УДК 616.858-008.6;611.018.82

Изменение соотношения возбудительных и тормозных синаптических процессов в кортиконигральной проекции на модели болезни Паркинсона с протекцией ядом *Naja naja oxiana*

Л. М. Хачатрян

Государственный институт физической культуры и спорта Армении
0070, Ереван, ул. А. Манукяна, 11
Институт физиологии им.акад. Л.А. Орбели НАН РА
0028, Ереван, ул. Бр.Орбели, 22

Ключевые слова: ротеноновая модель болезни Паркинсона, первичная моторная кора мозга (M1), компактный (c) и ретикулярный (r) отделы черной субстанции (SN)

Черная субстанция (*Substantia nigra* – SN) – важная нейрональная структура, осуществляющая регуляцию базальных ганглиев (БГ) через нигростриатный путь. Постеромедиальная область SN *pars compacta* (SNc) связана с дорзальным стриатумом [16]. Антеролатеральная зона SN *pars reticulate* (SNr) – состоит из ГАМКергических нейронов, воспринимающих афференты от стриатума и субталамического ядра. SN, осуществляя регуляцию БГ [7], вовлекается в различные нейрологические и нейропсихиатрические болезни, в частности болезнь Паркинсона (БП) [4]. Согласно данным, на грызунах SNr – большая выходная инстанция БГ, воспринимающая информацию от мозговой коры через три главных пути, прямой тормозной трансстриатный, непрямой возбудительный трансстриатный, который вовлекает паллидум и субталамус и прямой возбудительный транссубталамический [10]. Недавно доказано существование кортиконигральной проекции у людей. Menke et al. [15], применив вероятностную диффузионную тензорную магнитно-резонансную томографию с целью дифференциации взаимоотношений SNc и SNr с мозговой корой посредством таламуса, показали высочайший профиль связи SNc с префронтальной корой (ПФК). Kwon H.G. and Jang S.H. описали связь SN с различными структурами мозга – мозолистое тело, первичная сенсорная кора, премоторная кора [12]. Одностороннее удаление фронтальной коры сопровождается значительной редукцией глутаминовой кислоты в ипсилатеральной SN, при неизменном содержании ГАМК, что свидетельствует о глутамате в качестве передатчика в кортиконигральном тракте [5,11].

Корковый контроль среднего мозга – один из важных механизмов, которым глутаматергический вход прямо или непрямо может управлять дофаминергическими клетками [20]. Проведена оценка корковых связей SN *in vivo* у человека [3]. Обнаружено, что связи SN с мозговой корой вовлекают ПФК, пре- и постцентральную извилины и верхнюю париетальную долю. Тем самым, подкреплена гипотеза, что SN является не только частью сети подкорковых БГ, но также обладает связью с корой, посредством дополнительного параллельного круга. Представлены трактографические находки наличия кортиконигрального пути у людей, подтверждающие ранее существующую литературу, основанную на исследованиях на животных [3].

Предметом настоящей работы явилось изучение повреждения кортиконигральных связей в результате интоксикации ротеноном с последующим исследованием эффекта змеиного яда среднеазиаткой кобры *Naja naja oxiana*. Изучалась импульсная активность нейронов SNc и SNr в условиях активации первичной моторной коры мозга (M1).

Материал и методы

Проводили электрофизиологические исследования на 32 крысах-самцах линии Альбино (250г.) в трех сериях: интактная (n=11), на модели БП, индуцированной унилатеральным введением ротенона и выдержанных 4 нед. (n=12) и в условиях протекции NOX (n=9). Введение ротенона (12 мкг в 0.5 мкл димексида) осуществляли в стереотаксическом аппарате в условиях нембуталового наркоза (40 мг/кг, в/б) в “medial forebrain bundle” по координатам стереотаксического атласа [19] (AP+0,2; L±1,8; DV+8 мм). Яд NOX вводили в дозе 5% от LD 50 (1 мг/кг). Исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями руководства ARRIVE [9]. Раздражающий электрод вживляли в ипсилатеральную M1 по координатам (AP+2,1; L±2,6; DV+1,6 мм), а стеклянные микроэлектроды (1-2 мМ, 2M NaCl) вводили в SNc (AP-5,0; L±2,0; DV+8,1 мм) и SNr (AP–5,1; L±2,0; DV+8,6 мм) для экстраклеточной регистрации спайковой активности. Высокочастотная стимуляция (ВЧС) MI – прямоугольные толчки тока (длительность 0,05 мс, амплитуда 0,12–0,18 мВ, сила тока 0,32 мА и частота 100 Гц в течение 1сек). Регистрацию осуществляли на наркотизированных уретаном животных (urethane 1.5 г/кг и/п). Зарегистрирован 701 нейрон.

Активность проявлялась в виде тетанической потенциации (ТП) и депрессии (ТД) с посттетаническими – ПТП и ПТД. Использовался t-критерий Стьюдента. Учет критических значений, в сравнении с таковыми нормального распределения при уровнях 0,05; 0,01 и 0,001, показал, что в большинстве случаев спайкинга статистически значимое изменение достигало как минимум уровня 0,05.

Результаты и обсуждение

В нейронах SNc при ВЧС М1 в депрессорных последовательностях ТД, в условиях применения NOX на модели БП, достигала 1,73- и 1,78-кратного занижения, что является выше нормы (1,55- и 1,50-кратное) (рис. 1 А, Б, В, Г). Это свидетельствует о восстановлении депрессорных эффектов. В возбудительной последовательности ТП в нейронах SNc после применения NOX выявлялась в пределах 1,98- и 1,73-кратного значений, в то время как в норме и БП (2,00-, 1,58-кратного и 3,31-, 3,04-кратного соответственно) (рис. 1 Д, Е, Ж, З). Таким образом, в результате протекции NOX, показано противодействие эксайтотоксичности в условиях патологии, т.е. наблюдался протекторный эффект яда NOX.

В нейронах SNr при ВЧС М1 на модели БП с протекцией NOX в депрессорных последовательностях ТД достигала 1,5-кратного занижения (в норме и при БП 2,05-, 2,07- и 1,21-, 1,23-кратного соответственно) (рис. 2 А, Б, В, Г, Д, Е). В возбудительных последовательностях ТП в нейронах SNr под воздействием NOX исчислялась в пределах 1,09- и 1,10-кратного завышения, в сравнении с нормой и БП (4,87-, 2,21- и 1,38-, 1,60-кратного соответственно) (рис. 2 Ж, З, И, К, Л, М), т.е. в нейронах SNr при протекции NOX депрессорные эффекты оказались выше, чем в патологии, а возбудительные – ниже, чем в патологии. Очевидное проявление протекторного эффекта яда NOX.

В нейронах SNc при ВЧС MI на модели БП с протекцией NOX престимульная частота в депрессорных проявлениях определялась 17,20 и 11,73, в то время как в норме она достигала 14,70 и 9,10 при полном отсутствии депрессорных проявлений на модели БП (рис. 1 А, Б, В, Г). На модели БП престимульная частота при возбудительных эффектах превышала таковые в норме и была в пределах 25,4 и 23,7 против 11,10 и 15,77 в норме (рис 1 И, К, Ж, З). В условиях протекции NOX престимульная частота при возбудительных реакциях достигла 18,90 и 25,68, т.е. получено снижение эксайтотоксичности (рис. 1 А, Б). Иными словами, в условиях применения NOX имело место восстановление депрессорной активности и снижение эксайтотоксичности при возбудительных эффектах.

Постстимульная частота нейронов SNc на модели БП при возбудительных проявлениях реакций составляла 84,3 и 72,27 против 22,2 и 25,0 в норме (рис. 1 И, К, Ж, З). В условиях протекции NOX постстимульная частота нейронов SNc была в пределах 37,45 и 44,44, т.е. имело место двукратное снижение частоты в сравнении с патологией (рис. 1 Д, Е). Это свидетельствует о снижении эксайтотоксичности с приближением к норме. Таким образом, в результате ротеноновой интоксикации наблюдается эксайтотоксичность, которая значительно снижается в условиях протекции NOX. В нейронах SNr на модели БП уровни престимульной частоты в депрессорных последовательностях, в сравнении с нормой, определялись в пределах 30,34

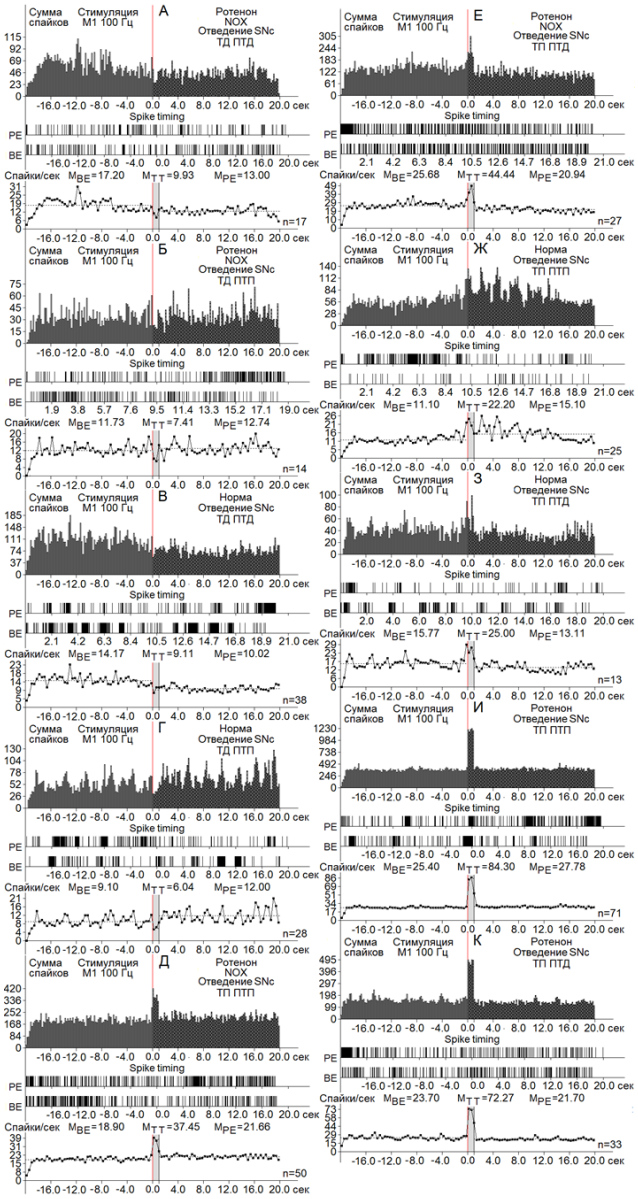

Рис. 1. А-Г – гистограммы суммы спайков пре- и постстимульных депрессорных проявлений активности ТД ПТД (А, В), в сочетании с возбудительными – ТД ПТП (Б, Г), возбудительных – ТП ПТП (Д, Ж, И), в сочетании с депрессорными (Е З, К) в реальном времени 20 сек (до и после стимуляции) нейронов SNc, вызванных ВЧС М1 в условиях протекции NOX на модели БП (А, Б, Д, Е), в норме (В, Г, Ж, З) и на модели БП (И, К). Здесь и на остальных рисунках: диаграммы частоты спайков, представленных в гистограммах, с усредненными значениями (М) для временных отрезков до стимуляции (BE – before event), на время тетанизации (TT – time tetanization) и после стимуляции (PE – post event). Справа от диаграмм – количество испытаний (n)

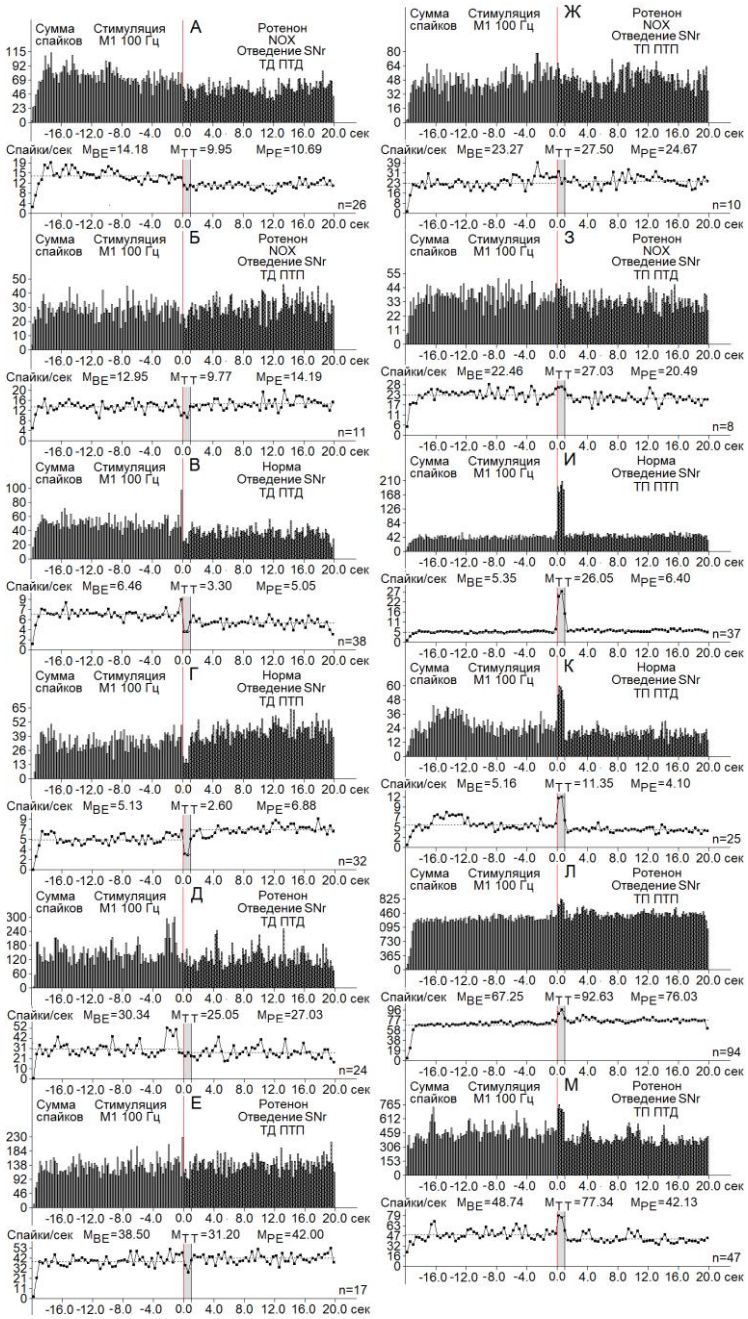

Рис. 2. А-Е – гистограммы суммы спайков пре- и постстимульных депрессорных проявлений активности (А, В, Д), депрессорно-возбудительных (Б, Г, Е), возбудительных (Ж, И, Л), возбудительно-депрессорных (З, К, М) в реальном времени 20 сек (до и после стимуляции) нейронов SNr, вызванных ВЧС М1 в условиях протекции NOX (А, Б), в норме (В, Г) и на модели БП (Д, Е).Справа от диаграмм – количество испытаний (n)

и 38,5 против 6,46 и 5,13 (рис. 2 А, Б, В, Г). В условиях протекции NOX на модели БП престимульная частота в депрессорных последовательностях исчислялась порядка 14,18 и 12,95, что оказалось ниже таковой при БП – 2,14- и 3,07-кратно, т.е. частота почти вернулась к норме (рис. 2 А, Б, Д, Е). Престимульная частота нейронов SNr, в двух возбудительных последовательностях на модели БП, достигала 67,25 и 48,74 против 5,35 и 5,16 в норме (рис. 2 Л, М, Ж, З). В условиях протекции NOX престимульная частота в возбудительных последовательностях достигала 23,27 и 22,46, т.е. 2,89- и 2,17-кратно ниже таковой на модели БП (рис. 2 Ж, З, И, К).

На модели БП постстимульная частота нейронов SNr в возбудительных последовательностях составила 92,63 и 77,34 против 26,05 и 11,35 в норме соответственно (рис. 2 Л, М, И, К). С протекцией NOX в нейронах SNr указанная частота достигла 27,50 и 27,03, что оказалось очень близким к норме (рис. 2 Ж, З). В условиях протекции достигнуто значительное снижение эксайтотоксичности.

Эксайтотоксичность является результатом сверхактивации глутаматных NMDA и AMPA рецепторов, содействующей повреждению нейронов [14] с их гибелью [13, 17]. Возникает она в результате развития кальциевой буферизации, генерации свободных радикалов, активации митохондриальной проницаемости и вторичной эксайтотоксичности. С целью их предотвращения необходимо восстановление и углубление депрессорных эффектов и снижение чрезмерных возбудительных эффектов [1].

В нейронах SNc выявлено восстановление депрессорных и возбудительных эффектов. В нейронах SNr при протекции NOX на модели БП уровни депрессорной и возбудительной активности оказались ниже нормы. В нейронах SNc без протекции выявлена значительная эксайтотоксичность, достаточно снижаемая NOX. Уровни пре- и постстимульной частоты нейронов SNr на модели БП без протекции показали мощное превышение нормы в результате эксайтотоксичности, NOX способствовал их снижению.

Приведенные результаты позволяют предполагать достаточнный терапевтический эффект использованного средства, достигаемый депрессией протекторного назначения. В основе депрессорных проявлений активности лежит торможение, опосредуемое тормозными моноаминами ГАМК или глицином. Нейрогенез в зрелом мозге находится под ГАМКергическим контролем и ГАМК действует в качестве фактора, влияющего на пролиферацию, миграцию, дифференциацию и созревание синапса, клеточную гибель и экспрессию рецептора ГАМКА [18], что предусматривает универсальное протекторное назначение обусловленного им торможения. Установлена решающая роль ГАМК рецептором опосредованных событий при вестибулярной компенсации [6, 8]. Таким образом, текущие исследования позволили утверждать, что синаптическое торможение обеспечивает высоко специфические функции в нервной системе млекопитающих [2].

Поступила 23.10.20

Պարկինսոնի հիվանդության մոդելի վրա կորտիկոնիգրալ պրոյեկցիայում դրդող և արգելակող սինապտիկ պրոցեսների հարաբերակցության փոփոխությունը՝ *Naja naja oxiana* թույնի պրոտեկցիայով

Լ.Մ. Խաչատրյան

Էքսպերիմենտների Ալբինո ցեղատեսակի 32 առնետների վրա (250 գ) առաջնային շարժիչ կեղևի (M1) բարձր հաճախականության խթանմամբ (ԲՀԽ) իրականացվել է substantia nigra compacta – SNc (n=11) և reticulate – SNr (n=12) և NOX-ի պրոտեկցիայի պայմաններում (n=9). մեկական նեյրոնների իմպուլսային ակտիվության համեմատական վերլուծություն՝ նորմայում, Պարկինսոնի հիվանդության (ՊՀ) մոդելի վրա և միջինասիական կոբրայի *Naja naja oxiana* (NOX) թույնի պրոտեկցիայի պայմաններում: ՊՀ մոդելի վրա SNc նեյրոններում դեպրեսոր ակտիվությունը բացակայել է, սակայն դրդող էֆեկտները մեծացել են: SNc նեյրոնների հաճախականությունը նշանակալի բարձր է նորմայից: SNr նեյրոններում դեպրեսոր և դրդող էֆեկտներն իջել են: SNr նեյրոնների ակտիվության հաճախականությունը պաթոլոգիայում ցույց տվեց անհամեմատ բարձրացում նորմայից: Սա վկայում է էքսայտոտոքսիկության մասին: Պաթոլոգիայի պայմաններում դուրս է բերվել SNc նեյրոնների դեպրեսոր էֆեկտների մեծ խոցելիություն SNr-ի համեմատությամբ: NOX թույնի կիրառումից հետո SNc նեյրոններում վերականգնվել են դեպրեսոր էֆեկտները, և իջել՝ դրդողները: Հաճախականությունը կտրուկ իջել է: SNr նեյրոնները NOX կիրառումից հետո ցույց տվեցին էֆեկտների աննշան փոփոխություն: SNr նեյրոնների հաճախականությունը կտրուկ իջել է: Ցույց է տրված NOX թույնի ուժեղ դրական էֆեկտ:

Change of Ratio of Excitatory and Inhibitory Synaptic Processes in Cortico-nigral Projection on the Model of Parkinson's Disease with Protection of Venom *Naja naja oxiana*

L.M. Khachatryan

In a series of experiments on 32 Albino rats (250 g), the impulse activity of the *substantia nigra* compacta - SNc (n=11) and reticulate - SNr neurons (n=12) and under NOX protection (n=9) during high-frequency stimulation of the primary motor cortex (M1) on a PD model using snake venom of the Central Asian cobra NOX analyzed. In the PD model, there were no depressor

effects in SNc neurons, but the excitatory effects increased. The frequency of SNc neurons was significantly higher than in intact. The depressor and excitatory effects of SNr neurons decreased. The frequency activity of SNr neurons in pathology showed a powerful excess in comparison with the norm. This indicates excitotoxicity. The pathology revealed a greater vulnerability of depressive effects of SNc neurons in comparison with SNr. After the use of NOX venom in SNc neurons, depressor effects were restored and excitatory effects decreased. The frequency has dropped significantly. The neurons of the SNr after the application of NOX showed a slight change of effects. The frequency of SNr neurons dropped significantly. A strong positive effect of NOX poison has been shown.

Литература

1. *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.
2. *Birke G., Draguhn A.,* Simple Brake – the Complex Functions of Inhibitory. Pharmacopsychiatry. 2010, 43(S1): 21-31.
3. *Cacciola A., Milardi D., Quartarone A.* Role of cortico-pallidal connectivity in the pathophysiology of dystonia. Brain, 2016. doi: 10.1093/brain/aww102. [Epub ahead of print].
4. *Carman, J.B.* Anatomic basis of surgical treatment of Parkinson's disease. N. Engl. J. M. 1968, 17: 919–930.
5. *Frankle W.G., Laruelle M., Haber S.N.* Prefrontal cortical projections to the midbrain in primates: evidence for a sparse connection. Neuropsychopharmacology, 2006, 31: 1627–1636.
6. *Giardino L., Zanni M., Fernandez M., Battaglia A., Pignataro O., Calza' L.* Plasticity of GABA(a) system during ageing: focus on vestibular compensation and possible pharmacological intervention. Brain Res., 2002, 929 (1): 76-86.
7. *Guatteo E., Cucchiaroni M.L., Mercuri N.B.* Substantia nigra control of basal ganglia nuclei. J. Neural Transm. Suppl., 2009, 73: 91–101.
8. *Johnston A.R., Him A., Dutia M.B.* Differential regulation of GABA (a) and GABA (b) receptors during vestibular compensation. Neuroreport., 2001, 12: 597-600.
9. *Kilkenny C., Browne W.J., Cuthill I.C., Emerson M., Altman D.G.* Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. PLoS Biol., 2010, 8(6): e1000412.
10. *Kolomiets B.P., Deniau J.M., Glowinski J., Thierry A.M.* Basal ganglia and processing of cortical information: functional interactions between trans-striatal and trans-subthalamic circuits in the substantia nigra pars reticulate. Neuroscience., 2003, 117(Issue 4): 931-938.
11. *Kornhuber J.* The cortico-nigral projection: reduced glutamate content in the substantia nigra following frontal cortex ablation in the rat. Brain Res., 1984, 322:124–126.
12. *Kwon H.G., Jang S.H.* Differences in neural connectivity between the substantia nigra and ventral tegmental area in the human brain. Front. Hum. Neurosci. 2014, 8:41
13. *Lucas D.R., Newhouse J.P.* The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. AMA Archives of ophthalmology, 1957, 58(2): 193–201.
14. *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.
15. *Menke R. A., Jbabdi, S., Miller, K. L., Matthews, P. M., and Zarei, M.* Connectivity-based segmentation of the substantia nigra in human and its implications in Parkinson's disease. Neuroimage., 2010, 52: 1175–1180.

16. *Nestler E.J., Hyman S.E., Malenka R.C.* Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience. New York, NY: McGraw-Hill Medical., 2009.
17. *Olney J.W.* Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate Science., 1969,164(3880): 719–721.
18. *Owens D.F., Kriegstein A.R.* Is there more to GABA than synaptic inhibition. Nat. Rev. Neuroscience,2002, 3 (9): 715–727.
19. *Paxinos G., Watson C.* The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier, Academic Press, 5th ed., 2005. p.367.
20. *Sesack S.R, Carr D.B.* Selective prefrontal cortex inputs to dopamine cells: implications for schizophrenia. Physiol. Behav., 2002, 77: 513–517.