

Бактериальный меланин как ускоритель восстановления моторики после повреждения кортико-руброспинальной системы двигательного контроля

Т.Р. Петросян¹, О.В. Геворгян²

¹ – Армянский государственный институт физической культуры, кафедра кинезиологии

² – Институт физиологии Национальной академии наук Армении, Ереван

Контактная информация: Петросян Т.Р., tigpetrosyan@mail.ru

Одностороннее разрушение руброспинального тракта у крыс после предварительной выработки инструментального условного рефлекса (ИУР) вызывает гемипарез конечностей противоположной стороны. На следующий день после операции половине оперированных животных вводили внутримышечно раствор бактериального меланина (БМ). Сравнение сроков восстановления ИУР и балансирующего движения парализованной задней конечности у крыс контрольной группы и животных, получавших меланин, показало, что срок посттравматического восстановления намного короче у животных последней группы. Такое ускорение восстановительного процесса является результатом протекторного влияния БМ и облегчения процесса переключения нисходящего регулирующего воздействия от руброспинальной к кортикоспинальной системе. Морфогистохимическое исследование показало, что БМ способствует спраунтингу нервных волокон и регенерации в нервной ткани.

Ключевые слова: инструментальный условный рефлекс, руброспинальный тракт, бактериальный меланин, посттравматическое восстановление, морфогистохимическое исследование.

Введение

Руброспинальная система является одним из нисходящих проекционных путей, который контролирует спинальные моторные нейроны. Использование всех конечностей соответствует тому периоду развития у животного, когда руброспинальный тракт устанавливает контакты со спинальными нейронами [5]. Совершенствование точностных движений связано со связями латерального мозжечка, с корой мозга и мелкоклеточной части красного ядра (КЯ) [11]. Эта проекционная система филогенетически предшествуют возникновению моторной коры и пирамидного тракта. КЯ на этом этапе представляет основную структуру для

координации мозжечковых и корковых посылок для контроля движений [14].

Исследованиями, проведенными методом повреждения кортикоспинального и руброспинального трактов, показано, что при организации движений эти тракты взаимно заменяют друг друга, а их функции сходны при регуляции скорости, силы и времени подключения движения. Переключение функций между этими трактами является основным механизмом восстановления нарушенных движений, наступающих после травмы каждого из них [12]. Но такое восстановление у взрослого животного бывает затяжным и неполным, особенно если не проводятся терапевтические мероприятия.

Настоящее исследование было проведено как продолжение работ, выполняемых в предыдущие годы, в которых после травмы некоторых структур ЦНС, участвующих в организации двигательной деятельности организма крыс, исследовалось влияние бактериального меланина на процесс посттравматической реабилитации [1, 3]. В работе представлены результаты влияния введения бактериального меланина на восстановление инструментальных рефлексов и балансирующего движения задней конечности после одностороннего разрушения руброспинального тракта у крыс.

Бактериальный меланин был получен в Институте биотехнологии РА из мутантного штамма *Bacillus thuringiensis*. Физико-химическими исследованиями было установлено, что этот пигмент является меланином [7]. Были проведены исследования по изучению физиологической активности бактериального меланина на животных моделях травматической нейродегенерации [3].

Материалы и методы

Работа выполнена на белых нелинейных крысах ($n=12$) в возрасте 2-3 мес., массой 200-250 г.

У всех животных заранее вырабатывался инструментальный рефлекс на равновесие, при котором они балансировали на медленно вращающемся (9 об./мин) горизонтальном бруске 250 сек, в течение которых крысы сохраняли постоянную позу и равновесие тела благодаря попеременному переставлению задних лап. Животных тестировали 10 раз в день, а интервал между тестами составлял 60 сек. После выработки прочного инструментального рефлекса под нембуталовым наркозом (40 мг/кг), на уровне верхних шейных сегментов (С3-4) унилатерально

разрушали руброспинальный тракт [13]. Разрушение приводило к парезу гомолатеральных конечностей.

Половине оперированных крыс ($n=6$) на следующий день после операции в/м вводили раствор бактериального меланина в концентрации 6 мг/мл, из расчета 170 мг/кг оперированных животных. Другая половина животных ($n=6$) служила контролем.

Через день после введения меланина всех оперированных животных брали на тестирование для возобновления выработки инструментального рефлекса до окончательного его восстановления.

Для изучения влияния БМ было проведено морфогистохимическое исследование срезов спинного мозга. Был использован гистохимический метод для выявления активности Ca^{2+} -зависимой кислой фосфатазы [4].

Результаты исследований

После операции клинические симптомы были выражены в первые 2 суток. Крысы ходили медленно, задняя лапа на стороне операции значительно отставала, часто они ее влачили по полу, четко виден был дефект флексии. До достижения нормального уровня выработки рефлекса животные не способны были долго продержаться на вращающемся бруске, быстро переворачивались и падали намного раньше положенного срока. Статистическая обработка данных показала, что инструментальный рефлекс у интактных крыс вырабатывался, в среднем, за $1,75 \pm 0,3$ суток, который у животных контрольной группы после возобновления выработки в постоперационный период восстановился, в среднем, за $13,7 \pm 1,3$ суток. У получивших после операции раствор бактериального меланина животных инструментальный

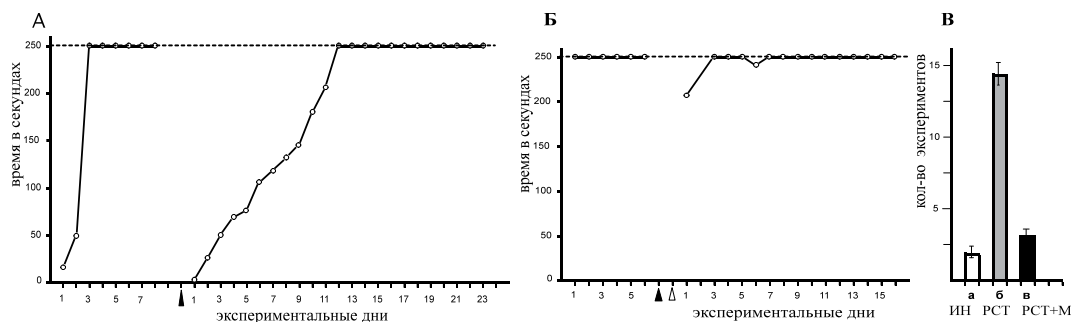


Рис. 1. А – динамика выработки инструментального рефлекса (левая часть графика) и его восстановления (правая часть графика) после унилатерального разрушения руброспинального тракта (темный треугольник под осью абсцисс). По оси абсцисс – дни экспериментов, по оси ординат – среднее время нахождения животного на вращающемся бруске при 10 испытаниях. Штриховая горизонтальная линия на 250 с – критерий выполняемости рефлекса.

Б – обозначения те же, что и на рис. А, светлым треугольником под осью абсцисс обозначен день введения раствора бактериального меланина.

В – гистограмма (а) среднего времени выработки инструментального рефлекса у интактных животных (ИН), (б) – среднего времени восстановления инструментального рефлекса после разрушения руброспинального тракта, (в) – среднего времени восстановления инструментального рефлекса после разрушения руброспинального тракта и введения раствора бактериального меланина (PCT+M).

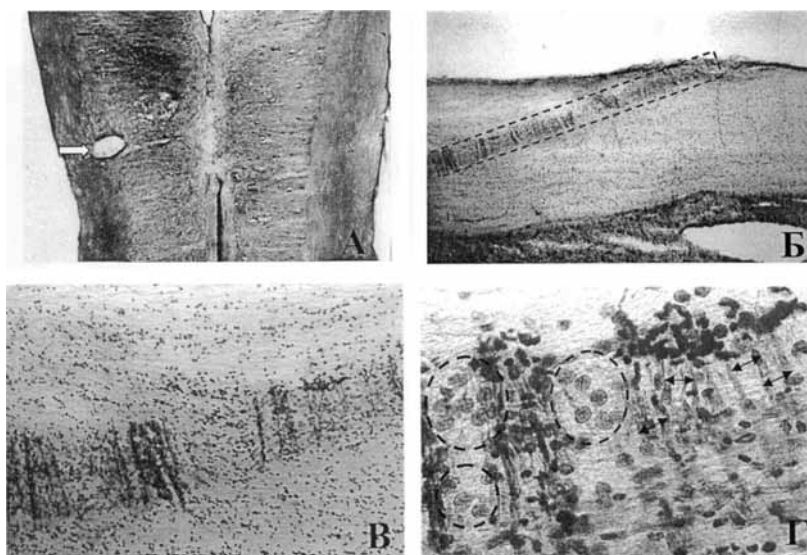


Рис. 2. А – горизонтальный срез спинного мозга контрольных крыс с перерезкой руброспинального тракта (место перерезки указано белой стрелкой); Б, В – горизонтальный срез спинного мозга крыс с перерезкой руброспинального тракта, получивших раствор бактериального меланина в/м в концентрации 6 мг/мл; Г – фрагмент Б в прямоугольнике (черные стрелки указывают на нервные волокна, в кружочках показаны зернистые тельца).

Выявление активности Ca^{2+} – зависимой кислой фосфатазы.

Увеличение: ок. 10, об. 2,5 (А); 6,3 (Б); 40 (Г).

рефлекс восстановился, в среднем, за $2,7 \pm 0,5$ суток.

Сравнение этих результатов показало, что у получивших меланин животных:

1) срок выработки инструментального рефлекса после операции укорачивается в несколько раз по сравнению с контрольными животными;

2) выработка рефлекса и восстановление движения происходят почти одновременно;

3) постоперационная реабилитация у таких крыс бывает полной, а поведение не отличается от нормальных.

Восстановление балансирующего движения задней парализованной конечности на стороне операции у контрольных крыс является подтверждением факта переключения функции между руброспинальным и кортикоспинальным трактами. В случае введения меланина это произошло почти одновременно с восстановлением инструментального рефлекса. Такое быстрое восстановление, по-видимому, обусловлено как протекторным действием меланина, так и маленьким размером травмы по сравнению с кортикоспинальным трактом. Приведенные выше результаты подтверждаются данными морфо-гистохимического исследования срезов спинного мозга [4].

Срезы мозга делались продольными (рис. 2), чтобы проследить ход волокон перерезанного участка руброспинального тракта. У контрольных животных без меланина в участке травмы наблюдается картина полной демиелинизации, прогрессирующая пролиферация ядер глиальных клеток, которая почти завершена по окончании эксперимента. Нервные клетки набухшие, их отростки и ядра не выявляются. Совершенно другая картина наблюдается у получивших меланин животных, у которых на срезах травмированного участка

спинного мозга четко видно усиление васкуляризации (рис. 2Б, В), вследствие чего повышается трофика нервной ткани, благоприятствующая регенерации и подавлению процесса образования астроглиального рубца, а также предопределяет интенсивность коллатерального спраутинга, пролиферации, дифференциации и формирования новых клеточных элементов. На рис. 2Г отчетливо видно в межклеточном пространстве множество зернистых телец круглой или овальной формы, которые также являются благоприятствующими факторами для выживания клеточных элементов, так как в связи с усилением нормального обмена увеличиваются продукты расщепления, которые быстро захватываются ими. На этом кадре между ядрами глиальных клеток виден ход нервных волокон, отмеченный черными стрелками. В наших предыдущих исследованиях с введением бактериального меланина были получены аналогичные результаты [1, 3]. Известно, что у зрелого организма млекопитающих регенерация аксонов в ЦНС после травмы затруднена по причине наличия в миелине тормозящих рост факторов, которые сильно подавляют способность роста волокон [15]. В то же время не отрицается, что с помощью блокады рецепторов этих тормозящих протеогликанов в нервной системе создаются условия для регенерации и коллатерального спраутинга кортикоспинальных волокон спинного мозга, а также улучшается локомоторная функция [15].

Показано, что использование нейротрофических факторов может предотвратить атрофию аксономитированных год назад нейронов руброспинального тракта.

Таким образом, на основании полученных данных можно предположить, что бактериальный меланин проявляет протекторные свойства предотвращени-

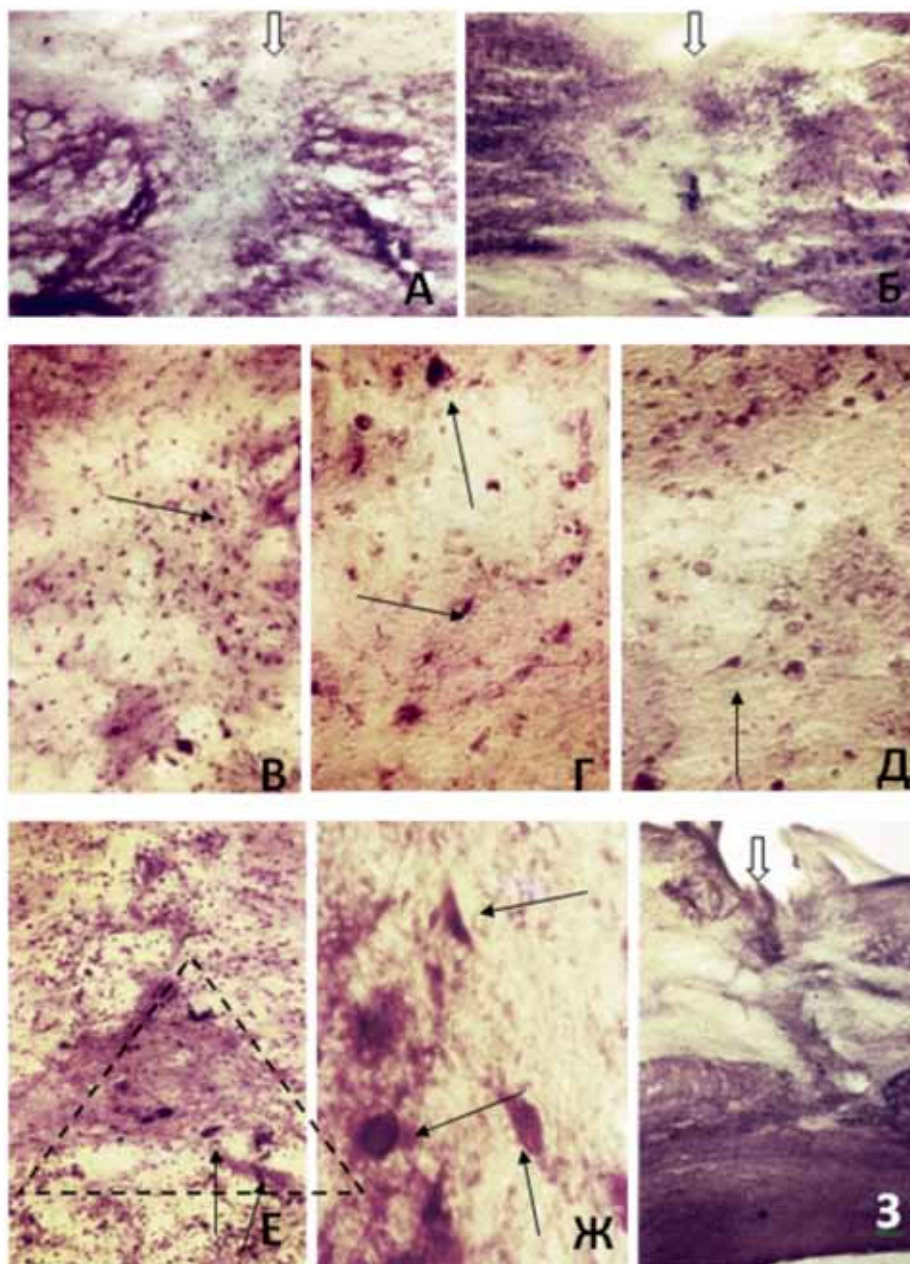


Рис. 3. Горизонтальные срезы спинного мозга крыс после иссечения руброспинального тракта (белая стрелка) с последующей инъекцией БМ. На месте перерезки наблюдается реакция ядер глиальных клеток, среди которых обнаруживаются темные клетки (черные стрелки); А и Б – место перерезки, Е – треугольником охвачено разрастание белого вещества спинного мозга, среди волокон которого видны темные клетки с высокой ферментной активностью (черные стрелки). Увеличение: 25 (З); 63 (Б); 100 (А); 160 (В-Е); 400 (Ж).

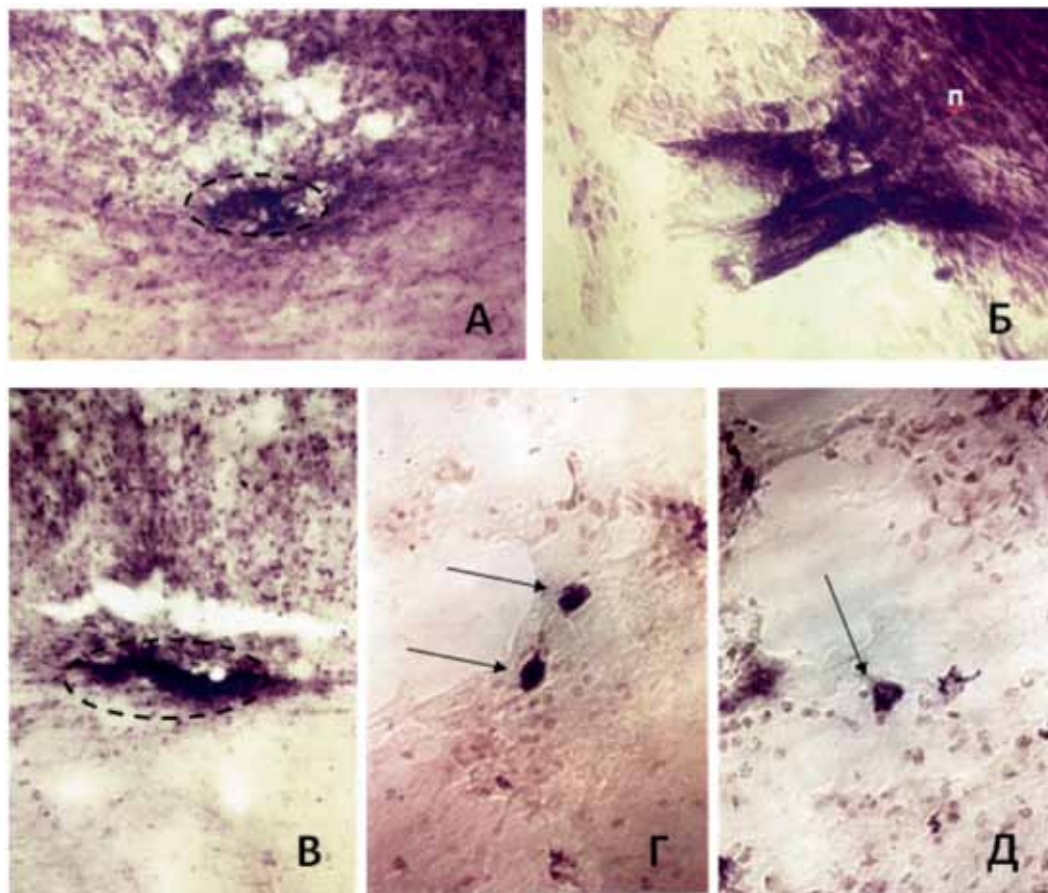


Рис. 4. Горизонтальные срезы спинного мозга крыс после иссечения руброспинального тракта с последующей инъекцией бактериального меланина. А, В – на месте перерезки наблюдается реакция ядер глиальных клеток и небольшие участки их сильного скопления в виде глиозного рубца (овал); Б – исходящий из проксимального отдела (п) пучок нервных волокон с высокой ферментной активностью; Г, Д – среди слабоокрашенных ядер глиальных клеток наблюдается реакция темных крупных клеток с высокой активностью КФ (черные стрелки). Увеличение: 100 (А); 160 (В); 400 (Б, Г, Д).

ем образования рубца и перерождения нервных клеток после травмы их аксонов, тем самым ускоряя восстановительные процессы в структурах ЦНС.

Нередко на уровне травмы в виде треугольника наблюдается разрастание слоя белого вещества с противоположной интактной стороны спинного мозга, в направлении к месту перерезки, среди волокон которых обнаруживаются темноокрашенные клетки (рис. 3Е). Под воздействием БМ размер травмы малень-

кий, без нагноения и уплотнения ткани. Анализ данных свидетельствует о сохранности нервных клеток проксимального отдела спинного мозга на границе места перерезки (рис. 3). Мотонейроны в этом отделе обладают высокой активностью КФ, ядра большинства клеток не окрашены, в цитоплазме обнаруживается зернистый осадок, отростки длинные. В целом, их можно охарактеризовать как нейроны, сходные с таковыми у интактных крыс.

Отметим, что у контрольных животных наблюдаются явления, напоминающие центральный хроматоз: наличие клеток-теней, вплоть до полного их исчезновения.

В ряде случаев с проксимального отдела обнаруживается пучок нервных волокон, пересекающий место перерезки. В дистальном отделе ниже уровня перерезки на некотором протяжении наблюдаются очаги некроза, фрагментация и распад нервных волокон (рис. 4Б). Данное обстоятельство, по-видимому, можно считать выражением регенерации нервных волокон.

Особый интерес представляют довольно крупные, интенсивно окрашенные клетки, расположенные вокруг полостей на месте перерезки (рис. 4Г, Д). Судя по расположению в телах и отростках этих клеток осадка фосфата свинца в виде тигроида, они больше похожи на нервные клетки. Принадлежность их к астроцитам исключается, так как выбранная в данном эксперименте инкубационная смесь предназначена для избирательного выявления нервных клеток, в то время как у глиальных клеток окрашиваются только ядра. Однако, принимая во внимание реверсию эмбрионального фенотипа астроглиальных клеток, активацию миграционных процессов нейрональных стволовых клеток, микроглиоцитов или перемещение клеток-предшественников в зоны локальной дегенерации нервных клеток, можно также предположить, что эти клетки, по-видимому, относятся к типу радиальной глии [2]. Обнаруженные крупные, интенсивно окрашенные клетки можно рассматривать с точки зрения нейрогенеза.

Таким образом, несмотря на то, что при данных послеоперационных сроках терапевтический эффект при примене-

нии БМ не полностью обеспечивал сращивание обоих концов травмированного участка, можно констатировать благоприятный для дальнейшей регенерации факт – отсутствие прогрессирующей пролиферации ядер глиальных клеток, которое наблюдается у контрольных животных. Отмечается также значительная разница в степени инфильтрации раны глиальными клетками, а именно – в окружающей рану мозговой ткани наблюдается умеренная реакция ядер глиальных клеток, отсутствие грубого рубца и сохранность нервных клеток вокруг участка травмы.

Обсуждение результатов

Обычно после травмы ЦНС всегда наблюдается некоторое функциональное восстановление благодаря пластичности нервных структур. Конечно, пластичность в каждом отдельном случае отличается по своему временному течению и степени восстановления функций. В литературе отмечается возможность демаскирования молчащих синапсов [9] спустя несколько минут и в течение нескольких часов, что способствует избыточному высвобождению возбуждающих медиаторов, увеличению плотности постсинаптических рецепторов, изменению проводимости постсинаптической мембраны, следовательно, и уменьшению тормозного действия или его отмены [5, 8, 10, 17, 18].

Все эти процессы в нервной ткани ЦНС после травмы и введения БМ протекают намного быстрее. В длинной полимерной цепочке БМ имеются определенные активные составляющие (протеины с активной связью, свободные радикалы и т.д.), играющие важную роль в его протекторной функции. С помощью активных связей БМ способен

не только демаскировать латентные сигналы, но и тотально «оккупировать» постсинаптические рецепторы нейронов, вызывая мощные изменения на синаптическом уровне.

При компенсации двигательных и поведенческих нарушений после повреждения руброспинального тракта образованием, участвующим в ликвидации руброспинального дефицита, является кортикоспинальная система, что во многом определяется большим сходством структурных и функциональных особенностей этих двух нисходящих систем. Дефицит, вызванный одной из этих двух систем, является проходящим, а функциональное восстановление – результатом способности неповрежденной системы брать на себя контроль движения. Ведущим фактором в описанном феномене является взаимовлияние кортикоспинальной и кортико- руброспинальной систем, их свойство взаимозамещаемости, уникальное среди всех нисходящих двигательных систем [16]. Переключающее действие рубро-оливарной проекции может осуществляться в обоих направлениях, и в случае повреждения кортикоспинальной системы в компенсацию возникающих расстройств включается кортико-руброспинальная система [6].

Благодаря такому компенсаторному переключению функций восстановление ИУР происходит в обеих группах. Однако в группе, получавшей раствор меланина, на следующий день после операции восстановление ИУР и движений задней парализованной конечности происходит 4-5 раз быстрее, чем у контрольных

крыс. Балансирующее движение парализованной задней конечности у контрольных животных восстанавливается очень поздно, после 16 дней тестирования.

Заключение

В хроническом эксперименте на крысах с заранее выработанным инструментальным рефлексом балансирования на вращающейся перекладине исследовалось влияние одностороннего разрушения руброспинального тракта, а также действия раствора бактериального меланина, введенного на следующий день после операции. Показано, что у контрольных крыс после разрушения наблюдается гемипарез, который особенно отчетливо виден при балансировании оперированных животных на вращающейся горизонтальной перекладине. У второй группы крыс после внутримышечного введения бактериального меланина уже с третьего постоперационного дня наблюдается нормальное выполнение рефлекса на вращающейся перекладине, а балансирующее движение задней конечности полностью восстанавливается после пяти экспериментов. Итак, восстановление инструментального рефлекса балансирования после разрушения руброспинального тракта у крыс происходит полностью и за очень короткий срок. Это дает основание полагать, что введенная крысам концентрация бактериального меланина имеет выраженное нейропротекторное действие, благодаря чему у них достигается быстрое и полное, по сравнению с контрольными животными, восстановление нарушенных движений.

Список литературы

1. **Геворкян О.В., Меликсетян И.Б., Петросян Т.Р., Аветисян С.В., Овсепян А.С., Агаджанян А.Е., Манвелян Л.Р.** Восстановление инструментальных условных рефлексов у крыс после разрушения латерального ядра мозжечка и при воздействии бактериального меланина // материалы Международной конференции «Структурно-функциональные, нейрохимические и иммунохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга». - М. 2007. С. 178-181.
2. **Коржевский Д.Э.** Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейростологических исследованиях // Морфология. СПб.: Эскулап. 2006. Том 129. N 1. С. 85-86.
3. **Манвелян Л.Р., Геворкян О.В., Петросян Т.Р.** Восстановление инструментальных условных рефлексов у крыс после пирамидотомии и воздействия бактериального меланина // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2008. 44. (3). С. 268-273.
4. **Меликсетян И.Б.** Выявление активности Ca^{2+} -зависимой кислой фосфатазы в клеточных структурах мозга крыс // Морфология. 2007. 131 (2): С. 77-80.
5. **Фанарджян В.В., Папоян Е.В., Геворкян О.В., Погосян В.И.** К механизму переключения нисходящих супраспинальных влияний // Доклады НАН Армении. 1999. 99 (1): С. 90-96.
6. **Фанарджян В.В., Папоян Е.В., Погосян В.И., Геворкян О.В.** Роль ВЛ ядра таламуса в переключении нисходящих влияний на двигательную активность крыс // Российский физиологический журнал. 2000. 86 (7): С. 753-761.
7. **Aghajanyan A.E., Hambardzumyan A.A., Hovsepyan A.S. Asaturyan R.A., Vardanyan A.A. and Saghyan A.S.** Isolation, purification and physicochemical characterization of water-soluble *Bacillus thuringiensis* melanin Pigm // Cell. Research. 2005. V. 18. P. 130-135.
8. **Ding Yuemin, Abba J. Kastin, Weihong Pan.** Neural plasticity after spinal cord injury // Current Pharmaceutical Design. 2004. V. 10. P. 11381-11396.
9. **Donoghue J.P.** Limits of reorganization in cortical circuits // Cereb. Cortex. 1997. V. 7. P. 97-99.
10. **Donoghue J.P.** Plasticity of adult sensorimotor representations // Curr Opin Neurobiol. 1995. V. 5. P. 749-754.
11. **Donoghue J.P., Suner S., Sanes J.N.** Dynamic organization of primary motor cortex output to target muscles in adult rats. II. Rapid reorganization following motor nerve lesions // Exp. Brain Res. 1990. V. 79. P. 492-503.
12. **Fanardjian V.V., Papoyan E.V., Hovhannisyan E.A., Melik-Mussian A.B., Pogossian V.I., Gevorkyan O.V.** The role of some structures in the switching of the descending influences in operantly conditioned rats // Neuroscience. 2000. 98(2): 385-395.
13. **Fanardjian V.V., Papoyan E.V., Pogossian V.I., and Gevorkyan O.V.** Comparison of the effects of electrolytic and chemical destruction of the red nucleus on the compensatory capacity of rats with rubrospinal tract lesions // Neural Plasticity. 1999. 6(4). P. 123-131.
14. **H.J. ten Donkelaar.** Evolution of the red nucleus and rubrospinal tract // Behavioural Brain Research. 1988. V. 28. Issues 1-2, April-May. P. 9-20.
15. **Ji-Eun Kim, Betty P. Liu, James H. Park, and Stephan M. Strittmatter.**

- Nogo-66 receptor prevents raphespinal and rubrospinal axon regeneration and limits functional recovery from spinal cord injury // *Neuron*. 2004. 44: 439-451.
16. **Kennedy P.R.** Corticospinal, rubrospinal and rubroolivary projections: a unifying hypothesis // *Trends Neurosci*. 1990. 13: 474-479.
17. **Maier C.I. and Schwab M.E.** Sprouting, regeneration and circuit formation in the injured spinal cord: factors and activity // *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 2006. V. 361. P. 1611-1634.
18. **Schwab M.E., Bartholdi D.** Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord // *Physiol. Rev*. 1996. V. 76. P. 319-370.

Bacterial melanin as an accelerator of motility recovery after damage of cortico-rubrospinal motor control system

T.R. Petrosyan, O.V. Gevorgyan

Unilateral destruction of rubrospinal tract, performed in 12 rats after initial training to instrumental conditioned reflex, caused hemiparesis of ipsilateral limbs. On the second day after the operation part of the operated rats were injected intramuscularly with the solution of bacterial melanin. Comparison of periods for recovery of the instrumental conditioned reflex and recovery of hind limb balancing movements in control rats and in rats injected with melanin showed that the post-traumatic recovery period for the later group is considerably shorter than for the control group. It was shown that the acceleration of motor recovery in the study group animals was caused by protective action of bacterial melanin and by facilitation of switching of descending influences from rubrospinal tract to corticospinal. Morphohistochemical study showed that bacterial melanin stimulates the sprouting of nervous fibers and enhances regeneration in CNS.

Key words: instrumental conditioned reflex, rubrospinal tract, bacterial melanin, posttraumatic recovery, morphohistochemical study.