

*Гусева М. В., Каменский А. А., Голиченков В. А.*

## **ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ХОЛИНА НА СОСТОЯНИЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА РАСТУЩИХ КРЫС**

*Кафедра физиологии человека и животных (заведующий — проф. А. А. Каменский)  
биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, e-mail: gusvbr@mail.ru*

---

Актуальность исследования обусловлена необходимостью создания новых безопасных и эффективных медицинских препаратов для коррекции и лечения различной неврологической патологии. В настоящее время для вышеуказанной цели широко используется холин [1, 4, 9]. Однако клинические результаты его применения неоднозначны, а механизмы действия изучены недостаточно.

Цель работы — изучение экспрессии  $\alpha 7$  никотиновых рецепторов ( $\alpha 7$  nAChRs) в различных участках головного мозга и состояния когнитивных функций при изменении содержания холина в пищевом рационе крыс на ранних стадиях постнатального онтогенеза.

**Материал и методы.** Эксперименты проводились на самцах крыс породы Спрэг-Дуули, находящихся на ранних этапах постнатального онтогенеза. К началу эксперимента их возраст — 1 месяц, а к концу — 2 месяца, что соответствовало наступлению полового созревания. В экспериментах при кормлении животных использовались три диеты, которые отличались только содержанием холина. Так, стандартная диета соответствовала обычному пищевому рациону и содержала 0,2 % холина; холин-дефицитная не содержала холина (0 % холина); холин-избыточная содержала 2 % холина. Крысы находились на вышеуказанных диетах 14 или 28 суток (по 5–6 животных в каждой группе). В одну клетку помещали по 2 крысы. Они имели свободный доступ к еде и воде.

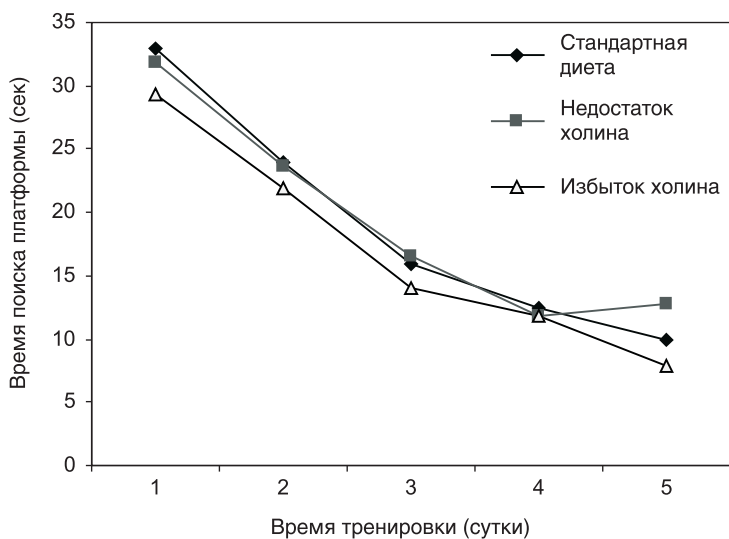


Рис. 1. Водный лабиринт Морриса — обучающая фаза (14 суток содержания животных на соответствующих диетах)

*Когнитивные функции.* При изучении состояния когнитивных функций мозга проводилась специальная тренировка крыс (фаза обучения) и последующая оценка сохранения в памяти результатов обучения (поисковая стратегия) с использованием стандартного водного лабиринта Морриса и разработанной им методики [8]. При тренировке животные плавали до тех пор, пока они не находили платформу, которая располагалась в определенном участке бассейна — в так называемом целевом квадранте. Всего проведено 20 обучающих испытаний (по 4 испытания в день, разделенных пятиминутным интервалом) в течение 5 дней. При этом измерялось время поиска платформы, которое являлось показателем эффективности обучения. Для оценки сохранения результатов обучения в памяти (поисковой стратегии) использовали специальные показатели: количество входов в целевой квадрант; время, проведенное в целевом квадранте; дистанция, пройденная в нем.

*Автордиографический анализ* использовался для изучения топографии  $\alpha 7$  nAChRs в коре головного мозга, в определенных участках среднего и промежуточного мозга, и также в гиппокампе, поскольку именно эти регионы имеют существенное значение для обеспечения когнитивных функций. Методом количественной автордиографии оценивали степень экспрессии рецепторов. Для этого по окончании теста Морриса животных выводили из опыта путем декапитации, после чего изымался головной мозг и помещался в изопентан, охлаждаемый на сухом льду. Затем в криостате Leica CM1850 изготавливали серийные срезы толщиной 16 микрон и переносили их на стекла, покрытые хромсульфатом калия, желатином и поли-L-лизинном. Кроме того, оценивалась степень экспрессии не  $\alpha 7$  nAChRs и их локализация в мозге. Для визуализации  $\alpha 7$  nAChRs использовался [125 I]- $\alpha$ -бунгаротоксин, для не  $\alpha 7$  nAChRs — [125 I]-эпibatидин. Выявление

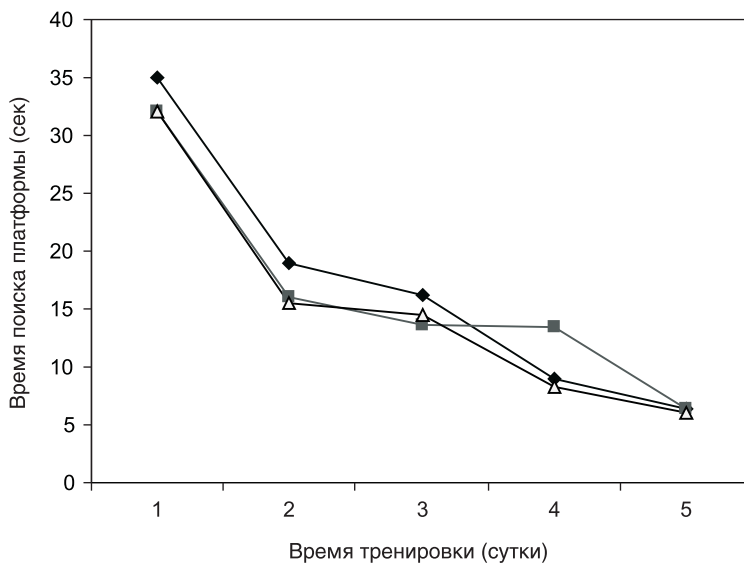


Рис. 2. Водный лабиринт Морриса — обучающая фаза (28 суток содержания животных на соответствующих диетах)

и оценка плотности не  $\alpha 7$  nAChRs служила дополнительным контролем селективного действия холина именно на  $\alpha 7$  nAChRs.

Полученные количественные данные проанализированы с использованием метода дисперсионного анализа ANOVA.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Известно, что холин участвует в обеспечении многочисленных физиологических функций нервной системы. В частности, он является исходным материалом для синтеза ацетилхолина, входит в состав фосфолипидов клеточных мембран и многих сигнальных молекул [3, 11]. Имеются данные о том, что холин, возможно, является селективным агонистом  $\alpha 7$  nAChRs. Некоторое количество холина синтезируется в организме, однако этого недостаточно для нормальной жизнедеятельности и большая часть этого вещества должна поступать с пищей.

В результате исследования установлено, что используемые модификации диет по содержанию холина (стандартная, холин-дефицитная и холин-избыточная) в конкретных условиях эксперимента не повлияли на когнитивные функции животных. Об этом свидетельствуют результаты, полученные с использованием водного лабиринта Морриса, которые показали, что при использовании указанных диет в течение 14 (рис. 1) или 28 (рис. 2) суток не изменяется способность крыс к пространственному обучению и закреплению в памяти полученных результатов ни по одному из изученных параметров.

При исследовании влияния холина на плотность  $\alpha 7$  nAChRs обнаружено существенное повышение этого показателя в коре, гиппокампе и некоторых других регионах мозга через 14 суток при использовании холин-избыточной диеты по сравнению со стандартной и холин-дефицитной диетами и последующее снижение к концу эксперимента (табл.).

Таблица

ПЛОТНОСТЬ  $\alpha 7$  nAChRS ЧЕРЕЗ 14 СУТОК СОДЕРЖАНИЯ ЖИВОТНЫХ НА  
СООТВЕТСТВУЮЩИХ ДИЕТАХ

\* — достоверное различие холин-избыточной диеты с холин-дефицитной диетой;  
# — достоверное различие холин-избыточной диеты со стандартной диетой ( $P < 0.05$ )

Участок мозга	Диета		
	Стандартный холин	Недостаток холина	Избыток холина
Корковые слои 1—4	0,90 ± 0,06	0,84 ± 0,1	1,29 ± 0,11 *#
Корковые слои 5—6	1,63 ± 0,12	1,54 ± 0,09	2,63 ± 0,33 *#
Внутригрушевидное ядро	3,30 ± 0,3	2,95 ± 0,18	4,87 ± 0,54 *#
CA1 (поле 1 собственно гиппокампа)	2,35 ± 0,03	2,31 ± 0,05	2,50 ± 0,03
CA2 (поле 2 собственно гиппокампа)	2,55 ± 0,03	2,72 ± 0,17	2,88 ± 0,05
Ворота зубчатой извилины	3,32 ± 0,11	3,26 ± 0,11	4,00 ± 0,11 *#
Зубчатая извилина	2,56 ± 0,04	2,51 ± 0,05	2,77 ± 0,03
Верхний холмик	3,81 ± 0,08	3,7 ± 0,07	4,38 ± 0,11 *#
Нижний холмик	4,24 ± 0,15	4,34 ± 0,37	4,60 ± 0,14
Краевой слой	2,67 ± 0,04	2,63 ± 0,07	2,82 ± 0,05
Вентральное ядро латерального коленчатого тела	3,58 ± 0,1	3,50 ± 0,08	4,06 ± 0,15
Задний гипоталамус	3,79 ± 0,1	3,64 ± 0,37	4,06 ± 0,09
Субталамическое ядро	4,47 ± 0,12	4,10 ± 0,2	4,80 ± 0,17
Заднее ядро покрышки	7,08 ± 0,32	7,12 ± 0,1	7,36 ± 0,09

Через 28 суток различия в степени экспрессии  $\alpha 7$  nAChRs при использовании различных диет не выявлялись.

В ходе эксперимента также установлено, что через 28 суток после использования холин-дефицитной диеты не изменяется плотность  $\alpha 7$  nAChRs по сравнению со стандартной. Это можно объяснить восполнением содержания холина в мозге из эндогенных источников, например, из фосфатидилхолина. Так, Клейн и др. [5] показали, что недостаточность пищевого холина не приводит к снижению его содержания в мозге, несмотря на снижение его уровня в плазме.

Повышение плотности  $\alpha 7$  nAChRs после 14 суток нахождения крыс на диете с повышенным содержанием холина и отсутствие этого повышения через 28 суток может быть обусловлено состоянием переносчиков холина через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) крыс на ранних этапах постнатального онтогенеза.

Сопоставление полученных результатов с имеющимися в литературе данными свидетельствует о том, что эффект действия холина на мозг зависит от многих

обстоятельств: способов и доз введения холина в организм и особенностей его метаболизма [7], возраста животного или человека [2, 6], проницаемости ГЭБ [2, 5].

Повышение экспрессии  $\alpha 7$  nAChRs через 14 суток после получения избыточного содержания холина с пищей свидетельствует о его избирательном действии на указанные рецепторы и о том, что холин является агонистом  $\alpha 7$  nAChRs даже в очень низких дозах.

Понижение плотности  $\alpha 7$  nAChRs через 28 суток на фоне холин-избыточной диеты может быть следствием повышенного распада холина в организме при длительном употреблении его с пищей. Известно, что с возрастом повышается интенсивность окисления холина, что приводит к снижению его содержания в крови [10]. Кроме того, понижение плотности  $\alpha 7$  nAChRs в указанный срок могло произойти по причине понижения чувствительности рецепторов к холину.

Полученные в работе результаты подтверждают представления о том, что холин является прямым селективным агонистом  $\alpha 7$  nAChRs, а также существенно дополняют эти представления сведениями о локализации последних в головном мозге.

Полученные результаты имеют значение для последующих исследований, в частности, для сравнительного анализа и оценки состояния головного мозга при патологии, а также при оценке эффективности лечения с использованием холина в экспериментальных условиях.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Глиатилин в комплексном лечении травм и заболеваний головного мозга. Методические рекомендации / Под ред. проф. А. Ю. Савченко. Омск, 1999.
2. Allen D. D., Smith Q. R. Blood-brain barrier choline transport in the senescent rat // *Neurosci. Lett.* 1999. V. 277. P. 198–202.
3. Blusztajn J. K. Choline, a vital amine // *Science.* 1998. V. 281. P. 794–795.
4. Guan Z.-Z., Zhang X., Ravid R., Nordberg A. Decreased protein levels of nicotinic receptor subunits in the hippocampus and temporal cortex of patients with Alzheimer's disease // *J. Neurochem.* 2000. V. 74. P. 237–243.
5. Klein J., Koppen A., Loffelholz K. Regulation of free choline in rat brain: dietary and pharmacological manipulations // *Neurochem. Int.* 1998. V. 32. P. 479–485.
6. Mooradian A. D. Blood-brain barrier transport of choline is reduced in the aged rat // *Brain Res.* 1988. V. 440. P. 328–332.
7. Morley B. J., Fleck D. L. A time course and dose-response study of the regulation of brain nicotinic receptors by dietary choline // *Brain Res.* 1987. V. 421. P. 21–29.
8. Morris R. G. M. Spatial Localization Does Not Require the Presence of Local Cues // *Learning and Motivation.* 1981. V. 12(2). P. 239–260.
9. Rinne J. O., Myllykyla T., Lonngberg P., Marjamaki P. A postmortem study of brain nicotinic receptors in Parkinson's and Alzheimer's disease // *Brain Res.* 1991. V. 547. P. 167–170.
10. Zeisel S. H. Nutritional importance of choline for brain development // *J. Am. Coll. Nutr.* 2004. V. 23. P. 621–626.
11. Zeisel S. H., Niculescu M. D. Perinatal choline influences brain structure and function // *Nutr. Rev.* 2006. V. 64. P. 197–203.