

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
Լ.Ա.ՕՐԲԵԼՈՒ ԱՆՎԱՆ ՖԻԶԻՈԼՈԳԻԱՅԻ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ ԶՐԻՍՏԻՆԵ ՎԱՆԻԿԻ

**ՊԱՐԿԻՆՍՈՆԻ ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅԱՆ ՍՈՂԵԼՈՒՄ
ՊԱԼԻԴՈՆԻԳՐԱԼ ՊՐՈԵԿՏԻԱՅԻ ՍՈՐՖՈՖՈՒՆԿՏԻՈՆԱԼ
ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆԸ` *NAJA OXIANA*, *MONTIVIPERA*
RADDEI ԹՈՒՅՆԵՐՈՎ և ԳԱԼԱՐՄԻՆՈՎ ՊՐՈՏԵԿՏԻԱՅԻ
ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ**

Գ.00.09 – «Մարդու և կենդանիների ֆիզիոլոգիա»
մասնագիտությամբ կենսաբանական գիտությունների
թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ– 2021

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ ИМЕНИ Л.А.ОРБЕЛИ

КАРАПЕТЯН КРИСТИНЕ ВАНИКОВНА

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ПАЛЛИДОНИГРАЛЬНОЙ ПРОЕКЦИИ НА МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ
ПАРКИНСОНА В УСЛОВИЯХ ПРОТЕКЦИИ ЯДАМИ *NAJA OXIANA*,
MONTIVIPERA RADDEI И ГАЛАРМИНОМ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.09 - «Физиология человека и животных»

ЕРЕВАН – 2021

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվ. ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի գիտական խորհրդի նիստում:

Գիտական ղեկավար՝	Կենս. գիտ. թեկ., Մ. Հ. Դանիելյան
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝	Կենս.գիտ.դոկ., պրոֆ. Ռ.Շ.Սարգսյան Կենս.գիտ.թեկ., Ա.Վ. Ոսկանյան
Առաջատար կազմակերպություն՝	Երևանի Մ. Զեդեգու անվան պետական բժշկական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը կկայանա 2021 թ. մարտի 18-ին, ժամը 13⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտում, ֆիզիոլոգիայի - 023 մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ, 0028, ք. Երևան, Օրբելի եղբ. 22):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի գրադարանում և <http://www.physiol.sci.am> կայքում:

Սեղմագիրն առաքվել է 2021 թ. փետրվարի 3-ին:

023 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենսաբանական գիտությունների թեկնածու՝  Ն.Է. Թադևոսյան

Тема диссертации утверждена в Институте физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА

Научный руководитель: канд.биол.наук, М.А. Даниелян

Официальные оппоненты: докт.биол.наук, проф., Р.Ш. Саркисян,
канд.биол.наук, А.В. Восканян

Ведущая организация: Ереванский государственный
медицинский университет
имени М. Гераци

Защита диссертации состоится 18-го марта 2021г. в 13⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 023 по физиологии, действующего в Институте физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА (РА, 0023, г. Ереван, ул. Бр.Орбели, 22).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА и на сайте <http://www.physiol.sci.am>.

Автореферат разослан 3-го февраля 2021 г.

Ученый секретарь специализированного совета 023,
канд.биол.наук  Н.Э.Татевосян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Болезнь Паркинсона (БП) – неуклонно прогрессирующее нейродегенеративное заболевание (НЗ), связанное с поражением преимущественно nigrostriарных нейронов и нарушением функции базальных ганглиев (БГ), проявляющееся как моторными, так и немоторными симптомами [Canesi M. et al., 2007]. БП наиболее распространенное после болезни Альцгеймера НЗ, поражающее примерно каждого сотого человека, перешагнувшего шестидесятилетний рубеж. Данное заболевание представляет собой раннее старение нервных центров, начинающееся в экстрапирамидных образованиях (преимущественно, бледный шар (*globus pallidus*, GP) и чёрная субстанция (*substantia nigra*, SN), то есть вовлечение паллидонигральной проекции в развитие БП); это старение продолжается в форме диффузных патологических процессов, которые постепенно охватывают и другие области [Kalaitzakis M.E. et al., 2008; Zhong P. et al., 2017]. БП клинически проявляется нарушением произвольных движений. При отсутствии лечения болезнь завершается полной иммобильностью и трудностями с балансированием. Большинство моторных синдромов являются следствием прогрессирующего и избирательного поражения дофаминергических, нейромеланинсодержащих нейронов SN [Brooks D.J., 2004; Fahn S., Sulzer D., 2004]. Поражение происходит в результате дегенерации nigrostriарного тракта и резкого падения концентрации предшественника нейромеланина – дофамина [Faucheux B.A. et al., 2003; Ebersbach G. et al., 2013], при этом нарушается передача возбуждения от SN к стриопаллидарной системе, в том числе и к GP.

В последнее время было признано серьезным просчетом признание лишь нигральной компоненты при БП. При данной патологии интенсивнее всего гибнут нейроны SN, которые, в свою очередь, связаны со структурами мозга, имеющими отношение к центральной регуляции программирования движения, в частности, с БГ, к которым относится GP. Продemonстрировано преимущественное представительство паллидонигральной проекции в дофаминергических клетках компактного отдела SN (SNc). Недостаток дофамина в стриатуме приводит к корковому сенсорному недостатку, феномену "чужеродной конечности", апраксии, ригидности и акинезии, тремору пострутального действия, дистонии конечности, гиперрефлексии и пострутальной нестабильности, характерных для БП [Hattori T., 1993]. При этом биохимический анализ мозга указывает на тяжелый, диффузный недостаток ДА в стриатуме. В свою очередь, наружный и внутренний сегменты GP приматов воспринимают дофаминовые аксонные проекции от SNc [Eid L., Parent M., 2015]. ДА осуществляет ключевой модуляторный эффект на нейроны GP во взаимодействии с прямым ГАМКергическим торможением и глутаматергическим возбуждающим воздействием стриатума и субталамических ядер [Eid L., Parent M., 2015]. Нейроны SN играют существенную роль в моторном обучении и связанным с ним поведением [Tremblay L. et al., 2010]. Функциональная важность дофаминергических нейронов в SNc определяется своей ролью в патофизиологии БП [Rommelfanger K., Wichmann T., 2010].

Высокое социально-экономическое бремя БП для общества, прогрессирующий рост числа больных за счет старения популяции, тенденция к более ранним срокам проявления болезни и отсутствие эффективных этиотропных схем лечения в силу недостаточной изученности этиологии и патогенеза этого нейродегенеративного заболевания определяют актуальность исследования. Согласно достижениям последних лет, на данный момент нет эффективной нейропротекции БП, поэтому продолжают оставаться крайне актуальными перспективы терапии этого тяжелого неизлечимого заболевания. Эффективной может стать терапия, направленная на замедление гибели

дофаминергических нейронов и на исключение прогрессии недофаминергических симптомов [Yacoubian T.A., Standaert D.G., 2009].

В качестве выраженных протекторов при многих патологических состояниях организма выступают животные яды [Kalam Y. et al., 2011; Минасян А.Л. и др., 2012; Sarkissian J.S. et al., 2013]. Так, яды змей действуют на активность фермента фосфолипазы A2, важного фактора защиты клетки от окислительного повреждения мембран [Costa S.K. et al., 2001]. На основе дендротоксинов змей из семейства *Elapidae* (среднеазиатская кобра – *Naja oxiana*) синтезированы соединения, адаптивно контролирующие возбудимость поврежденных нейронов при нейродегенеративных заболеваниях [Cook N.S., 1990]. В ряде работ были получены данные по нейропротекторным эффектам малых доз яда змей из семейства гадюковых *Vipera* на моделях периферической и центральной нейродегенерации [Сулханян Р.М. и др., 2003; Chavushyan V. et al., 2006]. В литературе есть данные о PRP-1 (пролином обогащенный пептид, Галармин), который проявляет себя как иммуномодулятор и протектор широкого спектра действия [Galoyan A.A. et al., 1998]. Он оказывает протекторное действие на нейроны спинного мозга крыс при острой и хронической неспецифической нейродегенерации [Galoyan A.A. et al., 2000, 2001], при болезни Альцгеймера [Yenkoyan K. et al., 2018]; противодействует формированию рубца [Сулханян Р.М. и др., 2003]. PRP-1 оказывает иммуномодуляторное [Априкян В.С., Галоян А.А., 1999а] и нейрорегуляторное действия [Akopian A., Galoyan A., 2004], защищает мембраны нейронов при различных патологических состояниях [Срапионян Р.М. и др., 2014].

Целью настоящей работы является выявление на ротеноновой модели БП микроэлектрофизиологических критериев нарушения синаптической активности в нейронах SNc при высокочастотной стимуляции (ВЧС) GP и в условиях воздействия яда *Naja oxiana* (*N.oxiana*), яда *Montivipera raddei* (*M.raddei*) и иммуномодулятора Галармина, с оценкой их протекторной действенности в отношении функциональной пластичности, содействующей восстановлению нормального соотношения синаптических процессов, с последующим морфогистохимическим подтверждением полученных результатов в отдельных сериях исследований.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Электрофизиологическое исследование потока импульсной активности нейронов SNc в условиях стимуляции GP на модели БП, в сравнении с нормой;
2. Электрофизиологическое исследование потока импульсной активности нейронов SNc в условиях стимуляции GP на модели БП, с протекцией ядом *M.raddei*, в сравнении с нормой;
3. Электрофизиологическое исследование потока импульсной активности нейронов SNc в условиях стимуляции GP на модели БП, с протекцией ядом *N.oxiana*, в сравнении с нормой;
4. Электрофизиологическое исследование потока импульсной активности нейронов SNc в условиях стимуляции GP на модели БП, с протекцией Галармином, в сравнении с нормой;
5. Морфогистохимическое изучение структурно-функциональных изменений нейронов SN и GP мозга методом выявления активности кислой фосфатазы с целью определения патологических сдвигов и эффекта протекции в отдельных вышеотмеченных экспериментах (пункты 1-4).

Научная новизна работы.

- Впервые показано, что применение Галармина, ядов *M.raddei* и *N.oxiana* приводит к значительному снижению завышенных при БП возбуждающих постстимульных эффектов в нейронах SNc (двукратное с ядом *M.raddei*), также в условиях

протекции ядом *M.raddei* - повышению таковых депрессорных. На модели БП показано значительное увеличение частоты пре- и постстимульной активности нейронов SNC (признак эксайтотоксичности) и их значительное уменьшение с использованием Галармина, яда *N.oxiana* и яда *M.raddei* (почти трехкратное), но без достижения нормы. Использование Галармина, ядов *M.raddei* и *N.oxiana* содействовало противостоянию нейродегенерации и успешному противодействию эксайтотоксичности, причем яд *M.raddei* был более эффективным. Исходя из этого, следует признать перспективность его использования при БП.

- Впервые получены новые данные комплексного изучения морфофункционального состояния клеточных структур SN и GP мозга крыс на ротеноновой модели БП и в условиях протекции. Показано, что при введении Галармина, малых доз яда *M.raddei* и яда *N.oxiana* наблюдаются сохранение морфологической картины, положительные изменения структурных свойств нейронов SN и GP по сравнению с моделью БП. Причем, яд *M.raddei* показывает себя более эффективным нейропротектором. В благоприятных условиях при своевременном и систематическом введении применяемых нами терапевтических агентов значительная часть клеточных изменений является обратимой или не развивается.

Научно-практическое значение работы. Результаты настоящей работы позволяют проникнуть в механизм динамики сдвигов в соотношении возбуждательных и депрессорных постстимульных синаптических проявлений, сопровождающих развитие БП, а также предлагают в преклиническом плане эффективное использование змеиных ядов и Галармина, которые широко используются в качестве перспективных для терапии многих заболеваний и многосторонне исследованы в отношении широкого спектра заболеваний. В работе исследовано вовлечение GP с целью активации нейронов SNC, что актуально и практически не изучено. При активации GP в одиночных нейронах SNC в норме отмечается выраженность депрессорных постстимульных эффектов, что и надо было ожидать, поскольку активность нейронов GP регулируется ГАМКергическим торможением, в том числе от собственных внутриядерных аксонных коллатералей, к тому же, плохо изученным. В данной работе яд *M.raddei*, яд *N.oxiana* и Галармин зарекомендовали себя в качестве перспективных терапевтических агентов при специфической нейродегенерации успешным регулированием измененных в результате интоксикации ротеноном показателей активности нейронов SNC. Морфогистохимические данные также дают основание полагать, что Галармин, змеиные яды *M.raddei* и *N.oxiana* действуют в качестве нейропротекторных агентов, что предусматривает необходимость дальнейших исследований с целью выявления механизмов их воздействия и предложения для терапии БП. Предлагаемый нами терапевтический подход может содействовать длительному и стабильному воздействию, поскольку различные компоненты змеиных ядов обладают высокой специфической избирательностью и необратимостью эффектов.

Апробация работы. Материалы и некоторые основные положения диссертационной работы представлены на конференции “Science Week”, 27 nov. - 1 dec. 2017, Yerevan, RA; Междун.конф. по токсикологии “EU-IST”, 2018 г., Ереван, РА; XVI Всерос. совещании с междун. участием и IX школе по эволюционной физиологии, 19-24 октября, 2020, Санкт-Петербург, РФ.

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 11 научных публикациях.

Структура и объём работы. Диссертационная работа изложена на 133 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материала и методов исследования, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 250 источников. Диссертация содержит 1 схему и 22 рисунка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Были проведены электрофизиологические исследования спайковой активности нейронов SNc при ВЧС GP у интактных крыс (1 группа, $n=4$), на модели БП, индуцированной унилатеральным введением ротенона на 4 недели выдерживания (2 группа, $n=5$) и в условиях протекции Галармином (3 группа, $n=2$) и ядами *M.raddei* (4 группа, $n=2$) и *N.oxiana* (5 группа, $n=4$). Введение ротенона осуществляли в условиях пентобарбиталового наркоза (40 мг/кг, в/б) из расчета 12 мкг ротенона в 0.5 мл Димексида (со скоростью 0.1 мкл/мин) в “medial forebrain bundle” по координатам стереотаксического атласа [Paxinos G., Watson C., 2005] (AP+0.2; $L\pm 1.8$; DV+8 мм). Ротеноновая модель БП признана в качестве надежной для изучения механизмов повреждения ДА нейронов [Moreira C. et al., 2012]. Протекторы вводили животным по следующей схеме: инъекции яда *M.raddei* (10% от LD50 = 1,6 мг/кг, т.е. 0,16 мг/кг) проводили в/м через день после унилатерального введения ротенона в течение 2 недель и выдерживали 4 недели; инъекции яда *N.oxiana* (5% от LD50 = 1 мг/кг, т.е. 0,05 мг/кг) проводили в/м через день после унилатерального введения ротенона в течение 2 недель и выдерживали 4 недели; инъекции Галармина (10 мкг на 100 г веса животного) проводили в/м через день после унилатерального введения ротенона в течение 4 недель.

У экспериментальных животных производили экстраклеточную регистрацию фоновой и вызванной спайковой активности одиночных нейронов SNc при ВЧС GP. Операции осуществляли на наркотизированных уретаном животных (urethane, 1.5 г/кг, в/б). В остром эксперименте белых крыс ($n=17$) предварительно обездвигивали 1% дитилином (25 мг/кг в/б), фиксировали в стереотаксическом аппарате и переводили на искусственное дыхание. Стекланный микроэлектрод и раздражающий электрод были погружены в соответствующие структуры мозга согласно стереотаксическим координатам [Paxinos G., Watson C., 2005]. Был проведен программный математический анализ импульсной активности нейронов (разработчик В.С. Каменецкий). Статистическая обработка данных производилась с учетом t-критерия Стьюдента.

Морфогистохимические исследования SN и GP мозга крыс проводили методом выявления активности Ca^{2+} -зависимой кислой фосфатазы (КФ) [Меликсетян И.Б., 2007]. Данный метод был разработан с учетом закономерности концентрационного взаимоотношения, установленной А.М.Чилингаряном [Чилингарян А.М., 1967].

Животные ($n=25$) были подразделены на следующие группы: интактные крысы (1 группа, $n=5$) и экспериментальные крысы: инъекцированные унилатерально ротеноном (2 группа, $n=5$) с в/м введением физиологического раствора через день в течение 2 недель и выдержанных до острого эксперимента 4 недели; инъекцированные ротеноном аналогично группе (2) в сочетании с в/м инъекцией яда *N.oxiana* через день в течение 2 недель и выдержанные 4 недели (3 группа, $n=5$); инъекцированные ротеноном аналогично группе (2) в сочетании с в/м инъекцией яда *M.raddei* через день в течение 2 недель и выдержанные 4 недели (4 группа, $n=5$); инъекцированные ротеноном аналогично группе (2) в сочетании с в/м инъекцией Галармина через день в течение 4 недель (5 группа, $n=5$).

Соответствующие отделы мозга быстро извлекали, фиксировали в 5% растворе нейтрального формалина на 0,1 М фосфатном буфере в течение 48 часов при температуре +4°C. Из кусочков мозга готовились замороженные срезы во фронтальной плоскости, толщиной 40-50 мкм, которые, согласно требованиям дальнейшей обработки, переносились в свежеприготовленную инкубационную смесь. Последующие съёмки полученных препаратов производились с помощью фотонасадки AmScope MU800 через микроскоп OPTON (West Germany) на программном компьютерном обеспечении TourView. Сбор микрорисунков в скомпанованные микрофотографии проводился с помощью компьютерной программы Adobe PhotoShop.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Электrofизиологические исследования

В экспериментальных микроэлектрофизиологических исследованиях на крысах, подверженных ротеноновой интоксикации, в сравнении с нормой, в условиях протекции ядом *M.raddei*, ядом *N.oxiana* и Галармином, изучено соотношение сравнительной степени выраженности возбуждательных и тормозных постстимульных тетанических и посттетанических проявлений и частоты импульсной активности нейронов SNC при ВЧС GP ($n=17$, 625 нейронов). Сравнительная количественная оценка всего массива испытаний изученных нейронов выявила формирование возбуждательных и депрессорных ответов в одиночных нейронах SNC при ВЧС GP, исчисляемых на основе усредненного количества спайков (PETN), с пересчетом в межимпульсные интервалы и частоты в Гц (Frequency Average) на примере комплексных усредненных перистимульных гистограмм, привела к следующему заключению о соотношении возбуждательных и депрессорных постстимульных проявлений спайкинга активности. Выявлено формирование ответов в SNC в виде тетанической потенциации (ТП) и тетанической депрессии (ТД), сопровождаемых посттетаническими депрессией (ПТД) и потенциацией (ПТП).

Соотношение возбуждательных и депрессорных постстимульных синаптических процессов в нейронах черной субстанции при активации бледного шара на модели БП и в условиях протекции ядом *M.raddei*, в сравнении с нормой.



Рис.1. Усредненные перистимульные гистограммы (PETN Average) депрессорных (А, В, Д, Группы А, В), депрессорно-возбудительных (А, В, Д, Группы Б, Г), возбуждательных (Б, Г, Е, Группы А, В) и возбуждительно-депрессорных (Б, Г, Е, Группы Б, Г) постстимульных тетанических и посттетанических проявлений активности нейронов SNC при ВЧС GP в норме (А, Б, Д, Е), на ротеноновой модели БП (А, Б, Группы В, Г; В, Г, Группы А, Б) и с протекцией ядом *M.raddei* (MR) спустя 4 недели (В-Е, Группы В, Г). Обозначения: исп. – испытания, сек – секунды, мс – миллисекунды. Уровень значимости $P < 0.05$.

2.0-кратная тетаническая депрессия (ТД), в депрессорно-возбудительной – 2.0-кратная (Рис. 1 А, Д, Группы А, Б), в возбуждательной последовательности – 1.0-кратная ТП, в возбуждительно-депрессорной – 3.5-кратная (Рис. 1 Б, Е, Группы А, Б). На модели БП в

депрессорной последовательности ТД достигала 3.75-кратного занижения престимульной активности, в депрессорно-возбудительной – 4.0-кратного (Рис. 1 А, Группы В, Г; 1 В, Группы А, Б), в возбудительной – 2.26-кратного, в возбудительно-депрессорной – 1.46-кратного (Рис. 1 Б, Группы В, Г; 1 Г, Группы А, Б). На модели БП, в условиях протекции ядом *M.raddei*, ТД в депрессорной последовательности претерпевала занижение престимульной активности в пределах 5.0-кратного уровня, в депрессорно-возбудительной – 6.0-кратного (Рис. 1 В, Д, Группы В, Г) в возбудительной – 1.1-кратного, в возбудительно-депрессорной – 1.4-кратного (Рис. 1 Г, Е, Группы В, Г).

Таким образом, получено углубление депрессорных постстимульных проявлений активности нейронов SNc в условиях протекторного воздействия яда *M.raddei* на модели БП (порядка 1.33- и 1.5-кратно в обеих последовательностях) и снижение таковых возбудительных (например, ТП 2.05-кратно в возбудительной последовательности) (Рис. 1). Иными словами, очевидно протекторное воздействие яда *M.raddei*, обусловленное снижением эксайтотоксичности, посредством выдвигания депрессии протекторного назначения.

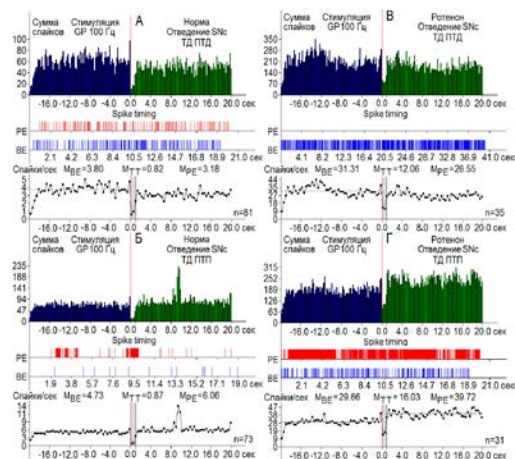


Рис. 2. А-Г – гистограммы суммы спайков пре- и постстимульных депрессорных проявлений активности ТД ПТД (А, В), в сочетании с возбудительными – ТД ТПТ (Б, Г) в реальном времени 20 сек (до и после стимуляции) нейронов SNc, вызванных при ВЧС GP в норме (А, Б) и на ротононовой модели БП (В, Г). Диаграммы частоты спайков, представленных в гистограммах, с усредненными значениями (М) для временных отрезков до (BE - before event), на время тетанизации (ТТ - time tetanization) и после стимуляции (PE - post event). n – количество испытаний. Уровень значимости $P < 0.05$.

Анализ относительных показателей частотных постстимульных проявлений активности нейронов SNc при ВЧС GP, в сравнении с престимульными, привел к следующему выводу. В целом наметилась тенденция значительного увеличения частоты активности нейронов SNc, предшествующей постстимульным депрессорным и возбудительным эффектам на модели БП, по сравнению с нормой и, как правило, ее уменьшение с использованием яда *M.raddei*. Частота пресинаптической активности, предшествующей ТД ПТД, 8.16-кратно превышала норму, с использованием яда *M.raddei* частота снизилась 2.51-кратно, в сравнении с таковой на модели БП, но 3.24-кратно не достигла нормы (Рис. 2 А; 4 Д).

Частота пресинаптической активности, предшествующей ТД ТПТ, менялась аналогично, но в других пределах измеренных значений, а именно, на модели БП она превышала норму 6.35-кратно, яд *M.raddei* снижал ее 1.8-кратно, но опять не имелось достижения нормы почти в тех же пределах – 3.55-кратно (Рис. 2 Б, Г; 4 Е). Частотные пределы пресинаптической активности, предшествующей ТП ТПТ, на модели БП превышали норму уже 13.21-кратно, с применением яда *M.raddei* лишь 1.21-кратно снизило таковую на модели БП, но не было достижения нормы даже 11.0-кратно (Рис. 3 В, Г; 4).

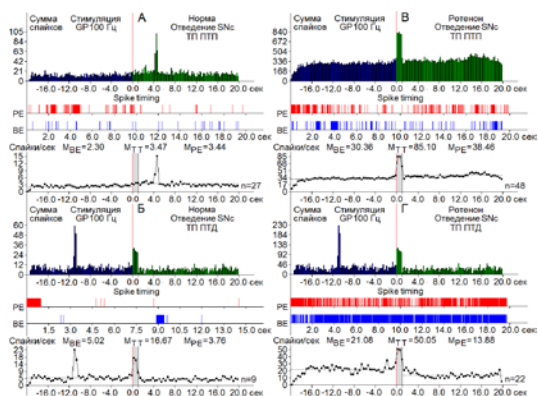


Рис. 3. А-Г – гистограммы суммы спайков пре- и постстимульных проявлений активности – ТП ПТП (А, В), в сочетании с депрессорными – ТП ПТД (Б, Г), нейронов SNc, вызванных при ВЧС GP в реальное время 20 сек (до и после стимуляции), в норме (А, Б) и на модели БП (В, Г). Уровень значимости $P < 0.05$.

Наконец, частота престаимпульной активности нейронов SNc, предшествующей ТП ПТД, на модели БП отличалась от нормы (в пределах 4.2-кратного), но меньше предыдущих случаев (за исключением первого), а с использованием яда *M. raddei* превысила норму 2.1-кратно и не достигла нормы 8.82-кратно (несколько меньше, чем в предыдущем случае).

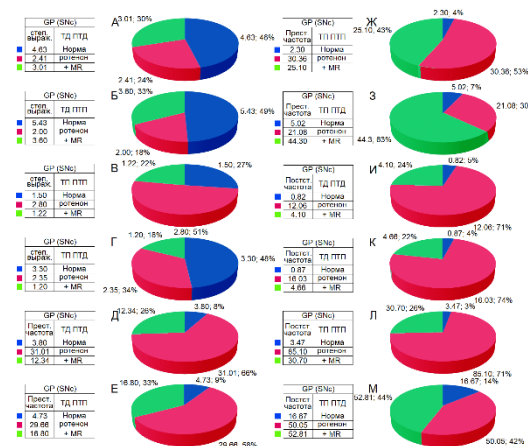


Рис. 4. Процентное соотношение степени выраженности (по усредненной частоте) депрессорных (А), депрессорно-возбудительных (Б), возбудительных (В) и в сочетании с депрессорными (Г) постстимульных эффектов в одиночных нейронах SNc при ВЧС GP в норме, на модели БП спустя 4 недели после введения рофенона и с протекцией ядом *M. raddei* (MR). Сравнительные частоты пре- (Д-З) и постстимульной (И-М) активности в норме, на модели БП и в условиях протекции ядом

M. raddei.

Анализ постстимульной активности нейронов SNc при ВЧС GP показал, что, в целом, нарастала разница между нормой и моделью БП, с каждым последующим испытанием от ТД ПТД до ТП ПТП (в пределах 14.7-, 18.4 и 24.52- кратного) (Рис. 2 А-В; 3 А-В; 4 И-Л), но с резким снижением в случае предшествования ТП ПТД (порядка лишь 3.0-кратного) (Рис. 3 Б, Г; 4 М), в то время как значения снижения величин частоты активности, в условиях протекции ядом *M. raddei*, в сравнении с моделью БП, резко не менялись (будучи в пределах, 3.14-, 3.23-, 2.77), но опять с достаточным снижением в последнем случае (ТП ПТД) – 1.06-кратно (Рис. 4 И-М). Наконец, с той же тенденцией

нарастания (до ТП ПТП), определялось увеличение разницы активности в условиях протекции, в сравнении с нормой (в пределах 5.0-, 5.35- и 8.84 и также с достаточным спадом в последнем случае (ТП ПТП, порядка 3.16-кратного) (Рис. 2 А-Г; 3 А-Г; 4 И-М).

Таким образом, на модели БП показано повышение частоты спайков в нейронах SNc, что свидетельствует о возникновении эксайтотоксичности. В условиях протекции ядом *M.raddei* выявляется повышение постстимульных депрессорных эффектов, снижение постстимульных возбудительных эффектов и понижение частоты спайков, что свидетельствует о значительном протекторном эффекте данного яда, а также об успешном подавлении эксайтотоксичности.

Соотношение возбудительных и депрессорных постстимульных синаптических процессов в нейронах черной субстанции при активации бледного шара на модели БП и в условиях протекции ядом *N.oxiana*, в сравнении с нормой.

В нейронах SNc при ВЧС GP ТД в депрессорной и депрессорно-возбудительной последовательности в норме достигала 2.0-кратного занижения (Рис. 5 А, Группы А, Б). На модели БП ТД в депрессорной последовательности определялась в пределах 3.0-кратного занижения, а в депрессорно-возбудительной – 3.2-кратного (Рис. 5 А, Группы В, Г), а в условиях протекции ядом *N.oxiana* – 1.75-кратного (Рис. 5 В, Группы А, Б). В нейронах SNc при ВЧС GP ТП в возбудительной последовательности в норме исчислялась в пределах 1.0-кратного занижения, а в возбудительно-депрессорной – 3.5-кратного (Рис. 5 Б, Группы А, Б); на модели БП ТП в обеих последовательностях определялась в пределах 2.26- и 1.46-кратного, соответственно (Рис. 5 Б, Группы В, Г), наконец, ТП в обеих последовательностях в условиях протекции ядом *N.oxiana* – порядка 1.07- и 1.43-кратного (Рис. 5 Г, Группы А, Б).

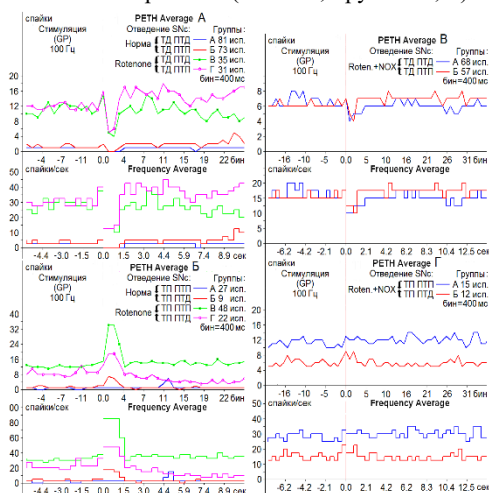


Рис. 5. Усредненные перистимульные (PETH Average) и гистограммы частоты (Frequency Average) депрессорных и депрессорно-возбудительных (А, Группы А-Г), возбудительных и возбудительно-депрессорных (Б, Группы А-Г) постстимульных тетанических и посттетанических проявлений активности нейронов SNc при ВЧС GP в норме и на модели БП; депрессорных и депрессорно-возбудительных эффектов нейронов SNc в условиях протекции ядом *N.oxiana* (NOX) (В, Группы А, Б), а также таковых возбудительных и возбудительно-депрессорных (Г, Группы А, Б). Уровень значимости $P < 0.05$.

Таким образом, выявлено некоторое занижение параметров всех постстимульных эффектов, как в норме, так и в условиях протекции, по сравнению с таковыми в патологии, но без учета частоты активации изученных нейронов до- и после стимуляции (Рис. 5).

В нейронах SNc при ВЧС GP в депрессорной последовательности в норме, по сравнению с престимульным уровнем, выявлена 4.63-кратная тетаническая депрессия (ТД), в депрессорно-возбудительной – 5.43-кратная, в возбудительной

последовательности – 1.50-кратная тетаническая потенциация (ТП), в возбuditельно-депрессорной – 3.30-кратная (Рис. 6 А-Г). На модели БП в депрессорной последовательности ТД достигала 2.41-кратного занижения пререстимульной активности, в депрессорно-возбuditельной – 2.00-кратного, в возбuditельной – 2.80-кратного, в возбuditельно- депрессорной – 2.35-кратного (Рис. 6 А-Г). На модели БП в условиях протекции ядом *N.oxiana* ТД в депрессорной последовательности претерпевала занижение пререстимульной активности в пределах 1.50-кратного уровня, в депрессорно-возбuditельной – 1.43-кратного, в возбuditельной – 1.14-кратного, в возбuditельно-депрессорной – 1.25-кратного (Рис. 6 А-Г). Таким образом, получено значительное снижение возбuditельных постстимульных проявлений активности нейронов SNc в условиях протекторного воздействия яда *N.oxiana* на модели БП (порядка 2.45- и 1.88-кратно в обеих последовательностях), но также со значительным отставанием углубления постстимульных депрессорных процессов от нормы (порядка 3.10 и 3.81-кратно) (Рис. 6 А-Г).

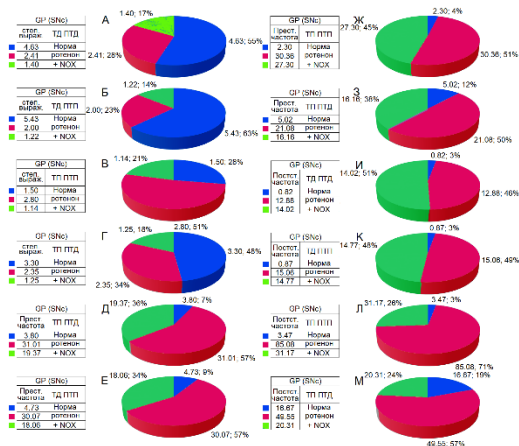


Рис. 6. Процентное соотношение степени выраженности (по усредненной частоте) депрессорных (А), депрессорно-возбuditельных (Б), возбuditельных (В) и в сочетании с депрессорными (Г) постстимульных эффектов в одиночных нейронах SNc при ВЧС GP в норме, на модели БП спустя 4 недели после введения ротенона и с протекцией ядом *N.oxiana* (NOX). Сравнительные частоты пре- (Д-З) и постстимульной (И-М) активности в норме, на модели БП и в условиях протекции ядом *N.oxiana*.

В целом, намечалась тенденция значительного увеличения частоты активности нейронов SNc на модели БП, по сравнению с нормой, и, как правило, ее уменьшение с использованием яда *N.oxiana*. Частота пререстимульной активности, предшествующей ТД ПТД, 8.16-кратно превышала норму, с использованием яда *N.oxiana* частота снизилась 1.64-кратно, в сравнении с таковой на модели БП, но 5.06-кратно не достигла нормы (Рис. 6 Д). Частота пресинаптической активности, предшествующей ТД ПТП, изменялась аналогично, а именно, на модели БП она превышала норму 6.50-кратно, яд *N.oxiana* снижал ее 1.73-кратно, и опять не имелось достижения нормы, но в пределах – 3.66-кратно (Рис. 6 Е). Частотные пределы пресинаптической активности, предшествующей ТП ПТП на модели БП, превышали норму уже 13.21-кратно, с применением яда *N.oxiana* лишь 13.36-кратно снизились таковые на модели БП, но не было достижения нормы 13.34-кратно (Рис. 6 Ж). Наконец, частота пререстимульной активности нейронов SNc, предшествующей ТП ПТД, хотя меньше предыдущих случаев (за исключением первого), на модели БП отличалась от нормы (в пределах 4.20-кратного), а с использованием яда *N.oxiana* - даже превысила норму 3.43-кратно (намного меньше, чем в предыдущем случае) (Рис. 6 З). В случае постстимульной активности нейронов SNc при ВЧС GP, в целом, нарастала разница между нормой и моделью БП, с каждым последующим

испытанием от ТД ПТД до ТП ПТП (в пределах 15.7-, 17.3- и 24.52- кратного) (Рис. 6 И-Л), но с резким снижением в случае предшествования ТП ПТД (порядка лишь 3.07-кратного) (Рис. 6 М), в то время как значения снижения величин частоты активности, в условиях протекции ядом *N.oxiana*, в сравнении с моделью БП, резко изменялись (будучи в пределах, 1.28-, 1.14-кратного), но опять с достаточным снижением уже как для ТП ПТП, так и ТП ПТД – 2.43 и 2.30-кратного (Рис. 6 Л, М). Наконец, с той же тенденцией нарастания (до ТП ПТП) определялось увеличение разницы активности в условиях протекции, в сравнении с нормой (в пределах 13,36-, 14.13-, 10.10-кратного) и также с достаточным спадом в случае ТП ПТД (порядка 1.30) (Рис. 6 И-М).

Таким образом, на модели БП условиях протекции ядом *N.oxiana* выявляется снижение постстимульных возбуждительных эффектов и понижение частоты спайков в нейронах SNc, что свидетельствует о протекторном эффекте яда *N.oxiana*, а также о снижении эксайтотоксичности.

Соотношение возбуждательных и депрессорных постстимульных синаптических процессов в нейронах черной субстанции при активации бледного шара на модели БП и в условиях протекции Галармином, в сравнении с нормой.

В нейронах SNc при ВЧС GP у интактного животного ТД в депрессорной и депрессорно-возбудительной последовательности в норме 2.0-кратно превысила уровень претимпульной активности (Рис. 7 А, Группы А, Б); в возбуждательной и возбуждительно-депрессорной последовательности ТП оказалась выше претимпульной активности 1.0- и 3.5-кратно, соответственно (Рис. 7 Б, Группы А, Б).

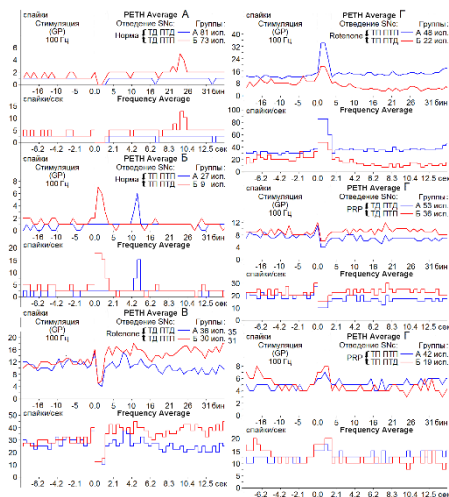


Рис. 7. А-Е - усредненные перистимульные гистограммы (PETH Average) депрессорных (А, В, Д, Группы А, В), депрессорно-возбудительных (А, В, Д, Группы Б, Г), возбуждательных (Б, Г, Е, Группы А, В) и возбуждительно-депрессорных (Б, Г, Е, Группы Б, Г) постстимульных тетанических и посттетанических проявлений активности нейронов SNc при ВЧС GP в норме (А, Б), на ротеноновой модели БП (В, Г) и с протекцией Галармином (PRP-1) спустя 4 недели (Д, Е). Обозначения: исп. – испытания, сек – секунды, мс – миллисекунды. Уровень значимости $P < 0.05$.

На модели БП в депрессорной последовательности ТД достигала 3.0-кратного занижения претимпульной активности, в депрессорно-возбудительной – 3.2-кратного (Рис. 7 В, Группы А, Б), в возбуждательной – 2.26-кратного, в возбуждительно-депрессорной – 1.46-кратного (Рис. 7 Г, Группы А, Б). На модели БП в условиях протекции Галармином ТД в депрессорной последовательности претерпевала 2.75-кратное занижение претимпульной активности, в депрессорно-возбудительной – 2.0-кратное (Рис. 7 Д, Группы А, Б), в возбуждательной – 1.16-кратное, в возбуждительно-депрессорной – 1.14-кратное (Рис. 7 Е, Группы А, Б). Таким образом, получено фактическое приближение к норме всех показателей постстимульных тетанических

проявлений активности нейронов SNc, за исключением лишь возбuditельно-депрессорной последовательности (более чем двухкратного снижения, в сравнении с нормой), в условиях протекторного воздействия Галармина. Иными словами, очевидно протекторное воздействие Галармина, направленное против эксайтотоксичности (Рис. 7).

Анализ относительных показателей частотных постстимульных проявлений активности нейронов SNc при ВЧС GP, в сравнении с престимульными, показал, что, в целом, наметилась тенденция значительного увеличения частоты активности нейронов SNc, предшествующей постстимульным депрессорным и возбuditельным эффектам на модели БП (8.24-, 6.27-, 13.2- и 4.21-кратно), по сравнению с нормой, особенно выраженное в случае возбuditельных постстимульных эффектов и, как правило, ее уменьшение с использованием Галармина (1.51-, 1.31-, 2.5- и 1.48-кратно) (Рис. 8 Д-З).

Анализ постстимульной активности нейронов SNc при ВЧС GP показал, что нарастала разница между нормой и моделью БП, с каждым последующим испытанием от ТД ПТД до ТП ПТП (в пределах 14.70-, 18.45-, 24.52-кратно) (Рис. 8 И-Л), но с резким снижением в случае предшествования ТП ПТД (порядка лишь 3.00-кратного) (Рис. 8 М), в то время как значения снижения величин частоты активности, в условиях протекции Галармином, в сравнении с моделью БП, резко не менялись (будучи в пределах, 1.04-, 3.78- и 2.54-кратного), но с приближением в случае ТД ПТП (16.03 против 16.40) (Рис. 8 И-М). Наконец, определялось сближение показателей активности в условиях протекции, в сравнении с нормой, хотя и без достижения нормы (в пределах 14.1-, 18.85-, 5.06- и 1.18-кратно), но с лучшим достижением в случае возбuditельных постстимульных эффектов (Рис. 8 И-М).

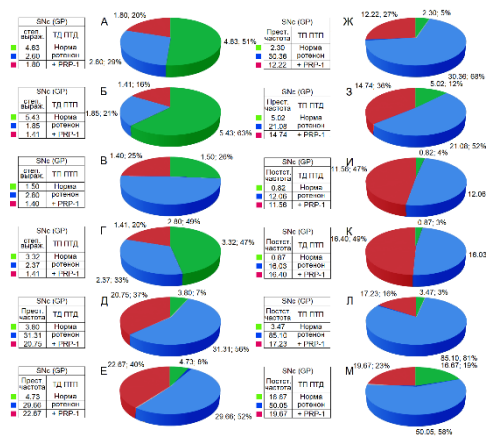


Рис. 8. Процентное соотношение степени выраженности депрессорных (А), депрессорно-возбuditельных (Б), возбuditельных (В) и в сочетании с депрессорными (Г) постстимульных эффектов в одиночных нейронах SNc при ВЧС GP в норме, на модели БП спустя 4 недели после введения рофенона и с протекцией Галармином (PRP-1). Сравнительные частоты пре- (Д-З) и постстимульной (И-М) активности, предшествующие соответствующими депрессорными и возбuditельными постстимульными эффектами, в норме, на модели БП и в условиях протекции Галармином.

Таким образом, Галармин, яд *M.raddei* и яд *N.oxiana* зарекомендовали себя в качестве перспективных протекторов при БП успешным снижением тетанических постимпульных возбuditельных эффектов в SNc в условиях протекции вышеуказанными терапевтическими агентами и углублением тетанических постимпульных депрессорных эффектов в SNc в условиях протекции ядом *M.raddei*. Этот феномен входит в реестр компенсаторных механизмов, неизбежно вовлекаемых при нейродегенерациях как специфического, так и неспецифического происхождения. И это действительно может служить в качестве показателя эффективности терапевтической стратегии, что собственно и было показано в настоящей работе. Результаты исследования позволяют признать очевидную тенденцию протекторного воздействия яда *M.raddei* на мощную эксайтотоксичность, сопровождающую нейродегенеративные изменения при БП.

Морфогистохимические исследования

Целью настоящей работы было изучение влияния Галармина, яда *N.oxiana* и яда *M.raddei* на морфофункциональное состояние клеточных структур SNc и GP мозга крыс, подвергнутых ротеноновой интоксикации (модель БП), в сравнении с нормой.

Исследование клеточных структур черной субстанции

У интактных животных основная часть SNc – это средних размеров мультиполярные нейроны разнообразной формы – треугольные, вытянутые, полигональные, с диффузным распределением хроматофильного вещества цитоплазмы, богатые пигментом нейромеланином. (Рис. 9 А-В; Рис. 10 А-В). Все клетки содержат длинные аксоны, имеют несколько умеренно или слабо ветвящихся отростков.

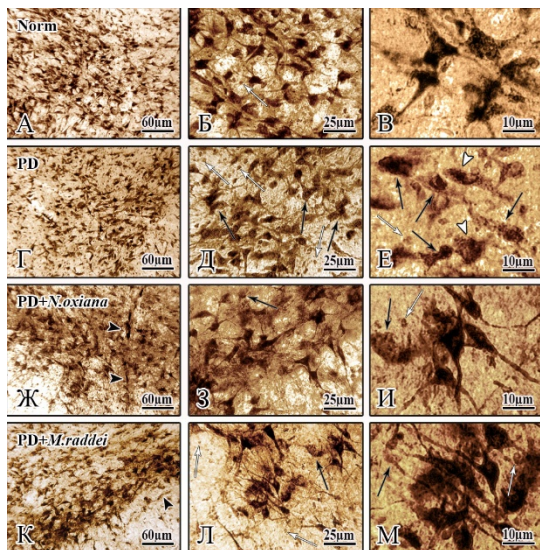


Рис. 9. SNc интактных (А-В, Norm) и экспериментальных (Г-М) крыс (Г-Е – модель БП (PD); Ж-И – модель БП в сочетании с введением яда *N.oxiana* (PD+N.oxiana); К-М – модель БП в сочетании с введением яда *M.raddei* (PD+ *M.raddei*); Г-Е – нарушение формы, просветление цитоплазмы, эктопия ядра, утолщение отростков; Ж-М – нейроны с характерными для SNc формами и размерами, высокая активность КФ в цитоплазме и отростках, ядра центрально расположены) (черная стрелка – хроматолиз; белая стрелка – ядра глии; белая головка стрелки – эксцентрично расположенное ядро; черная головка стрелки – сосуд).

В условиях ротеноновой интоксикации выявлено нарушение нейроархитектоники в SNc. По сравнению с нормой, отмечается уменьшение плотности нейронов. Поражение нервной клетки сопровождается лизисом гранул хроматофильного вещества (тигроида) цитоплазмы вплоть до ее просветления, в телах поврежденных нейронов осадок фосфата свинца распределен в основном гомогенно. Хроматолиз базофильного вещества цитоплазмы наблюдается в разной степени выраженности: сегментарный, перинуклеарный (Рис. 9 Д, Е; Рис. 10 Д, Е). Фосфатазная активность в цитоплазме клеток снижена, что свидетельствует о понижении метаболизма в нейронах обеих частей SN. Наблюдается депигментация нейронов SNc, выявляются светлые клетки с полным отсутствием меланина вследствие его выхода в межклеточное пространство (Рис. 9 Д, Е; Рис. 10 Д, Е). У клеток нарушена полигональная форма, не наблюдается четкого разграничения групп клеток. У некоторых клеток SNc полигональная форма сменяется на шарообразную из-за набухания тел (Рис. 9 Е; Рис. 10 Е). Контуры клеток становятся неправильными, нечеткими, появляются участки, где клеточная оболочка неразличима, не просматривается граница между телом и отростками (Рис. 9 Е; Рис. 10 Д, Е).

В целом, у нейронов реагируют длинные отростки, но фосфатазная активность в них снижена, осадок фосфата свинца пылевидный или мелкозернистый. В некоторых случаях от тел нейронов отходит короткий утолщенный отросток. Дендриты представлены в виде коротких обрубков. У таких нейронов крупно-глыбчатый осадок фосфата свинца неравномерно распределен в теле клетки, что свидетельствует о возможном полном распаде (Рис. 9 Е; Рис. 10 Е). У большинства клеток отмечается деформация и набухание ядра, имеющего нечеткие контуры. Ядро постепенно перемещается к одному из полюсов клетки, принимает эксцентричное положение. В ретикулярной части черной субстанции (SNr) отмечается аналогичная картина поражения (в автореферате не представлено).

Таким образом, ротеноновая интоксикация мозга, помимо гибели нейронов и депигментации SN, приводит к резким морфологическим изменениям внутриклеточных структур, свидетельствующим о грубых метаболических нарушениях. Отмечаются разной степени поражения клеточных структур SN. Поражения нервных клеток в SN происходят по так называемому абiotрофическому типу.

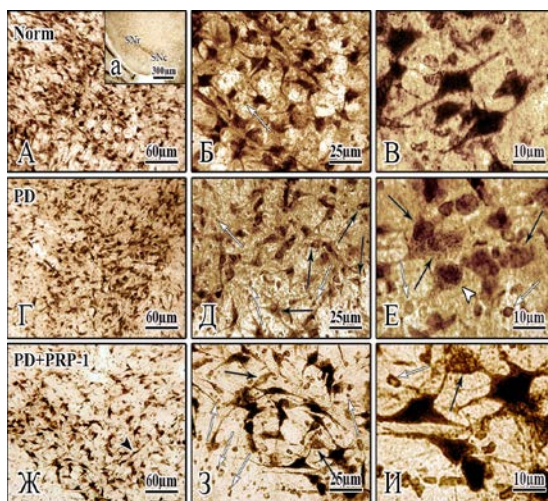


Рис. 10. SNc интактных (А-В, Norm) и экспериментальных (Г-И) крыс (Г-Е - модель БП (PD); Ж-И - модель БП в сочетании с введением Галармина (PD+PRP-1); Г-Е – форма нейронов нарушена, цитоплазма осветлена, ядро перемещено, отростки утолщены, лишены нейромеланина; Ж-И – сохранение формы, размеров нейронов, высокая активность КФ в цитоплазме и отростках, ядра центрально расположены) (черная стрелка – хроматин; белая стрелка – ядра глии; белая головка стрелки – эктопированное ядро; черная головка стрелки – сосуд).

У животных, получивших инъекцию ротенона в сочетании с последующими инъекциями яда *N.oxiana* и Галармина, изолированно в разных сериях, полигональность формы клеток SNc частично восстановлена, есть тенденция к восстановлению характерных для них размеров (Рис. 9 Ж-И; Рис. 10 Ж-И). У большинства нейронов SNc просматриваются светлоокрашенные центрально расположенные ядра, которые выделяются на фоне гиперхромной цитоплазмы; выявляются тонкие длинные отростки, что указывает на сохранение их связей с соседними клетками и другими областями мозга (Рис. 9 З, И; Рис. 10 З, И). На фоне сохранивших форму и размеры клеток местами выявляются пораженные нейроны, в которых активность КФ слабая, отростки не выявляются (Рис. 9 З; Рис. 10 З). В ряде случаев наблюдаются клетки, у которых прослеживаются короткие отростки, они интенсивно окрашены, ядра эктопированы (Рис. 9 Ж, З; Рис. 10 Ж, И). Среди крупных нейронов реагируют мелкие округлые клетки (Рис. 9 И). В целом, под воздействием яда *N.oxiana* и Галармина наблюдается морфологическая картина нейронов SNc, близкая к норме. Сильно реагируют расширенные сосуды, пронизывающие SNc (Рис. 9 Ж; Рис. 10 Ж). То есть, имеет место очевидное улучшение

васкуляризации. В межклеточном пространстве обнаруживаются ядра глиальных клеток, имеет место защитная реакция глиальных клеток по отношению к нейронам.

Аналогичные изменения наблюдаются в морфологической картине SNc под воздействием яда *M.raddei* на фоне ротеноновой интоксикации крыс. По сравнению с моделью БП наблюдается восстановление морфофункционального состояния клеточных структур SN – сохранение формы и размеров нейронов, увеличение плотности расположения клеток, выявляются ядра глии (Рис. 9 К-М). У большинства клеток выявляются длинные отростки, что важно для сохранения связей SNc с другими областями мозга и соседними нейронами. Бросается в глаза усиление васкуляризации (Рис. 9 К). По сравнению с нормой, наблюдается повышение фосфатазной активности в цитоплазме и ядре клеток, что говорит об активации обменных процессов, направленных на поддержание нарушаемого в результате ротеноновой интоксикации гомеостаза организма. Наряду с сохранившимися нейронами, изредка встречаются пораженные клетки (Рис. 9 Л, М). Аналогичная картина наблюдалась в SNr при интоксикации ротеноном и в условиях протекции ядом *N.oxiana*, ядом *M.raddei* и Галармином, соответственно (не представлено).

Итак, на модели БП под воздействием Галармина, змеиных ядов *M.raddei* и *N.oxiana* в нейронах SN мозга крыс отмечается сохранение морфологической картины, повышение метаболизма и плотности нейронов, усиление Ca^{2+} -зависимых процессов фосфорилирования, по сравнению с ротеноновой моделью БП. Это значит, что при своевременном выявлении болезни и соответствующем лечении значительная часть клеточных изменений, наблюдаемых при БП, может быть обратимой.

Исследование клеточных структур бледного шара

GP состоит преимущественно из крупных нейронов (около 50 мк), которые бывают разной формы - пирамидной, веретенообразной, мультиполярной. В цитоплазме нейронов много равномерно распределенных хроматофильных глыбок. В GP имеются также мелкие нейроны - в роли промежуточных элементов (Рис. 11 А-В; 12 А-В).

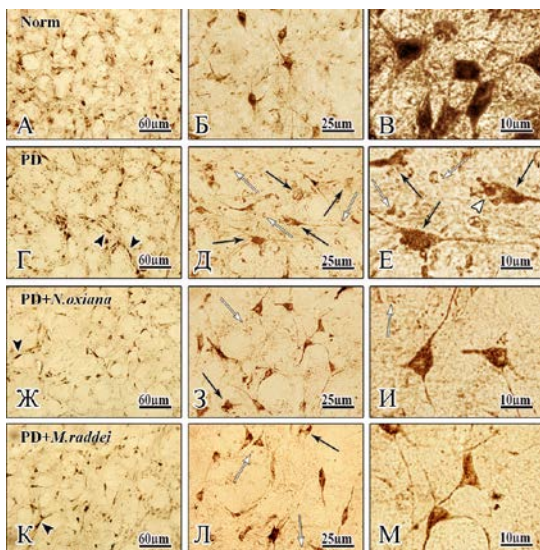


Рис. 11. GP интактных (А-В, Norm) и экспериментальных (Г-М) крыс (Г-Е – модель БП (PD); Ж-И – модель БП в сочетании с введением яда *N.oxiana* (PD+N.oxiana); К-М – модель БП в сочетании с введением яда *M.raddei* (PD+M.raddei)). Г-Е – форма нейронов нарушена, цитоплазма осветлена, низкая активность КФ, ядро перемещено, отростки сохранены, но лишены тигроидного вещества; Ж-М – сохранение формы и размеров нейронов, высокая активность КФ в цитоплазме и отростках, ядра центрально расположены (черная стрелка – хроматолиз; белая стрелка – ядра глии; белая головка стрелки – эктопия ядра; черная головка стрелки – капилляры).

Нейроны GP имеют разветвленную сеть дендритов, среди них проходят пучки волокон по пути к коре головного мозга. Эти крупные нейроны дают начало быстропроводящим длинным аксонам (Рис. 11 А, Б; 12 А, Б).

В условиях ротеноновой интоксикации цитоархитектоника нейронов GP не нарушена (Рис. 11 Г; 12 Г). Часть нейронов GP имеют 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. 11 Г-Е; 12 Г-Е). В целом, у нейронов реагируют длинные отростки, но фосфатазная активность в них снижена, осадок фосфата свинца в них пылевидный или мелкозернистый. На фоне нормальных клеток выявляются различные типы клеточной атрофии (Рис. 11 Д, Е; 12 Д, Е). 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. 11 Е; 12 Е). В поврежденных нейронах темноокрашенный крупно-глыбчатый осадок фосфата свинца неравномерно распределен по телу клетки, из-за чего не просматривается граница между телом и отростками (Рис. 11 Д, Е). Некоторые нейроны подвергнуты сильно выраженной атрофии, которая может привести к их исчезновению (Рис. 12 Г, Е). Внутри клеток происходят значительные изменения цитоплазмы и ядра. Подобные нейроны приобретают вытянутую форму, теряют отростки, их цитоплазма слабо окрашена, ядро эктопировано и деформировано (Рис. 11 Д; 12 Д, Е). Снижение фосфатазной активности в цитоплазме клеток свидетельствует о снижении обменных процессов (метаболизма) в нейронах GP.

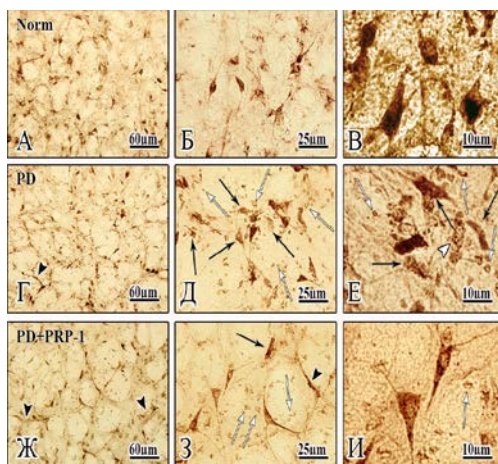


Рис. 12. Микрофотографии GP intactных (А-В, Norm) и экспериментальных (Г-И) крыс (Г-Е – модель БП (PD); Ж-И – модель БП в сочетании с введением Галармина (PD+PRP-1)). Г-Е – форма нейронов нарушена, цитоплазма осветлена, краевой гиперхроматоз; Ж-И – форма и размеры нейронов сохранены, в цитоплазме и отростках нейронов высокая активность КФ, ядра центрально расположены (черная стрелка – хроматоллиз; белая стрелка – ядра глии; белая головка стрелки – эксцентрично расположенное ядро; черная головка стрелки-капилляры).

У животных, получивших инъекции яда *N.oxiana* и яда *M.raddei* через день после унилатерального введения ротенона, в GP наблюдаются сохранившие характерные форму и размеры нейроны (Рис. 11 Ж-И, К-М). У большинства из них просматриваются светлоокрашенные центрально расположенные ядра, которые выделяются на фоне гиперхромной цитоплазмы, что характерно для нормы. У них выявляются тонкие длинные отростки с высокой активностью КФ, что указывает на сохранение их связей с соседними клетками и другими областями мозга. В этих клетках грануляции внутри

цитоплазмы формируют спиралевидные или глыбчатые образования (Рис. 11 И, М). Увеличено число клеток с сопровождающими миелиновыми волокнами (Рис. 11 Ж, З, К, Л). На фоне сохранивших форму и размеры клеток изредка выявляются пораженные дегенерированные нейроны, потерявшие форму и размеры, у них не выявляются отростки (Рис. 11 З, Л). В целом, под воздействием яда *N.oxiana* и яда *M.raddei* наблюдается морфологическая картина нейронов GP, близкая к норме. При введении ядов имеет место очевидное улучшение васкуляризации, на стенках сосудов четко и интенсивно окрашиваются темные перicyты (Рис. 11 Ж, К). В межклеточном пространстве, на фоне сохранившихся нейронов, обнаруживаются ядра глиальных клеток, но в меньшем количестве, чем при введении ротенона без протекции, то есть глиальная реакция успокаивается.

Аналогичная картина протекции наблюдается в GP под воздействием Галармина на фоне ротеноновой интоксикации крыс. У животных, получивших инъекцию ротенона в сочетании с систематическим введением Галармина, в GP отмечается тенденция к сохранению характерных для нейронов размеров и форм, у них реагируют отростки с высокой активностью КФ (Рис. 12 Ж-И). Осадок фосфата свинца в цитоплазме клеток мелкогранулярный, отмечается незначительное снижение фосфатазной активности, в сравнении с нормой. Изредка выявляются пораженные нейроны (Рис. 12 З). Наблюдаются микрососуды с перicyтами и ядра глии (Рис. 12 Ж, З).

Таким образом, под влиянием Галармина, малых доз змеиных ядов *N.oxiana* и *M.raddei* в нейронах SN и GP наблюдаются положительные изменения структурных свойств по сравнению с ротеноновой моделью БП, сохранение характерной морфологической картины. У большинства клеток реагируют длинные отростки с высокой активностью КФ, что важно для сохранения межклеточных контактов GP с другими областями мозга. По сравнению с моделью БП наблюдается повышение фосфатазной активности в цитоплазме клеток, что говорит об ускорении обменных процессов, которые были нарушены в результате ротеноновой интоксикации. Можно предположить, что Галармин, а также малые дозы ядов *N.oxiana* и *M.raddei* проявляют нейропротекторные свойства в отношении клеточных структур мозга, поражаемых при БП, за счет их включения в механизмы восстановления и ремоделирования путем повышения выживаемости поражаемых нейронов и сохранения межклеточных контактов с различными областями мозга, ответственными за двигательные функции организма.

ВЫВОДЫ

1. На модели БП, в сравнении с нормой, выявлено повышение частоты пре- и постстимульной активности в нейронах SNc и изменение в соответствующих соотношениях депрессорных и возбудительных эффектов, что свидетельствует о мощной эксайтотоксичности.
2. На модели БП в нейронах SNc в условиях протекции змеиными ядами *N.oxiana*, *M.raddei* и Галармином выявлено значительное снижение частоты пре- и постстимульной активности нейронов, а также снижение завышенных возбудительных постстимульных эффектов, что является результатом подавления эксайтотоксичности и проявления успешной протекции.
3. В отличие от яда *N.oxiana* и Галармина, на модели БП в условиях протекции ядом *M.raddei*, наряду со снижением эксайтотоксичности, выявлено повышение сниженных постстимульных депрессорных эффектов, что свидетельствует о более эффективном протекторном воздействии яда *M.raddei*.
4. Морфогистохимические изменения нейронов GP и SN на ротеноновой модели БП характеризуются общей тенденцией структурно-метаболической дисфункции -

резкими морфологическими изменениями внутриклеточных структур, свидетельствующими о грубых метаболических нарушениях.

5. В условиях протекции ядами *N.oxiana*, *M.raddei* и Галармином на модели БП получены положительные изменения с повышением метаболизма, характеризующим клеточное выживание, с сохранением и нормализацией структуры, усилением Ca^{2+} -зависимого фосфорилирования и предотвращением нейродегенерации.
6. По сравнению с ядом *N.oxiana* и Галармином, яд *M.raddei* проявляет себя более эффективным нейропротектором, что, видимо, обусловлено различиями в пептидном составе змеиных ядов и Галармина и в механизмах воздействия их терапевтических доз на поражаемые при БП структурные мишени.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Karapetyan K.V., Poghosyan M.V., Avetisyan Z.A., Sarkissian J.S. The effect of the globus pallidus on the substantia nigra neurons // The New Armenian Medical Journal ("ScienceWeek-2017" Conference, 27 Nov. – 1 Dec., 2017, vol. 11, № 3, p. 31.
2. Карапетян К.В., Погосян М.В., Гевондян Т.А., Даниелян М.Г., Саркисян Дж.С. Соотношение возбуждательных и тормозных синаптических процессов в паллидо-нигральной проекции на модели болезни Паркинсона в условиях одностороннего введения ротенона // Журнал «Ассиметрия», 2017, т. 11, №4, с. 5-16.
3. Карапетян К.В. Соотношение возбуждательных и депрессорных синаптических процессов в нейронах черной субстанции на стимуляцию бледного шара у крыс // Медицинская наука Армении, 2018, т. 58, № 1, с. 32-39.
4. Карапетян К.В., Даниелян М.А., Назарян О.А., Антонян И.В., Погосян М.В., Саркисян Дж.С. Влияние яда среднеазиатской кобры на нейроны черной субстанции на модели болезни Паркинсона // "Вестник БГМУ", Уфа, 2019, № 6, с. 66-77.
5. Poghosyan M.V., Karapetyan K.V., Ghevondyan T.H., Sarkissian J.S. The correlation of excitatory and depressor synaptic processes in pallido-nigral projection on the model of Parkinson's disease with protection by *Vipera raddei* venom // EU-IST 2018, Materials of the 19th Congress of the European Section of the International Society of Toxinology". *Toxicon*, 5 March 2019, Volume 159, Supplement 1, Page S17.
6. Karapetyan K.V., Poghosyan M.V., Sarkissian J.S. The correlation of excitatory and depressor synaptic processes in pallido-nigral projection on the model of Parkinson's disease with protection by NOX venom // EJNS, Armenia, 2020, v. 34, № 1, p. 71-75.
7. Карапетян К.В. Патогенез и факторы риска развития болезни Паркинсона // Медицинская наука Армении, 2020, т. 60, № 1, с. 16-32.
8. Даниелян М.А., Карапетян К.В., Назарян О.А., Небогова К.А., Погосян М.В., Саркисян Дж.С. Протекторный эффект галармина на черную субстанцию крыс на модели болезни Паркинсона // Медицинская наука Армении, 2020, т. 60, № 2, с. 18-27.
9. Карапетян К.В., Даниелян М.А., Погосян М.В., Саркисян Дж.С. Структурные изменения бледного шара мозга крыс на ротеноновой модели болезни Паркинсона под влиянием яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* и галармина // Медицинская наука Армении, 2020, т. 60, № 3, с. 52-61.
10. Даниелян М.А., Карапетян К.В., Назарян О.А., Небогова К.А. Морфогистохимическое исследование изменений в нейронах бледного шара на модели болезни Паркинсона и в условиях введения яда армянской гадюки // Доклады НАН РА, 2020, т. 120, № 3, с. 222-230.
11. Карапетян К.В., Даниелян М.А., Назарян О.А. Влияние яда армянской гадюки на морфофункциональное состояние нейронов бледного шара на модели болезни Паркинсона // Материалы XVI Всероссийской конференции с международным участием "Совещание по эволюционной физиологии имени академика Л.А. Орбели" (19–22 октября 2020 г.) и IX школы по эволюционной физиологии (22–24 октября 2020 г.), Журнал эволюционной биохимии и физиологии, Санкт-Петербург, т. 56, № 7, с. 606-607.

ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ ԶՐԻՍՏԻՆԵ ՎԱՆԻԿԻ

ՊԱՐԿԻՆՍՈՆԻ ԶԻՎԱՆԴՈՒԹՅԱՆ ՍՈՂԵԼՈՒՄ ՊԱԼԵՆՈՒԹՅԱՆ ՊՐԵԿԵԶԻԱՅԻ ՍՈՐՖՈՖՈՒՆԻՆԱԼ ՅԵՏԱՉՈՏՈՒԹՅՈՒՆԸ՝ *N.A.J.A* *OXIANA, MONTIVIPERA RADDEI* ԹՈՒՅՆԵՐՈՎ և ԳԱԼԱՐՍԻՆՈՎ ՊՐՈՏԵԿԶԻԱՅԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

ԱՄՓՈԹԱԳԻՐ

Պարկինսոնի հիվանդության (ՊՀ) մոդելում, դժգույն գնդի (ԴԳ) բարձր հաճախականային խթանման պայմաններում, էլեկտրաֆիզիոլոգիական մեթոդի կիրառմամբ, իրականացվել է սև նյութի կոմպակտ հատվածի (SNc) մեկական նյարդաբջիջների իմպուլսային ակտիվության դրդիչ և արգելակիչ ազդեցությունների հարաբերական արտահայտվածության աստիճանի վերլուծություն: Ուսումնասիրության արդյունքում բացահայտվել է արգելակիչ ազդեցությունների հետխթանիչ ակտիվության հաճախականության նորմայից ցածր մակարդակ, միևնույն ժամանակ դրդիչ ազդեցությունները գերակշռել են նեյրոդեգեներացիան ուղեկցող արտահայտված էքսայթոտոքսիկության արդյունքում: Այս մեխանիզմն գործում է որպես վնասված նյարդաբջիջների դրդիչ ակտիվության փոխհատուցման պատասխան:

ՊՀ մոդելում, Գալարմինի ազդեցության պայմաններում, բացահայտվել է հետխթանիչ արգելակիչ և դրդիչ ազդեցությունների նախորդող SNc նյարդաբջիջների գործունեության նախախթանիչ հաճախականության ակտիվության նվազում: Ինչ վերաբերվում է դրդիչ և արգելակիչ ռեակցիաներով ուղեկցվող նույն նյարդաբջիջների հետխթանիչ ակտիվությանը, ապա նորմայի համեմատ, պրոտեկցիայի պայմաններում, արձանագրվել է նյարդաբջիջների ակտիվության ցուցանիշների հավասարման միտում, սակայն չհասնելով նորմայի ցուցանիշին, ինչպես նաև դրդիչ հետխթանիչ ազդեցությունների նվազում, ինչը վկայում է էքսայթոտոքսիկությանը արդյունավետ հակազդելու մասին:

N.oxiana և *M.raddei* օձերի թույլների կիրառման պայմաններում ի հայտ են եկել գերակշռող դրդիչ հետխթանիչ ազդեցությունների զգալի նվազում (*M.raddei* թույլնով կրկնակի անգամ) և *M.raddei* կիրառմամբ արգելակիչ ազդեցությունների աճ՝ *N.oxiana* թույլի և Գալարմինի համեմատ: ՊՀ մոդելում գրանցվել է SNc նյարդաբջիջների նախախթանիչ ակտիվության հաճախականության զգալի աճ (իզոլ էքսայթոտոքսիկության ցուցանիշ) և վերջինիս զգալի նվազում՝ *M.raddei* թույլի (զրեթե երեք անգամ), *N.oxiana* թույլի և Գալարմինի կիրառման դեպքում (նորմային չհասնելով), ինչն էլ նպաստել է նեյրոդեգեներացիային հակազդելուն:

Այսպիսով, համաձայն հետազոտության արդյունքների, *N.oxiana*, *M.raddei* օձերի թույլները և իմունամոդուլատոր Գալարմինը դրսևորվել են որպես հեռանկարային նյարդապաշտպան միջոցներ, որոնց ազդեցության դեպքում SNc-ում, պրոտեկցիայի պայմաններում, արձանագրվել է սպայկային ակտիվության հաճախականությունն նշանակալի նվազում՝ ՊՀ համեմատ: Միաժամանակ, *M.raddei* թույլով պրոտեկցիայի հետևանքով SNc նյարդաբջիջներում խորացվում են տետանիկ հետխթանիչ ճնշող ազդեցությունները: Այս ֆենոմենը կարող է հանդես գալ որպես թերապևտիկ ռազմավարության արդյունավետության ցուցանիշ, ինչն էլ ցույց է տրված աշխատանքում:

ՊՀ ռոտենոնային մոդելում և պրոտեկցիայի պայմաններում ստացվել են առևտների գլխուղեղի SN և GP բջջային կառույցների մորֆոֆունկցիոնալ վիճակի վերաբերյալ համալիր ուսումնասիրության նոր տվյալներ: Պարզվել է, որ գլխուղեղի ռոտենոնային թունավորումը հանգեցնում է SN և GP նյարդաբջիջների մահվան և SN նյարդաբջիջների

դեպիզմենտացման, ինչպես նաև հանգեցնում է ներբջջային կառույցների կտրուկ մորֆոլոգիական փոփոխությունների՝ վկայելով նյութափոխանակության կոպիտ խանգարումների մասին: Ակնառու են SN և GP բջիջների կառույցների տարբեր աստիճանի խաթարումները: Բացահայտվել է, որ ՊՅ պայմաններում տեղի է ունենում նյարդաբջիջների, այսպես կոչված, աբիոտրոֆիկ տիպի խաթարում: Հիվանդության սկզբնական փուլում այս գործընթացը հիմնականում դարձել է: Ի տարբերություն ՊՅ ռոտենոնային մոդելի, *N.oxiana*, *M.raddei* օձերի թույլների փոքր չափաբաժինների և Գալարմինի ներարկման դեպքում SN և GP նյարդաբջիջների ձևաբանական պատկերը պահպանվում է, միևնույն ժամանակ նկատվում են նյարդաբջիջների կառուցվածքային հատկությունների դրական փոփոխություններ: Նորմայի հետ համեմատած, բջիջների ցիտոպլազմայում նկատվում է ֆոսֆատազային ակտիվության աճ, ինչը վկայում է ռոտենոնային թունավորման արդյունքում օրգանիզմի խաթարված հոմեոստազի պահպանմանն ուղղված նյութափոխանակության գործընթացների ակտիվացման մասին: ՊՅ հետևանքով զլխուղեղի վնասված բջջային կառույցներում Գալարմինը, ինչպես նաև *N.oxiana* և *M.raddei* օձերի թույլների փոքր չափաբաժինները ցուցաբերում են նյարդապաշտպան հատկություններ, որոնք ընդգրկվելով վերականգնման մեխանիզմներում, նպաստում են վնասված նյարդաբջիջների կենսակայունության բարձրացմանը, ինչպես նաև ուղեղի շարժողական գործառույթների համար պատասխանատու տարբեր կառույցների միմյանց հետ միջբջջային կապերի պահպանմանը: *M.raddei* թույլի փոքր չափաբաժինները, *N.oxiana* թույլի և Գալարմինի համեմատ, ցուցաբերում են ավելի արդյունավետ նյարդապաշտպան ազդեցություն, ինչն էլ, ըստ ամենայնի, պայմանավորված է օձի թույլի և Գալարմինի պեպտիդային կազմի տարբերություններով և միտոքոնդրիալ դիսֆունկցիայի և օքսիդատիվ սթրեսի վրա (լիպիդների պերօքսիդացման չեզոքացմամբ) դրանց ազդեցության մեխանիզմների տարբերությամբ, որոնք ՊՅ ռոտենոնային մոդելում ներգրավված պաթոֆիզիոլոգիական մեխանիզմներ են:

Ստացված տվյալները հիմք են տալիս ենթադրել, որ Գալարմինը, ինչպես նաև *N.oxiana* և *M.raddei* թույլների փոքր չափաբաժինները գործում են որպես նյարդապաշտպան գործոններ: Այնուամենայնիվ, ՊՅ թերապիայում Գալարմինի, *N.oxiana* և *M.raddei* օձերի թույլների առանձին կամ այլ դեղամիջոցների հետ համատեղ կիրառման համար անհրաժեշտ են լրացուցիչ հետազոտություններ թերապևտիկ չափաբաժինների ազդեցության մեխանիզմների բացահայտման համար:

KARAPETYAN K.V.

MORPHOFUNCTIONAL STUDY OF PALLIDONIGRAL PROJECTION IN A MODEL OF PARKINSON'S DISEASE UNDER PROTECTION WITH NAJA OXIANA, MONTIVIPERA RADDEI VENOMS AND GALARMINE

SUMMARY

Using electrophysiological studies, an analysis of the relative expression of depressor and excitatory effects of an impulse activity of single substantia nigra pars compacta (SNc) neurons during high-frequency stimulation of globus pallidus (GP) was carried out in a Parkinson's disease (PD) model. Studies revealed that frequency of post-stimulus activation of depressive effects was below the norm, while excitatory effects prevailed due to excitotoxicity

linked to neurodegeneration. This mechanism is considered as a compensatory response to the excitatory activity of damaged neurons.

In a PD model, under the action of Galarmin, a decrease in the prestimulus frequency of SNc neuronal activity preceding the poststimulus depressor and excitatory effects has been shown. As for the poststimulus activity of the same neurons, accompanied by excitatory and depressor reactions, a convergence of activity indices was determined under protection, compared to the norm, although without reaching the norm, as well as a decrease in excitatory poststimulus effects, which indicates that successfully counteracts the excitotoxicity.

With the use of *N.oxiana* and *M.raddei* venoms, increased excitatory poststimulus effects significantly decreased (two-fold in case of *M.raddei* venom) and an increase in depressor with the use of *M.raddei* venom, in contrast to *N.oxiana* venom and Galarmin has been revealed. In a PD model a significant increase in the frequency of the prestimulus activity of SNc neurons (a sign of powerful excitotoxicity) and a significant decrease with the use of *M.raddei* venom (almost threefold), *N.oxiana* venom and Galarmin (but without reaching the norm) was recorded, which contributed to the resistance to neurodegeneration.

Thus, according to the results of the study, *N.oxiana*, *M.raddei* snake venoms and the immunomodulator Galarmin have been shown promising effects as neuroprotective agents and under protective action in SNc successfully reduced the frequency of spike activity compared to PD. In addition, under conditions of *M. raddei* venom protection, tetanic post-stimulus depressive effects in SNc neurons have deepened. This can serve as an indicator of the effectiveness of therapeutic strategy, which, in fact, was shown in the work.

New data have been obtained from a comprehensive study of the morphofunctional state of the SN and GP cell structures of the rat brain using a rotenone PD model and under protective actions. Rotenone intoxication of the brain causes SN and GP neuronal death and depigmentation of SN neurons, as well as severe morphological changes in intracellular structures, indicating gross metabolic disorders. Various degrees of damage to the SN and GP cell structures are noted. Abiotrophic type nerve cell damage in PD occurs. Usually this condition is a reversible cellular process in the early stages of the disease. With the introduction of Galarmin and small doses of the snake venoms of *N.oxiana* and *M.raddei*, the morphological picture is preserved, as well as positive changes in the structural properties of the SN and GP neurons, compared with the PD model. Compared with the norm, there is an increase in phosphatase activity in the cytoplasm of cells, which indicates the activation of metabolic processes aimed at maintaining the body's homeostasis as a result of rotenone intoxication. It can be assumed that Galarmin and small doses of *N.oxiana* and *M.raddei* venoms exhibit neuroprotective actions against cellular structures of the brain affected by PD, due to their possible inclusion in the mechanisms of recovery by increasing the survival rate of damaged neurons and maintaining intercellular contacts with various brain regions responsible for the motor functions. Compared to *N.oxiana* venom and Galarmin, small doses of *M.raddei* venom appear to be a more effective neuroprotector, which is apparently due to differences in the peptide composition of snake venom and Galarmin and mechanisms of their effect on mitochondrial dysfunction and oxidative stress (by neutralization of lipid peroxidation), which are pathophysiological mechanisms involved in the rotenone PD model.

The data obtained suggest that Galarmin, as well as small doses of *N.oxiana* and *M.raddei* venoms, act as neuroprotective agents. However, further research is needed to identify the mechanisms of action of therapeutic doses of *N.oxiana* and *M.raddei* snake venoms and Galarmin and suggest them for PD therapy alone or in combination with other medications.