



Биолог. журн. Армении, 2 (68), 2016

РОЛЬ ХОЛИНОВЫХ ЭФИРОВ N-ЗАМЕЩЁННЫХ- α , β -ДЕГИДРО-АМИНОКИСЛОТ В КОРРЕКЦИИ СИНДРОМА НИЗКОГО ТРИЙОДТИРОНИНА ПРИ ГЕМИСЕКЦИИ СПИННОГО МОЗГА

В.О. ТОПУЗЯН, Т.С. ХАЧАТРЯН

*Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии НАН РА
tskhachatryan@outlook.com*

Исследовались концентрации тиреотропного гормона гипофиза и тиреоидных гормонов в сыворотке крови у крыс при гемисекции спинного мозга с наличием синдрома низкого трийодтиронина, до и после изолированного воздействия сверхмалых доз 10^{-9} М холиновых эфиров N-замещённых- α , β -дегидроаминокислот. Показано, что в условиях гемисекции спинного мозга у крыс наблюдалось снижение концентрации свободных тиреоидных гормонов в сыворотке крови, вызванное патологией щитовидной железы. После изолированного воздействия сверхмалой дозы 10^{-9} М холиновых эфиров N-замещённых- α , β -дегидроаминокислот в сыворотке крови у крыс в условиях гемисекции спинного мозга наблюдалось повышение уровня свободных тиреоидных гормонов, с достижением такового у интактных животных.

*Тиреотропный гормон гипофиза – тироксин – трийодтиронин –
холиновые эфиры – гемисекция спинного мозга*

Տվյալ հետազոտության նպատակն է հիպոֆիզի թիրեոտրոպ հորմոնի և վահանագեղձի հորմոնների կոնցենտրացիայի փոփոխության հետազոտությունը առնետների արյան շիճուկում, ողնուղեղի կիսահատման պայմաններում՝ ցածր տրիյոդթիրոնինի սիմպտոմի առկա-յության դեպքում, N-տեղակալված- α , β -դեհիդրոամինաթթուների խլիխի եթերների 10^{-9} Մ գերցածր չափաբաժնի ազդեցությունից առաջ և հետո: Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ ողնուղեղի կիսահատման պայմաններում առնետների մոտ դիտվում է ազատ թիրեոիդային հորմոնների կոնցենտրացիայի իջեցում, որը պայմանավորված էր վահանագեղձի ախտաբանությամբ: N-տեղակալված- α , β -դեհիդրոամինաթթուների խլիխի եթերների 10^{-9} Մ գերցածր չափաբաժնի մեկուսացված ազդեցությունից հետո ողնուղեղի կիսահատման պայմաններում, առնետների արյան շիճուկում դիտվում է թիրեոիդային հորմոնների մակարդակի բարձրացում, հասնելով նրան ինտակտ կենդանիների մոտ արձանագրվող մակարդակին :

*Հիպոֆիզի թիրեոտրոպ հորմոն – թիրոքսին – տրիյոդթիրոնին –
խլիխի եթերներ – ողնուղեղի կիսահատում*

The purpose of the present research is investigation of concentration of thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones in blood serum of rats at hemisection of spinal cord in presence of low triiodothyronine syndrome, before and after isolated influence of ultra-low dose 10^{-9} M of choline ethers of N-substituted- α , β -dehydroaminoacids. Results of investigations have shown that in the conditions of spinal cord hemisection of in rats the concentration of free thyroid hormones in blood serum was decreased caused by a thyroid gland pathology. After the isolated influence of ultra-low dose of 10^{-9} M choline ethers of N-substituted- α , β -dehydroaminoacids in blood serum of rats with hemisection of spinal cord the level of free thyroid hormones was increased to the level observed at intact animals.

*Thyroid-stimulating hormone – thyroxin – triiodothyronine – choline ethers –
spinal cord hemisection*

Известно, что нейродегенеративные заболевания спинного мозга (СМ), в том числе и рассматриваемая в настоящем исследовании гемисекция (ГМС), относятся к важнейшим нерешённым проблемам современной медицины [2]. Системные проявления повреждений СМ связаны с прогрессирующим вовлечением в патологический процесс гормональной системы [15]. Исследование тиреоидной функции в течение первой недели со дня спинального повреждения позволило выявить изменение уровней тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3), которые укладываются в картину синдрома низкого трийодтиронина (СНТ). При этом не только значительно снижается концентрация общего и свободного Т3, но и уменьшается конверсия Т4 в Т3. СНТ является часто встречаемым и распространённым патологическим состоянием в современной эндокринологии, однако в его диагностике и терапии остаётся много вопросов, не имеющих однозначной трактовки. Поэтому у учёных разных стран не ослабевает интерес к изучению различных аспектов СНТ, обусловленного стойким дефицитом тиреоидных гормонов (ТГ) в организме [20]. ГМС характеризуется тем, что в месте повреждения СМ происходит образование глиальной мембраны и формирование соединительнотканного рубца, который служит основным препятствием для прохождения нервных импульсов. В нашем предыдущем исследовании [4] по воздействию гормональных и ферментных препаратов (протеолитических и муколитических) при спинальных патологиях разной степени интенсивности показана положительная роль терапевтических, малых и сверхмалых (СМД препаратов) трипсина, химотрипсина, лидазы, эласатазы, гиалуронидазы и других.

Одним из современных направлений фармацевтической химии является разработка методов синтеза и изучение свойств биологически активных веществ (БАВ) на основе ненасыщенных или α,β -дегидроаминокислот. Холиновые эфиры N-замещённых- α,β -дегидроаминокислот (ХЭА) имеют сравнительно небольшую историю. По структуре они напоминают ацетилхолин, в связи с чем вызывают в последние годы большой интерес с точки зрения их синтеза и биологической активности. В процессах синтеза ХЭА применяются основные положения, существующие в фармацевтической химии, согласно которым проводится выбор соответствующих защитных групп, способов синтеза эфира, удаление защиты и выделения конечного продукта [5, 6]. Согласно [1], эфирами и амидами холина натурального и синтетического происхождения осуществляется ряд важнейших функций в организме млекопитающих. В представленных исследованиях, исходя из химических и биологических особенностей ХЭА, проведено изучение изолированного воздействия СМД 10^{-9} М ХЭА у крыс в условиях левосторонней латеральной ГМС СМ на уровне Т9 с наличием СНТ. Внутримышечные инъекции ХЭА проводили в СМД 10^{-9} М в течение 14 послеоперационных дней во всех группах животных.

Материал и методика. В настоящем исследовании в Научно-технологическом центре органической и фармацевтической химии Национальной Академии наук Республики Армении осуществлён синтез 9 ХЭА. Более подробно с методом синтеза ХЭА можно ознакомиться в работе [14]. Были получены следующие химические соединения:

1. холиновый эфир N-(4-бромбензоил)-3,4-диоксиметилен- α,β -дегидрофенилаланина (ХЭД1);
2. холиновый эфир N-бензоил-O-метил- α,β -дегидротирозина (ХЭД2);
3. холиновый эфир N-(4-бромбензоил)-O-изопропил- α,β -дегидротирозина (ХЭД3);
4. холиновый эфир N-(4-бромбензоил)-4-хлор- α,β -дегидрофенилаланина (ХЭД4);
5. холиновый эфир N-(4-бромбензоил)-O-метил- α,β -дегидротирозина (ХЭД5);
6. холиновый эфир N-бензоил- α,β -дегидрофенилаланина (ХЭД6);
7. холиновый эфир N-(4-изобутоксibenзоил)-O-изопропил- α,β -дегидротирозина (ХЭД7);

8. холиновый эфир N-(2-метоксибензоил)-O-метил- α,β -дегидротирозина (ХЭД8);
9. холиновый эфир N-(2-метоксибензоил)-O-изопропил- α,β -дегидротирозина (ХЭД9).

Исследования проведены на 120 крысах-самцах линии Вистар, массой 180 – 220 г., разделённых на 4 подопытные группы:

1. интактные животные – 10 шт.;
2. контрольные животные с СНТ – 10 шт.;
3. контрольные животные с левосторонней латеральной ГМС СМ – 10 шт.;
4. животные с левосторонней латеральной ГМС СМ с СНТ, получавшие СМД 10-9 М ХЭА – 90 шт. (по 10 шт. на каждый эфир).

В проведенных сериях исследований использовалась хирургическая модель ГМС. Более подробно с методикой проведения ГМС можно ознакомиться в исследовании [8]. СНТ для группы контрольных животных был получен путём ежедневных внутримышечных инъекций дозы СМД 10^{-3} М препарата “Пропилтиоурацил”, полученной как и СМД 10^{-9} М, многостаканным методом Ганемана [3], подопытным крысам в течение 7 дней. В сыворотке крови с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА) определялась концентрация тиреотропного гормона гипофиза (ТТГ), свободных Т3 и Т4 посредством иммуноферментного анализатора “RISER 8793”. В проведенных сериях экспериментов принцип работы набора заключался в том, что определение уровня ТТГ (или ТГ) основано на использовании конкурентного варианта твердофазного ИФА [7]. Статистическая обработка результатов производилась с использованием параметрического однофакторного дисперсионного анализа (one-way Anova) и постдисперсионного анализа Холм-Сидака с помощью пакета программ “Sigma Plot 12. 0 for Windows” и “Microsoft Excel 2013”. В данных сериях исследований использовались графики гистограмм накопления. Гистограммы с накоплением данных используются для сравнения частей общего значения и применяются для отображения изменения сегмента общего значения с временем. Эксперименты проводились с соблюдением принципов “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1986) и постановления первого национального конгресса по биоэтике (Киев, 2001).

Результаты и обсуждение. В проведенных сериях исследований у крыс в условиях латеральной ГМС СМ было выявлено наличие СНТ, выражающееся в резком снижении референсных диапазонов концентрации (РДК) свободных Т3 и Т4 (рис. 1, группы 5, 6) в сыворотке крови по сравнению с их нормальными значениями (рис. 1, группы 2, 3).

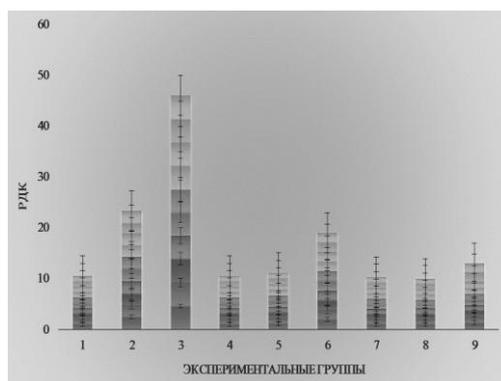


Рис. 1. РДК концентрации ТТГ (группа 1), свободного Т3 (группа 2) и свободного Т4 (группа 3) в сыворотке крови в норме, в условиях латеральной ГМС СМ (ТТГ (группа 4), свободный Т3 (группа 5), свободный Т4 (группа 6)) и у крыс с моделью СНТ без спинальных повреждений (ТТГ (группа 7), свободный Т3 (группа 8), свободный Т4 (группа 9)). Концентрация ТТГ выражена в мкМЕ/мл; свободного Т3 – в нг/мл; свободного Т4 – в мкг/мл. Число животных в каждой рассматриваемой группе ($n=10$). Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп $F=91.49, p < 0.001$.

Достоверность наличия СНТ в наших исследованиях подтверждена регистрацией аналогичных сдвигов РДК свободных ТГ в сыворотке крови у крыс без спинальных повреждений на экспериментальной модели СНТ (рис. 1, группы 8, 9). Что же касается показателей РДК сывороточного ТТГ, то они в проведенных сериях исследований оставались неизменными, что присуще СНТ (рис. 1, группы 1, 4, 7).

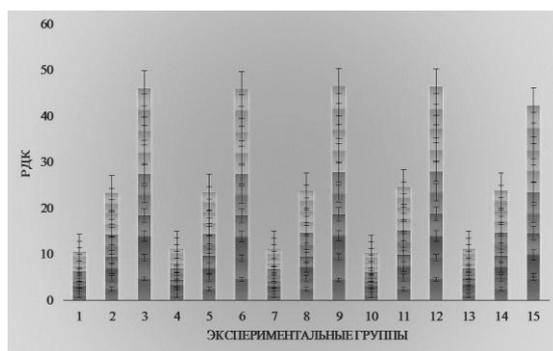


Рис. 2. Эффекты изолированного воздействия сверхмалой дозы 10^{-9} М ХЭД1 – ХЭД5 на изменение РДК концентрации ТТГ и свободных ТГ в сыворотке крови у крыс в условиях латеральной гемисекции спинного мозга с наличием синдрома низкого трийодтиронина. ТТГ – группы 1, 4, 7, 10, 13; свободный Т3 – группы 2, 5, 8, 11, 14; свободный Т4 – группы 3, 6, 9, 12, 15. Концентрация ТТГ выражена в мкМЕ/мл; свободного Т3 – в нг/мл; свободного Т4 – в мкг/мл. Число животных в каждой рассматриваемой группе ($n=10$). Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: $F=55.21$, $p < 0.001$.

Данная закономерность, установленная в наших исследованиях, полностью согласуется с результатами исследований ряда зарубежных авторов по аналогичной рассматриваемой проблеме [16, 17]. В следующей серии исследований, исходя из полученных в предыдущей серии результатов, нами изучалось изолированное воздействие СМД 10^{-9} М ХЭА в условиях ГМС СМ с наличием СНТ у крыс (рис. 2, 3). На рис. 2 приведены накопительные диаграммы изменения РДК свободного Т3 и свободного Т4 и их неизменность в отношении ТТГ в условиях острого спинального повреждения. Проведенные нами исследования иллюстрируют восстановительное воздействие ХЭД1 – ХЭД5 в отношении РДК свободных ТГ практически с достижением таковых у интактных животных (рис. 1, группы 2, 3). Как видно на рис. 2, систематические аппликации СМД 10^{-9} М ХЭД1 (рис. 2, группы 2, 3), ХЭД2 (рис. 2, группы 5, 6), ХЭД3 (рис. 2, группы 8, 9), ХЭД4 (рис. 2, группы 11, 12) и ХЭД5 (рис. 2, группы 14, 15) способствуют восстановлению до нормы нарушенных вследствие ГМС и СНТ показателей РДК свободных ТГ: Т3 и Т4.

Что же касается исследования РДК ТТГ в сыворотке крови у спинальных крыс (рис. 2, группы 1, 4, 7, 10, 13), то после воздействия СМД 10^{-9} М ХЭА, он оставался неизменным по сравнению с таковым у интактных животных (рис. 1, группа 1), у крыс с ГМС СМ (рис. 1, группа 4) и у крыс с моделью СНТ без наличия ГМС (рис. 1, группа 7).

На рис. 3 представлены результаты исследований по изучению закономерностей изменения РДК свободных ТГ в сыворотке крови у крыс с ГМС СМ с наличием СНТ после изолированного воздействия СМД 10^{-9} М ХЭД6 – ХЭД9. В этих исследованиях, аналогично предыдущим сериям, зарегистрировано протекторное действие ХЭА: ХЭД6 – ХЭД9 в отношении РДК свободных ТГ также с достоверным приближением к интактным значениям (рис. 1, группы 2, 3).

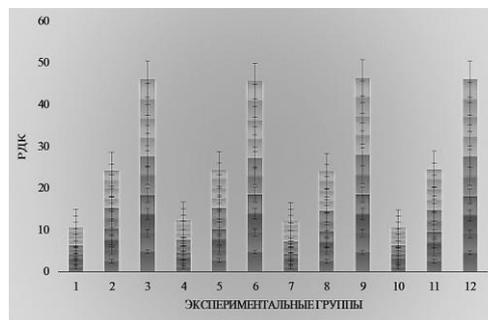


Рис. 3. Эффекты изолированного воздействия сверхмалой дозы 10^{-9} М ХЭД6 – ХЭД9 на изменение РДК концентрации ТТГ и свободных ТГ в сыворотке крови у крыс в условиях латеральной гемисекции спинного мозга с наличием синдрома низкого трийодтиронина. ТТГ – группы 1, 4, 7, 10; свободный Т3 – группы 2, 5, 8, 11; свободный Т4 – группы 3, 6, 9, 12. Концентрация ТТГ выражена в мкМЕ/мл; свободного Т3 – в нг/мл; свободного Т4 – в мкг/мл. Число животных в каждой рассматриваемой группе ($n=10$). Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп $F=77.38$, $p < 0.001$.

Как видно на рис. 3, систематические аппликации СМД 10^{-9} М ХЭД6 (рис. 3, группы 2, 3), ХЭД7 (рис. 3, группы 5, 6), ХЭД8 (рис. 3, группы 8, 9) и ХЭД9 (рис. 3, группы 11, 12) способствуют повышению нарушенных вследствие ГМС и СНТ показателей РДК свободных ТГ: Т3 и Т4. Что же касается исследования РДК ТТГ в сыворотке крови у спинальных крыс (рис. 3, группы 1, 4, 7, 10), то после воздействия СМД 10^{-9} М ХЭА он также, как и в предыдущем рассматриваемом случае, оставался неизменным по сравнению с таковым у интактных, спинальных крыс и у животных с СНТ без спинномозговых травм (рис. 1, группы 1, 4, 7).

Анализируя результаты проведенных серий исследований, можно сделать вывод о том, что изолированное применение в течение 14 дней СМД 10^{-9} М ХЭА в условиях острого спинального повреждения с наличием патологического состояния типа СНТ демонстрирует громадный потенциал биологической активности используемых химических соединений, относящихся к эфирам холина, который может быть использован для эффективного воздействия на биохимические и физиологические процессы и их регуляцию. Принимая во внимание, что нами в настоящих исследованиях установлен факт протекторного воздействия СМД 10^{-9} М ХЭА в отношении процессов регулирования РДК свободных ТГ в сыворотке крови у спинальных крыс с наличием СНТ, логично предположить, что и высокая фармакологическая активность использованных химических соединений, относящихся к ХЭА, содержащих материальные концентрации БАВ, будет обусловлена биологическими свойствами этих веществ. Согласно [18], тяжёлая травма позвоночника, осложнённая повреждением СМ в виде его компрессии, разможения, частичном или полном разрыве, остаётся одной из актуальных медико-социальных проблем, так как ведёт к глубокой инвалидности пострадавших. Высокая частота позвоночно-спинальной травмы сочетается со сложностью патогенеза травматической болезни СМ. Расстройства в деятельности ряда органов и систем, непосредственно не пострадавших при травме, создают новые многообразные патологические ситуации. В денервированных тканях повышается чувствительность к БАВ (ацетилхолину, адреналину и т. д.), возрастает возбудимость рецептивных полей, снижается порог мембранного потенциала, уменьшается содержание АТФ, гликогена, креатинфосфата [19]. В паретичных мышцах нарушается липидный и углеводный

обмен, что влияет на их механические свойства – растяжимость и сократимость, способствует регидности. Складываются связи, носящие разрушительный характер. Возникает угнетение и функциональное выпадение ряда систем, непосредственно в травме не пострадавших. Под действием непрерывного потока афферентной импульсации активные нервные структуры впадают в состояние парабриоза и становятся невосприимчивыми к специфическим импульсам. Параллельно формируется и другая динамическая линия – восстановительно-приспособительных функциональных изменений. В условиях глубокой патологии происходит оптимально возможная перестройка механизмов обеспечения адаптации к среде. Организм переходит на новый уровень гомеостаза. В этих условиях гиперреактивности и напряжения формируется травматическая болезнь СМ [12].

В настоящее время патогенез СНТ неизвестен, но существует мнение, что он может включать сниженную периферическую конверсию Т4 в Т3, сниженный клиренс реверсного Т3 и пониженную способность ТГ к соединению с тироксин-связывающим глобулином (ТСГ). Противовоспалительные цитокины (фактор некроза опухолей α , ИЛ-1) могут быть ответственны за некоторые изменения [13]. Существует диагностическая дилемма: имеет ли пациент гипотиреоз или СНТ? Наилучшим лабораторным тестом для разрешения дилеммы является уровень ТТГ, который в случае СНТ обычно находится в норме или умеренно повышен, но не так высоко, как это могло быть при гипотиреозе. В условиях спинальных повреждений, согласно [11], следует максимально точно производить диагностику СНТ с целью исключения гипотиреоза и установления стойкого наличия СНТ. Исходя из вышеотмеченного, подходящей может оказаться терапия СНТ при острых спинальных повреждениях посредством применения СМД БАВ. Такими, на наш взгляд, являются ХЭА.

Подводя итоги проведенных исследований по изучению изолированного воздействия СМД 10^{-9} М ХЭА на моделях ГМС СМ с наличием СНТ, можно сделать вывод о том, что в целом имеется положительный эффект воздействия всех 9 ХЭА в отношении изменения РДК сывороточных ТГ. Все препараты проявляют протекторный эффект в данном рассматриваемом случае, благодаря, вероятно, их химической структуре и молекулярным особенностям воздействия СМД эфиров холина. Полученные результаты исследования согласуются и с нашими предыдущими исследованиями [9, 10] относительно изменения РДК ТТГ и ТГ при спинальных и тиреоидных патологиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Авакян А. Э., Топузьян В. О., Хачатрян Т. С.* Ультрафиолетовое излучение и эфиры холина при манифестном гипотиреозе у крыс. Исследования в области естественных наук. Май 2014. № 5 [Электронный ресурс]. URL: <http://science.snauka.ru/2014/05/6772>.
2. *Каладзе Н. Н., Кадала Р. В.* Травматическая болезнь спинного мозга и остеопороз. Вестник физиотерапии и курортологии, 1, с. 81-84, 2005.
3. *Крылов А. А., Песонина С. П., Крылова Г. С.* Гомеопатия для врачей общей практики. Изд. "ПИТЕР", 398 с., 1997.
4. *Матинян Л. А., Хачатрян Т. С., Киприян Т. К., Арутюнян Э. Ю., Авакян А. Э.* Влияние трипсина, химотрипсина, лидазы на вызванную активность повреждённых травмой одиночных мотонейронов спинного мозга крыс. Вестник МАНЭБ, 13, 4, вып. 1., с. 117-120, 2008.
5. *Мнджоян О.Л., Топузьян В.О.* Методы синтеза и свойства β -диметиламиноэтиловых и холиновых эфиров аминокислот и пептидов. Успехи химии., 10, 12, с. 2198-2211, 1981.

6. *Топузьян В.О.* Синтез физиологически активных соединений на основе α,β -дегидроаминокислот и пептидов. Хим. журн. Армении, 60, 4, с. 731-748, 2007.
7. *Хачатрян Т.С.* Изменение концентрации тиреотропного гормона гипофиза и тиреоидных гормонов в крови у шестимесячных крыс при гипотиреозе. Биолог. журн. Армении, 65, 1, с. 89-92, 2013.
8. *Хачатрян Т.С.* Протекция тироксином изменений вызванной активности повреждённых травмой одиночных мотонейронов спинного мозга крыс. Биолог. журн. Армении, LX, с. 64-67, 2008.
9. *Хачатрян Т.С., Геворкян Г.А.* Роль галармина при манифестном гипотиреозе у крыс. Мед. наука Армении, LV, 3, с. 47-50, 2015.
10. *Хачатрян Т.С., Топузьян В.О., Геворкян Г.А.* Эффекты галармина и эфиров холина в изменении концентрации тиреотропного и тиреоидных гормонов в крови при гемисекции спинного мозга и разрушении супрахиазматического ядра гипоталамуса у крыс. Мед. наука Армении, LV, 1, с. 25-35, 2015.
11. *Широкова В.И., Голоденко В.И., Демин В.Ф.* Йодная недостаточность: диагностика и коррекция. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского, 6, с. 68-72, 2005.
12. *Шлапак И.П., Баран Ю.В., Лисянский М.С.* Спинальная травма: патофизиологические и клинические аспекты. Український медичний часопис, 5, с. 39-44, 2002.
13. *Genovese T., Esposito E., Mazzon E., Di Paola R., Caminiti R., Bramanti P., Cappellani A., Cuzzocrea S.* Absence of endogenous interleukin-10 enhances secondary inflammatory process after spinal cord compression injury in mice. J. Neurochem., 6, 108, pp. 1360-1372, 2009.
14. *Grigoryan H.A., Hambardzumyan A.A., Mkrtychyan M.V., Topuzyan V.O., Halebyan G.P., Asatryan R.S.* α,β -Dehydrophenylalanine choline esters, a new class of reversible inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. J. Chem. Biol. Interact., 1, 171, pp. 108-116, 2008.
15. *Tator C.H.* Acute management of spinal cord injury. Br. J. Surg., 77, 5, pp. 485-486, 1990.
16. *Tator C.H.* Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. J. Brain Pathol., 5, 4, pp. 407-413, 1995.
17. *Tator C.H., Duncan E.G., Edmonds V.E., Lapczak L.I., Andrews D.F.* Complications and costs of management of acute spinal cord injury. J. Paraplegia, 31, 11, pp. 700-714, 1993.
18. *Tator C.H., Rowed D.W.* Current concepts in the immediate management of acute spinal cord injuries. Can. Med. Assoc. J., 21, 11, pp. 1453-1464, 1979.
19. *Tator C.H., van der Jagt R.H., Malkin A.* The effect of acute spinal cord compression injury on thyroid function in the rat. J. Surg. Neurol., 18, 1, pp. 64-68, 1982.
20. *Wémeau J.L., Lefebvre J., Linquette M.* "Low triiodothyronine (T3) syndrome": "thyroxine (T4) euthyroidism" evidence (author's transl). J. Nouv. Presse Med., 8, 6, pp. 415-419, 1979.

Поступила 12.11.2015