфиров холина: холинового эфира N-(p-метоксибензоил)-DL-фенилаланина (ХЭФ) и холинового эфира N-бензоил-DL-валина (ХЭВ), синтезированных в институте тонкой органической химии им. А.Л. Мнджояна НАН РА под руководством д.х.н. Топузьяна В.О., на внеклеточную фоновую электрическую активность одиночных ИН и МН СМ крыс в норме и при его экспериментальных повреждениях типа гемисекции (ГМС).

Материал и методика: Эксперименты поставлены на 50 белых крысах – самцах, массой (210–230 г), разделённых на следующие подопытные группы: первая – 10 экз. – интактные животные; вторая – 20 экз. – животные с левосторонней латеральной ГМС СМ на уровне Т8–Т9; третья – 20 экз. – животные с левосторонней латеральной ГМС СМ на уровне Т8–Т9, получавшие в течение 1 месяца ежедневно сочетанные инъекции ХЭФ и ХЭВ в место повреждения СМ (дозировка – 100 мкг/кг массы животного – ХЭФ и 100 мкг/кг массы животного – ХЭВ, каждое животное индивидуально). После проведения клинических наблюдений и дачи препаратов на всех 3 группах животных были поставлены электрофизиологические эксперименты. Микроэлектро-физиологическими методами производили экстраклеточную регистрацию внеклеточной фоновой электрической активности (ФА) одиночных ИН дорсального рога СМ и одиночных МН вентрального рога СМ крыс. Отведение активности исследуемых мотонейронов проводили стеклянным микроэлектродом с диаметром кончика 1–2 мк, заполненным 2М раствором NaCl. Регистрацию ФА ИН и МН проводили с помощью специально разработанной математической программы, обеспечивающей в режиме on-line селекцию спайков посредством амплитудной дискриминации спайков и последующим построением куммулятивной импульсной гистограммы для выбора необходимого режима записи вызванной активности одиночных ИН и МН СМ. Анализ полученных данных осуществляли по алгоритму, подробно описанному в наших предыдущих статьях [11]. Более подробно с программной методикой наших экспериментов можно ознакомиться в нашей работе [12].

Результаты и обсуждение. На рис. 1 демонстрируется пример куммулятивной (рис. 1, а) и суммированной (рис. 1, в) гистограмм ФА одиночного фоновоактивного МН СМ (глубина 1200 мкм) в норме (рис. 1, а, б, в); у крыс с левосторонней латеральной ГМС СМ (глубина 1200 мкм, рис. 1, 2, а, б, в) и у крыс с левосторонней латеральной ГМС СМ, получавших сочетанные инъекции ХЭФ и ХЭВ в течение 1 месяца (глубина 1200 мкм, рис. 1, 3, а, б, в). Как видно из рисунка, последствия спинномозгового повреждения проявляются в виде урежения ФА одиночного МН СМ по сравнению с нормой.

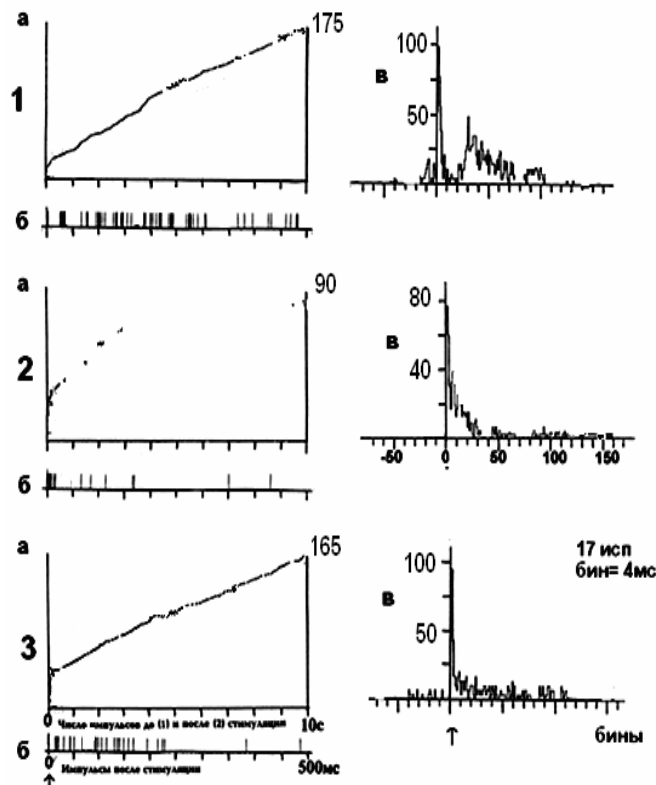


Рис. 1. Внеклеточная фоновая электрическая активность одиночного мотонейрона спинного мозга крыс в норме (1 а, б, в); одиночного мотонейрона спинного мозга крыс при левосторонней латеральной гемисекции (2 а, б, в) и одиночного мотонейрона спинного мозга у крыс с левосторонней латеральной гемисекцией, получавших в течение 1 месяца ежедневно сочетанные инъекции ХЭФ и ХЭВ (3а, б, в). Глубина отведения 3 мотонейронов – 1300 мк.

Данный эффект хорошо виден на куммулятивной гистограмме (рис. 1, 2, а, 1), где имеет место уменьшение числа импульсов в пачке; и на суммированной (17 исп.) гистограмме (рис. 1, 2, в), на которой наблюдается аналогичный эффект.

На рис. 2 демонстрируется пример куммулятивной (рис. 2, а) и суммированной (рис. 2, в) гистограмм ФА одиночного фоновоактивного ИН СМ (глубина 800 мкм) в норме (рис. 2, 1, а, б, в); у крыс с левосторонней латеральной ГМС СМ (глубина 800 мкм, рис. 1, 2, а, б, в) и у крыс с левосторонней латеральной ГМС СМ, получавших сочетанные инъекции ХЭФ и ХЭВ в течение 1 месяца (глубина 800 мкм, рис. 2, 3, а, б, в).

Как видно из рис. 2, и в случае с ИН последствия спинномозгового повреждения проявляются также в виде урежения ФА одиночного ИН СМ по сравнению с нормой. Данный эффект хорошо виден на куммулятивной гистограмме (рис. 2, 2, а, 1), где имеет место уменьшение числа импульсов в пачке, и на суммированной (17 исп.) гистограмме (рис. 2, 2, в), на которой также наблюдается аналогичный эффект.

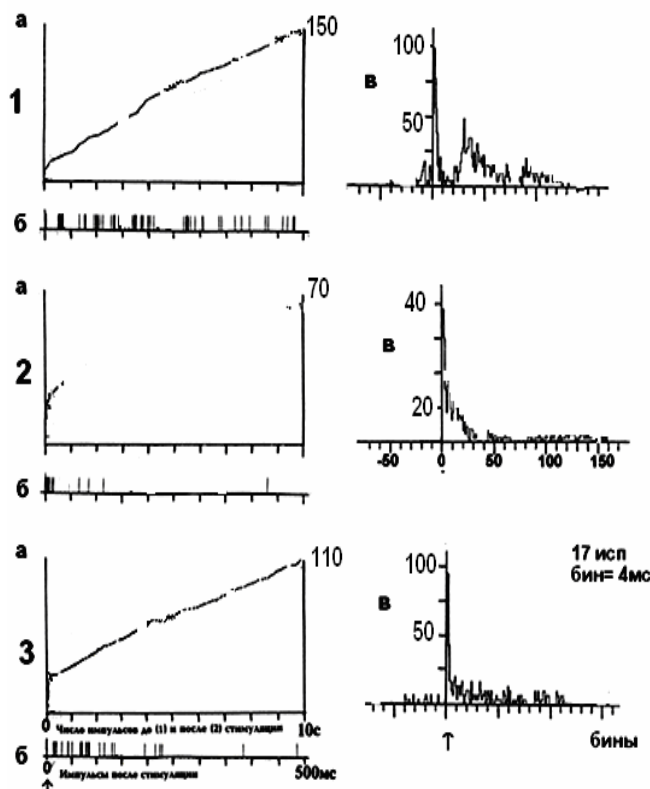


Рис. 2. Внеклеточная фоновая электрическая активность одиночного интернейрона спинного мозга крыс в норме (1 а, б, в); одиночного интернейрона спинного мозга крыс при левосторонней латеральной гемисекции (2 а, б, в) и одиночного интернейрона спинного мозга у крыс с левосторонней латеральной гемисекцией, получавших в течение 1 месяца ежедневно сочетанные инъекции ХЭФ и ХЭВ (3 а, б, в). Глубина отведения 3 мотонейронов – 800 мк.

При сравнении зарегистрированной картины ФА у одиночных ИН и МН СМ крыс можно прийти к заключению, что в целом при спинномозговом повреждении (ГМС) проявляется резкое урежение ФА одиночных ИН и МН и переход её из нормального регулярного типа разряда данных нейронов в патологический “пачечный” тип разряда (рис. 1, 2, а, б, в).

При систематическом каждодневном введении ХЭФ и ХЭВ в вышеуказанных дозировках проявляется резкое учащение ФА как ИН, так и МН, сопровождающееся исчезновением пачечной активности и восстановлением практически до нормы регулярного типа разряда данных спинномозговых нейронов (рис. 1, 3, а, б, в; рис. 2, 3, а, б, в), вызванное, вероятно, протекторными свойствами данных холиновых эфиров (ХЭФ и ХЭВ).

Ранее нами исследовались действия холиновых производных [7] в сочетании с тиреоидным гормоном тироксином при повреждениях спинного мозга, а также действие ХЭФ на фоновую и вызванную активность одиночных пирамидных нейронов IV слоя коры больших полушарий головного мозга крыс при латеральной ГМС СМ [8]. Анализируя данные проведенных исследований, пришли к выводу о том, что в целом имеется положительный эффект от сочетанного применения холиновых производных (ХЭФ и ХЭВ) при органических повреждениях спинного мозга у крыс и наблюдается наличие стойких положительных результатов.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о протекторном действии сочетанного комплекса ХЭФ и ХЭВ на ФА одиночных ИН и МН СМ при его органических повреждениях типа левосторонней латеральной ГМС.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Андреасян А.С., Хачатрян Т.С.* Влияние лидазы на проводимость повреждённого спинного мозга. Вестник МАНЭБ, 8, 7, 206–210, 2003.
2. *Андреасян А.С., Матинян Л.А., Хачатрян Т.С.* Роль тироксина в изменении фоновой электрической активности пирамидных нейронов коры больших полушарий головного мозга крыс при органическом повреждении спинного мозга. Вестник МАНЭБ, 3, 142–145, 2004.
3. *Андреасян А.С., Хачатрян Т.С.* Исследования комплексного влияния лидазы, тироксина и структурированной воды на электрическую активность одиночных пирамидных нейронов коры больших полушарий головного мозга крыс до и после гемисекции спинного мозга. Вестник МАНЭБ, 12, 4, 207–209, 2007.
4. *Асратян Э.А.* Физиология центральной нервной системы (научные работы). Изд. АН СССР, М., с. 338–362; 380, 342, 354–359, 425, 1953.
5. *Асратян Э.А.* Лекции по некоторым вопросам нейрофизиологии. Изд. АН СССР, М., с. 5–34, 1959.
6. *Асратян Э.А.* К теории компенсации функций. В кн.: Проблема компенсаторных приспособлений. Изд. АН СССР, М., с. 235–245, 1960.
7. *Киприян Т.К., Топузьян В.О., Карапетян И.Р., Хачатрян Т.С.* Анализ влияния сочетанного комплекса тироксина и йодметилата 2–(диметиламино) этилового эфира-N-(п-метоксибензоил)-DL-фенилаланина на электрическую активность повреждённых травмой одиночных мотонейронов спинного мозга крыс. В сб.: Международная научная конференция “Актуальные проблемы интегративной деятельности и пластичности нервной системы”, посвящ. 80-летию со дня рождения академика НАН РА, чл.-корр. РАН В.В. Фанарджяна, Ереван, Изд. “Гитутюн” НАН РА, с. 154–158, 2009.
8. *Киприян Т.К., Топузьян В.О., Карапетян И.Р., Арутюнян Э.Ю., Хачатрян Т.С.* Влияние йодметилата 2–(диметиламино) этилового эфира – N–(п-метоксибензоил)-DL-фенилаланина на фоновую и вызванную активность одиночных пирамидных нейронов IV слоя коры больших полушарий головного мозга крыс при латеральной гемисекции спинного мозга. Ж. Мед. Наука Армении, XLIX, 2, с. 31–34, 2009.
9. *Ткачук В.А.* Молекулярные механизмы нейроэндокринной регуляции. Соросовский научно-образовательный журнал, 6, с. 5–10, 1998.
10. *Угрюмов В.М.* Восстановление функций при закрытых повреждениях позвоночника и спинного мозга. В кн.: Восстановление функций при поражении центральной нервной и периферической нервной системы. Материалы симпозиума. Л., 104, 105, 1967.

11. *Хачатрян Т.С., Матинян Л.А., Андреасян А.С., Киприян Т.К.* Роль тироксина в изменении электрической активности интернейронов и мотонейронов повреждённого спинного мозга крыс. Вопросы теоретической и клинической медицины, 5, 1 (25), 40–45, 2002.
12. *Хачатрян Т.С.* Действие лидазы и тироксина на фоновую электрическую активность одиночных пирамидных нейронов коры больших полушарий крыс. Биолог. журн. Армении, 59, 3–4, 2007, 198–202.
13. *Venes V.* Poraneni michy. Praha, 184, 1965.
14. *Brown J.O., McCouch G.P.* Abortive regeneration of the transected spinal cord. 1947. J. Comp. Neurol., v. 87, № 2, pp. 131 – 137.
15. *Clemente C.D.* Structural regeneration in the mammalian central nervous system and the role of neuroglia and connective tissue. 1955. In: «Regeneration in the central nervous system» (W.F. Windle, ed.), Springfield, Illinois, pp. 147–161.
16. *Clemente C.D., Windle W.F.* Regeneration of severed nerve fibers in the spinal cord of the adult cat. 1954. J. Comp. Neurol., 101, № 3, pp. 691 – 731.
17. *Eibl K. H., Lewis G.P., Betts K., Linberg K.A., Gandorfer A., Kampik A., Fisher S.K.* The effect of alkylphosphocholines on intraretinal proliferation initiated by experimental retinal detachment. J. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 48, 3, p. 1305–1311. 2007.
18. *Fawcett J.V.* bindibg spinal cord injuries. J. Rehabil. Med., 9, 40, pp. 780–782, 2008.
19. *Carrasco M.P., Jimenes – Lopez J.M., Segovia J.L., Marco C.* Hexadecylphosphocholine interferes with the intracellular transport of cholesterol in HepG2 cells. J. FEBS, 8, 275, , pp. 1675–1686. 2008.
20. *Holmes–McNary M.Q., Cheng W.L., Mar M.H., Fussel S., Zeisel S.H.* Choline and choline esters in human and rat milk and in infant formulas. J. Am. J. Clin. Nutr., 4, 64, pp. 572–576, 1996.
21. *Lillesaar C., Stigloher C., Tannhauser B., Wullimann M.F., Bally – Cuif L.* Axonal projections originating from raphe serotonergic neurons in the developing and adult zebrafish, *Danio rerio*, using transgenics to visualize raphe-specific *pet1* expression. J. Comp. Neurol., 2, 512, pp. 158–182, 2009.
22. *Maestro B., Gonzalez A., Garcia P., Sanz J. M.* Inhibition of pneumococcal choline-binding proteins and cell growth by esters of bicyclic amines. J. FEBS, 2, 274, pp. 364–376, 2007.
23. *Masson P., Froment M.T., Gillon E., Nachon F., Lockridge O., Schopfer L.M.* Hydrolysis of oxo- and thio-esters by human butyrylcholinesterase. J. Biochim. Biophys. Acta, 1, 1774, pp. 1–34, 2007.
24. *Perez–Orribo L., Perez–Lorensu P.J., Roldan–Delgado H., Garcia–Conde M., Spreafico M., Garcia–Marin V.* Intraoperative neurophysiological monitoring of the spinal cord: our experience. J. Rev. Neurol., 5, 47, pp. 236–241, 2008.
25. *Placzek A.N., Dani J.A.* Synaptic plasticity within midbrain dopamine centers contributes to nicotine addiction. J. Nebr. Symp. Motiv., 55, pp. 5–15, 2009.
26. *Zeisel S.H.* Choline: Needed for Normal Development of Memory. J. Am. J. Clin. Nutr., 19, 9005, pp. 528–531, 2000.
27. *Zeisel S.H.* Nutritional Importance of Choline for Brain Development. J. Am. J. Clin. Nutr., 90006, pp. 621–626, 2004.
28. *Zelder F. H., Salvio R., Rebek J. Jr.* A synthetic receptor for phosphocholine esters. J. Chem. Commun. (Camb.), 12, 28, pp. 1280–1282, 2006.

Поступила 09.11.2009.