

Экспериментальная и профилактическая медицина

УДК 577,112,5;612,8;615,919;616,858
DOI:10.54503/0514-7484-2023-63.1-77

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

**Л.Ж. Тадевосян, А.С. Оганесян , З.А. Аветисян, А.Л. Минасян,
А.Ю. Степанян, Дж.С. Саркисян**

*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, меланин, синэстрол

Несмотря на интенсивные исследования путей, передающих боль, недостаточно внимания уделялось антиноцицептивным, участвующим в ее восприятии и модуляции, а следовательно – оценке механизмов боли [6, 14]. В настоящее время весьма актуально изучение соотношения возбудительных и тормозных синаптических процессов в антиноцицептивных структурах для оценки их поражения в условиях нейродегенеративных болезней. Нет доступной терапевтической стратегии для подавления хронической боли, в особенности при болезни Паркинсона (БП), в которой ей принадлежит особое место среди самых частых немоторных сенсорных отклонений [14]. Большое ядро шва (*Nucleus raphe magnus* – RMG), вместе с околоводопроводным серым веществом (*Periaqueductal gray matter* – PAG), входят в число структур, играющих важную роль в модуляции спинальной ноцицептивной передачи [12]. Изменения в ядре дорсального шва связаны с БДР и суицидальностью [15]. В свою очередь RMG, будучи важным участком эндогенной болевой тормозной системы, воспринимает проекции от PAG [8]. Ядра шва содержат в основном серотонинергические нейроны с аутокринным и паракринным действием, в которых снижение синтеза серотонина связано с клинической депрессией, а усиление серотонинергической передачи – с помощью селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (СИОЗС) – давно является самым успешным в лечении депрессии [9]. Серотонинергические пути, исходящие из ядер шва, участвуют во множестве физиологических и пове-

денческих функций. Кортиколимбические проекции из ростральной группы в миндалину, гиппокамп, таламус и базальные ганглии модулируют эмоции, настроение, реакцию на стресс и познание [5]. Дополнительные функции включают регулирование аппетита, циклов сна, движения, секреций и сексуальной функции [5]. Точно так же воздействие RMG сильно изменяет восприятие боли. Аналогичным образом серотонинергический ввод в чувствительные к боли области таламуса и клетки дугообразного ядра гипоталамуса оказывает обезболивающее действие [16].

В последние годы особое внимание уделяется участию эстрогенов в регуляции нейрогенеза, воспаления и апоптоза в центральной нервной системе; в контроле формирования и функционирования церебральных сосудов [1]. К тому же, эстрогенные рецепторы широко распространены в дофаминергических нейронах среднего мозга [1]. Более того, нейротрансмиттерные факторы или факторы роста, действуя через свои собственные мембранные рецепторы, способны заменить влияние стероидных гормонов и активируют рецепторы стероидов за счет вторичных мессенджеров, даже в отсутствие стероидных гормонов [4].

В настоящем исследовании предпринято изучение соотношения возбудительных и депрессорных ответов одиночных нейронов RMG при стимуляции PAG в качестве управляющих болевым процессом, что поможет оценке механизмов их поражения при НБ в норме и на модели БП, индуцированной односторонним введением ротенона, и успешности протекции бактериальным меланином в сочетании с синэстролом, в сравнении с нормой.

Материал и методы

Проведены электрофизиологические исследования на 12 крысах линии Альбино ($250\pm30\text{г}$): интактных ($n=3$), на ротеноновой модели БП, индуцированных unilateralным введением ротенона и выдержанных до опыта 4 нед. ($n=4$) и в условиях протекции сочетанным введением бактериального меланина и синэстрола (14 инъекций через день в дозе 170 мг/кг и 1мг/1мл) ($n=5$). 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 [13] (AP+0,2; L±1,8; DV+8 мм). Исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями руководства ARRIVE [10]. В стереотаксическом аппарате производили трепанацию черепа от брегмы до лямбды и вскрывали твердую мозговую оболочку. Стеклянные микроэлектроды с диаметром кончика 1-2 мкм, заполненные 2M NaCl, вводили в RMG, согласно стереотаксическим координатам (AP-11,6; L±2,0; DV+10,3 мм) для экстраклеточной регистрации спайковой активности одиночных нейронов. Осуществляли

высокочастотную стимуляцию (ВЧС) PAG 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 1сек, согласно стереотаксическим координатам (AP-4,92; L±2,0; DV+5,7 мм) (рис. 1). Операции осуществляли на наркотизированных животных (уретан 1,2 г/кг, в/б), зафиксированных в стереотаксическом аппарате.

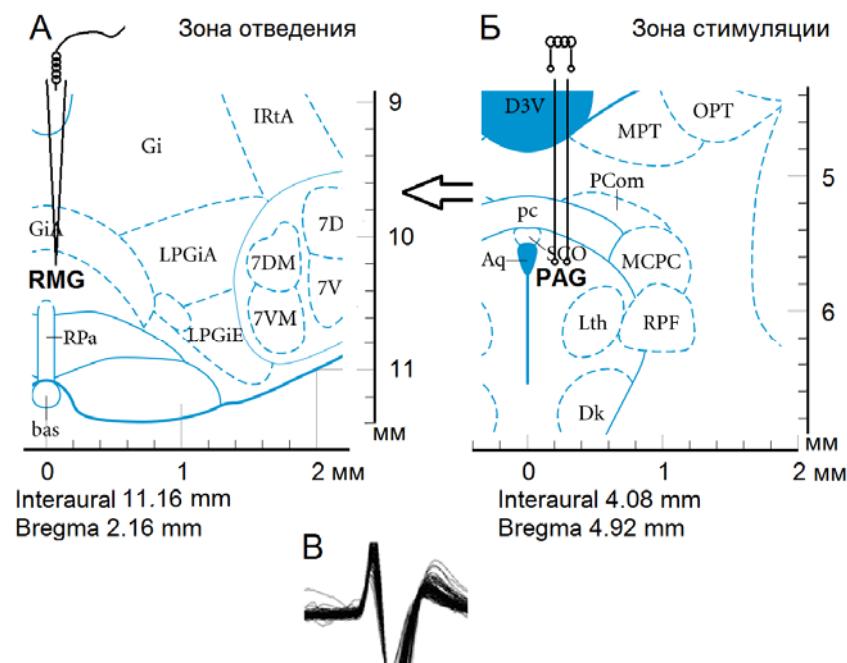


Рис. 1. Схема эксперимента по раздражению PAG и отведению из RMG. Стереотаксическое изображение пункта регистрации нейронной активности – А, зоны стимуляции – Б и характеристического потенциала действия – В

Активность проявлялась в виде тетанической депрессии (ТД) и потенциации (ТП), сопровождаемых посттетанической депрессией (ПТД) и потенциацией (ПТП). Проводили анализ импульсной активности одиночных 399 нейронов RMG. Проявления активности оценивали online регистрацией и программным математическим анализом, позволяющим селекцию спайков посредством амплитудной дискриминации с построением «растеров» перистимульного спайкинга нейронов, гистограмм суммы и диаграмм усредненной частоты спайков. Строили суммированные и усредненные перистимульные гистограммы (PETH Average) и гистограммы частоты (Frequency Average). Использовался t-критерий Стьюдента, а также двухвыборочный критерий Вилкоксона-Манна-Уитни [2]. 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 бактериальным меланином и синэстролом (128 нейронов, n=5). В нейронах RMG в ответ на ВЧС PAG ТД в обеих последовательностях в норме определялась порядка 1,66- и 2,0-кратного снижения престимульной активности соответственно (рис. 2 А, группы А, Б). ТП, сопровождаемая ПТП и депрессией, выявлялась в пределах 1,1- 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 снижения престимульной активности в обеих последовательностях соответственно (рис. 2 В, группы А, Б), а ТП показала 3,33- и 2,66-кратное повышение престимульной активности (рис. 2 Г, группы А, Б). Что же касается депрессорных постстимульных активностей нейронов RMG, то при наличии почти одинаковых значений, в сравнении с нормой, количество нейронов при ротеноновой модели многократно уменьшилось.

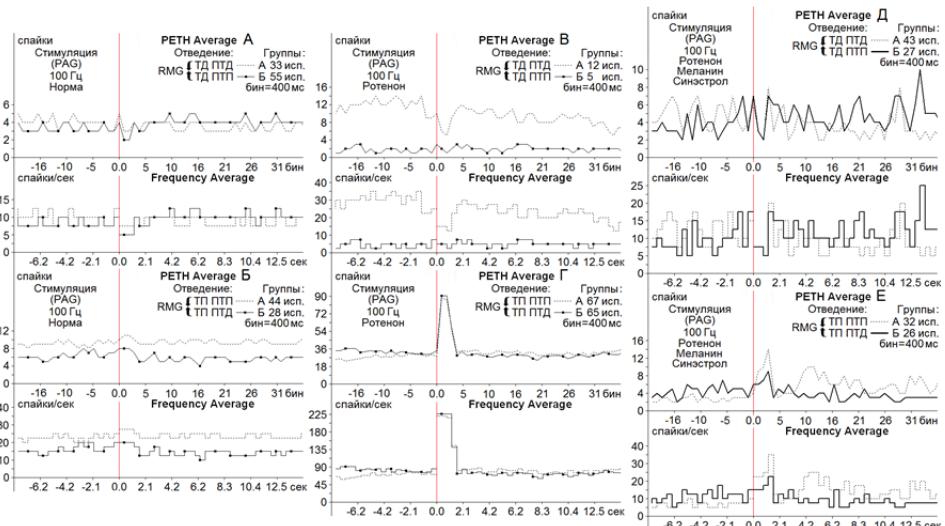


Рис. 2. Усредненные перистимульные (PETH Average) гистограммы и гистограммы частоты (Frequency Average) депрессорных, депрессорно-возбудительных (А, В, Г, группы А, Б) и возбудительных, возбудительно-депрессорных постстимульных проявлений активности нейронов PAG (Б, Г, Е, группы А, Б) при ВЧС (100 Гц,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

Очевидна эксайтотоксичность, содействующая повышению частоты пре- и постстимульной активности в обеих последовательностях. Таким образом, выявлено нейродегенеративное поражение RMG. Наконец, в нейронах RMG при ВЧС PAG, в условиях воздействия меланина в сочетании с синэстролом, ТД в обеих депрессорных последовательностях достигала соответственно 3,0- и 3,5-кратного снижения престимульной активности (рис. 2 Д, группы А, Б), а ТП в соответствующих возбудительных постстимульных последовательностях исчислялась порядка 3,5- и 1,5- кратного превышения престимульной активности (рис. 4 Е, группы А, Б).

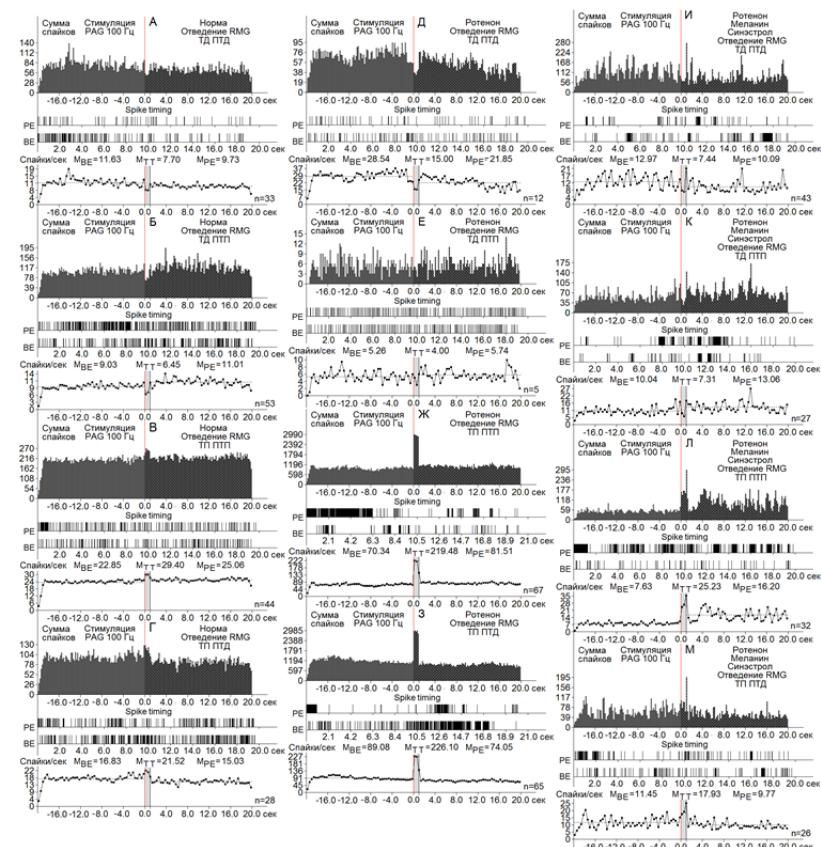


Рис. 3. А-Г – гистограммы суммы спайков пре- и постстимульных тетанических депрессорных проявлений активности ТД ПТД (А, Д, И), в сочетании с посттетаническими возбудительными – ТД ПТП (Б, Е, К), возбудительными – ТП ПТП (В, Ж, Л), сопровождаемых депрессорными (Г, З, М), нейронов RMG, вызванных на ВЧС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

Оценивалась степень выраженности депрессорных и возбудительных эффектов, на диаграммах усредненной частоты спайков 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. Полученные значения, представленные в виде дисковых диаграмм для представления степени выраженности в частотном отображении (в %) экспериментальных данных, на рис. 4 (на основе рис. 3).

Значения ТД в депрессорной и депрессорно-возбудительной последовательности и уровни ТП в возбудительной и возбудительно-депрессорной последовательности нейронов RMG при ВЧС PAG в 1,51- и 1,40-кратного снижения (рис. 3 А, Б; 4 А, Б), 1,30- и 1,28-кратного превышения (рис. 3 В, Г; 4 В, Г), в сравнении с престимульным уровнем активности соответственно. Как видно, указанные значения отличались незначительно, что свидетельствует о фактическом балансе депрессорных и возбудительных постстимульных проявлений активности исследуемых нейронов. На модели БП значения ТД в депрессорной и депрессорно-возбудительной последовательности и уровни ТП в возбудительной и возбудительно-депрессорной последовательности нейронов RMG, в сравнении с престимульным уровнем активности на модели БП, отличались достаточно (2,0-против 3,12- и 1,31- против 2,54-кратного, для одно- и разнонаправленных депрессорных и возбудительных эффектов соответственно) (рис. 3 Д-З; 4 А-Г), что свидетельствует о превалировании возбудительных постстимульных проявлений активности над депрессорными (порядка 1,56- и 2,0-кратного), что является свидетельством выраженной эксайтотоксичности. Наконец, в нейронах RMG значения ТД в депрессорной и депрессорно-возбудительной последовательности и уровни ТП в возбудительной и возбудительно-депрессорной последовательности, в сравнении с престимульным уровнем активности на модели БП в условиях протекции, исчислялись в пределах 1,74- и 1,37- кратного снижения и 3,30- и 1,56- кратного превышения престимульной активности (рис. 3 И-М; 4 А-Г). Иными словами, с учетом лишь кратности измерений сравнительных показателей указанных постстимульных эффектов в патологии, в сравнении с таковыми в условиях протекции, не обнаружено существенных различий, за исключением возбудительных эффектов, даже имело место увеличение ТП в возбудительной и уменьшение – в возбудительно-депрессорной последовательности (3,12- против 3,30- и 1,56- против 3,12- и 2,54-кратного на модели БП и с протекцией соответственно; к тому же, в последнем случае с приближением к норме – 1,30- и 1,28-кратного превышения). Однако совершенно обратная картина была обнаружена при сравнении частоты пре- и постстимульной активности нейронов RMG на ВЧС PAG в указанных экспериментальных условиях. Престимульная частота активности, предшествующая депрессорным эффектам в норме и на модели БП достигала 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-З; 4 Д-З). Престимульная частота активности в нейронах RMG, предшествуемая депрессорными и возбудительными последовательностями в условиях протекции, исчислялась в пределах 18,35; 10,13; 9,45 и 14,71 соответственно (рис. 3 И-М; 4 Д-З). Иными словами, в патологии, по сравнению с нормой, престимульная частота активности, предшествуемая депрессорными постстимульными эффектами, повысилась и понизилась – 2,45- и 1,71-кратно, а таковая, предшествуемая возбудительными, понизилась значительно.

Престимульная частота активности нейронов RMG при ВЧС PAG на модели БП, предшествующая депрессорной и депрессорно-возбудительной последовательностям, достигала значений порядка 28,54 и 5,26, в отличие от таковой в возбудительной и возбудительно-депрессорной последовательностях – порядка 70,34 и 89,08 соответственно повысилась 3,08- и 5,30-кратно, что свидетельствует о выраженной эксайтотоксичности (рис. 3 Д-З; 4 Д-Е). В условиях протекции в нейронах RMG пре-синаптическая частота, предшествуемая депрессорными постстимульными реакциями, приблизилась к норме, а предшествуемая возбудительными – также с тенденцией сближения с нормой, по сравнению с патологией, претерпела резкое снижение в пределах 7,63- и 11,45-кратного (9,22- и 7,78-кратно) (рис. 3; 4 Ж, З). Что же касается постстимульной частоты активности нейронов RMG, то в норме, будучи сопровождаемыми депрессорными и возбудительными постстимульными эффектами, она достигала 7,70; 6,45; 29,40 и 21,52, а на модели БП 15,0; 4,0; 219,48 и 226,10, иными словами – на модели БП она превысила таковую, снизилась на 2,24-, и 1,61-, сопровождаемая депрессорными, и намного превысила порядка 23,35- и 10,5-кратно, сопровождаемая возбудительными эффектами (рис. 3 А-З; 4 И-М). Таким образом, имело место мощное повышение частоты постстимульной активности, свидетельствующее опять-таки, как и в случае престимульной частоты, о громадной эксайтотоксичности (рис. 3 А-З; 4 И-М). Наконец, в условиях протекции, произошло фактическое приближение депрессорной постстимульной активности к норме и резкое снижение постстимульной частоты, сопровождаемой возбудительными эффектами, с приближением к норме, что свидетельствует об успешном протекторном эффекте (рис. 3; 4 И-М).

Таким образом, на модели БП выявлена мощная эксайтотоксичность, вследствие сверхактивации NMDA и AMPA глутаматных рецепторов [11], которая сопровождается рядом отрицательных последствий в виде нарушения кальциевой буферизации, генерации свободных радикалов, активации митохондриальной проницаемости [7], что указывает на

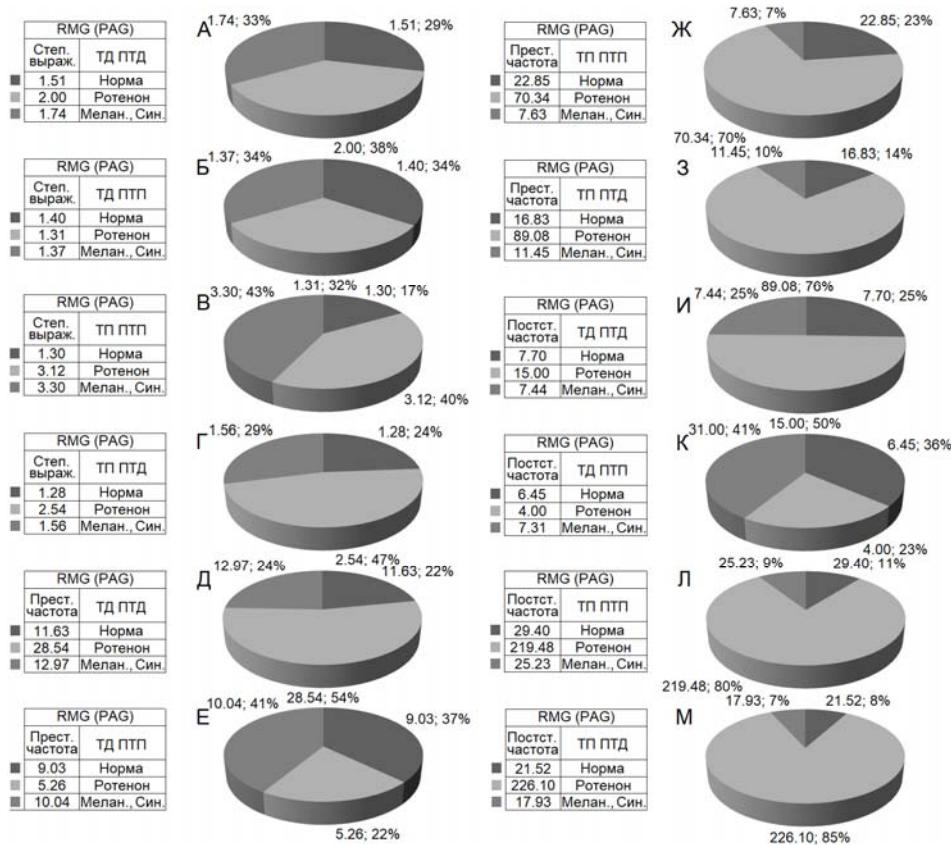


Рис. 4. А-К – процентное соотношение степени выраженности (по усредненной частоте) (А-Г) депрессорных (ТД ПТД), депрессорно-возбудительных (ТД ПТП), возбудительных (ПП ПТП) и возбудительно-депрессорных (ПП ПТД) постстимульных эффектов в одиночных нейронах RMG при ВЧС РАГ, а также частоты престимульной (Д-З) и постстимульной активности, предшествующих и сопровождаемых указанными проявлениями постстимульной активации, в норме, на ротеноновой модели БП и в условиях протекции меланином и синэстролом.

Обозначения: степ. выраж. – степень выраженности, прест. – престимульная, постст. – постстимульная

глубокое нейродегенеративное поражение важной антиноцицептивной структуры RMG при БП, содействующее возникновению стойкой хронической боли.

Очевидна необходимость углубления депрессорных эффектов протекторного назначения и снижения чрезмерных возбудительных [3].

Поступила 08.07.22

**Պարկինսոնի հիվանդության մողելում մելանինի
պաշտպանության պայմաններում սինեստրոլի հետ համատեղ
ուղեղի ռաֆեի մեծ կորիզում ակտիվության սինապտիկ
դրսնորումներ ուղեղի պերիակվեդուկտալ մոխրագույն նյութի
ակտիվացման ժամանակ**

**Լ.Ժ. Թաղեռոսյան, Ա.Ա. Հովհաննիսյան, Զ.Ա. Ավետիսյան,
Ա.Լ. Մինասյան, Հ.Յու. Ստեփանյան, Զ.Ա. Սարգսյան**

Էլեկտրաֆիզիոլոգիական ուսումնասիրություններ են իրականացվել 10 Ալբինո առնետների վրա (250գ.): Ինտակտ (n=3), Պարկինսոնի հիվանդության (ՊՀ) ոռտենոնային մողելների վրա, որոնք առաջացել են ոռտենոնի միակողմանի կառավարմամբ, պահպանվել են 4 շաբաթ մինչև փորձը (n=4) բակտերիալ մելանինի պաշտպանության պայմաններում Սինեստրոլի հետ համատեղ (n=5): Raphe magnus nucleus (RMG) 340 մելական նեյրոնների արտաքշային իմպուլսային ակտիվության գրանցում Periaqueductal gray matter (PAG) բարձր հաճախականության ստիմուլացիայի ժամանակ: Ոռտենոնի բունավորումից հետո ծանրության փոփոխություններ են տեղի ունեցել ինչպես դեպրեսորային, այնպես էլ գրգիչ ազդեցությունների մեջ: Մելանինի և սինեստրոլի օգտագործումից հետո տեղի է ունեցել երկու ազդեցությունների ցուցանիշների վերականգնում: Ոռտենոնի օգտագործումից հետո դեպրեսորային ազդեցություններում գործողության պոտենցիալների հաճախականության ցուցանիշները խախտվել են դեպի բարձրացում և իշեցում: Մելանինի և սինեստրոլի օգտագործումը հանգեցրել է այդ ցուցանիշների վերականգնման նորմայի մակարդակներին: Գրգիչ ազդեցություններում ոռտենոնի օգտագործումից հետո նկատվել է գործողության պոտենցիալների հաճախականության ուժեղ աճ: Մելանինի և սինեստրոլի օգտագործումից հետո նկատվել է գործողության պոտենցիալների հաճախականության ուժեղ աճ: Մելանինի և սինեստրոլի օգտագործումից հետո նկատվել է ցուցանիշների վերականգնում մինչև նորմայի մակարդակ: Այլ կերպ ասած ՊՀ-ի ժամանակ հայտնաբերվել է էքսիթոթոքսիկություն, ինչը նպաստում է իմպուլսային գործունեության հաճախականության հզոր բարձրացմանը: Սա վկայում է ՊՀ-ի ժամանակ RMG-ի խոր նեյրոդեգեներատիվ վնասվածքի մասին: Մելանինի և Սինեստրոլի օգտագործման շնորհիվ տեղի են ունեցել նորմայի մոտարկում և էքսիթոթոքսիկության հզոր նվազում, ինչը վկայում է այդ դեղերի հաջող պաշտպանողական ազդեցության մասին:

**Synaptic Post-Stimulus Manifestations of Activity in the
Antinociceptive Raphe Magnus Nucleus When Activating the
Periaqueductal Gray Matter on the Model of Parkinson's Disease
under the Protection of Melanin in Combination with Synoestrol**

**L. J. Tadevosyan, A. S. Hovhannisyan , Z. A. Avetisyan, A. L. Minasyan,
H. Y. Stepanyan, J. S. Sarkissian**

Electrophysiological studies were conducted on 10 Albino rats (250g). Intact (n=3), on the rotenone model of Parkinson's disease (PD), induced by unilateral administration of rotenone, were maintained for 4 weeks before the experiment (n=4) under the conditions of bacterial melanin protection in combination with synoestrol (n=5). There was recorded extracellular impulse activity of 340 single neurons of Raphe magnus nucleus (RMG) during high frequency stimulation (HFS) of the Periaqueductal gray matter (PAG). After intoxication with rotenone, there were changes in the severity of both depressor and excitatory effects. After the use of melanin and synestrol, the indicators of both effects were restored. After the use of rotenone, the frequency of action potentials in depressor effects was violated in the direction of increasing and decreasing. The use of melanin and synestrol led to the restoration of these indicators to normal levels. A strong increase in the frequency of action potentials was observed after the use of rotenone with excitatory effects. After the use of melanin and synestrol, the indicators recovered to normal levels. In other words, in PD, excitotoxicity was revealed, contributing to a powerful increase in the frequency of pulse activity. This indicates a deep neurodegenerative lesion of RMG in PD. Due to the use of melanin and synestrol, there was an approximation to the norm and a powerful decrease in excitotoxicity, indicating a successful protective effect of these drugs.

Литература

1. Кареева Е. Н. и др. Эстрогены и головной мозг. Вестник Российской академии медицинских наук. 2012, 67(2), с. 48-59.
2. Орлов А.И. Прикладная статистика М., 2004.
3. 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.
4. Babichev V. N. Receptor mechanisms of action of sex hormones. Can the receptor work without a ligand? *Problems of Endocrinology*, 2006, 52(1):32-38. (In Russ.).
5. Charnay Y., Léger L. Brain serotonergic circuitries. *Dialogues Clin Neurosci.*, 2010, 12(4): 471-487.
6. de Tommaso M., Arendt-Nielsen L., Defrin R. et al. Pain in Neurodegenerative Disease: Current Knowledge and Future Perspectives. *Behavioural Neurology*, 2016, 2016(1): 1-14.
7. Dong Xiao-xia, Wang Yan, Qin Zheng-hong. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2009, 30: 379–387.
8. Hornung J. P. The Human Nervous System (Third Edition), 2012.

9. *Ikuta T., Matsuo K., Harada K. et al.* Disconnectivity between Dorsal Raphe Nucleus and Posterior Cingulate Cortex in Later Life Depression. *Front Aging Neurosci.*, 2017, 9: 236.
10. *Kilkenny C., Browne W., Cuthill I. C., Emerson M., Altman D.G.* Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines 06 July, 2010.
11. *Matthew R. H., Heather L. S., Peter R. D.* Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *NCI*, 2004, 45(Issue 5): 583–595.
12. *Millan M. J.* Descending control of pain. *Prog Neurobiol.*, 2002, 66: 355-474.
13. *Paxinos G., Watson C.* The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier, Academic Press, 5th ed., 2005, p. 367.
14. *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.
15. *Walker E. P., Tadi P.* Neuroanatomy, Nucleus Raphe. In: *StatPearls Publishing*, 2022.
16. *Wang QP, Nakai Y.* The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation. *Brain Res Bull.*, 1994, 34(6):575-85.