

УДК 577,112,5;612,8;615,919;616,858
DOI:10.54503/0514-7484-2022-62.4-60

**Синаптические проявления активности в большом ядре
шва мозга при активации околоводопроводного серого
вещества мозга на модели болезни Паркинсона в условиях
протекции синэстролом**

Л.Ж. Тадевосян

*Институт физиологии им. Л.А.Орбели НАН РА
0028, Ереван, ул. Бр.Орбели, 22*

*Ключевые слова: Nucleus raphe magnus, Periaqueductal gray matter, ротеноновая
модель болезни Паркинсона, синэстрол*

Несмотря на интенсивные исследования, боль, сопровождающая большинство нейродегенеративных болезней (НБ), остается мало изученной [6]. Она, в значительной степени, представлена в болезни Паркинсона (БП), амиотрофическом латеральном склерозе и хронической наследственной полинейропатии [6]. К тому же, в противоположность моторным симптомам, боль одна из немоторных симптомов БП, нередко неадекватно леченная. Более того, не установлена сложная патофизиология ноцицептивных механизмов при БП с изменениями в вовлекаемых структурах мозга. Необходимы дальнейшие изучения механизмов формирования боли для улучшения управления ею у пациентов с БП [15].

Ноцицептивная информация не передается непосредственно от спинного мозга к высшим центрам [5], так как модулируется нисходящими путями, вовлекающими различные ядра ствола мозга. Показано, что ростромедиальный продолговатый мозг, состоящий из *Nucleus raphe magnus* (RMG) и гигантоклеточного ретикулярного ядра, вовлекается во 2-м периоде БП и роль этого поля важна в нисходящей регуляции антиноцицептивных путей [8]. БП может поразить болевой процесс на множественных уровнях, от периферических структур к высшим центрам до их восприятия и ответной реакции [15]. Некоторые из этих структур поражаются рано при БП, в частности RMG [13]. Среди играющих важную роль в нисходящей регуляции антиноцицептивных путей, торможением ноцицептивных стимулов, следует отметить голубое пятно, RMG, околоводопроводное серое вещество (*Periaqueductal gray matter* – PAG). Вместе с *Locus coeruleus* (LC) RMG вовлекается в аффективное и когнитивно-оценочное измерение боли, болевую память и автономные ответы [15]. Нарушение в этой больтормозящей области может вызвать повы-

шение ощущения боли [16]. К тому же, RMG, будучи важным участком эндогенной болевой тормозной системы, воспринимает проекции от PAG [9].

В настоящем исследовании предпринято изучение соотношения возбудительных и депрессорных ответов одиночных нейронов RMG при стимуляции PAG, структур, управляющих болевым процессом, с целью оценки механизмов их поражения на модели БП, индуцированной односторонним введением ротенона, и успешности протекции синэстролом, в сравнении с нормой.

Материал и методы

Проведены электрофизиологические исследования на 14 крысах линии Альбино (250 г): интактных ($n=3$), на ротеноновой модели БП, индуцированных унилатеральным введением ротенона и выдержанных до опыта 4 нед. ($n=4$) и в условиях протекции синэстролом (по 14 инъекций через день в дозах 1 мг/1 мл) ($n=7$). Введение ротенона осуществляли в условиях нембуталового наркоза (40 мг/кг, в/б) из расчета 12 мкг в 0,5 мкл димексида (со скоростью 1 мкл/мин) в «*medial forebrain bundle*» по координатам стереотаксического атласа [14] ($AP+0,2$; $L\pm 1,8$; $DV+8$ мм). Исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями руководства ARRIVE [11]. В стереотаксическом аппарате производили трепанацию черепа от брегмы до лямбды и вскрывали твердую мозговую оболочку. Стеклообразные микроэлектроды с диаметром кончика 1-2 мкм, заполненные 2М NaCl, вводили в RMG, согласно стереотаксическим координатам ($AP-11,6$; $L\pm 2,0$; $DV+10,3$ мм) для экстраклеточной регистрации спайковой активности одиночных нейронов. Осуществляли высокочастотную стимуляцию (ВЧС) посредством прямоугольных толчков тока длительностью 0,05 мс, амплитудой 0,12–0,18 мВ, силой тока 0,32 мА и частотой 100 Гц в течение 1 сек, PAG согласно стереотаксическим координатам ($AP-4,92$; $L\pm 2,0$; $DV+5,7$ мм) (рис. 1). Операции осуществляли на наркотизированных животных (уретан 1,2 г/кг, в/б), зафиксированных в стереотаксическом аппарате. Активность проявлялась в виде тетанической депрессии (ТД) и потенциации (ТП), сопровождаемых посттетанической депрессией (ПТД) и потенциацией (ПТП). Проводили анализ одиночной спайковой активности 393 нейронов RMG. Постстимульные проявления активности оценивали online регистрацией и программным математическим анализом, позволяющим селекцию спайков амплитудной дискриминацией, с выводом «растеров» перистимульного спайкинга нейронов, построением гистограмм суммы и диаграмм усредненной частоты спайков. Производили далее многоуровневую статистическую обработку для пре- и постстимульного отрезков времени. Для избираемых сравниваемых групп спайкинга строили суммированные и

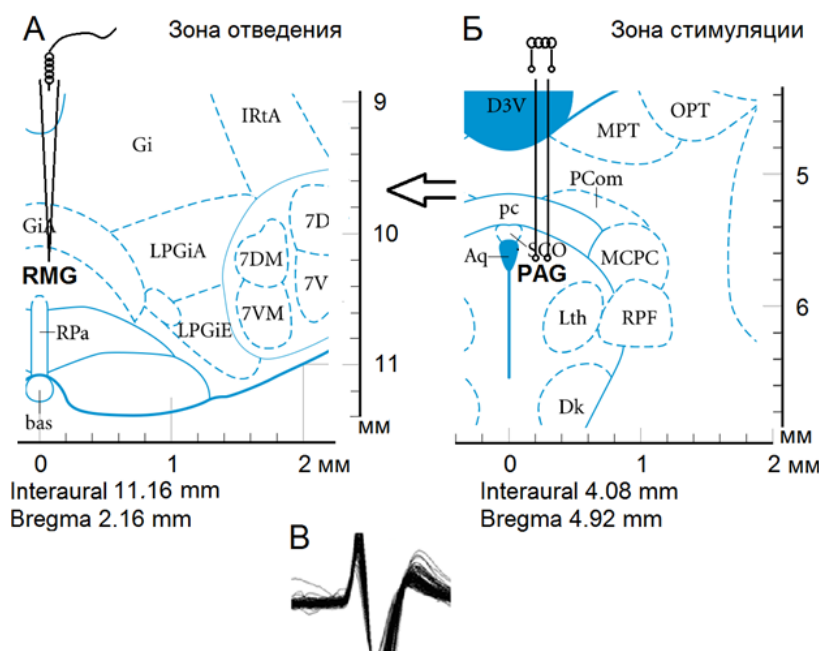


Рис. 1. Схема эксперимента по раздражению PAG и отведению из RMG. Стереотаксическое изображение пункта регистрации нейронной активности – А, зоны стимуляции – Б и характерного потенциала действия – В

усредненные перистимульные (PETH Average) гистограммы и гистограммы частоты (Frequency Average). Анализ полученных данных производили по специально разработанному алгоритму, обеспечивающему достоверность перистимульных изменений межспайковых интервалов. Однородность двух независимых выборок контролировалась t-критерием Стьюдента. С целью повышения статистической достоверности перистимульных изменений межспайковых интервалов использовали также двухвыборочный критерий Вилкоксона-Манна-Уитни (Wilcoxon-Mann-Whitney test), в качестве непараметрического, оценивающего однородность независимых двух выборок [1]. Использовалась также разновидность указанного теста – z-тест, определяющий его асимптотическую нормальность. Учет критических значений в сравнении с таковыми нормального распределения при уровнях значимости 0,05; 0,01 и 0,001 показывает, что в большинстве случаев спайкинга при ВЧС статистически значимое изменение достигало, как минимум, уровня 0,05.

Результаты и обсуждение

Производили экстраклеточную регистрацию спайковой активности одиночных нейронов RMG в норме (122 нейрона, $n=3$), на модели БП (149

нейронов, $n=4$) и с протекцией синэстролом (122 нейрона, $n=7$). Посредством анализа на основе усредненного количества спайков (PETN), с пересчетом в межимпульсные интервалы и частоты в Гц (Frequency Average), были обнаружены следующие изменения нейрональной активности.

В нейронах RMG в ответ на ВЧС PAG тетаническая депрессия в обеих последовательностях в норме определялась порядка 1,66- и 2,0-кратного занижения престимульной активности соответственно (рис. 2 А, группы А, Б). ТП, сопровождаемая ПТП и ПТД, выявлялась в пределах 1,10- и 1,14- кратного превышения престимульной активности (рис. 2 Б, группы А, Б). В нейронах RMG при ВЧС PAG ТД на модели БП определялась в пределах 1,8- и 2,0-кратного занижения престимульной активности в обеих последовательностях соответственно (рис. 2 В, группы А, Б), а ТП исчислялась порядка 3,33- и 2,66-кратного превышения престимульной активности в обеих последовательностях (рис. 2 Г, группы А, Б). Что же касается депрессорных постстимульных проявлений активности нейронов RMG, то при наличии почти одинаковых значений, в сравнении с нормой, количество нейронов на ротеноновой модели многократно уменьшилось. Очевидна эксайтотоксичность, содействующая по-

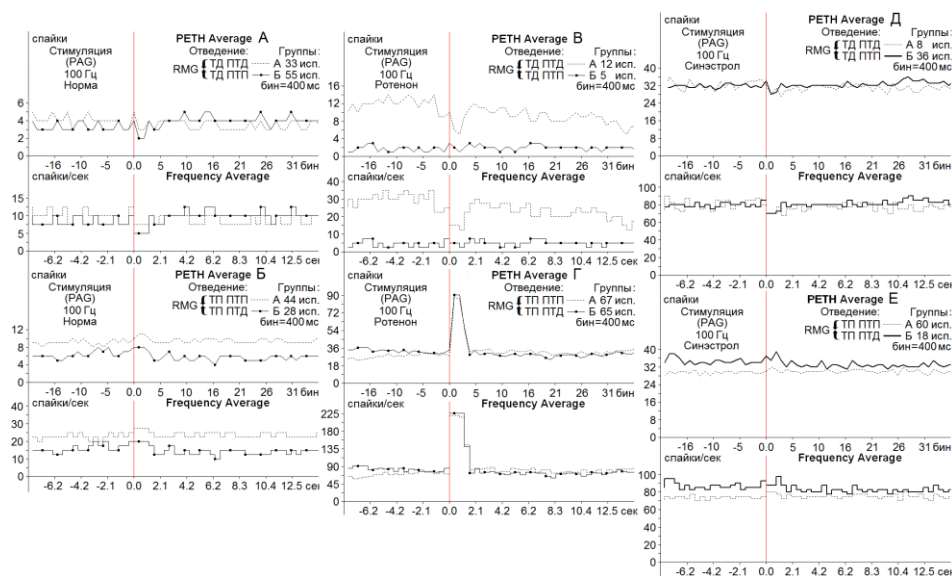


Рис. 2. Усредненные перистимульные (PETN Average) гистограммы и гистограммы частоты (Frequency Average) депрессорных, депрессорно-возбудительных (А, В, Д, группы А, Б) и возбудительных, возбудительно-депрессорных (Б, Г, Е, группы А, Б) постстимульных проявлений активности нейронов RMG при ВЧС PAG (100 Гц, 1 сек) в норме (А, Б), на модели БП (В, Г) и с протекцией синэстролом (Д, Е). Для групп указано количество испытаний (исп.)

вышению постстимульной активности в обеих последовательностях. Таким образом, выявлено нейродегенеративное поражение RMG. Наконец, в нейронах RMG при ВЧС PAG, в условиях воздействия синэстрола, ТД в обеих постстимульных депрессорных последовательностях достигала соответственно 1,14- и 1,21-кратного снижения престимульной активности (рис. 2 Д, группы А, Б), а ТП в обеих возбуждательных последовательностях определялась в пределах 1,06- и 1,05-кратного превышения престимульной активности, при отсутствии таковой возбуждательно-депрессорной (рис. 2 Е, группы А, Б). Следует отметить достаточно высокую частоту активации на модели БП и ее значительное снижение под воздействием синэстрола, что свидетельствует об эксайтотоксичности, неизбежно сопровождающей нейродегенеративную патологию, и успешном противодействии ей используемой протекции. В свою очередь, высокая частота активации сопровождается относительно небольшими значениями постстимульной активации, что связано с ухудшением синаптической активности. Поэтому окончательное заключение будет сделано позже.

При оценке относительной степени выраженности вышеотмеченных депрессорных и возбуждательных эффектов, на примере диаграмм, выведенных на основе растров пре- и постстимульных депрессорных и депрессорно-возбуждательных разнонаправленных проявлений спайковой активности нейронов в норме, на модели БП и в условиях протекции, с указанием средних цифровых значений в реальном времени 20 сек до и после стимуляции, включая время ВЧС, получены значения, представленные в виде дисковых диаграмм для наглядного представления степени выраженности, в том числе и в частотном отображении (в %) на рис. 4 (на основе рис. 3), которые привели к следующему выводу. Значения тетанической депрессии в депрессорной и депрессорно-возбуждательной последовательностях и уровни тетанической потенциации в возбуждательной и возбуждательно-депрессорной последовательностях нейронов RMG при ВЧС PAG в норме достигали 1,51- и 1,40-кратного снижения, 1,30- и 1,28-кратного превышения (рис. 3 А-Г; 4 А-Г) в сравнении с престимульным уровнем активности соответственно. Как видно, указанные значения отличались незначительно, что свидетельствует о фактическом балансе депрессорных и возбуждательных постстимульных проявлений активности исследуемых нейронов в норме. Значения тетанической депрессии в обеих депрессорных последовательностях и уровни тетанической потенциации в таковых возбуждательных нейронах RMG на ВЧС PAG, в сравнении с престимульным уровнем активности на модели БП, отличались достаточно (2,00- против 3,12- и 1,31- против 2,54-кратного) (рис. 4 Д-З; 4, А-Г), что свидетельствует о превалировании возбуждательных постстимульных проявлений активности над депрессорными (порядка 1,56- и 2,0-кратного), это является результатом выраженной эксайтотоксичности. Наконец, в нейронах RMG на ВЧС PAG значения тетанической депрессии в депрес-

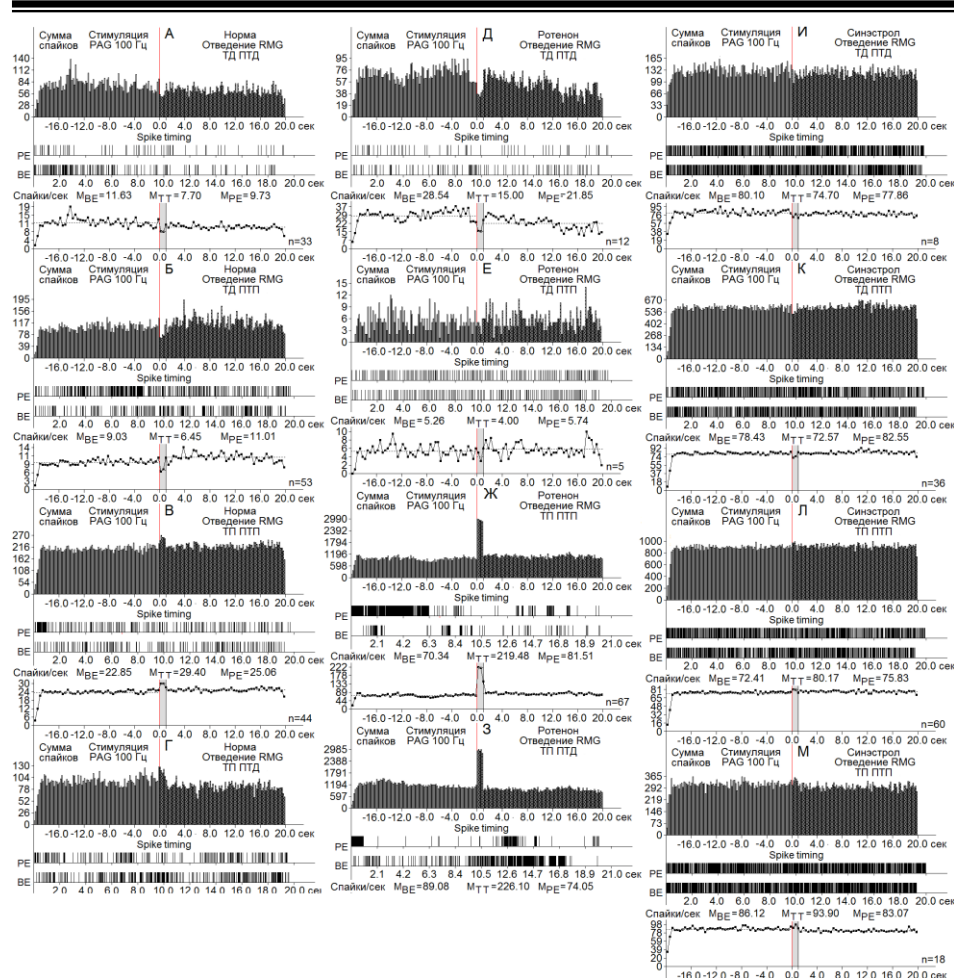


Рис. 3. А-Г – гистограммы суммы спайков пре- и постстимульных тетанических депрессорных проявлений активности ТД ПТД (А, Д, И), в сочетании с посттетаническими возбудительными – ТД ПТП (Б, Е, К), возбудительными – ТП ПТП (В, Ж, Л), сопровождаемых депрессорными (Г, З, М), нейронов RMG, вызванных ВЧС PAG в норме (А-Г), на модели БП (Д-З) и с протекцией синэстролом (И-М) в реальном времени 20 сек (до и после стимуляции). Растеры активности на А-Г – детальный анализ произвольно избранных одиночных нейронов из данной группы. Диаграммы частоты спайков, представленных в гистограммах, с усредненными значениями (М) для временных отрезков до (BE – before event), на время тетанизации (ТТ – time tetanization) и после стимуляции (РЕ – post event). Справа от диаграмм – количество испытаний (n)

сорной и депрессорно-возбудительной последовательностях и уровни тетанической потенциации в возбудительной и возбудительно-депрессорной последовательностях, в сравнении с престимульным уровнем активности на модели БП в условиях протекции синэстролом, исчислялись в пределах 1,07- и 1,10-кратного снижения и 1,10- и 1,10-кратного превышения престимульной активности (рис. 3 И-М; 4 А-Г). Иными словами, в усло-

виях протекции в депрессорной последовательности имело место снижение ТД (1,07- и 1,10- против 2,00- и 1,31-кратного на модели БП, т.е. 1,87- и 1,20-кратно и против 1,51- и 1,40-кратного в норме, т.е. 1,41 и 1,27-кратно), уменьшение ТП в возбудительной и в возбудительно-депрессорной последовательностях (1,10- и 1,10-кратного на модели БП с протекцией против 3,12- и 2,54-кратного на модели БП без протекции, т.е. 2,83- и 2,31-кратно) и с реальным приближением к норме (1,10- и 1,10-кратного против 1,30- и 1,28-кратного) (рис. 3 А-М; 4 А-Г).

Интересная картина была выявлена при анализе пре- и постстимульной частоты активности нейронов RMG на ВЧС РАГ в указанных экспериментальных условиях. Престимульная частота активности, предшествующая депрессорным эффектам в норме и на модели БП достигала кратных значений 11,63; 9,03 и 28,54; 5,26 соответственно, а предшествуемая возбудительными последовательностями в норме и патологии 22,85; 16,83 и 70,34; 89,08 соответственно (рис. 3 А-3; 4 Д-3). Престимульная частота активности в нейронах RMG, сопровождаемая депрессорными и возбудительными последовательностями в условиях протекции, исчислялись в пределах 80,10; 78,43; 72,41 и 86,12 соответственно, по сравнению с 11,63; 9,03; 22,85; 16,83 в норме и 28,54; 5,26; 70,34; 89,08 в патологии без протекции (рис. 3 А-М; 4 Д-3). Иными словами, в патологии с протекцией престимульная частота активности, предшествуемая депрессорными постстимульными эффектами, повысилась (2,80- и 15,01-кратно соответственно), отдалившись от нормы в депрессорной последовательности 80,10 против 11,63 и 78,43 против 9,03) (рис. 3; 4, Д, Е). Престимульная частота, предшествуемая возбудительными эффектами, в условиях протекции, фактически не претерпела изменений в сравнении с патологией без протекции в обоих случаях (72,41 и 86,12 против 70,34 и 89,08, также отдалившись от нормы (72,41 и 86,12 против 22,85 и 16,83) (рис. 3; 4, Ж, З).

Что же касается постстимульной частоты активности нейронов RMG, то в норме, будучи сопровождаемой депрессорными и возбудительными постстимульными эффектами, она достигала 7,70; 6,45; 29,40 и 21,52, а на модели БП – 15,00; 4,00; 219,48 и 226,10 (рис. 3; 4, И-М). Иными словами, постстимульная частота активности на модели БП, сопровождаемая депрессорными реакциями, превысила норму 2,05-кратно и снизилась 1,61-кратно, и намного превысилась порядка 7,46- и 10,50-кратно, сопровождаемая возбудительными эффектами. Таким образом, имело место мощное повышение частоты постстимульной активности, свидетельствующее опять-таки, как и в случае престимульной частоты, о громадной эксайтотоксичности. Наконец, в условиях протекции произошло резкое отдаление депрессорной постстимульной активности от нормы (74,70 против 7,70 и 72,57 против 6,45) и резкое снижение постстимульной частоты на модели БП, сопровождаемой возбудительными

эффектами (80,17 против 219,48 и 94,00 против 226,10, т.е. 2,74- и 2,40-кратно), с тенденцией приближения к норме, что уже свидетельствует об успешном протекторном эффекте синэстрола (рис. 3; 4, И-М).

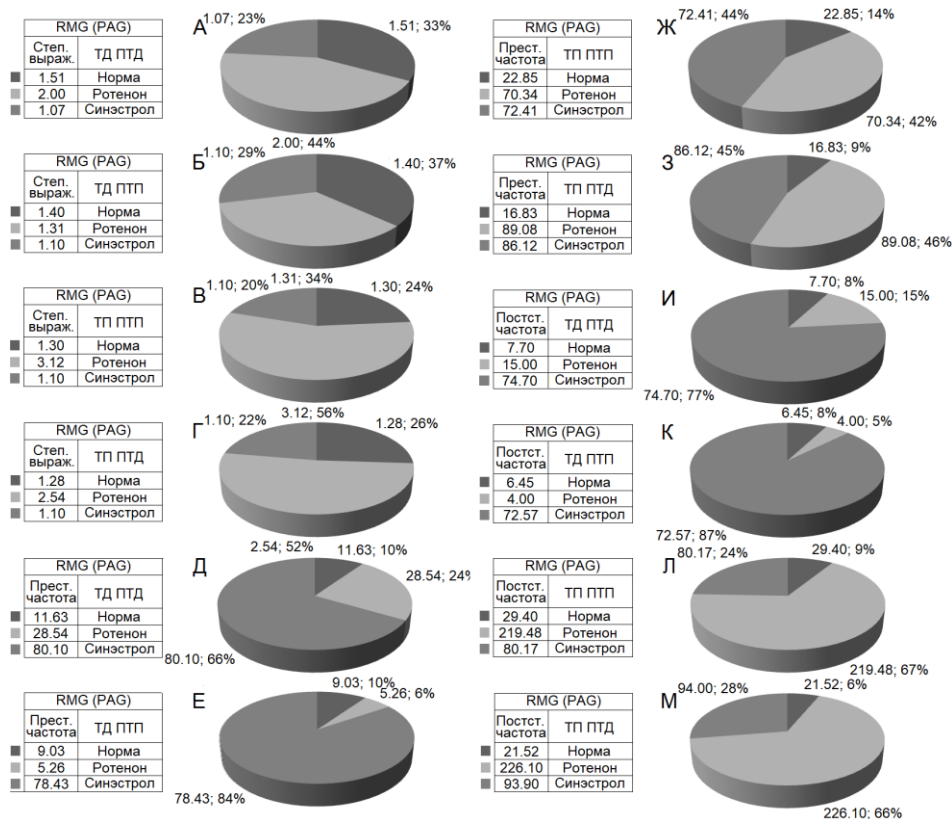


Рис. 4. А-М – процентное соотношение степени выраженности (по усредненной частоте) (А-Г) депрессорных (ТД ПТД), депрессорно-возбудительных (ТД ПТП), возбудительных (ТП ПТП) и возбuditельно-депрессорных (ТП ПТД) постстимульных эффектов в одиночных нейронах RMG при ВЧС PAG, а также частоты престимульной (Д-З) и постстимульной (И-М) активности, в норме, на ротеноновой модели БП и в условиях протекции синэстролом. Обозначения: степ. выраж. – степень выраженности, прест. – престимульная, постст. – постстимульная

Тем не менее, отсутствие привычной картины протекции синэстролом на всех уровнях вышеотмеченного анализа, представило интерес, при сравнении с аналогичными экспериментами в условиях обратной проекции, при отведении из нейронов PAG и стимуляции RMG [3]. Следует лишь полагать, в качестве предварительного объяснения, относительно большую успешность протекции из-за меньшей выраженности

нейродегенерации в последней проекции. Это, в свою очередь, свидетельствует об избирательной протекции в реципрокной проекции. Однако указанный факт нуждается в дальнейшем исследовании.

В заключение, эксайтотоксичность содействует нейродегенерации при многих острых болезнях ЦНС, включающих ишемию, травму, эпилепсию и хронические НБ: множественный склероз, БА, амиотрофический латеральный склероз, фибромиалгии, болезни Паркинсона и Гантингтона [4]. Эксайтотоксичность при НБ является результатом сверхактивации глутаматных NMDA и AMPA (2-amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl) propionate) рецепторов, содействующей серьезному повреждению нейронов [12]. Чрезмерная активация глутаматных рецепторов посредством возбуждающих аминокислот ведет к нарушению кальциевой буферизации [10], генерации свободных радикалов, активации митохондриальной переходной проницаемости и клеточной гибели. Понимание путей, вовлекаемых в эксайтотоксичность, является критическим для будущего клинического лечения многих НБ [7]. С целью их предотвращения необходимо восстановление и углубление депрессорных эффектов протекторного назначения и снижение чрезмерных возбудительных [2].

Поступила 08.07.22

**Պարկինսոնի հիվանդության մոդելում սինեստրոլի
պաշտպանիչ ազդեցությամբ գլխուղեղի կարի մեծ կորիզում
ակտիվության սինապսիսային դրսևորումներ
պերիակվեդուկտալ գորշ նյութի ակտիվացման ժամանակ**

Լ.Ժ. Թադևոսյան

14 ալբինո առնետների վրա (ինտակտ, n=3) Պարկինսոնի հիվանդության (PD) ռոտենոնային մոդելում, որն առաջացել է ռոտենոնի միակողմանի կիրառմամբ և մինչև փորձը պահվել է 4 շաբաթ (n=4), ինչպես նաև sinestrol-ի պաշտպանության պայմաններում (14 ներարկում ամեն օր 1 մգ/1 մլ չափաբաժիններով), (n=7) իրականացվել են էլեկտրաֆիզիոլոգիական ուսումնասիրություններ RMG նեյրոններում PAG-ի HFS-ի ժամանակ: PD մոդելում և սինեստրոլի ազդեցությամբ RMG նեյրոններում դեպրեսորային և գրգռիչ ազդեցությունները նորմալի համեմատ մեծ տարբերություն չեն ցուցաբերել: RMG նեյրոնների իմպուլսային հաճախականությունը PD մոդելում զգալիորեն ավելացել է նորմալ հաճախականության համեմատ: PD մոդելում սինեստրոլի օգտագործումից հետո RMG նեյրոնների իմպուլսային հաճախականությունը դեպրեսորային էֆեկտներում ավելացել է PD մոդելի հաճախականության համեմատ: Գրգռիչ ազդեցություններում RMG նեյրոնների իմպուլսային հաճախականությունը PD մոդելում սինեստրոլի օգտագոր-

ծումից հետո զգալիորեն նվազել է՝ PD մոդելի հաճախականության համեմատ: Այսպիսով, ռոտենոնով թունավորվելուց հետո ցուցադրվում է էքսայթոթորսիկության ազդեցությունը: Միներտրոլի օգտագործումից հետո էքսայթոթորսիկության հետևանքները դեպրեսիվ ազդեցությամբ չեն վերացվել, վերացվել են գրգռիչ ազդեցություններում:

Synaptic Poststimulus Manifestations of Activity in Antinociceptive Raphe Magnus Nucleus of the Brain under Activation of Periaqueductal Gray Matter on the Model of Parkinson's Disease in Condition of Protection by Synoestrole

L. J. Tadevosyan

Electrophysiological studies were carried out in RMG neurons with high frequency stimulation of PAG in 14 Albino rats - intact (n=3), on a rotenone model of Parkinson's disease (PD) induced by unilateral administration of rotenone and sustained before the experiment for 4 weeks (n=4) and under the protection of Synestrol (14 injections every other day at doses of 1 mg/1ml) (n=7). In RMG neurons on the PD model and under the conditions of exposure to synestrol, depressor and excitatory effects did not show much difference compared to the norm. The pulse frequency of RMG neurons in the PD model has greatly increased compared to the normal frequency. The pulse frequency of RMG neurons in the depressive effects on the PD model after the use of synestrol increased compared to the frequency on the PD model. The pulse frequency of RMG neurons in excitatory effects on the PD model after the use of synestrol decreased significantly compared to the frequency on the PD model. Thus, after intoxication with rotenone, the effect of excitotoxicity is shown. After the use of synestrol, the effects of excitotoxicity were not eliminated in depressor effects and were eliminated in excitatory effects.

Литература

1. Орлов А.И. Прикладная статистика, 2004.
2. Саркисян Дж.С., Погосян М.В., Даниелян М.А. и др. Назначение депрессорных синаптических процессов в условиях специфической нейродегенеративной патологии и протекции. LAP LAMBERT Academic Publishing RU. 2018.
3. Тадевосян Л.Ж., Погосян М.В., Даниелян М.А. и др. Синаптические постстимульные процессы в антиноцицептивном околосредоводном сером веществе мозга при активации большого ядра шва на модели болезни Паркинсона в условиях протекции синэстролом, Мед.наука Армении НАН РА, 2021, т. LXI, 3, с. 38-49.
4. Arundine M., Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity, Cell Calcium, 2003, 34(4-5): 325-37.
5. Brefel-Courbon C., Payoux P., Thalamas C., Ory F., Quélven I., Chollet F. et al. Effect of levodopa on pain threshold in Parkinson's disease: a clinical and positron emission tomography study, Mov. Disord., 2005, 20: 1557-1563.
6. de Tommaso M., Arendt-Nielsen L., Defrin R., Kunz M., Pickering G., Valeriani M. Pain in neurodegenerative disease: Current knowledge and future perspectives, Behavioural Neurology, 2016, 2016(1): 1-14.

7. *Dong Xiao-xia, Wang Yan and Qin Zheng-hong*. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases, *Acta Pharmacologica Sinica*, 2009, 30: 379–387.
8. *Gebhart G.F.* Descending modulation of pain, *Neurosci Biobehav Rev.*, 2004, 27: 729-737.
9. *Hornung J-P.* in *The Human Nervous System (Third Edition)*, 2012.
10. *Jaiswal M. K., Zech W. D., Goos M., Leutbecher C., Ferri A., Zippelius A., Carri M. T., Nau R., Keller B. U.* Impairment of mitochondrial calcium handling in a mtSOD1 cell culture model of motoneuron disease, *BMC Neurosci.*, 2009, 10: 64.
11. *Kilkenny C., Browne W., Cuthill I. C., Emerson M., Altman D. G.* Animal research: Reporting *in vivo* experiments: The ARRIVE guidelines, 06 July, 2010.
12. *Matthew R. Hynd, Heather L. Scott, Peter R. Dodd* Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease, *NCI*, 2004, 45(Issue 5): 583–595.
13. *Millan M. J.* Descending control of pain, *Prog Neurobiol.*, 2002, 66: 355-474.
14. *Paxinos G., Watson C.* The rat brain in stereotaxic coordinates, Elsevier, Academic Press, 5th ed., 2005, p. 367.
15. *Ramiro-González M., Fernández-de-las-Peñas C.* Pain in Parkinson disease: A review of the literature, *Parkinsonism & Related Disorders*, 2013, 19(Issue 3): 285-294.
16. *Scherder E., Wolters E., Polman C., Sergeant J., Swaab D.* Pain in Parkinson's disease and multiple sclerosis: its relation to the medial and lateral pain systems, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2005, 29: 1047-1056.