

## Эффекты разных концентраций бактериального меланина на электрическую активность нейронов коры мозга при раздражении нервов задней конечности у крыс

Т.Р. Петросян<sup>1</sup>, В.А. Чавушян<sup>2</sup>, А.С. Тер-Маркосян<sup>3</sup>, А.С. Овсепян<sup>3</sup>

<sup>1</sup> – Ереванский государственный медицинский университет, Ереван, Армения

<sup>2</sup> – Институт физиологии НАН РА, Ереван, Армения

<sup>3</sup> – НПП «Армбиотехнология» ГНКО НАН РА, Ереван, Армения

Контактная информация: Петросян Т.Р., [tigpetrosyan@mail.ru](mailto:tigpetrosyan@mail.ru)

---

С целью выявления сдвигов в электрической постстимульной активности нейронов сенсомоторной коры мозга (СМК) под влиянием разных концентраций бактериального меланина изучалась высокочастотная тетаническая активация корковых нейронов в ответ на стимуляцию периферических нервов задней конечности у крыс. Регистрировались соответствующие посттетанические короткие (СТР) и/или длительные (ЛТР) изменения активности корковых нейронов, связанных с мобилизацией того или иного медиатора изучаемой структуры. Характер воздействия раствора меланина оказался прямо зависящим от исследуемой концентрации раствора. Оптимальным для данной работы признан способ внутримышечного введения. Картины посттетанических ответов практически идентичны при прямой аппликации и внутримышечном и/или внутривнутрибрюшинном введении меланина при применении одной и той же концентрации. При введении низких концентраций раствора меланина отмечалось повышение нейрональной активности. Самой надежной концентрацией является 4,5 мг/мл, которая вызывает стабильное и длительное повышение активности корковых нейронов. Активирующее влияние бактериального меланина может способствовать процессам восстановления при нейродегенеративных заболеваниях.

**Ключевые слова:** меланин, нейроны сенсомоторной коры, вызванная активность нейронов.

---

### Введение

Согласно современным литературным данным, нейромеланины (НМ) являются природными антиоксидантами, эффект которых определен значительным подавлением липидной перекисидации в мышцах [14]. Исследователи отмечают, что оксидативный путь допаминового метаболизма в мозге человека ведет к формированию и аккумуляции НМ в цитоплазме большинства нигростриарных допаминергических нейронов, и считают спорным физи-

ологическое значение НМ и их вклад в нейродегенеративные процессы, лежащие в основе болезни Паркинсона (БП). Изучена корреляция эффекта меланинконицентрирующего гормона (МКГ) на способность восстановления памяти после амнезии, вызванной LN-нитроаргинином (L-NOArg). Более того, электрофизиологические исследования показали, что L-NOArg не блокирует потенциацию нейронов [13].

Другими авторами выявлено повышение уровня редокс-активного железа

( $Fe^{2+}$ ) в черной субстанции в ассоциации с НМ у людей с БП [1]. Согласно этим данным, наиболее обширная дегенерация допаминергических нейронов при БП наблюдается в субпопуляции меланизированных нейронов, локализованных в компактной части черной субстанции. Авторы исследовали редокс-активные НМ-агрегаты у группы пациентов с БП и показали значительное понижение (70%) числа меланизированных нейронов и повышение негемового  $Fe^{3+}$ , вследствие чего возникает усиление оксидативного стресса и выраженности интранейрональных повреждений.

На примере латерального гипоталамуса крыс показано, что МКГ подавляет синаптическую активность глутаматных и ГАМК-ергических нейронов [5].

**Целью** настоящего исследования было изучение влияния разных концентраций водорастворимого бактериального меланина на специфику электрической постстимульной активности нейронов сенсомоторной коры (СМК) мозга.

Нами было отдано предпочтение не одиночной, а высокочастотной тетанической активации корковых нейронов и регистрации соответствующих посттетанических коротких (STP) и/или длительных (LTP) изменений их активности, связанных с мобилизацией того или иного медиатора изучаемой структуры. Интерес к указанному явлению приобретает всё большую значимость в связи с проблемой нейрональной пластичности и памяти. Явление LTP, например, обнаружено не только в гиппокампе, где оно особенно интенсивно изучалось в связи с его непосредственным участием в обеспечении кратковременной памя-

ти, но и в других структурах мозга – в зрительной стриатной коре [9], в синапсах, сформированных ручками нижних колликул, в медиальном коленчатом теле [6] и т.д. Что касается нейронов сенсомоторной коры, на которых проведено настоящее исследование, индукция долгодлящей депрессии (LTD), в частности, видимо, ассоциируется с понижением дендритного протяжения и плотностью шипиков в 3-ем и 5-ом слоях данной области [7, 10]. В другой работе [11] теми же авторами изучена потенциация в СМК, вызванная квалифицированным обучением – поведенческой формой LTD. При LTD важным фактором является также и депотенциация в СМК у свободно передвигающихся крыс [2].

В настоящем исследовании влияние БМ на электрическую активность нейронов СМК было изучено при прямой аппликации, внутрибрюшинном и внутримышечном введении вещества. В предыдущей серии электрофизиологических опытов мы пытались выяснить влияние раствора БМ на допаминергические нейроны черной субстанции [12]. Было установлено, что БМ повышает электрическую активность допаминергических нейронов компактной части черной субстанции, что практически может способствовать облегчению восстановления моторной функции в условиях нейродегенерации. Преимуществом настоящей серии является возможность регистрации нейрональной активности от поверхностных нейронов СМК и сравнения полученных постстимульных эффектов при внутримышечном (внутрибрюшинном) введении вещества и прямой аппликации на кору.

### Материалы и методы

Эксперименты проведены на 14-ти зрелых разнополых крысах-альбиносах массой 200-300 г. Всего зарегистрировано 209 нейронов сенсомоторной коры мозга, в т.ч. интактных (n=7 крыс) – 103 нейрона, и 106 нейронов, подверженных многочасовому воздействию бактериального меланина с концентрацией 0,009 г/мл, 0,006 г/мл и 0,0045 г/мл (методом прямой аппликации – 45 нейронов, внутрибрюшинным и внутримышечным введением – 41 нейрон и 20 нейронов соответственно).

В остром эксперименте крыс обездвигивали однопроцентным дитилином (внутрибрюшинно, 25 мг/кг), переводили на искусственное дыхание и после фиксации головы животного в стереотаксическом аппарате открывали область СМК (до 3 мм латеральнее от средней линии и 3 мм назад от брегмы), соответствующую представительству задней контралатеральной по отношению к точке отведения конечности [8]. Стереотаксически ориентированный стеклянный микроэлектрод с кончиком 1-2 мкм, заполненный 2М раствором NaCl, вводили в СМК мозга для регистрации одиночной активности пирамидных нейронов и интернейронов на глубине от 250 до 1800 мкм, вызванной на одиночное и частотное (прямоугольными импульсами длительностью 0,5 мс и частотой 50 и 100 Гц на протяжении 1 с) раздражение смешанного (n. Ischiadicus-I), флексорного (n. Peroneus communis-P) и экстензорного (n. Gastrocnemius-G) нервов задней конечности. Ответы нейронов в виде посттетанической потенциации (ПТП) или депрессии (ПТД) различной выраженности и длительности регистриро-

вались на компьютере при помощи специальной программы, разработанной В. Каменским [3].

Что касается выбора концентрации раствора меланина, то из испытанных нами в исследовательском проекте шести концентраций были выбраны три самых низких. Это связано с тем, что в наших предыдущих исследованиях с выработкой инструментальных условных рефлексов (ИУР) после удаления СМК, внутримышечное введение вышеуказанных концентраций приводило к эффекту ускорения восстановления ИУР и движения парализованной задней конечности. Особенно результативной оказалась концентрация 0,0045 г/мл.

После воздействия бактериального меланина велось многочасовое наблюдение и запись экстраклеточной электрической активности нейронов, через определенные периоды времени. Примененная нами программа обеспечивает регистрацию электрической активности в режиме реального времени и проводит селекцию спайков посредством амплитудной дискриминации. В автоматическом режиме строились суммарные перистимульные гистограммы межспайковых интервалов (PETH-Peri-Event Time Histogram). В среднем, в течение одной регистрации проводилось до 10-30 постстимульных испытаний. Программа проводит анализ полученных данных по алгоритму, специально разработанному для оценки значимости отрезков PETH. Постстимульная нейронная тоническая активность вычисляется посредством последовательного усечения рассматриваемого спайкового потока с исключением значений диапазонов,

выпадающих из интервала  $M \pm 2SD$  ( $M$  – среднее значение,  $L$  – стандартное отклонение), повторяющегося до тех пор, пока среднее значение и  $SD$  стабилизируются (различие менее 2%). Конечная выборка принимается за тоническую активность (ТА) нейрона.

Значимость различия фоновой (ФА) и ТА определялась с помощью  $t$ -критерия Стьюдента.

Аналогичная задача решается программой посредством кумулятивных кривых, построенных для фоновой и тонической гистограмм. По методу наименьших квадратов определялся наклон прямых, аппроксимирующих данные кривые. По наклону прямой, аппроксимирующей отклоняющийся участок кумулятивной кривой, рассчитывалась значимость расхождения с тонической активностью. Для заключения о физических ответах отбирались периоды активности со статистически значимым ( $p < 0,001$ ) отличием от тонического уровня. По углам наклона аппроксимирующих прямых рассчитывалась значимость изменения тонической активности нейрона по сравнению с фоновой. Анализ данных, полученных при частотном раздражении, проводился на основе графиков скользящей частоты. При этом со сдвигом в 50 мс рассчитывалась частота разряда нейрона в интервале в 200 мс и более.

При наличии фоновой активности для нее также проводился расчет, вычислялась соответствующая средняя частота и стандартное отклонение [3, 4]. На основании этих величин, по  $M \pm 2SD$  выявлялись периоды ПТП и ПТД нейрона. При отсутствии фона выделялись соответственные участки повышенной и пониженной активации.

## **Результаты и их обсуждение**

Проведено исследование вызванной импульсной активности 209-ти одиночных нейронов СМК мозга крыс, в т.ч. 103 нейрона – в норме и 106 – под воздействием бактериального меланина. В целом, у крыс в норме, без воздействия препарата, следует отметить регулярное формирование преимущественно первичного раннего ответа, возникающего на 9-ой мс (рис. 1).

Представлены гистограммы постстимульных проявлений активности в нейронах СМК мозга в ответ на раздражение ствола п. ischiadicus (I) и его флексорного (P) и экстензорного (G) коллатерального ответвления в норме (рис. 1), а также эффекты аппликации, внутрибрюшинного и внутримышечного введения трех разных концентраций бактериального меланина в динамике (на протяжении до 3-х ч регистрации), с восстановлением ответа до исходного уровня (рис. 2-4).

Особенно эффективной оказалась концентрация 0,0045 г/л (рис. 2 и 3). Она, по нашему мнению, явилась оптимальной в связи с её «мягким» действием (характерным первоначальным возбуждением и/или торможением с последующим нередко быстрым восстановлением исходного уровня постстимульной частоты активности исследуемого нейрона с дальнейшим феноменом отдачи в виде повышения частоты активации и повторным восстановлением до постстимульного уровня без применения препарата).

Регистрация, полученная после раздражения трех нервов задней конечности (I, P и G). Была повторно проведена через 1, 10, 15, 18, 26 (A); 34, 42 (B); 50 (C) мин.

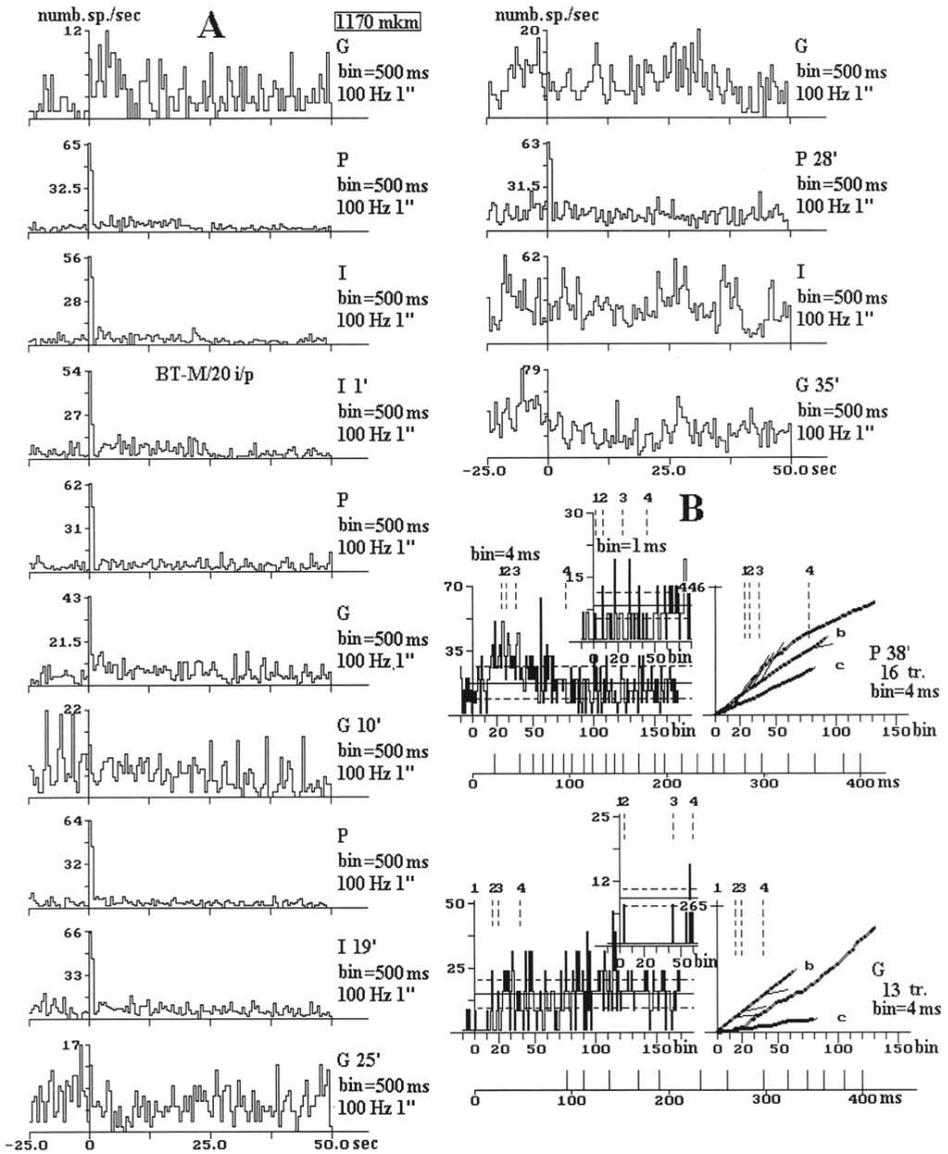


Рис. 1. Электрическая активность нейронов сенсомоторной коры в ответ на единичную и частотную стимуляцию периферических нервов задней конечности I, P и G у интактных крыс.

A – регистрация, полученная после раздражения трех нервов задней конечности (I, P и G). Была повторно проведена через 1, 10, 19, 25, 28 и 35 мин.

B – аппроксимирующие кривые, построенные на основе зарегистрированных гистограмм. По углам наклона аппроксимирующих кривых рассчитывалась значимость изменения тонической активности нейрона по сравнению с фоновой. Анализ данных, полученных при частотном раздражении, проводился на основе графиков скользящей частоты.

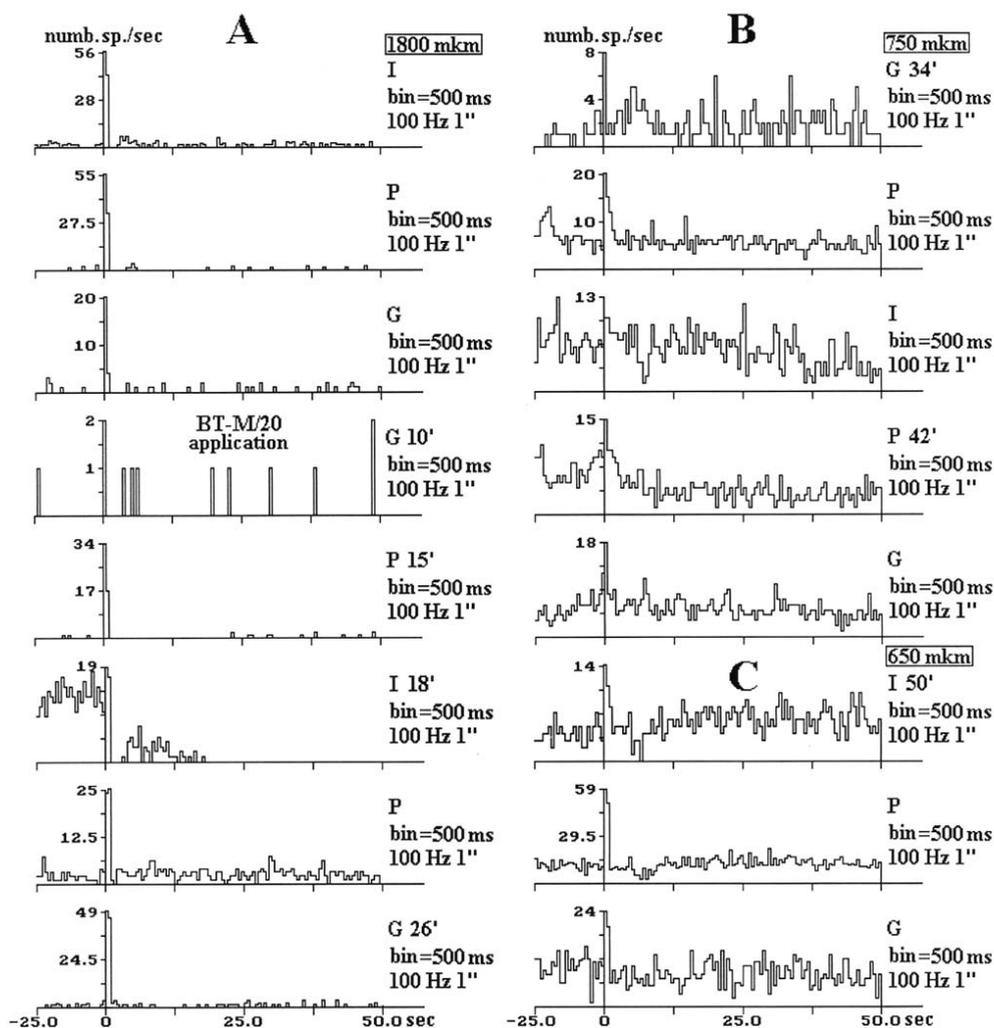


Рис. 2. Электрическая активность нейронов сенсомоторной коры в ответ на высокочастотную стимуляцию периферических нервов задней конечности I, P и G в условиях непосредственной аппликации меланина в концентрации 4,5 мг/мл (M20 – 20-кратное разведение начальной концентрации).

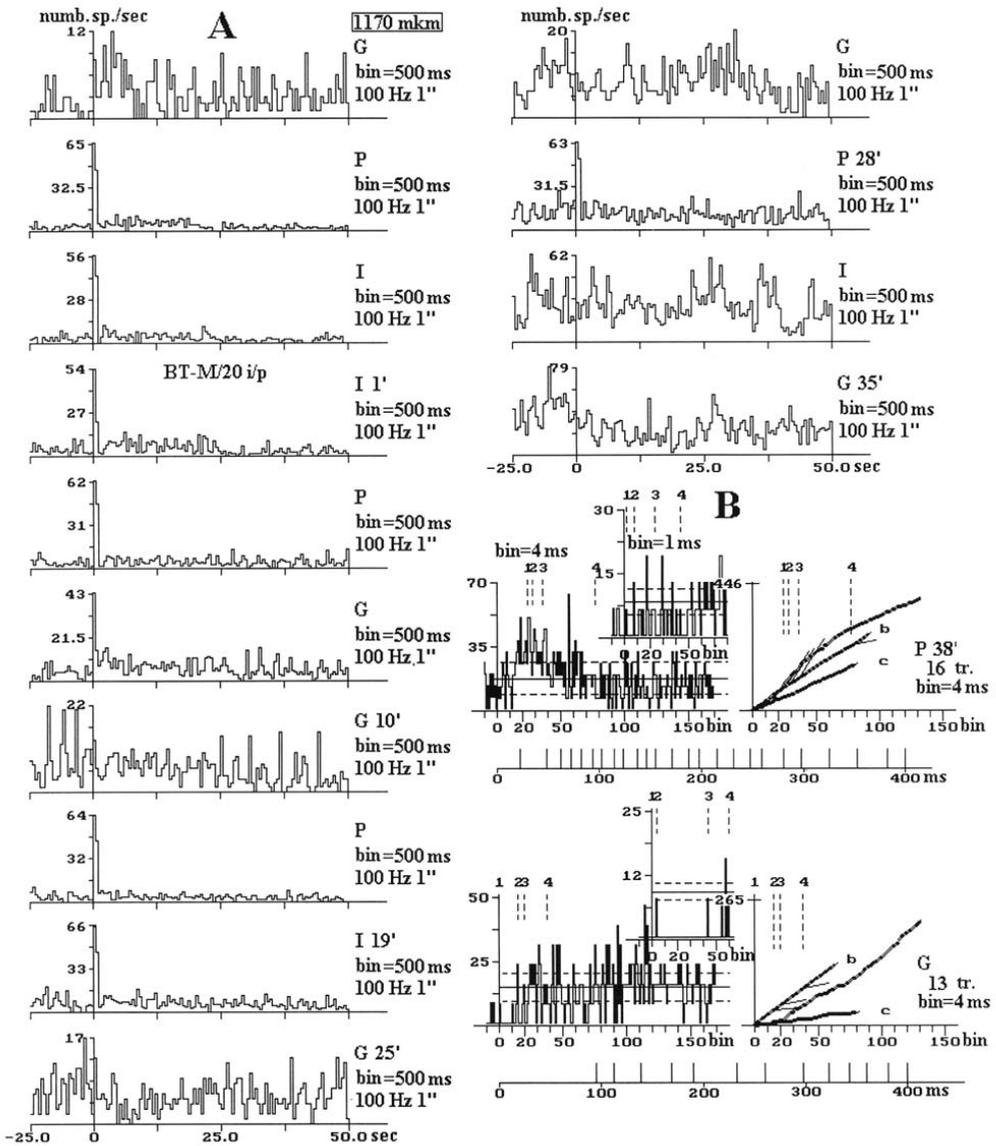


Рис. 3. Электрическая активность нейронов сенсомоторной коры в ответ на единичную и частотную стимуляцию периферических нервов задней конечности I, P и G, в условиях внутрибрюшинного введения меланина в концентрации 4,5 мг/мл (M20).

A – регистрация, полученная после раздражения трех нервов задней конечности (I, P и G). Была повторно проведена через 1, 10, 19, 25, 28, 35 мин.

B – аппроксимирующие кривые, построенные на основе зарегистрированных гистограмм. По углам наклона аппроксимирующих кривых рассчитывалась значимость изменения тонической активности нейрона по сравнению с фоновой. Анализ данных, полученных при частотном раздражении, проводился на основе графиков скользящей частоты.

Что же касается остальных испытанных более высоких концентраций, то можно отметить следующее. Концентрация 0,009 г/л чаще оказывалась резко и длительно тормозящей, нередко с ПТД,

независимо от формы применения, иногда этот эффект прослеживался до 2-3 ч и более. А концентрация 0,006 г/л выявила промежуточные значения постстимульных проявлений активности (рис. 4).

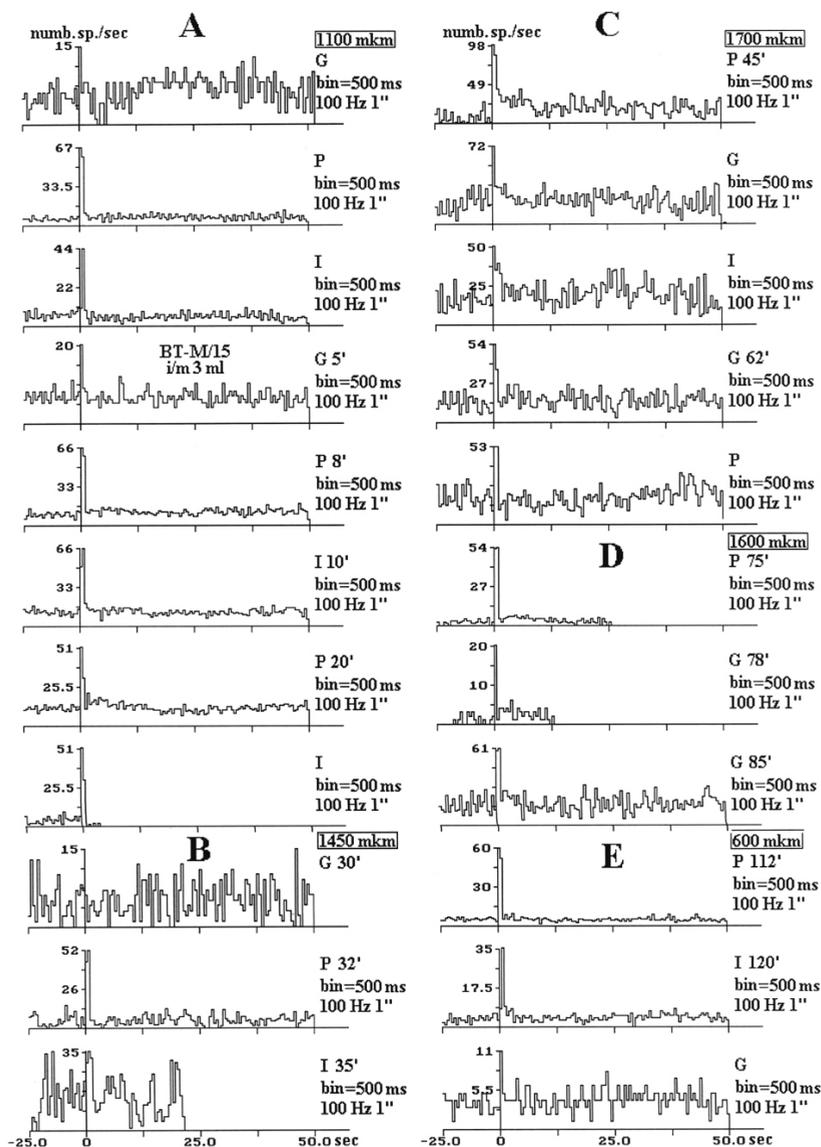


Рис. 4. Электрическая активность нейронов сенсомоторной коры в ответ на высокочастотную стимуляцию периферических нервов задней конечности I, P и G, в условиях внутримышечного введения меланина в концентрации 6 мг/мл (M15).

Регистрация, полученная после раздражения трех нервов задней конечности (I, P и G). Была повторно проведена через 1, 10, 20 (A); 30, 32, 35 (B); 45, 62 (C); 75, 78, 85 (D); 112, 120 (E) мин.

Однако их объединяло характерное первоначальное урежение активности с последующим ее учащением и дальнейшим восстановлением. Более того, в отношении всех изученных концентраций препарата была выявлена интересная разница не только в степени, но и в характере постстимульных изменений частоты активации от различных нервов задней конечности. Подобный феномен, предполагается, обусловлен их принадлежностью к различной ступени эволюционного развития, в частности – флексорных произвольных точностных движений и экстензорных, больше обслуживающих поздние установки. Нередко препарат проявлял выраженный эффект в отношении флексорного нерва при отсутствии такого в ответе экстензорного. Но характерным паттерном для всех серий испытаний является высокий уровень посттетанической активности после раздражения п. *Gastrocnemius*. Данная особенность была зарегистрирована при внутримышечном, внутрибрюшинном введении вещества, а также при прямой аппликации.

На концентрацию раствора меланина, равную 0,006 г/л, особенно при внутрибрюшинном введении, наблюдалось некоторое начальное возбуждение испытуемых нейронов, за которым следовало торможение с последующим облегчением и восстановлением их активности.

### Выводы

Таким образом, характер постстимульного ответа оказался прямо зависящим от испытуемой концентрации раствора.

Результаты исследования показали, что метод внутримышечного введения

является самым удачным в том аспекте, что при прямой аппликации бактериальный меланин действует очень быстро. Эффекты при внутримышечном введении длятся намного дольше (2-3 ч), создавая возможность для обстоятельного исследования.

Самой надежной концентрацией является концентрация 4,5 мг/мл, которая вызывает стабильное и длительное повышение активности корковых нейронов. Картины посттетанических ответов практически идентичны при прямой аппликации и внутримышечном и/или внутрибрюшинном введении меланина при применении одной и той же концентрации. Такая корреляция результатов свидетельствует о том, что повышение нейрональной активности при введении низкой концентрации (4,5 мг/мл) раствора обусловлено применением меланина.

Полученные данные сопоставимы с результатами регистрации электрической активности глубоких допаминергических нейронов черного вещества мозга [12]. Активирующее влияние бактериального меланина может способствовать процессам восстановления при нейродегенеративных заболеваниях.

### Список литературы

1. *Faucheux B.A., Martin M.E., Beaumont C., Hauw J.J., Agid Y., Hirsh E.C.* Neuromelanin associated redox-active iron is increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease // *J. Neurochem.* 2003. N. 5. P. 1142-1148.
2. *Froc D.J., Capman C.A., Trepel C., Racine R.J.* Long-term depression and depotentiation in the sensorimotor cortex of reely moving rat // *J. Neurosci.* N. 20 (1). P. 438-445.
3. *Galoyan A.A., Sarkissian J.S., Kipriyan T.K., Sarkissian E.J., Chavushyan E.A., Sulkhanyan R.M., Meliksetyan I.E., Abrahamyan S.S., Grigorian Y.Kh., Avetisyan Z.A., Otieva N.A.*

- Protective effect of a new hypothalamic peptide against cobra venom and trauma induced neuronal injury // *Neurochem. Res.* 2001. N. 26. P. 1023-1038.
4. *Galoyan A.A., Sarkissian J.S., Kipriyan T.K., Sarkissian E.J., Grigorian Y.Kh., Sulkhanyan R.M., Khachatryan T.S.* Comparison of the protection against neuronal injury by hypothalamic peptides and by dexamethasone // *Neurochem. Res.* 2000. N. 25. P. 1567-1578.
  5. *Gao X.B., van den Pol A.N.* Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus // *J. Physiol.* 2001. N. 533 (Pt 1). P. 237-252.
  6. *Gerren R.A., Weinberger N.M.* Long term potentiation in the magnocellular medial geniculate nucleus of anesthetized cat // *Brain Res.* 1983. N. 265. P. 138-142.
  7. *Gevorgyan O.V.* Neuronal activity of sensorimotor cortex on the mesencephalic reticular formation stimulation // *Biol. J. of Armenia.* 1987. V. 40. N. 12. P. 993-997.
  8. *Hicks S.P., D'Amato C.I.* Locating corticospinal neurons by retrograde axonal transport of horseradish peroxidase // *Exp. Neurol.* 1977. N. 56. P. 410-420.
  9. *Komatsu Y., Toyama K., Maeda J., Sakaguchi H.* Long term potentiation investigated in a slice preparation of striate cortex of young kittens // *Neurosci. Lett.* 1981. N. 26. P. 269-274.
  10. *Monfils M.H., Teskey G.C.* Induction of long-term depression is associated with decreased dendritic length and spine density in layers III and V of sensorimotor neocortex // *Synapse.* 2004. N. 2. P. 141-121.
  11. *Monfils M.H., Teskey G.C.* Skilled-learning-induced potentiation in rat sensorimotor cortex: a transient form of behavioral long-term potentiation // *Neuroscience.* 2004. N. 125 (2). P. 329-336.
  12. *Petrosyan T.R., Chavushyan V.A., Hovsepyan A.S.* Bacterial melanin increases electrical activity of neurons in Substantia Nigra pars compacta // *J. of Neural. Transmission.* Springer. 2014. N. 121. P. 259-265.
  13. *Varas M., Perez M., Mouzon M.E., de Barioglio S.R.* Melanin concentrating hormone, hippocampal nitric oxide levels and memory retention // *Peptides.* 2002. N. 12. P. 2213-2221.
  14. *Wilczok T., Stepien K., Dzierzega-Leczmar A., Zajdel A., Wilczok A.* Model neuromelanins as antioxidative agents during lipid peroxidation // *Neurotox. Res.* 1999. N. 2. P. 141-147.

## **Effects of different concentrations of bacterial melanin on the electrical activity of neurons in the cerebral cortex in response to stimulation of the rat hindlimb nerves**

**T.R. Petrosyan, V.A. Chavushyan, A.S. Ter-Markosyan, A.S. Hovsepyan**

In order to detect changes in the post-stimulus electrical activity of neurons in sensorimotor cortex (SMC) induced by the influence of different concentrations of bacterial melanin, high-frequency tetanic activation of cortical neurons was studied in response to stimulation of peripheral nerves of rat hindlimb. The corresponding post-tetanic short (STP) and/or long-term (LTP) changes in the activity of cortical neurons, caused by the mobilization of a mediator, were registered. The nature of the impact was directly dependent on the concentration of the tested solution. The method of intramuscular injection is recognized as the best method for this research. The pattern of posttetanic responses was almost identical after direct application and intramuscular and/or intraperitoneal injection of melanin at use of the same concentration. The increase of neuronal activity was noted by introduction of low concentration of solution of melanin. The most reliable concentration is the concentration of 4.5 mg/ml, which induces stable and long-lasting increase in the activity of the cortical neurons. Activating effect of bacterial melanin can contribute to the recovery processes in neurodegenerative diseases.

**Key words:** melanin, the neurons of the sensorimotor cortex, evoked neuronal activity.