

УДК577,112,5;612,8;615,919;616,858

DOI:10.54503/0514-7484-2024-64.1-90

Соотношение возбуждательных и тормозных синаптических процессов в миндалевидном теле при стимуляции энторинальной коры мозга на модели болезни Паркинсона

А.С. Оганнисян

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

Ключевые слова: амигдала (*Amygdala*), энторинальная кора (*Entorhinal cortex*), ротеноновая модель болезни Паркинсона

Болезнь Паркинсона (БП) на сегодняшний день является неизлечимым заболеванием. В то время как двигательные симптомы БП хорошо известны и изучены, очень малоисследованными остаются таковые не двигательные. В частности, когнитивные нарушения являются одним из наиболее сложных аспектов развития данного заболевания. В связи с чем возникает необходимость изучения структур лимбической системы, поскольку эта система играет важную роль в когнитивных функциях. Одной из важных структур этой системы является энторинальная кора (*Entorhinal cortex* – ENT). БП является вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием и, по прогнозам, ее распространенность удвоится в следующем поколении. БП является вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием с глобальной распространенностью – более 6 млн человек. Это число соответствует 2,5-кратному увеличению распространенности за последнее время, что делает БП одной из ведущих причин неврологической инвалидности. Недавние исследования убедительно свидетельствуют о том, что прионоподобная передача от клетки к клетке и разрешающий шаблон синуклеина являются ключевыми механизмами прогрессирования заболевания [9]. При БП миндалевидное тело (*Amygdala* – Am) претерпевает серьезные патологические изменения. Тельца Леви и нейриты Леви особым образом распределяются по всему ядерному комплексу Am [1]. Am получает широкий спектр афферентов, что позволяет интегрировать экстероцептивную информацию с интероцептивными данными. Она формирует основные проекции на изокортекс (в частности, на префронтальную кору), лимбическую систему (гиппокамп и энторинальную область) и центры, регулирующие эндокринные и вегетативные функции [1]. Хотя данные свидетельствуют о том, что базолатеральная миндалина (*Basolateral*

amygdala – BLA) и дорсальный гиппокамп работают вместе, влияя на пространственную/контекстную консолидацию обучения, механизм схемы, с помощью которой BLA избирательно модулирует пространственную/контекстную консолидацию памяти, неизвестен. Медиальная энторинальная кора (mENT) является важной областью в системе гиппокампа для обработки пространственной информации и с помощью BLA влияет на консолидацию такого обучения [10]. Механизм, с помощью которого миндалины влияют на консолидацию пространственной/контекстной памяти, неизвестен.

В настоящем исследовании проведено изучение соотношения возбуждающих и депрессорных ответов одиночных нейронов Am при стимуляции ENT, с целью оценки механизмов их поражения на ротеноновой модели БП, в сравнении с нормой.

Материал и методы

Проведены электрофизиологические исследования на 13 крысах линии Альбино (250г): интактных ($n=7$), на ротеноновых моделях БП, индуцированных унилатеральным введением ротенона и выдержанных до опыта 4 нед. ($n=6$). 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 [7] (AP+0,2; $L\pm 1,8$; DV+8 мм). Исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями руководства ARRIVE [3]. В стереотаксическом аппарате производили трепанацию черепа от брегмы до лямбды и вскрывали твердую мозговую оболочку. Стеклообразные микроэлектроды с диаметром кончика 1-2 мкм, заполненные 2M NaCl, вводили в Am согласно стереотаксическим координатам (AP–3,24; $L\pm 5,4-5,8$; DV+9,5-10,2 мм) для экстраклеточной регистрации спайковой активности одиночных нейронов. Осуществляли высокочастотную стимуляцию (ВЧС) ENT 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–11; $L\pm 3,5$; DV+4,0 мм). Операции осуществляли на наркотизированных животных (уретан 1,2 г/кг, в/б), зафиксированных в стереотаксическом аппарате.

Активность проявлялась в виде тетанической депрессии (ТД) и тетанической потенциации (ТП) с последующей посттетанической потенциацией (ПТП) и посттетанической депрессией (ПТД) различной латенции, выраженности и длительности. Проводили программный математический анализ одиночной спайковой активности 201 нейрона. 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 в отдельности для пре- и постстимульного отрезков времени и периода ВЧС. 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 Манна-Уитни Вилкоксона (Wilcoxon-Mann-Whitney test), в качестве непараметрического, оценивающего однородность независимых двух выборок. Так как число регистрируемых спайков было достаточно велико (до нескольких сотен спайков за 20 сек интервал после действия стимула), использовалась разновидность указанного теста, z-тест, определяющего его асимптотическую нормальность. Учет критических значений, в сравнении с таковыми нормального распределения, при уровнях значимости 0,05; 0,01 и 0,001 (для различных испытаний) показывает, что нейрональная активность при постстимульной активации имеет статистически значимое изменение, как минимум 0,05. Иными словами, статистическая достоверность данных достигается в результате приведенного online математического анализа с использованием стандартной ошибки для соответствующих временных отрезков анализа.

Результаты и обсуждение

Производили экстраклеточную регистрацию спайковой активности одиночных нейронов Am в норме (107 нейронов, n=7) и на модели БП (94 нейрона, n=6).

При частотном анализе получены значения, представленные в виде дисковых диаграмм для наглядного представления степени выраженности, в том числе и в частотном отображении на рис. 3 (на основе рис. 1, 2), которые привели к следующему выводу. Значения ТД в депрессорной и депрессорно-возбудительной последовательности и уровни ТП в возбудительной и возбудительно-депрессорной последовательности нейронов Am при ВЧС ENT в норме достигали 1,72- и 1,37-кратного снижения и 1,65- и 1,51-кратного превышения (рис. 1 А-Г, 3 А-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 последовательности и уровни ТП в возбудительной последовательности нейронов Am при ВЧС ENT, в

сравнении с престаимпульным уровнем активности, также не отличались достаточно (1,15- против 1,72- и 1,65- против 1,12-кратного) (рис. 2 А-Г; 3 А-Г), что свидетельствует об отсутствии превалирования возбудительных постстимульных проявлений активности над депрессорными на этом уровне анализа.

Другая картина была выявлена при анализе пре- и постстимульной частоты активности нейронов Am при ВЧС ENT в указанных экспериментальных условиях. Престаимпульная частота активности, предшествующая депрессорным эффектам в норме и на модели БП достигала кратных значений 6,20; 5,15 и 42,47; 0,00 соответственно, а предшествующая возбудительным последовательностям – 4,09; 3,30 и 39,62; 0,00 соответственно (рис. 1 А-Г; 3 Д-З). Иными словами, в патологии, в сравнении с нормой, престаимпульная частота активности, предшествующая депрессорному постстимульному эффекту, повысилась 39,27-кратно.

Престаимпульная частота, предшествующая возбудительной последовательности, также претерпела значительное повышение (39,62 против 4,09, т.е. 9,68-кратно), что, очевидно, свидетельствует о мощной эксайтотоксичности на модели БП.

Что же касается постстимульной частоты активности нейронов Am на ВЧС ENT, то в норме, будучи сопровождаемой депрессорными и возбудительными постстимульными эффектами, она достигала 3,60; 3,75; 6,75 и 5,00, а на модели БП 36,76; 0,00; 44,62 и 0,00 (рис. 1 А-Г; 2 А, Б; 3 И-М). Иными словами, постстимульная частота активности на модели БП, сопровождаемая депрессорной и возбудительной активностью превысила норму 10,21- и 6,61-кратно. Таким образом, имело место мощное повышение частоты постстимульной активности, свидетельствующая также, как и в случае престаимпульной частоты, о громадной эксайтотоксичности.

В заключение, на модели БП выявлена мощная эксайтотоксичность, возникающая при нейродегенеративных заболеваниях в качестве компенсаторной реакции на снижение возбуждения в результате гибели нейронов, что повреждается их сверхактивацией глутаматных NMDA и AMPA рецепторов [5], тем самым вызывая апоптоз нейронов и последующую гибель [4, 6].

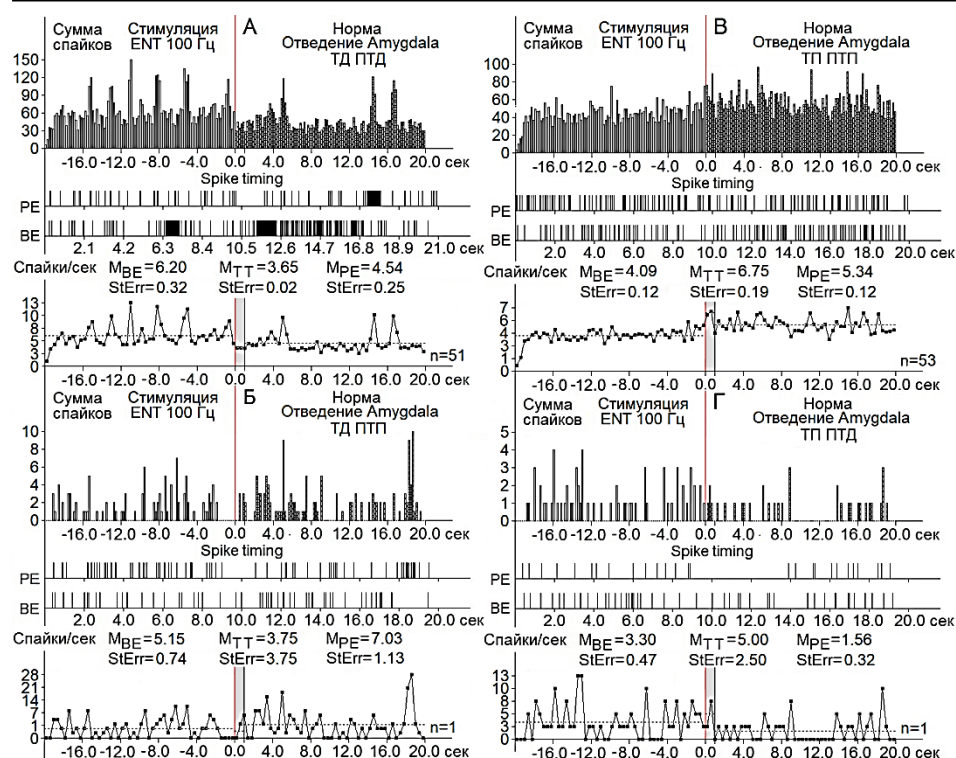


Рис. 1. А-Г – гистограммы суммы спайков пре- и постстимульных депрессорных проявлений активности ТД ПТД (А), в сочетании с возбудительными – ТД ПТП (Б), возбудительных – ТП ПТП (В) и возбудительно-депрессорных (Г), в реальном времени 20 сек (до и после стимуляции) нейронов Am, вызванных ВЧС ENT в норме. Здесь и на следующем рисунке 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), а также стандартной ошибки (StErr) в тех же пределах. Справа от диаграмм – количество испытаний (n)

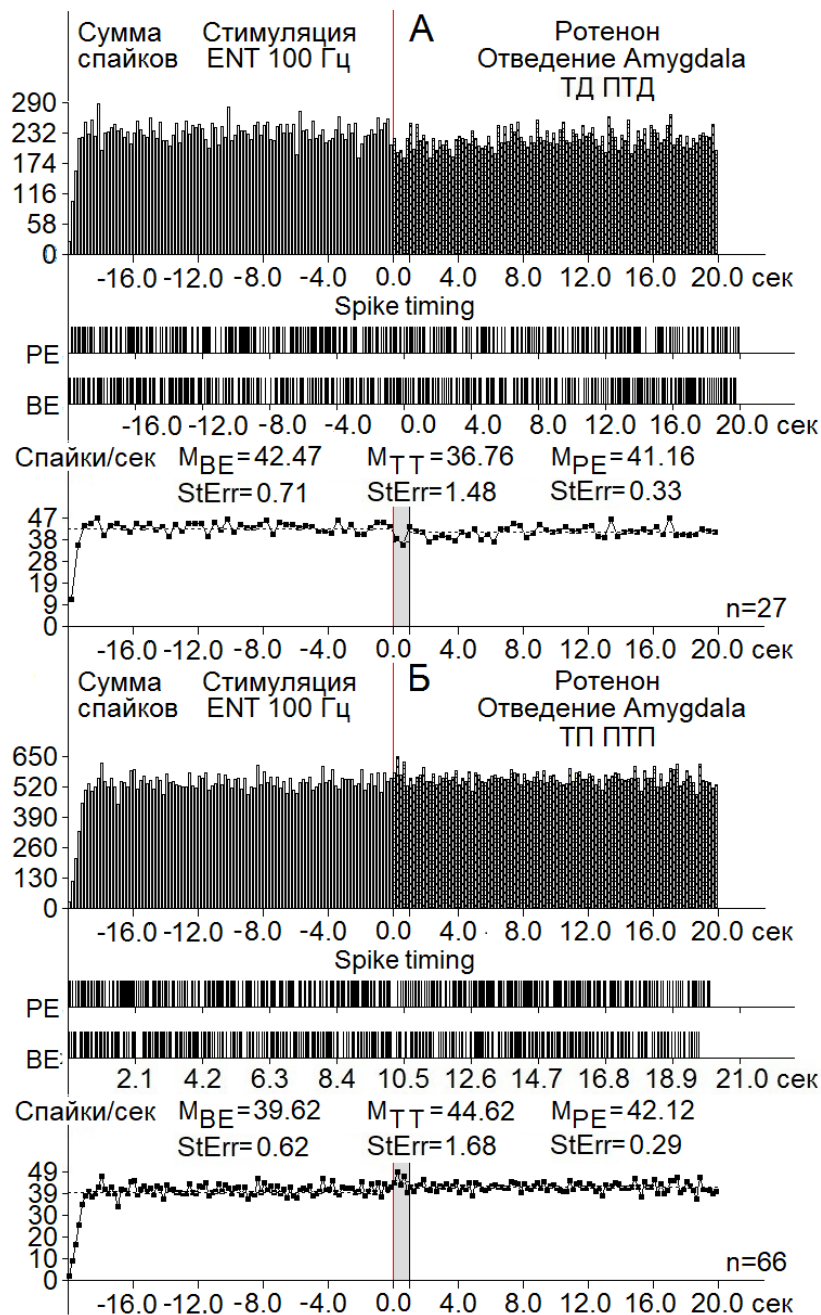


Рис. 2. А, Б – перистимульные гистограммы суммы спайков с диаграммой частоты спайков, с усредненными значениями, сконструированные на основе пре- и постстимульных тетанических депрессорных в сочетании с депрессорными (А) и возбудительных в сочетании с возбудительными (Б) проявлениями спайковой активности одиночных нейронов Am при ВЧС ENT на модели БП. Справа от диаграмм – количество испытаний (n)

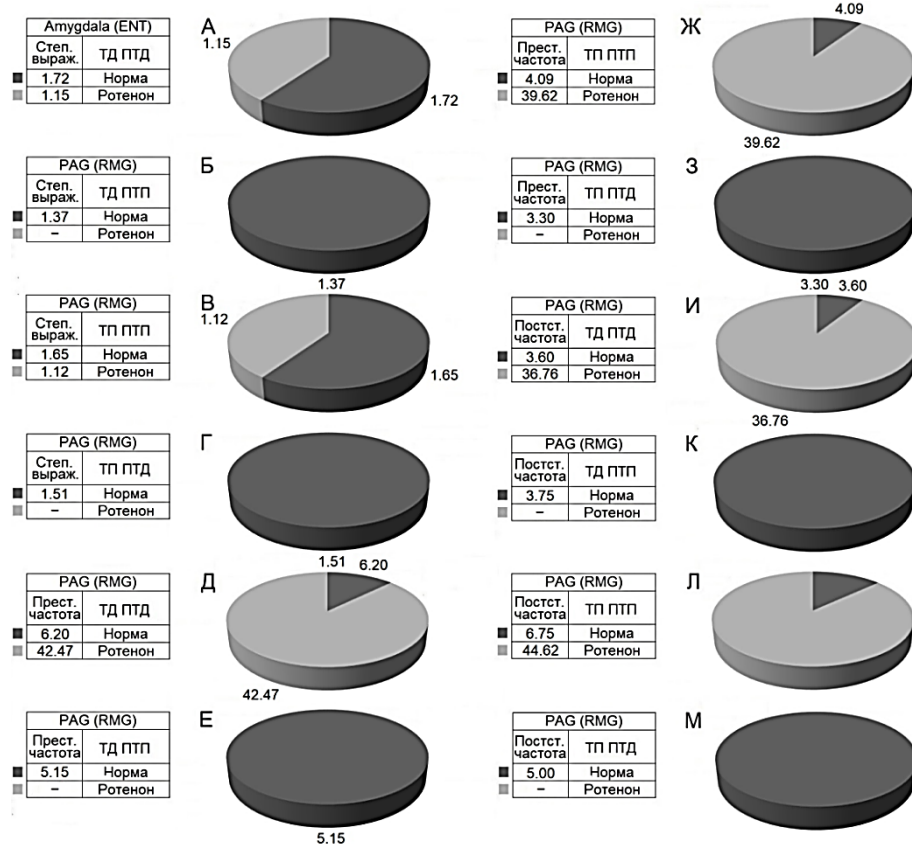


Рис. 3. А-М – соотношение степени выраженности (по усредненной частоте А-Г), депрессорных (ТД ПТД), депрессорно-возбудительных (ТД ПТП), возбудительных (ТП ПТП) и возбудительно-депрессорных (ТП ПТД) постстимульных эффектов в одиночных нейронах Am при ВЧС ENT, а также частоты престоимulatory (Д-З) и постстимульной (И-М) активности, предшествующих и сопровождающих указанные проявления постстимульной активации, в норме и на ротеноновой модели БП. Обозначения: степ. выраж. – степень выраженности, прест. – престоимulatory, постст. – постстимульная

Эксайтотоксичность сопровождается нарушением кальциевой буферизации, генерацией свободных радикалов, активацией митохондриальной проницаемости и вторичной эксайтотоксичности [2]. Отмеченное, согласно концепции, выдвинутой в недавно опубликованном сообщении, свидетельствует о необходимости углубления, в условиях нейродегенерации, депрессорных эффектов, несущих протекторную нагрузку и снижающих чрезмерные возбудительные реакции [8].

Поступила 22.01.24

Նշաձև մարմնում գրգռող և արգելակող սինապտիկ պրոցեսների հարաբերակցությունն էնտորինալ կեղևի խթանմանը Պարկինսոնի հիվանդության մոդելում

Ա. Ս. Հովհաննիսյան

Էլեկտրաֆիզիոլոգիական հետազոտություն ամիգդալայի (Am) 201 միայնակ նեյրոնների գրանցմամբ էնտորինալ կեղևի (ENT) բարձր հաճախականությամբ խթանման ժամանակ (ԲՀԽ) 13 ավրինո առնետների վրա (250 ± 30 գ), նորմայում ($n=7$), Պարկինսոնի հիվանդություն (ՊՀ) ռոտենոնային մոդելի վրա, որն առաջացել է ռոտենոնի միակողմանի ընդունմամբ և պահպանվել է մինչև 4 շաբաթ ($n=6$): Am-ի նեյրոններում ENT-ի ԲՀԽ-մբ ՊՀ-ի մոդելում, նորմայի համեմատ, հայտնաբերվել է զգալի էքսայտոտոքսիկություն: Նեյրոդեգեներացիային ուղեկցող էքսայտոտոքսիկության հաստատման հիմքը եղել է ակտիվացման նախա- և հետխթանման հաճախականության հետագա մանրամասն վերլուծությունը, որը նախորդել և ուղեկցվել է գրգռիչ և դեպրեսորային հետգրգռիչ տեսանիկ ազդեցություններով: ENT-ի ԲՀԽ-մբ Am նեյրոնների ակտիվացման նախախթանման հաճախականության վերլուծությունից, որին նախորդում էին դեպրեսորային և գրգռիչ հետտեսանիկ ռեակցիաները ՊՀ մոդելի վրա, հանգեցինք այն եզրակացության, որ դեպրեսորային հետխթանիչ էֆեկտին նախորդող ակտիվության նախախթանման հաճախականությունն աճել է 39,27 անգամ: Գրգռիչ հաջորդականությանը նախորդող նախախթանային հաճախականությունը նույնպես ենթարկվել է զգալի աճի (39,62 ընդդեմ 4,09-ի, այսինքն՝ 9,68 անգամ), ինչը հստակորեն ցույց է տալիս ՊՀ մոդելի հզոր էքսայտոտոքսիկությունը: ՊՀ մոդելի ակտիվացման հետխթանային հաճախականությունը, որն ուղեկցվում է դեպրեսորային և գրգռիչ ակտիվությամբ, գերազանցել է նորման 10,21 և 6,61 անգամ: Նշվում է, որ ընդհանուր առմամբ ՊՀ մոդելի վրա բացահայտվել է հզոր էքսայտոտոքսիկություն, որը սովորաբար տեղի է ունենում նեյրոդեգեներատիվ հիվանդությունների դեպքում՝ որպես փոխհատուցման պատասխան գրգռման նվազմանը:

The Ratio of Excitatory and Inhibitory Synaptic Processes in the Amygdala to Stimulation of the Entorhinal Cortex on a Model of Parkinson's Disease

A. S. Hovhannisyan

The electrophysiological investigation by recording 201 single neurons of amygdala (AM) at high frequency stimulation (HFS) of the entorhinal cortex (ENT) on 13 albino rats (250 ± 30 g.): intact ($n=7$), on the rotenone model of Parkinson's disease (PD) induced by unilateral administration of rotenone and sustained up to 4 weeks ($n=6$). In neurons of amygdala at high frequency stimulation of the entorhinal cortex on

the model of PD, in comparison with the norm, significant excitotoxicity was found. The basis for the assertion of excitotoxicity accompanying neurodegeneration was the follow-up detailed analysis of pre- and poststimulus frequency of activation, preceded and accompanied by excitatory and depressor poststimulus tetanic effects. Analysis of the prestimulus frequency of activation of AM neurons at high frequency stimulation of the entorhinal cortex, preceded by depressor and excitatory post-tetanic reactions on PD models, led to the conclusion that the prestimulus frequency of activity preceding the depressor post-stimulus effect increased 39,27-fold. The prestimulus frequency preceding the excitatory sequence also underwent a significant increase (39,62 versus 4,09, i.e., 9,68-fold), which clearly indicates powerful excitotoxicity on the PD model. Poststimulus frequency of activation of the PD model, accompanied by depressor and excitatory activity, exceeded the norm by 10,21- and 6.61-fold. It is noted that a powerful excitotoxicity, which usually occurs in neurodegenerative diseases, as a compensatory response to decreased excitation, was revealed on the PD model.

Литература

1. Braak H., Braak E., Yilmazer D., de Vos R. A. I., Jansen E. N.H., Bohl J. & Jellinger K. Amygdala pathology in Parkinson's disease *Acta Neuropathologica*, 1994, 88: 493–500.
2. Dong X. X., Wan Y., Qin Z. H. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2009, 30: 379–387.
3. Kilkenny C., Browne W., Cuthill I. C., Emerson M., Altman D. G. Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines, 06 July 2010.
4. 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.
5. Matthew R. H., Heather L. S., Peter R. D. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *NCI*, 2004, 45 (5): 583–595.
6. Olney J. W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with Monosodium glutamate. *Science*, 1969, 164(3880):719–721.
7. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier, Academic Press, 5th ed., 2005, p. 367.
8. Sarkissian J. S., Poghosyan M. V., Danielyan M. A., Stepanyan H. Y, Vardanyan A. V. The assign of depressor synaptic processes in condition of specific neurodegenerative pathology and protection. *LAP LAMBERT Academic Publishing RU*, 2018, p. 252 (in Russ).
9. Steiner JA., Quansah E., Brundin P. The concept of alpha-synuclein as a prion-like protein: ten years after. *Cell Tissue Res.*, 2018, 373(1): 161–173.
10. Wahlstrom K. L., Huff M. L., Emmons E. B., Freeman J. H., Narayanan N. S., McIntyre C. K. and LaLumiere R. T. Basolateral Amygdala Inputs to the Medial Entorhinal Cortex Selectively Modulate the Consolidation of Spatial and Contextual Learning. *Journal of Neuroscience*, 2018, 38(11): 2698–2712.