

Экспериментальная и профилактическая медицина

УДК 577,112,5;612,8;615,919;616,858

DOI: 10.54503/0514-7484-2025-65.3-74

Изучение воздействия меланина на функциональную активность нейронов энторинальной коры мозга на модели болезни Альцгеймера**А.С. Оганесян, М.В. Погосян, М.А. Даниелян, А.Л. Минасян,
А.Ю. Степанян, Дж.С. Саркисян***Институт физиологии им. акад. Л.А. Орбели НАН РА
0028, Ереван, ул. Бр. Орбели, 22*

Ключевые слова: энторинальная кора, базолатеральная амигдала, амилоидная модель болезни Альцгеймера, бактериальный меланин

Болезнь Альцгеймера (БА) является основной причиной деменции и быстро становится одним из самых дорогостоящих, смертельных и отягощающих заболеваний нашего столетия [11]. В 2018 году Международная организация по борьбе с БА оценила распространенность деменции примерно в количестве 50 млн человек во всем мире, которая, по прогнозам, утроится к 2050 году, причем две трети из них проживают в странах с низким и средним уровнем дохода [4]. В последние годы демографическая ситуация в высокоразвитых странах мира меняется в сторону старения населения. Среди заболеваний, которые в настоящее время чаще всего диагностируются у пожилых людей, большой процент составляют нейродегенеративные заболевания. Болезнь Альцгеймера – один из наиболее часто диагностируемых случаев старческого слабоумия в мире. Это неизлечимый процесс, чаще всего приводящий к смерти пациента [14]. В развитых странах примерно 1 из 10 пожилых людей (старше 65 лет) страдает той или иной степенью деменции, в то время как более трети очень пожилых людей (старше 85 лет) могут иметь симптомы и признаки, связанные с деменцией [9].

Это заболевание бросает серьезный вызов глобальному здравоохранению из-за своей сложной и многофакторной природы. Помимо генетической предрасположенности, на развитие БА влияет множество факторов риска, включая старение, системные воспаления, хронические заболевания, образ жизни и воздействие окружающей среды [16]. БА представляет собой целый спектр клинических симптомов, первоначально проявляющихся в виде ранних амнестических когнитивных нарушений и трудностей с кратковременной памятью [13]. По мере прогрессирования БА у больных могут наблюдаться нарушения комплексного внимания, экспрессивной речи, зрительно-прос-

пространственной обработки и исполнительных функций [12]. Нейропсихиатрические симптомы часто сопровождают когнитивный дефицит при БА, особенно на ранних стадиях, когда преобладают тревога, депрессия и апатия. По мере прогрессирования заболевания у пациентов могут развиваться дополнительные симптомы, включая бред, галлюцинации, возбуждение/агрессию и раздражительность/лабильность [3].

Патологически БА характеризуется внеклеточным отложением β -амилоида (A β) и внутриклеточным накоплением гиперфосфорилированного тау (pTau), образующих сенильные бляшки и нейрофибриллярные клубки (NFT) соответственно [2–4]. Клинически БА ассоциируется с ухудшением памяти, часто сопровождающимся афазией, агнозией, нарушением зрительно-пространственных способностей, трудностями в абстрактном мышлении и решении проблем, а также изменениями личности и поведения [7].

Энторинальная кора (ENT) – это область мозга, в которой часто наблюдаются самые ранние гистологические изменения при БА, включая образование нейрофибриллярных клубков и гибель клеток. Недавно исследования изображений головного мозга у доклинических пациентов с БА и электрофизиологические записи, полученные на животных моделях БА, показали, что нарушение нейрональной активности в ENT предшествует нейродегенерации. Это означает, что нарушения памяти и пространственной ориентации на начальной стадии БА, скорее всего, вызваны нарушением активности, а не гибелью клеток [5]. В результате чего возникает необходимость поиска новых терапевтических средств с целью улучшения функционального состояния нейронов энторинальной коры.

В настоящей статье представлены результаты исследования влияния меланина на импульсную активность нейронов энторинальной коры в условиях модели болезни Альцгеймера.

Материал и методы

Проведены электрофизиологические исследования на 15 крысах линии Альбино (250 г): интактных (n=4), на амилоидной модели БА, индуцированной билатеральным интрацеребровентрикулярным введением A β 25–35, и выдержанных до опыта 12 нед. (n=4) и с протекцией бактериальным меланином (по 14 **инъекций** через день в дозе 1,25 мг/кг) (n=7). Введение A β 25–35 осуществляли в условиях нембуталового наркоза (40 мг/кг, в/б) по стереотаксическим координатам (AP–1; L \pm 1,5; DV+3,5 мм) [8]. Вводили по 3 мкл 10^{–9} М фрагментов Ab 25–35 (агрегированного при t 37°C в течение 4 дней). Исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями руководства ARRIVE [6]. В стереотаксическом аппарате производили трепанацию черепа от брегмы до лямбды и вскрывали твердую мозговую оболочку. Стекланные микроэлектроды (диаметр кончика 1–2 мкм), заполненные 2M NaCl, вводили в ENT, согласно стереотаксическим ко-

ординатам (AP–2,76; L±1,5; DV+2,9 мм), для экстраклеточной регистрации спайковой активности одиночных нейронов. Осуществляли высокочастотную стимуляцию (ВЧС) ВЛА 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±3,5; DV+4,0 мм). Операции осуществляли на наркотизированных животных (уреган 1,2 г/кг, в/б), зафиксированных в стереотаксическом аппарате.

Активность проявлялась в виде тетанической депрессии (ТД) и тетанической потенциации (ТП), с последующей посттетанической депрессией (ПТД) и посттетанической потенциацией (ПТП). Была проанализирована импульсная активность 248 нейронов. Активность оценивалась online регистрацией и программным математическим анализом. Проводилась селекция спайков посредством амплитудной дискриминации с выводом растров перистимульного спайкинга нейронов, построением гистограмм суммы и диаграмм усредненной частоты спайков. Использовался t-критерий Стьюдента и критерий Манна-Уитни Вилкоксона. 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 имеет статистически значимое изменение, как минимум, на уровне 0,05. 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 ENT в норме (56 нейронов, n=4) и на модели БА (72 нейрона, n=4) и в условиях протекции бактериальным меланином (120 нейронов, n=7). Посредством анализа на основе усредненного количества спайков (PETH), с пересчетом в межимпульсные интервалы и частоты в Гц (Frequency Average), были обнаружены следующие изменения нейрональной активности. При оценке степени выраженности депрессорных и возбудительных эффектов, на примере диаграмм усредненной частоты спайков, выведенных на основе растров пре- и постстимульных депрессорных и депрессорно-возбудительных проявлений спайковой активности нейронов ENT в норме, на модели БА и в условиях протекции меланином, с указанием средних цифровых значений в реальном времени 20 сек до и после ВЧС, получены представленные в виде дисковых диаграмм, для более наглядного представления степени выраженности в частотном отображении (в % и цифровом выражении) экспериментальных данных на рис. 4 (на основе рис. 1–3), которые привели к следующему выводу.

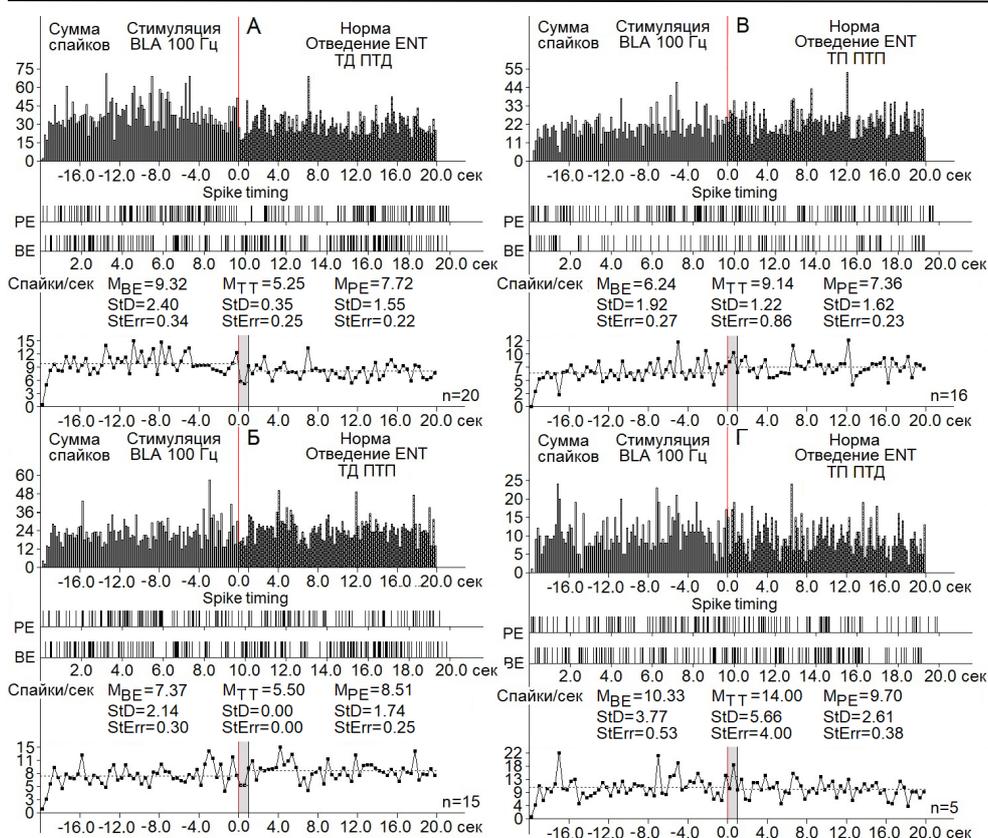


Рис. 1. А-Г – гистограммы суммы спайков пре- и постстимульных депрессорных эффектов ТД ПТД (А), в сочетании с возбудительными – ТД ПТП (Б), возбудительных – ТП ПТП (В) и возбудительно-депрессорных (Г), в реальном времени 20 сек (до и после стимуляции), нейронов ENT, вызванных ВЧС BLA в норме. Здесь и на следующих рисунках диаграммы частоты спайков, представленных в гистограммах, с усредненными значениями (М) для временных отрезков до стимуляции (BE – before event), на время тетанизации (ТТ – time tetanization) и после стимуляции (PE – post event), а также стандартной ошибки (StErr) в тех же пределах. Справа от диаграмм – количество испытаний (n)

Значения ТД в депрессорной и депрессорно-возбудительной последовательности и уровни ТП в возбудительной и возбудительно-депрессорной последовательности нейронов ENT при ВЧС BLA в норме достигали 1,77- и 1,34-кратного снижения и 1,46- и 1,35-кратного превышения, в сравнении с престимульным уровнем активности (рис. 1 А-В; 4 А-Г). На модели БА в нейронах ENT значения ТД в депрессорных последовательностях и уровни ТП в возбудительной последовательности достигали 2,01-, 3,04-кратного снижения и 1,12-кратного повышения соответственно, в сравнении с престимульным уровнем активности (рис. 2 А-В; 4 А-Г). Значения ТД в депрессорной

последовательности и уровни ТП – в возбудительной последовательности нейронов ENT при ВЧС ВЛА на модели БА с протекцией меланином оказались в пределах 2,45- и 2,70-кратного снижения и повышения престимульной активности соответственно, при отсутствии ПТП и депрессии (рис. 3 А, Б; 4 А, В). Интересная, к тому же более выраженная, картина была обнаружена при сравнении частоты пре- и постстимульной активности нейронов ENT при ВЧС ВЛА в указанных экспериментальных условиях.

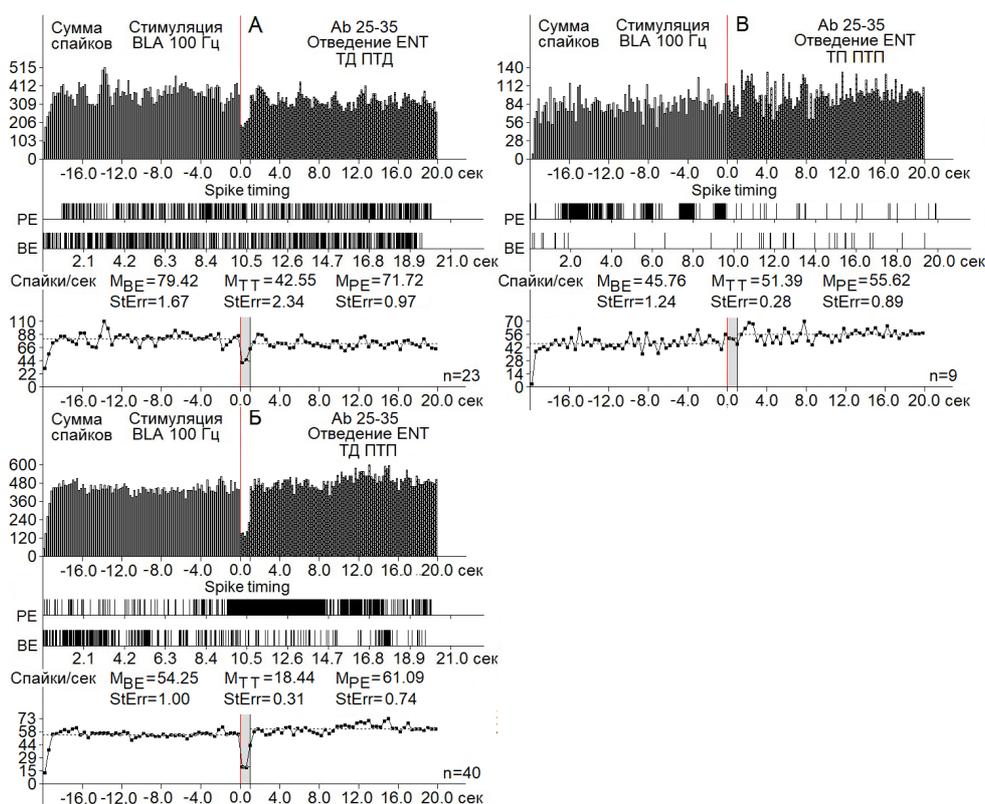


Рис. 2. А–В – гистограммы суммы спайков пре- и постстимульных тетанических депрессорных проявлений активности ТД ПТД (А), в сочетании с посттетаническими возбудительными – ТД ПТП (Б) и возбудительных – ТП ПТП (В), нейронов ENT при ВЧС ВЛА на модели БА, в реальном времени 20 сек (до и после стимуляции). Растеры активности А–В – детальный анализ произвольно избранных одиночных нейронов из данной группы. Справа от диаграмм – количество испытаний (n)

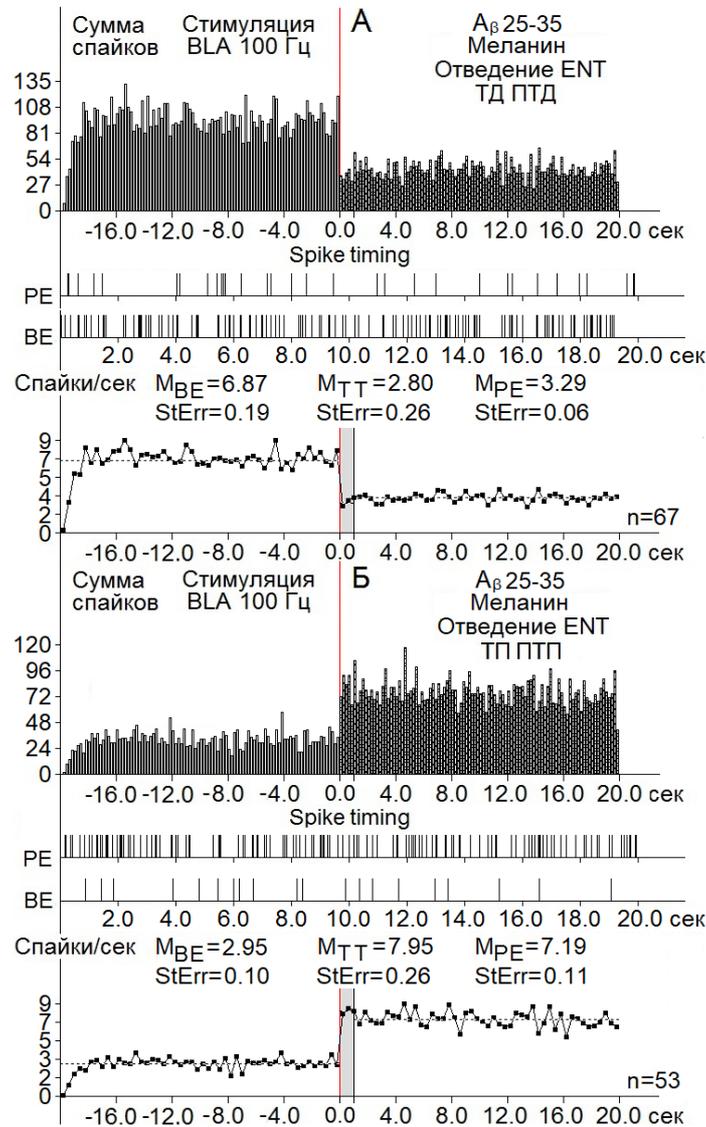


Рис. 3. А, Б – гистограммы суммы спайков пре- и постстимульных тетанических депрессорных ТД ПТД (А) и возбудительных – ТП ПТП (Б) проявлений активности нейронов ENT при ВЧС BLA на модели БА с протекцией меланином, в реальном времени 20 сек (до и после стимуляции). Растеры активности А, Б – детальный анализ произвольно избранных одиночных нейронов из данной группы. Справа от диаграмм – количество испытаний (n)

Очевидно наличие значительной эксайтотоксичности на модели БА, в сравнении с нормой, свидетельствующей о выраженной нейродегенерации, как в депрессорных, так и в возбудительных эффектах (8,50-, 7,33- и 7,31-кратно превалирующей соответственно).

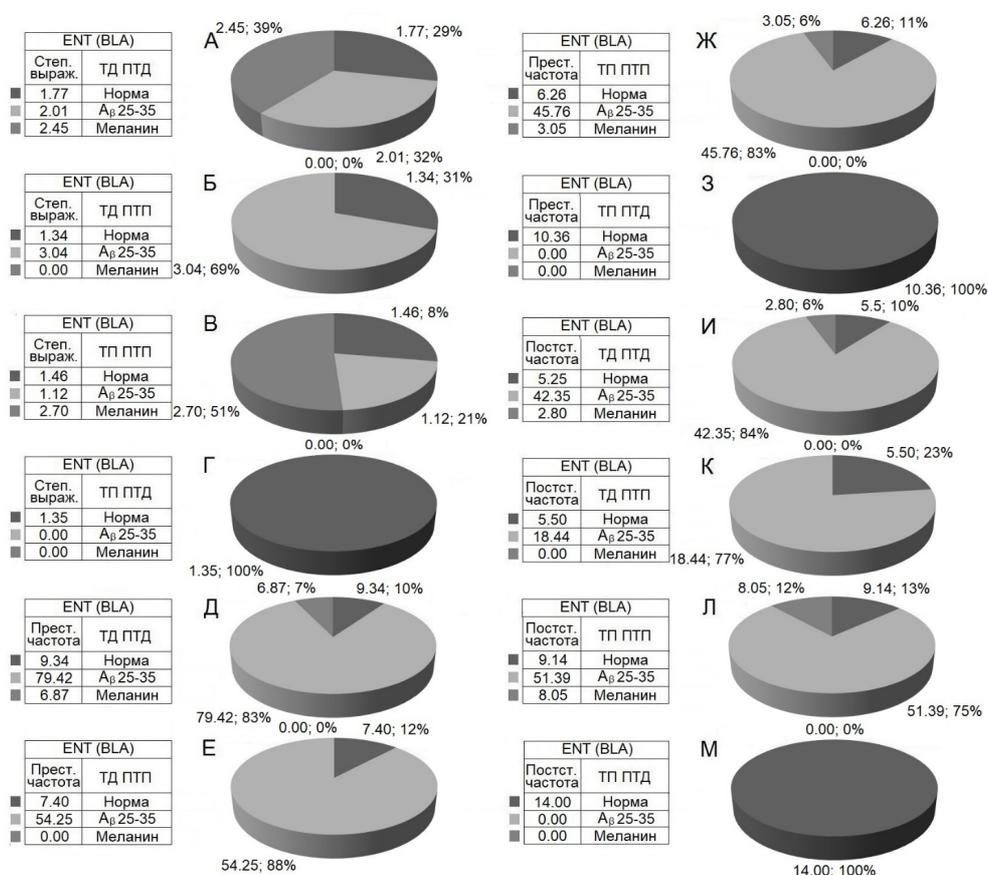


Рис. 4. А–М – процентное и цифровое соотношение степени выраженности (по усредненной частоте) депрессорных – ТД ПТД (А), депрессорно-возбудительных – ТД ПТП (Б), возбудительных – ТП ПТП (В) и возбудительно-депрессорных – ТП ПТД (Г) постстимульных эффектов в одиночных нейронах ENT при ВЧС ВLA, а также частоты престаимulatory (Д-З) и постстимульной (И-М) активности, предшествующей и сопровождающей указанные проявления постстимульной активации в норме, на модели БА и в условиях протекции меланином. Обозначения: Прест. частота – престаимulatory частота, Постст. – постстимульная частота

Престаимulatory частота активности в нейронах ENT, предшествующая депрессорной и возбудительной последовательностям, на модели БА, в условиях протекции меланином, исчислялась лишь в пределах 6,87 и 3,05 соответственно, по сравнению с 9,34; 7,40; 6,26; 10,36 в норме и 75,42; 54,25; 45,76 в патологии (рис. 1–3; 4 Д-З).

Иными словами, в патологии с протекцией престаимulatory частота активности, предшествующая депрессорному постстимульному эффекту, понизилась 11,56-кратно, а таковая, предшествующая возбудительному – 15,00-кратно, с реальным приближением к норме. Таким образом, в условиях про-

текции, в сравнении с патологией, имел место очевидный и значительный спад престаимпульной частоты, как в депрессорных, так и в возбуждающих постстимульных эффектах. Очевидно позитивное воздействие применения меланина на функциональную активность нейронов энторинальной коры в условиях данной модели БА.

Что же касается постстимульной частоты активности нейронов ENT, то в норме, будучи сопровождаемой депрессорными и возбуждающими эффектами, она достигала 5,25; 5,50 и 9,14; 14,00, а на модели БА – 42,55; 18,44 и 51,39 (рис. 1, 2 А–В; 4 И–М). Таким образом, в патологии, в сравнении с нормой, постстимульная частота в депрессорных эффектах повысилась 8,10- и 3,35-кратно, а таковая в возбуждающих эффектах – 5,62-кратно. В патологии с протекцией постстимульная частота нейронов ENT, сопровождающая депрессорные и возбуждающие эффекты, исчислялась в пределах 2,80 и 8,05, в сравнении с 42,55 и 51,39 в патологии без протекции и 5,25 и 9,14 в норме. Выявлено, что постстимульная частота снизилась 15,20- и 6,40-кратно, с очевидным достижением нормы. Таким образом, и в случае постстимульной частоты очевидно успешное позитивное воздействие меланина. Иными словами, выявлено мощное повышение частоты импульсной активности, как в депрессорных, так и в возбуждающих постстимульных проявлениях активности на модели БА. После применения меланина зафиксировано сильное снижение частоты импульсной активности нейронов энторинальной коры, что располагает к дальнейшему изучению меланина с целью применения его в качестве терапевтического средства.

Известно, что глутаматергическая система широко вовлечена в патофизиологию БА. Была обнаружена повышенная экспрессия рецептора GluN1 в энторинальной коре головного мозга. Очевидно, что экспрессия субъединиц глутаматергических рецепторов свидетельствует об изменениях в определенных областях мозга при БА, что указывает на возможное патологическое функционирование рецепторов. Таким образом, существует необходимость дальнейших исследований для выяснения патофизиологических механизмов данного явления и дальнейшего раскрытия потенциала субъединиц глутаматергических рецепторов в качестве терапевтических мишеней [15].

Глутаматергическая дисфункция при БА, по-видимому, опосредована различными механизмами, включая связывание A β с глутаматными рецепторами, тау-связывание с собственными белками цитоскелета, что приводит к гиперактивации рецепторов, и интернализацию переносчиков глутамата, что, в свою очередь, приводит к накоплению глутамата в синаптических и внесинаптических областях. Глутамат участвует во многих важнейших сигнальных и метаболических функциях, но контроль глутаматергической системы требует постоянного умеренного воздействия, чтобы избежать эксайтотоксичности. До сих пор изменения глутаматергической сигнализации, которые способствуют этому процессу или возникают в результате этого процесса, не были досконально исследованы в мозге человека с БА. Зна-

чительные усилия были приложены для изучения эксайтотоксичности глутамата, ассоциированной с Аβ, на клеточных и животных моделях, связанных с дисфункцией проницаемых для кальция глутаматных рецепторов в нейронах. Аβ участвует в ингибировании поглощения глутамата в синаптической щели [15], чрезмерной стимуляции NMDA-рецепторов, последующем нарушении кальций-зависимых внутриклеточных путей и гибели клеток [1]. Вполне возможно, именно указанные обстоятельства лежат в основе сильного повышения частоты потенциалов действия, зафиксированного в нейронах энторинальной коры на модели болезни Альцгеймера.

Поступила 27.05.25

Ալցհեյմերի հիվանդության մոդելով պայմանավորված ուղեղի էնտորինալ կեղևի նեյրոնների ֆունկցիոնալ ակտիվության վրա մելանինի ազդեցության ուսումնասիրություն

**Ա.Ս. Հովհաննիսյան, Մ.Վ. Պողոսյան, Մ.Հ. Դանիելյան,
Ա.Լ. Մինասյան, Հ.Յու. Ստեփանյան, Ջ.Ս.Սարգսյան**

Էլեկտրաֆիզիոլոգիական հետազոտություն է կատարվել՝ գրանցելով 248 առանձին նեյրոն էնտորինալ կեղևում (ENT)՝ բարձր հաճախականությամբ գրգռմամբ (HFS), որն իրականացվել է բազուատերալ ամիգդալայի (BLA) վրա: Օգտագործվել է 15 սպիտակ լաբորատոր առնետ (250±30 գ), ինտակտ խմբում (n=4), Ալցհեյմերի հիվանդության (ԱՀ) ամիլոիդային մոդելով, որը ձևավորվել է Ab 25–35-ի երկկոդմանի ներուղեղային ծակմամբ և պահպանվել է մինչև փորձը՝ 12 շաբաթ (n=4), և ԱՀ մոդելով՝ մելանինի կիրառմամբ (n=4): Գնահատվել է դեպրեսորային և գրգռիչ ազդեցությունների արտահայտման աստիճանը: Տեսանիկ դեպրեսորային արժեքները դեպրեսորային ազդեցությունների շարքում և տեսանիկ պոտենցիացիայի մակարդակները գրգռիչ ազդեցությունների դեպքում ԱՀ մոդելում հասել են համապատասխանաբար՝ 2,01; 3,04 և 1,12 անգամ: Մելանինի կիրառման դեպքում ԱՀ մոդելում նկատվել է դեպրեսորային ազդեցությունների փոքր-ինչ աճ: Տեսանիկ ազդեցությունները մեծացել են ԱՀ մոդելում և նվազել են մելանինի կիրառումից: Համեմատած նորմայի հետ՝ ախտաբանական պայմաններում նախագրգռման հաճախականությունը դեպրեսորային ազդեցությունների դեպքում աճել է 7 անգամ, իսկ գրգռիչ ազդեցությունների դեպքում՝ 6–7 անգամ: Հետիսթանային դեպրեսորային ազդեցությունների հաճախականությունը ԱՀ մոդելում աճել է 4–8 անգամ, իսկ գրգռիչ ազդեցությունների դեպքում՝ 5 անգամ: Մելանինի կիրառման արդյունքում դեպրեսորային և գրգռիչ ազդեցությունների հաճախականությունները վերականգնվել են նորմայի մակարդակին մոտ:

Study of the Effect of Melanin on the Functional Activity of Neurons of the Entorhinal Cortex of the Brain on the Model of Alzheimer's Disease

A.S. Hovhannisyan, M.V. Poghosyan, M.H. Danielyan, A.L. Minasyan,
H.Y. Stepanyan, J.S. Sarkissian

Electrophysiological study was carried out by recording 248 single neurons in the entorhinal cortex (ENT) with high frequency stimulation (HFS) of the basolateral amygdala (BLA). 15 Albino rats (250±30 g.) were used in the intact group (n=4), in the amyloid model of Alzheimer's disease (AD), induced by bilateral intracerebral injection of Ab 25–35 and preserved for 12 weeks (n=4) before the experiment and on the AD model with application of melanin (n=7). The degree of expression of depressor and excitatory effects was assessed. The values of tetanic depression in both depressor sequences and the levels of tetanic potentiation in excitatory sequences ENT neurons in the AD model, reached 2,01- and 3,04-fold and 1,12-fold prevalence, respectively. In the case of melanin application, a slight increase in depressant effects was observed in the AD model. Tetanic effects increased on the AD model and decreased with melanin application. Compared with the norm, in pathological conditions, the prestimulus frequency in case of depressive effects increased 7 times and in case of excitatory effects 6–7 times. The post-stimulus frequency of depressor effects in the AD model increased in 4–8 times, and in case of excitatory effects 5 times. As a result of melanin application, the frequency of depressor and excitatory effects were almost back to normal.

Литература

1. Bukke V.N., Archana M., Villani R. et al. The Dual Role of Glutamatergic Neurotransmission in Alzheimer's Disease: From Pathophysiology to Pharmacotherapy. *Int J Mol Sci.*, 2020, v. 21, № 20, p. 7452.
2. Dickerson B.C., Salat D.H., Greve D.N. et al. Increased hippocampal activation in mild cognitive impairment compared to normal aging and AD. *Neurology.*, 2005, v. 65, № 3, pp. 404–11.
3. D'Onofrio G., Sancarlo D., Panza F. et al. Neuropsychiatric symptoms and functional status in Alzheimer's disease and vascular dementia patients. *Curr Alzheimer Res.*, 2012, v. 9, № 6, pp. 759–71.
4. <https://www.alzint.org/u/WorldAlzheimerReport2018.pdf> (accessed May 22, 2025).
5. Igarashi K.M. Entorhinal cortex dysfunction in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.*, 2023, v. 46, № 2, p. 124–136.
6. Kilkenny C., Browne W., Cuthill I.C., Emerson M., Altman D.G. Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines 06 July 2010.
7. Liu E., Zhang Y., Wang J.Z. Updates in Alzheimer's disease: from basic research to diagnosis and therapies. *Transl Neurodegener.*, 2024, v. 13, № 1, p. 45.
8. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier, Academic Press, 5th ed. 2005.

9. *Qiu C., Kivipelto M., von Strauss E.* Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci.*, 2009, v. 11, № 2, pp. 111–28.
10. *Raghuraman R., Aoun A., Herman M. et al.* Lateral Entorhinal Cortex Dysfunction in Alzheimer's Disease Mice. *bioRxiv [Preprint]*., 2024, v. 4, 2024.04.15.589589.
11. *Scheltens P., De Strooper B., Kivipelto M. et al.* Alzheimer's disease. *Lancet.*, 2021, v. 397, № 10284, pp. 1577–1590.
12. *Tarawneh R., Holtzman D.M.* The clinical problem of symptomatic Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 2012, v. 2, № 5, p. a006148.
13. *Tran T.T., Speck C.L., Gallagher M., Bakker A.* Lateral entorhinal cortex dysfunction in amnesic mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging.*, 2022, v. 112, pp. 151–160.
14. *Twarowski B., Herbet M.* Inflammatory Processes in Alzheimer's Disease-Pathomechanism, Diagnosis and Treatment: A Review. *Int J Mol Sci.*, 2023, v. 24, (№7):6518.
15. *Yeung J.H.Y., Walby J.L., Palpagama T.H. et al.* Glutamatergic receptor expression changes in the Alzheimer's disease hippocampus and entorhinal cortex. *Brain Pathol.*, 2021, v. 31, № 6, p. e13005.
16. *Zheng Q., Wang X.* Alzheimer's disease: insights into pathology, molecular mechanisms, and therapy. *Protein Cell.*, 2025, v.16, №2, pp. 83–120.