

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 612.8; 615.919; 616.858

**М. А. Даниелян, К. В. Карапетян,
О. А. Назарян, К. А. Небогова**

**Морфогистохимическое исследование изменений
в нейронах бледного шара на модели болезни Паркинсона
в условиях введения яда армянской гадюки**

(Представлено чл.-кор. НАН РА Л. Р. Манвеляном 12/VIII 2020)

Ключевые слова: *нейроны, бледный шар, болезнь Паркинсона, яд армянской гадюки Vipera raddei.*

Введение. Болезнь Паркинсона (БП) – одна из самых частых форм первичных хронических нейродегенеративных заболеваний, поражающая каждого сотого в возрасте выше 65 лет. БП представляет собой хроническое прогрессирующее заболевание головного мозга с дегенерацией нигростриарных нейронов и нарушением функции базальных ганглиев, проявляющееся как моторными, так и немоторными симптомами [1, 2]. При БП поражаются структуры экстрапирамидной системы – черная субстанция, базальные ганглии и др. [3]. Симптомы обычно появляются медленно с течением времени, но неизбежно прогрессируют [4]. Большинство моторных симптомов является следствием прогрессирующего и избирательного поражения дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции [5] в результате дегенерации нигростриарного тракта и резкого падения концентрации предшественника нейромеланина – дофамина [6, 7], при этом нарушается передача возбуждения от черной субстанции к стриопаллидарной системе. Паллидо-нигральная проекция представлена преимущественно в дофаминергических клетках компактного отдела черной субстанции, недостаток которых в стриатуме приводит к проявлениям БП [8]. Помимо того дофамин осуществляет эффект на нейроны бледного шара, во взаимодействии с ГАМК-ергическим торможением и глутаматергическим возбуждением, посредством воздействия стриатума и субталамических ядер, что играет важную роль в организации базальных

ганглиев у приматов [9]. При дегенерации дофаминергических нигростриарных волокон повышается активность ГАМК-ергических нейронов стриатума, что приводит к чрезмерной активации не прямых путей базальных ганглиев [10, 11]. Избыточная активность внутреннего сегмента бледного шара и субталамического ядра в итоге приводит к чрезмерному торможению глутаматергических нейронов таламуса. Как следствие чрезмерное эфферентное торможение в системе паллидо-таламо-кортикальных связей приводит к уменьшению активности двигательных зон коры [12].

Механизмы, ответственные за дегенерацию нигростриарных дофаминергических нейронов, неизвестны, но нейровоспаление и оксидативный стресс играют решающую роль [13]. Данные исследований показывают, что системная дисфункция нейронов может привести к непрерывной дегенерации клеток и, возможно, вызывает патофизиологический стресс, приводящий к нарушению компенсаторных механизмов и в конечном итоге клиническому паркинсонизму с хронической нейрональной дисфункцией [14]. Ускорение гибели дофаминергических нейронов триггируется процессами, включающими источники оксидативного стресса [15].

На данный момент нет эффективной нейропротекции БП, поэтому продолжают оставаться крайне актуальными перспективы терапии и поиска эффективной терапевтической стратегии для этого тяжелого неизлечимого заболевания. Эффективной может стать терапия, направленная как на замедление гибели дофаминергических нейронов, так и на исключение прогрессии недофаминергических симптомов. Представляют особый интерес животные яды, выступающие в качестве выраженных протекторов при многих патологических состояниях организма в связи с их высокой избирательной специфичностью и необратимостью эффектов, обуславливающих длительность действия [16-20]. Яды различных змей триггируют повторный запуск в нейронах, содействуя высвобождению передатчика [21], а также действуют на активность фермента фосфолипазы А2, важного фактора протекции клетки от окислительного повреждения мембран [22, 23]. В отношении применения змеиных ядов при нейродегенерации изучены таковые из семейства *Elapidae* на основе дендротоксинов, из которых синтезированы соединения, адаптивно контролирующие возбудимость поврежденных нейронов при нейродегенеративных заболеваниях [24].

Целью наших исследований было сравнительное изучение морфологической картины бледного шара мозга крыс при ротеноновой интоксикации в условиях воздействия малых доз яда армянской гадюки *Vipera raddei* (VR).

Материал и методы. В качестве экспериментальной модели БП была применена ротеноновая модель, которая признана надежной для изучения

механизмов повреждения нейронов и оценки нейрохимических, иммуногистохимических, поведенческих и когнитивных проявлений, в особенности до 4 недель выживания [25]. Эксперименты проводили в трех сериях на 15 зрелых разнополых крысах Альбино (200-250 г): 1) ложнооперированные (5 крыс, контроль), инъекцированные стерильной дистиллированной водой в сочетании с в/м введением изотонического раствора NaCl (5 крыс, контроль); 2) инъекцированные унилатерально ротеноном (12 мг в 0.5 мл димексида со скоростью 0.1 мл/мин) в «medial forebrain bundle» по координатам (AP+0.2, L±1.8, DV 8 мм) стереотаксического атласа [26] с в/м введением физиологического раствора через день в течение 2 недель и выдержанные до острого эксперимента 4 недели (5 крыс); 3) инъекцированные ротеноном унилатерально аналогично группе (2) в сочетании с в/б инъекцией яда VR (10% от LD50 = 1.6 мг/кг) через день в течение 2 недель и выдержанные 4 недели (5 крыс). Операции по унилатеральному введению ротенона проводили под пентобарбиталовым наркозом (40 мг/кг, в/б). Животных содержали в одинаковых условиях в течение всего послеоперационного времени до острого эксперимента. Все работы с животными были проведены в соответствии с правилами «Европейской конвенции о защите животных, используемых в экспериментах» (Директива 2010/63/EU) и одобрены этическим комитетом ЕГМУ им. М. Гераци.

Для изучения морфофункционального состояния клеточных структур бледного шара крыс был применён гистохимический метод выявления активности Ca^{2+} -зависимой кислой фосфатазы (КФ) [27]. Животные были наркотизированы нембуталом (40-45 мг/кг веса, в/б) с последующим изъятием мозга, который фиксировали в 5%-ном растворе нейтрального формалина в течение 48 ч при +4°C. Производили ленточные срезы головного мозга крыс во фронтальной плоскости, ориентируясь по топографическому атласу. Замороженные срезы толщиной 40-50 мкм согласно требованиям дальнейшей обработки переносились в заранее свежеприготовленные соответствующие инкубационные смеси, предназначенные для выявления активности Ca^{2+} -зависимой КФ. Объектом исследования служили клеточные структуры бледного шара. Анализ полученных препаратов производили под световым микроскопом OPTON (West Germany), микрофотографии получали с помощью фотонасадки AmScope MU800.

Результаты и обсуждение. Бледный шар относится к *базальным ганглиям больших полушарий мозга* и представляет собой филогенетически древнее образование. Состоит преимущественно из крупных нейронов (размер около 50 мк), имеющих разветвленную сеть дендритов, среди них проходят пучки волокон по пути к коре головного мозга. Эти нейроны бывают разной формы – пирамидной, веретенообразной, мультипо-

лярной. В цитоплазме нейронов много хромотофильных глыбок, которые распределены равномерно. Нейроны имеют очень длинные аксоны, выходящие за пределы стриопаллидарной системы и соединяющие различные участки нервной системы (рис. 1, А-В). Бледный цвет данного образования мозга объясняется тем, что миелиновых волокон в нем больше, чем серого вещества (рис. 1, А).

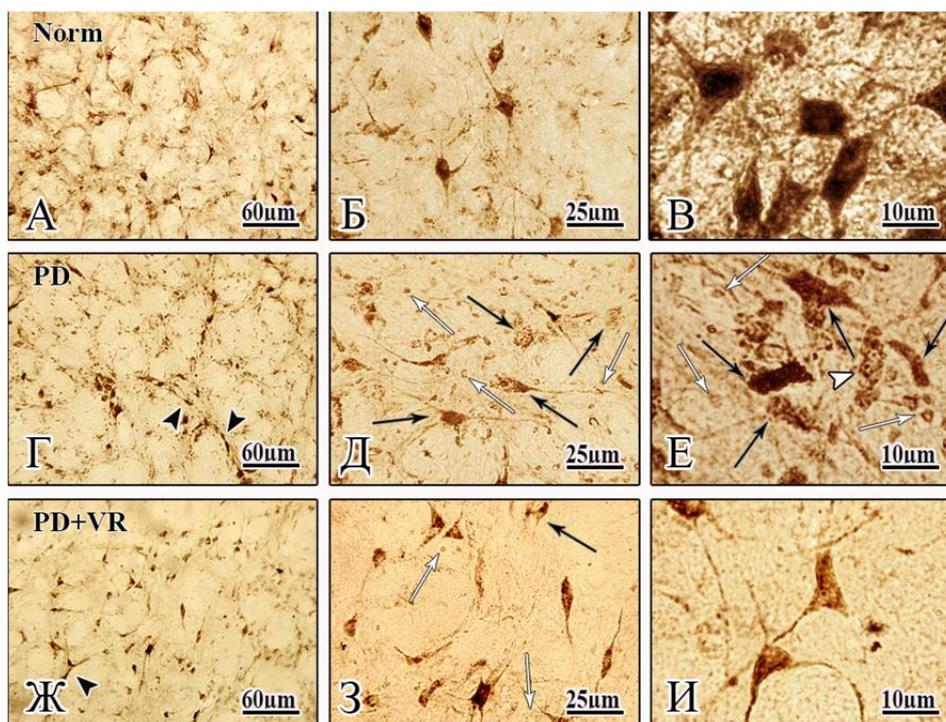


Рис. 1. Микрофотографии клеточных структур бледного шара головного мозга крыс (А-В – контроль (Norm); Г-Е – в условиях ротеноновой интоксикации (PD); Ж-И – в условиях ротеноновой интоксикации в сочетании с регулярным введением малых доз яда VR (PD+VR)); Г-Е – форма нейронов нарушена, цитоплазма осветлена, с низкой активностью КФ, ядро перемещено, отростки сохранены, но лишены тигроидного вещества; Ж-И – сохранение формы и размеров нейронов, высокая фосфатазная активность в цитоплазме и отростках нейронов, контуры чёткие, ядра центрально расположены, глиоз) (чёрная стрелка – хромотолиз; белая стрелка – ядра глии; белая головка стрелки – эктопированное ядро; черная головка стрелки – капилляры). Метод выявления активности Ca^{2+} -зависимой кислой фосфатазы. Увеличение: $\times 160$ (А, Г, Ж); $\times 400$ (Б, Д, З); $\times 1000$ (В, Е, И); цифровое ув. 8Мп.

В условиях ротеноновой интоксикации цитоархитектоника нейронов бледного шара не нарушена (рис. 1, Г). Часть нейронов бледного шара

имеет обычную форму с четкими границами клеток, но в цитоплазме отмечается распыление тигроидного вещества – просветление цитоплазмы по сравнению с нормой. Ядро имеет овальную или округлую форму с четкими контурами. Структура ядра однородна (рис. 1, Г-Е). В целом у нейронов реагируют длинные отростки, однако фосфатазная активность в них снижена и осадок фосфата свинца пылевидный или мелкозернистый. На фоне нормальных клеток выявляются различные типы клеточной атрофии. Поражение нейронов сопровождается лизисом хроматофильного вещества. Нервные клетки находятся в состоянии пигментного атрофического перерождения со значительной нейроглической реакцией вокруг ложноизвестковых глыбчатых инкрустаций – продуктов распада (рис. 1, Е). В поврежденных нейронах темноокрашенный крупноглыбчатый осадок фосфата свинца неравномерно распределён по телу клетки, из-за чего не просматривается граница между телом и отростками (рис. 1, Д, Е). Некоторые нейроны подвергнуты сильно выраженной атрофии, которая может привести к их исчезновению (рис. 1, Е). Внутри клеток происходят значительные изменения цитоплазмы и ядра. Состояние хроматофильных зерен подвергается глубоким изменениям. Подобные нейроны приобретают вытянутую форму, теряют отростки, их цитоплазма слабо окрашена, ядро центрально расположено и деформировано (рис. 1, Д). Снижение фосфатазной активности в цитоплазме клеток свидетельствует о снижении метаболизма в нейронах бледного шара. Среди нормальных и дегенерированных нейронов бледного шара чётко выделяются гомогенно окрашенные ядра глиальных клеток (рис. 1, Д, Е). Патологические сдвиги в нейронах приводят к реакции сателлитной нейроглии, что связано с защитной реакцией глиальных клеток по отношению к нейронам [28]. Известно, что длительное воздействие пестицида ротенона усиливает нейровоспалительные процессы через повышение плотности определенного тока астроглии, которая играет важную роль в синаптогенезе, синаптической пластичности и обеспечивает компенсацию недостатка дофамина [29]. Таким образом, ротеноновая интоксикация мозга приводит к резким морфологическим изменениям внутриклеточных структур и метаболическим нарушениям. Это состояние является обратимым процессом, однако при углублении нейродегенеративного процесса может перейти уже в необратимые формы клеточной патологии.

Под воздействием яда VR, введенного систематически через день после инъекции ротенона, в бледном шаре наблюдаются сохранившие форму и размеры нейроны (рис. 1, Ж-И). У большинства из них на фоне гиперхромной цитоплазмы выделяются светлоокрашенные центрально расположенные ядра, что характерно для нормы. Внутри цитоплазмы грануляции формируют спиралевидные или глыбчатые образования, что характерно для первично раздражённых нейронов, находящихся на пути к восстановлению (рис. 1, И). У подобных нейронов выявляются тонкие длинные отростки с высокой активностью КФ, что указывает на сохранение их связей с соседними клетками и другими областями мозга. Увеличено число клеток

с сопровождающими волокнами (рис. 1, Ж, З). На фоне сохранивших форму и размеры клеток изредка выявляются пораженные дегенерированные нейроны, потерявшие форму и размеры, без отростков (рис. 1, З). В целом под воздействием яда VR у нейронов бледного шара наблюдается морфологическая картина, близкая к норме. Имеет место очевидное улучшение васкуляризации (рис. 1, Ж). В межклеточном пространстве на фоне сохранившихся нейронов обнаруживаются ядра глиальных клеток, но в меньшем количестве, чем при введении ротенона без протекции, т.е. глиальная реакция успокаивается.

Выводы. При БП в бледном шаре повреждаются нейроны, в результате чего перестаёт вырабатываться дофамин, отвечающий за двигательные функции в организме. Пораженные нервные клетки подвергаются атрофии, которая при углублении процесса может привести к их исчезновению. Хроматофильные зерна в цитоплазме нейронов подвержены глубоким изменениям, метаболизм снижен. Значительные изменения глии проявляются прогрессирующими и регрессирующими процессами. Поражение нервных клеток сопровождается прогрессирующей потерей жизнеспособности, постепенной дегенерацией, приводящей к патологическим состояниям и утрате функций [30, 31].

Под влиянием малых доз яда VR в нейронах бледного шара наблюдаются положительные изменения структурных свойств по сравнению с моделью БП. Морфологическая картина близка к норме, у большинства клеток реагируют длинные отростки с высокой активностью КФ. По сравнению с ротеноновой моделью БП глиальная реакция постепенно успокаивается и наблюдается повышение фосфатазной активности в цитоплазме клеток, что говорит о повышении метаболизма, который был нарушен в результате ротеноновой интоксикации. Полученные результаты дают основание полагать, что малые дозы яда армянской гадюки VR действуют в качестве нейропротекторного агента. Дальнейшие исследования дадут возможность выявления механизмов воздействия терапевтических доз яда VR и предложений для терапии БП.

Институт физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА
e-mail: margaritadanielyan76@gmail.com

М. А. Даниелян, К. В. Карапетян, О. А. Назарян, К. А. Небогова

**Морфогистохимическое исследование изменений в нейронах
бледного шара на модели болезни Паркинсона
в условиях введения яда армянской гадюки**

Проведено сравнительное изучение морфофункционального состояния клеточных структур бледного шара головного мозга крысы на ротеноновой модели болезни Паркинсона в сочетании с введением малых доз яда армянской гадюки *Vipera raddei* (VR). Показано, что при ротеноновой интоксикации поражения

нервных клеток в бледном шаре происходят по так называемому абитрофическому типу, отмечаются постепенная дегенерация, прогрессирующая потеря жизнеспособности. При введении малых доз яда наблюдаются сохранение морфологической картины, положительные изменения структурных свойств нейронов бледного шара по сравнению с моделью болезни Паркинсона. Полученные данные позволяют предположить, что яд VR проявляет нейропротекторные свойства.

**Մ. Հ. Դանիելյան, Ք. Վ. Կարապետյան,
Օ. Հ. Նազարյան, Ք. Ա. Ներսիսյան**

Պարկինսոնի հիվանդության մոդելի վրա հայկական իծի թույնի ներարկման պայմաններում դժգույն գնդի նյարդաբջիջներում տեղի ունեցող փոփոխությունների մորֆոհիստոքիմիական հետազոտությունը

Իրականացվել է առնետների գլխուղեղի դժգույն գնդի բջջային կառույցների մորֆոֆունկցիոնալ վիճակի համեմատական ուսումնասիրություն՝ Պարկինսոնի հիվանդության ռոտենոնային մոդելի և հայկական իծի *Vipera raddei* (VR) թույնի փոքր չափաբաժինների ներարկման համակցմամբ: Հետազոտության արդյունքների վերլուծությունը ցույց տվեց, որ ռոտենոնային թունավորման պայմաններում դժգույն գնդի նյարդաբջիջների ախտահարումն իրականացվում է այսպես կոչված արիտրոֆիկ ձևով, ի հայտ են գալիս աստիճանական դեգեներացիա, կենսունակության արագընթաց կորուստ: Պարկինսոնի հիվանդության մոդելի համեմատ, թույնի փոքր չափաբաժինների ներարկման արդյունքում դիտարկվում են մորֆոլոգիական պատկերի պահպանում, դժգույն գնդի նյարդաբջիջների կառուցվածքային հատկանիշների դրական փոփոխություն: Ստացված տվյալները թույլ են տալիս ենթադրել, որ հայկական իծի թույնը դրսևորում է նյարդապաշտպան հատկություններ:

**M. H. Danielyan, K. V. Karapetyan,
O. H. Nazaryan, K. A. Nebogova**

Morphohistochemical Study of Changes in Globus Pallidus Neurons on a Model of Parkinson's Disease in the Conditions of the Introduction of Venom of the Armenian Viper

A comparative study of the morphological and functional state of the cellular structures of the globus pallidus of the rat brain on the rotenone model of Parkinson's disease in combination with the introduction of small doses of the venom of the Armenian viper *Vipera raddei* (VR) was carried out. An analysis of the results of the study shows that with rotenone intoxication, nerve cell lesions in the globus pallidus occur according to the so-called abiotrophic type, gradual degeneration, progressive loss of vitality is noted. With the introduction of small doses of venom, the morphological picture is preserved, positive changes in the structural properties of globus pallidus neurons are compared with the Parkinson's disease model. The data obtained suggest that the venom VR exhibits neuroprotective properties.

Литература

1. *Canesi M., Benti R., Marotta G. et al.* – Eur. J. Neurol. 2007. V. 14(3). P. 297-299.
2. *Jankovic J., Rajput A. H., McDermott M. P. et al.* – Archives of Neurology. 2000. V. 57. № 3. P. 369-372.
3. *Obeso J. A., Rodríguez-Oroz M. C., Benitez-Temino B. et al.* – Mov. Disord. 2008. V. 23. Suppl 3. S. 548-559.
4. *Fahn S., Sulzer D.* – J. of The American Society for Experimental Neuro Therapeutics. 2004. V. 1. P. 139-154.
5. *Brooks D. J.* – The Journal of the American Society for Experimental Neuro Therapeutics. 2004. V. 1. P. 243-254.
6. *Ebersbach, G., Moreau C., Gandor F. et al.* – Movement Disorders. 2013. V. 28. № 11. P. 1552-1559.
7. *Faucheux B. A., Martin M. E., Beaumont C. et al.* – J. Neurochem. 2003. V. 86. № 5. P. 1142-1148.
8. *Hattori T., Fibiger H. C., McGeer P. L.* – J. Comp. Neurol. 1975. V. 162. № 4. P. 487-504.
9. *Eid L., Parent M.* – Front. Neuroanat. 2015. V. 9. P. 111.
10. *Саркисян И. Г.* – ДНАН Армении. 1999. Т. 99. № 4. С. 392-395.
11. *Wirdefeldt K., Adami H., Cole P. et al.* – Eur J Epidemiol. 2011. 26 (Suppl 1):S1-58.
12. *Yacoubian T. A., Standaert D. G.* – Biochim Biophys Acta. 2009. V. 1792(7). P. 676-87.
13. *Mosley R. L., Benner E. J., Kadiu I. et al.* – Clin Neurosci Res. 2006. V. 6(5). P. 261-281.
14. *Chesselet M. F., Richter F.* – The Lancet Neurology. 2011. V. 10. Issue 12. P. 1108-1118.
15. *Bolam J. P., Pissadaki E. K.* – Mov. Disord. 2012. V. 27. P. 1478-1483.
16. *Abrahamyan S., Meliksetyan I., Chavushyan V. et al.* – Clinical Neuroscience. 2007. V. 60. № 3-4. P. 148-153.
17. *Galoyan A. A., Khalaji N., Hambardzumyan L. E. et al.* – Neuroch. Res. 2010. V. 35. P. 1747-1760.
18. *Kalam Y., Isbister G. K., Mirtschin P. et al.* – J Pharmacol Toxicol Methods. 2011. V. 63. P. 137-142.
19. *Минасян А. Л., Азнаурян А. В., Чавушян В. А. и др.* В кн.: Матер. Всерос. конф. с междунар. участием. М. Изд-во Рос. академии мед. наук. 2012. С. 328-333.
20. *Sarkissian J. S., Minasyan A. L., Aznauryan A. V. et al.* – The New Armenian Medical Journal. 2013. V. 7. № 1. P. 33-51.
21. *Harvey L.* – Quality in Higher Education. 2001. V. 7. № 2. P. 97-109.
22. *Costa S. K., Esquisatto L. C., Camargo E. et al.* – Life Sci. 2001. V. 6. P. 1573-1585.
23. *Faure G.* – Biochimie. 2000. V. 82. P. 833-840.
24. *Cook N. S., Quast U.* In: Potassium Channels, Structure, Classification, Function and Therapeutic. Ed. Cook N.S. Chichester. Ellis Horwood Ltd. 1990. P. 181-255.
25. *Moreira C. G., Barbiero J. K., Ariza D. et al.* – Neurotox. Res. 2012. V. 21. № 3. P. 291-301.

26. *Paxinos G., Watson C.* The rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 5th ed. Elsevier. Academic Press. 2005. 367 p.
27. *Меликсетян И. Б.* – Морфология. СПб. 2007. Т. 131. № 2. С. 77-80.
28. *Streit W. J., Conde J. R., Fendrick S. E. et al.* – *Neurol Res.* 2005. V. 27. № 7. P. 685-691.
29. *Gao X. F., Wang W., Yu Q. et al.* – *Purinergic Signal.* 2011. V. 7. № 1. P. 65-72.
30. *Никулеску И.Т.* (ред). Патоморфология нервной системы. Бухарест. Медицинское изд-во. 1963. 987 с.
31. *Kalaitzakis M. E., Graeber M. B., Gentleman S. M. et al.* – *Acta Neuropathol.* 2008. V. 116. P. 125-128.