

Л.В.Дарбинян¹
Л.Э.Амбарцумян¹
К.В.Симонян²
Л.П.Манукян¹
В.А.Чавушян²
С.А.Бадалян¹
В.А.Саргсян¹

¹ Институт Физиологии им.
Л.А.Орбели НАН РА, Лаборатория
сенсомоторной интеграции

² Институт Физиологии им.
Л.А.Орбели НАН РА, Лаборатория
нейроэндокринных взаимоотношений
Ереван, Армения

Ключевые слова: Ротенон, гиппокамп, чёрная субстанция.

Надійшла: 27.10.2016
Прийнята: 07.12.2016

УДК 612.44.018:616.893-053.8-092.9

АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА ПРИ ВЫСОКОЧАСТОТНОЙ СТИМУЛЯЦИИ ЧЕРНОЙ СУБСТАНЦИИ, В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВЫЗВАННОЙ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА У КРЫС

Реферат. Ротенон является пестицидом, который вызывает поведенческие, биохимические и морфологические изменения у крыс. Объектом данного исследования является изучение влияния ротенона на синаптическую передачу в гиппокампе. Для этой цели техникой внеклеточного отведения *in vivo* регистрировали ответы нейронов СА1 и СА3 гиппокампа на высокочастотную стимуляцию черной субстанции. Наши экспериментальные результаты показывают, что ротенон оказывает подавляющее воздействие на синаптическую передачу в нейронах гиппокампа.

Morphologia. – 2016. – Т. 10, № 4. – С. 29-34.

© Л.В.Дарбинян, Л.Э.Амбарцумян, К.В.Симонян, Л.П.Манукян, В.А.Чавушян, С.А.Бадалян, В.А.Саргсян, 2016
✉ karensimonyan86@gmail.com

Darbinyan L.V., Hambardzumyan L.E., Simonyan K.V., Chavushyan V.A., Manukyan L.P., Badalyan S.A., Sarkisian V.H. Activity of hippocampal neurons upon high frequency stimulation of substantia nigra in experimentally induced Parkinson's disease in rats.

ABSTRACT. Background. Rotenone is a pesticide, which causes behavioral, biochemical and morphological changes in rats and reproduces features of Parkinson's disease, including selective nigrostriatal dopaminergic degeneration. **Objective.** The object of the current research is to investigate the effect of rotenone on synaptic transmission in hippocampus. **Results.** Hippocampal CA1 and CA3 neuronal responses upon high frequency stimulation of substantia nigra (100 Hz) were recorded by *in vivo* extracellular recording technique. Intraperitoneal injection of rotenone caused degeneration in the hippocampus and substantia nigra of rats. Changes in the electrical activity of hippocampal neurons were found. **Conclusion.** Our experimental results show that rotenone exerts an inhibitory effect on synaptic transmission in hippocampal neurons.

Key words: Rotenone, hippocampus, substantia nigra.

Citation:

Darbinyan LV, Hambardzumyan LE, Simonyan KV, Chavushyan VA, Manukyan LP, Badalyan SA, Sarkisian VH. [Activity of hippocampal neurons upon high frequency stimulation of substantia nigra in experimentally induced Parkinson's disease in rats]. *Morphologia*. 2016;10(4):29-34. Russian.

Введение

Болезнь Паркинсона (БП) – медленно прогрессирующее хроническое неврологическое заболевание, характерное для лиц старшей возрастной группы [1], вызываемое постепенным разрушением и гибелью нейронов, вырабатывающих нейромедиатор дофамин в чёрной субстанции (SN), а также и в других отделах центральной нервной системы [2]. Кардинальными проявлениями БП являются тремор в покое, ригидность, брадикинезия и утрата постуральных рефлексов. Исследования на культуре крысиных нейронов и микроглии [3] показали, что низкие дозы ротенона (меньше 10 нМ) индуцируют окислительное повреждение и гибель дофами-

нергических нейронов, а именно, эти нейроны в SN погибают при БП. Ротенон известен как специфический ингибитор переноса электронов в комплексе I дыхательной цепи митохондрий. У крыс ротенон вызывает избирательную дегенерацию дофаминергических нейронов в головном мозге и гипокинезию [4]. Патоморфологические нарушения обусловлены появлением в цитоплазме нейронов эозинофильных включений - телец Леви, диффузно распределенных в SN среднего мозга, гиппокампе, подкорковых ганглиях. Процедурная (имплицитная) память, отражающая приобретение моторного или когнитивного навыка путем повторения и, связанная с функцией стриатума, нарушена у больных с БП в

большей степени, чем требующая сознательного усилия декларативная (эксплицитная) память, зависящая от функции гиппокампа [5]. Важной особенностью строения гиппокампа является упорядоченность проводящих путей внутри этой структуры головного мозга с формированием замкнутых кругов циркуляции возбуждения. Потoki возбуждения циркулируют из зубчатой извилины к полям СА3, затем в поле СА1, откуда в субкикулюм. Более 70% синаптической передачи гиппокампа находится под контролем возбуждающих аминокислот. Подавляющее большинство гиппокампальных нейронов являются глутаматергическими [6]. Целью данной работы было изучение влияния ротенона на состояние гиппокампальных клеток, соотношение и выраженность синаптической потенциации и депрессии на ротеноновой модели БП у крыс и дегенеративные изменения в черной субстанции.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на половозрелых крысах Альбино (200-230 г). Ротенон (2.5 мг/мл, растворенного в подсолнечном масле) вводили животным один раз в день по соответствующей схеме (1 мл / кг, в течение 21 дня, интраперитонеально). Контрольной группе животных вводили подсолнечное масло (1 мл / кг). После каждого электрофизиологического эксперимента животных с трехнедельной моделью БП забивали, мозг фиксировали в 10% растворе формалина. Серийные замороженные срезы среднего мозга окрашивали 1% раствором метиленового зеленого или толуидиновым синим по Нисслю. Для анализа гистологических препаратов использовали атлас мозга крысы [7].

В группах “Контроль” и “Ротенон” в микроэлектрофизиологических исследованиях производили экстраклеточную регистрацию фоновой и вызванной спайковой активности единичных нейронов гиппокампа при высокочастотной стимуляции (ВЧС) SN. В остром эксперименте спустя 21 дней под уретановой анестезией (1,2 г/кг, в/б) животное обездвигивали 1% дитилином (25 мг/кг в/б), голову фиксировали в стереотаксическом приборе и переводили на искусственное дыхание. Спинной мозг перерезали ультразвуковым ножом на уровне грудных сегментов (T2-T3) для получения модели изолированного головного мозга. Раздражающий биполярный цилиндрический электрод погружали в SN по стереотаксическим координатам (AP-5.0; L±2.0; DV+7.5-8.0 мм), а стеклянный регистрирующий микроэлектрод с диаметром кончика 1 мкм, заполненный 2M раствором NaCl, многократно погружали в гиппокамп по координатам AP-3.2-3.5; L±1.5-3.5; DV +2.8-4.0 мм, согласно стереотаксическому атласу мозга крысы [7]. ВЧС (100 Гц в течение 1сек) осуществляли прямоугольным током амплитудой 0,16 мА. Проводили программный математический анализ одиночной

спайковой активности гиппокампа в контроле и на модели БП спустя 3 нед. Активность проявлялась в виде тетанической потенциации (ТП) и депрессии (ТД) с последующей посттетанической потенциацией (ПТП) и депрессией (ПТД) различной латенции, выраженности и длительности. On-line регистрацию производили на основе программы, обеспечивающей селекцию спайков посредством амплитудной дискриминации с последующим выводом «растеров» пре- и постстимульного спайкинга от множества нейронов, а также диаграмм усредненной частоты спайков (разработчик В.С. Каменецкий). Импульсный поток после селекции подвергался программному математическому анализу. Для избираемых сравниваемых групп спайкинга нейрональной активности строили суммированные и усредненные перистимульные (PETH Average), куммулятивные (Cumulative Average) гистограммы и гистограммы частоты (Frequency Average). Анализ полученных данных производили по специально разработанному алгоритму. Для определения статистической достоверности различий в длительности межспайковых интервалов до и после действия стимула использовался непараметрический критерий проверки однородности двух независимых выборок - двухвыборочный критерий Вилкоксона-Манна-Уитни. Так как число регистрируемых спайков было достаточно велико (до нескольких сотен спайков за 20 секундный интервал после действия стимула), использовалась разновидность указанного теста, учитывающая его асимптотическую нормальность - z-тест. Сравнение критических значений с табличными значениями нормального распределения при уровнях значимости 0.05, 0.01 и 0.001 (для различных испытаний), показывает, что в результате ВЧС для большинства выборок спайкинга нейрональной активности имеется статистически значимое изменение как минимум с уровнем значимости 0.05.

Результаты исследования

Сравнительный анализ импульсной активности гиппокампа при высокочастотной стимуляции (ВЧС) SN в группе “Контроль”, и на модели БП спустя 3 нед. выявил формирование возбуждательных и депрессорных ответов в виде ТП и ТД, с последующими постстимульными одно- и разнонаправленными проявлениями активности в виде ПТП и ПТД.

В группе животных, получивших “Ротенон”, в нейронах гиппокампа выявлено следующее распределение баланса типов вызванной импульсной активности (рис. 2): возбуждательные ответы (на время ВЧС и постстимульный временной отрезок) – 10,2 %, тормозные ответы (на время ВЧС и постстимульный временной отрезок) 25,51 %, ответы смешанного типа (торможение на время ВЧС и возбуждение, на постстимульный временной отрезок) – 30,95 % и ареак-

тивные единицы – 8,16 %. При этом усредненные возбудительные ответы на время ВЧС выражены 2,88 раз, тормозные – 4,26 раза (рис. 2) и 4.1 раза в ответах смешанного типа (ТД ПТП на

рис. 2). Такие в контрольной группе выражены 4,02 (ТД на рис. 1) раза, 4.78 (ТД ПТП на рис. 1) раза соответственно.

Таблица 1
Цифровые показатели средней частоты престаимпульного, постстимульного спайкового потока и такового на время ВЧС, а также долевое соотношение для указанных типов ответов в группе "Ротенон"

Типы ответов	Средняя частота престаимпульного спайкового потока (имп/сек)	Средняя частота спайкового потока на время ВЧС (имп/сек)	Средняя частота постстимульного спайкового потока (имп/сек)	Процентная доля из всех зарегистрированных нейронов
ТД	14.32	3.56	14.31	36.56 %
ТД ПТД	16.25	4.05	12.16	22.58 %
ТД ПТП	19.66	4.11	25.16	37.63 %
ТП ПТП	6.95	10.67	10.65	3.23 %

Таблица 2
Цифровые показатели средней частоты престаимпульного, постстимульного спайкового потока и такового на время ВЧС, а также долевое соотношение для указанных типов ответов в группе "Контроль"

Типы ответов	Средняя частота престаимпульного спайкового потока (имп/сек)	Средняя частота спайкового потока на время ВЧС (имп/сек)	Средняя частота постстимульного спайкового потока (имп/сек)	Процентная доля из всех зарегистрированных нейронов
Ареактивные	6.66	5.75	6.25	8.16%
ТД	14.18	3.33	14.11	25.51%
ТП	6.30	18.13	5.57	10.2%
ПТД	12.36	12.00	8.58	1.7%
ТД ПТД	20.99	6.40	14.78	15.3%
ТД ПТП	26.30	6.46	34.14	30.95%
ТП ПТД	10.45	48.00	7.30	2.04%
ТП ПТП	12.66	74.17	18.29	6.12%

Контрольная группа

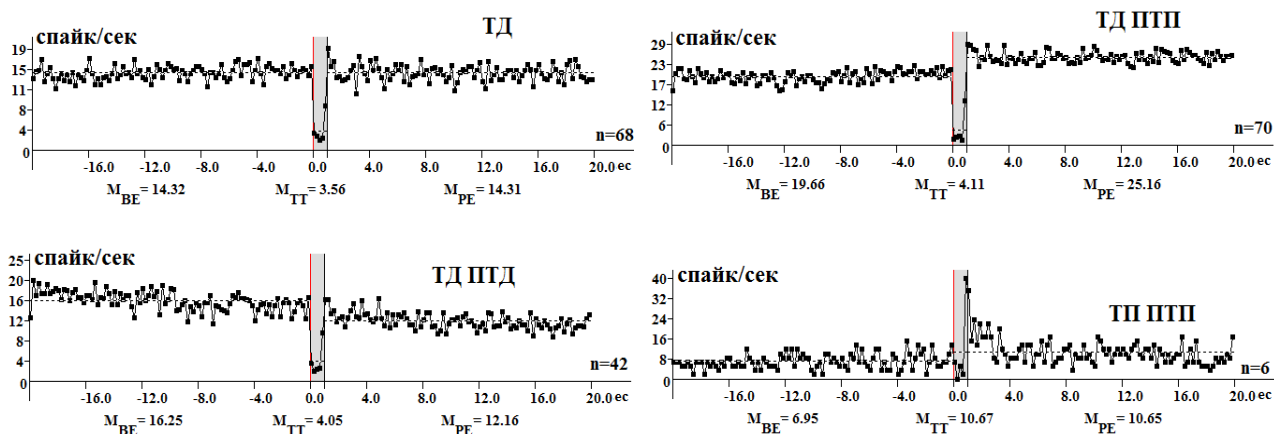


Рис 1. Перистимульные временные гистограммы суммы спайков, построенные на основе представленной в растере развернутой во времени перистимульной активности отдельных нейронов гиппокампа для популяций нейронов с возбудительными, тормозными и ТД, ТД ПТД, ТД ПТП и ТП ПТП типами ответов в группе "Контроль".

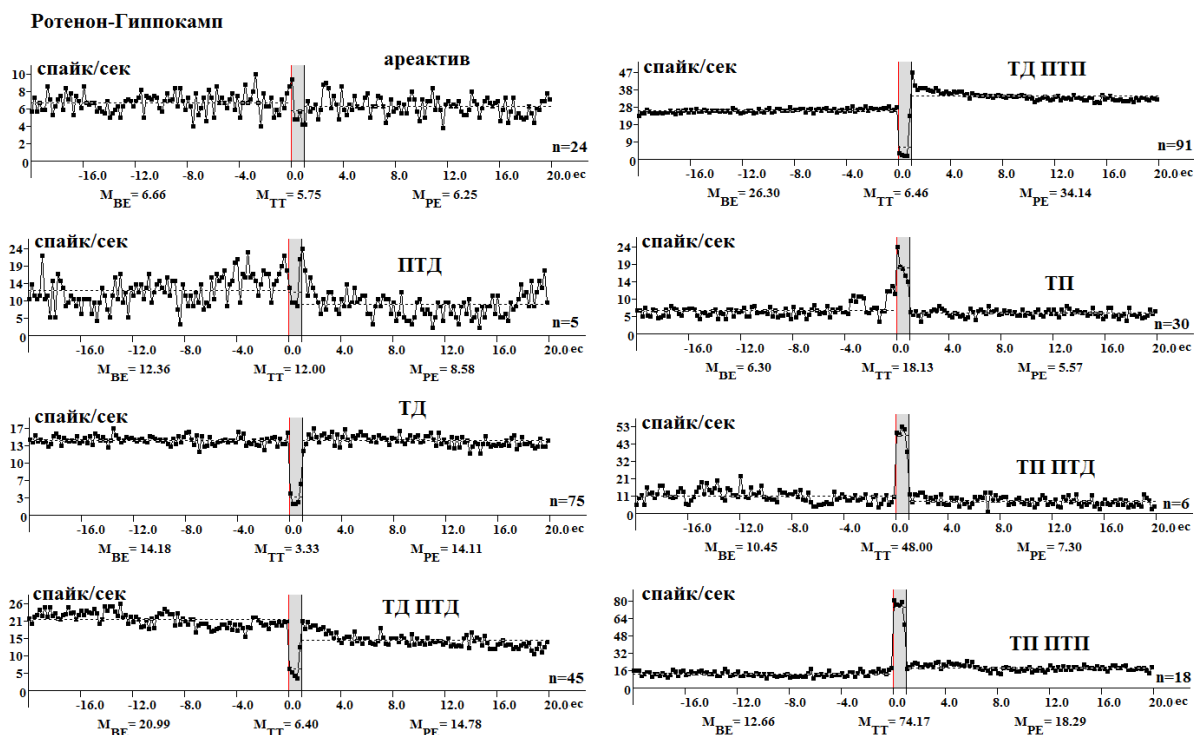


Рис 2. Перистимульные временные гистограммы суммы спайков, построенные на основе представленной в растре развернутой во времени перистимульной активности отдельных нейронов гиппокампа для популяций нейронов с возбудительными, ареактивными, тормозными ТП ПТД, ТП ПТП и ТД ПТП типами ответов в группе Ротенон-Гиппокамп.

Морфологический анализ изменений в черной субстанции

В дополнение к электрофизиологическим проводились морфологические исследования черной субстанции с целью выявления патологических изменений, вызванных ротеноном. Материал забирали после каждого электрофизиологического эксперимента в указанные сроки после введения ротенона. Контролем служили интактные крысы. Исследование черной субстанции после создания экспериментальной ротеноновой модели БП выявляет широкий спектр патологических изменений в нейронах черной субстанции, в частности, в ее компактной области. Следует отметить, что в норме нейроны черной субстанции проявляют большую хроматофильность по сравнению с нейронами других ядер. На препаратах мозга интактных крыс (контроль) нейроны черной субстанции интенсивно окрашиваются, в них хорошо просматриваются вещество Ниссля, светлое ядро, в центре которого темно-крашенное ядрышко (рис. 3, А, Б, В). В группе животных с ротеноновой моделью БП в популяции клеток черной субстанции наблюдается умеренно и резко гиперхромные клетки (Рис 3). Некоторые нейроны принимают угловатую или овальную форму, а их ядро и ядрышко неразличимы за счет резкой гиперхромии. Наличие гипер- и гипохромных нейронов принято считать

структурной основой перераспределения функциональной активности. Изменения в данных клетках рассматриваются как проявления защитно-компенсаторных реакций, в данном случае, возможно, в ответ на интоксикацию, вызванную ротеноном. В других нейронах на фоне понижения хроматофильности теряется четкость контуров клеток, гипертрофированные ядра отнесены к периферии, либо занимают все цитоплазматическое пространство (рис. 3, Г, Д, Е). При исследовании нейроглии выявляются активные глиальные реакции в виде визуально наблюдаемого увеличения числа ядер глиоцитов. Наряду с пролиферацией глии в некоторых участках черной субстанции начинает развиваться перивентрикулярный отек. Перивентрикулярный отек и его повреждающее действие на нейроны черной субстанции более выражены в компактной области ядра. Перивентрикулярный отек, как защитная ответная реакция, возможно, вызван накопившимися продуктами распада и невозможностью их утилизации в результате токсического действия ротенона. Однако, наряду с патологически измененными нейронами и их фрагментами, а также пролиферацией глии, часть нейронов нормохромно окрашены; в них отчетливо выявляются центрально расположенные ядро и ядрышко, что свидетельствует об их нормальном функционировании.

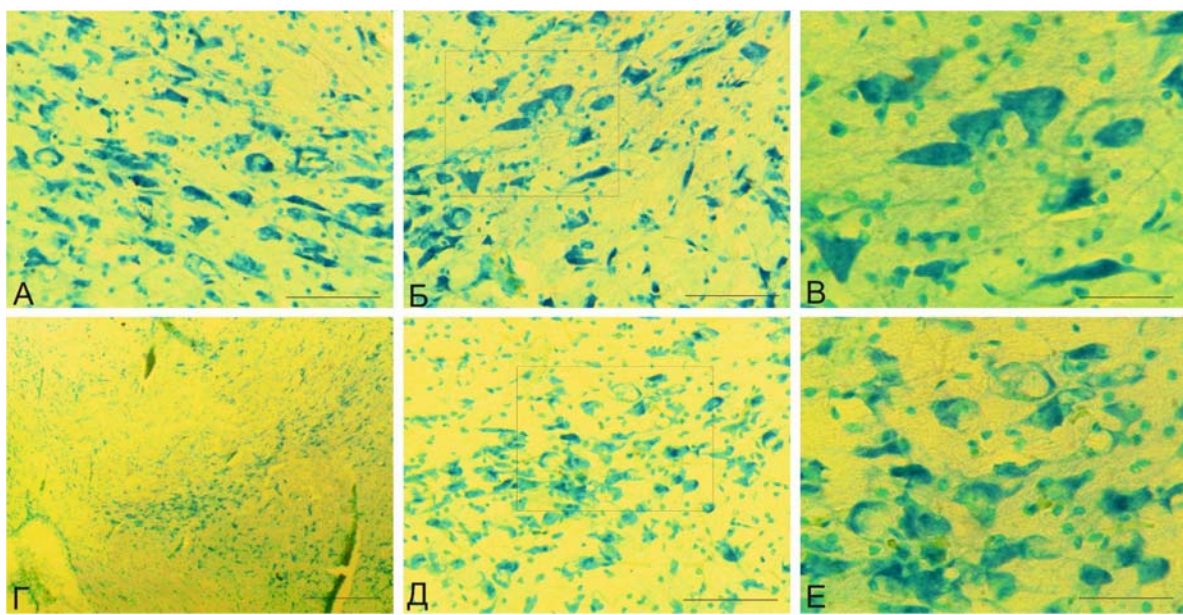


Рис 3. Микрофотографии фронтальных срезов черной субстанции: А, Б, В - контрольная группа. На В представлены нейроны, выделенные на Б, при большем увеличении. Г, Д, Е, - нейроны черной субстанции после вызова ротеноновой модели болезни Паркинсона. На Е представлены нейроны выделенные на Д. Окраска по Нисслю. Масштаб: А, Б, Д – 100 мкм, Г – 300 мкм, В, Е – 50 мкм.

Обсуждение

Для оценки состояния нейрональных клеток гиппокампа экспериментальным животным вводили ротенон в течение 21 дня. Эти данные сравнивали с результатами, полученными у контрольных животных. При электрофизиологическом исследовании гиппокампа контрольных и экспериментальных животных, в обеих группах были отмечены изменения нейронной активности. Ротеноновая модель - одна из моделей токсического паркинсонизма, которая вызывает nigrostriatную дегенерацию у грызунов, похожую по патогенетическим механизмам и симптомам на БП [8]. Преимущество ротеноновой модели, по сравнению с другими вариантами экспериментальных моделей БП, обеспечивается возможностью воспроизведения большинства симптомов расстройства движений и гистопатологических особенностей БП (например, образование телец Леви) [9]. В патогенезе БП у людей выявлены митохондриальная дисфункция, окислительный стресс, эксайтотоксичность, дисфункция убиквитин-протеасомного пути и апоптоз [4]. При БП ведущим механизмом омпатогенеза является гибель дофаминергических нейронов среднего мозга, индуцируемая дисфункцией митохондрий, окислительным стрессом и нейровоспалением вследствие активации микроглии, цитотоксичностью некоторых метаболитов, усилением функциональной активности клеток и нарушением нейро-глиальных взаимодействий [10]. У крыс максимальная концентрация NMDA рецепторов характерна для зоны CA1 гиппокампа. Для CA1 поля гиппокампа характерна также

высокая плотность других рецепторов возбуждающих аминокислот – а именно метаботропных mGluR1 рецепторов [11]. Главные гиппокампальные пирамидные и гранулярные нейроны представляют подавляющее большинство нейронов и составляют около 90% всех нейронов гиппокампа. Оставшиеся 10% представлены ГАМКергическими вставочными нейронами [12]. Вставочные нейроны формируют организованную сеть, которая контролирует и регулирует функционирование пирамидных и гранулярных нейронов. Группы ГАМКергических вставочных нейронов получают ГАМКергическую иннервацию из внегиппокампальных областей мозга, в то время как другие группы вставочных нейронов посылают аксональные проекции в другие внегиппокампальные области мозга. Гиппокампальная область содержит множество норадренергических, серотонинергических и холинергических аксональных окончаний [6]. В последние годы было показано, что дофамин оказывает возбуждающее действие лишь на некоторые интракаудатные нейроны, которые, получают прямые возбуждающие влияния от SN. При стимуляции SN около 50% нейронов подвергается торможению и лишь примерно 15% клеток возбуждается [13]. Необратимое ротеноновое вмешательство в глутаматергическую передачу может быть результатом дефицита транспортировки глутамата к пресинаптическим терминалям. Таким образом, ротенон может снизить уровень пресинаптического высвобождения глутамата. Более того, ингибирующее действие ротенона на нейрональные ответы может быть на

пресинаптическом, а не на постсинаптическом уровне [14]. Сообщалось, что ротенон уменьшает полевые потенциалы (fEPSP) на 17% в области CA1 гиппокампа. Есть и другие сообщения о повышении ротеноном ответов NMDA в срезах среднего мозга крыс, а эта потенцирующее действие связано с активацией рецепторов NMDA [15]. NMDA-рецепторы позволяют мембранному транспорту ионов натрия, калия и кальция работать в качестве детекторов совпадения, с момента открытия их каналов, требующих деполяризацию и высвобождение глутамата из пресинаптических нейронов одновременно. Каинатные и AMPA-рецепторы позволяют мембранному

транспорту ионов натрия и калия [16]. Тормозные эффекты, обнаруженные в нашем исследовании, предположительно, являются результатом непрямого, переключенного через ГАМКергические клетки, влияния.

Заключение

Наши экспериментальные результаты показывают, что ротенон оказывает подавляющее воздействие на синаптическую передачу в нейронах гиппокампа.

Перспективы дальнейших исследований

Полученные результаты являются предпосылкой к дальнейшим исследованиям, подтверждают их необходимость и актуальность.

Список литературы References

1. Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease. *Lancet*. 2004;363:1783-93.
2. Lanska DJ. The history of movement disorders. *Handb Clin Neurol*. 2010; 95:501-46.
3. Gao HM, Liu B, Hong JS. Critical role for microglial NADPH oxidase in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *The Journal of Neuroscience*. 2003;23(15):6181-7.
4. Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Greenamyre JT. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci*. 2003;23:10756-64.
5. Levin BE, Katzen HL. Early cognitive changes and nondementing behavioral abnormalities in Parkinson's disease. *Adv Neurol*. 2005;96:84-94.
6. Vizi ES. Neurochemistry and Pharmacology of the Major Hippocampal Transmitter Systems: Synaptic and Nonsynaptic Interactions. *Hippocampus*. 1998;8(6):566-607.
7. Paxinos G, Watson Ch. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th Edition. New York: Academic Press. 2005. 367 p.
8. Caboni P, Sherer TB, Zhang N. Rotenone, Deguelin, Their Metabolites, and the Rat Model of Parkinson's Disease. *Chem Res Toxicol*. 2004;17(11):1540-8.
9. Panov A, Dikalov S, Shalbuyeva N. Rotenone Model of Parkinson Disease. Multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. *J Biol Chem*. 2005;280(51):42026-35.
10. Shaikh SB, Nicholson LFB. Effects of chronic low dose rotenone treatment on human microglial cells. *Mol Neurodegener*. 2009;4(55):1-13.
11. Kloet ER. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev*. 1998;19(3):269-301.
12. Freund TF. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*. 1996;6(4):347-470.
13. Saybasili H, Yuksel M, Haklar G, Yalcin AS. Effect of mitochondrial electron transport chain inhibitors on superoxide radical generation in rat hippocampal and striatal slices. *Antioxid Redox Signal*. 2001;3:1099-104.
14. Ren Y, Liu W, Jiang H, Jiang Q, Feng J. Selective vulnerability of dopaminergic neurons to microtubule depolymerization. *J Biol Chem*. 2005;280:34105-12.
15. Wu YN, Johnson SW. Rotenone potentiates NMDA currents in substantia nigra dopamine neurons. *Neurosci Lett*. 2007;421:96-100.
16. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*. 1999;51:7-61.

Дарбінян Л.В., Амбарцумян Л.Е., Сімонян К.В., Манукян Л.П., Чавушян В.А., Бадалян С.А., Саргсян В.А. Активність нейронів гіпокампа при високочастотній стимуляції чорної субстанції за умов експериментально викликаної хвороби Паркінсона у щурів.

Реферат. Ротенон є пестицидом, який викликає поведінкові, біохімічні та морфологічні зміни у щурів. Об'єктом даного дослідження є вивчення впливу ротенону на синаптичну передачу в гіпокампі. Для цієї мети технікою позаклітинного відведення *in vivo* реєстрували відповіді нейронів CA1 і CA3 гіпокампу на високочастотну стимуляцію чорної субстанції. Наші експериментальні результати показують, що ротенон надає переважний вплив на синаптичну передачу в нейронах гіпокампу.

Ключові слова: ротенон, гіпокамп, чорна субстанція.