

© А. В. Ахмадеев, Л. Б. Калимуллина, 2016
УДК 611.813.13:613.8:599.323.4

А. В. Ахмадеев¹, Л. Б. Калимуллина²

ЦИТОАРХИТЕКТОНИКА И НЕЙРОННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БАЗОЛАТЕРАЛЬНОГО ЯДРА МИНДАЛЕВИДНОГО ТЕЛА МОЗГА У КРЫС, ПРЕДПОЧИТАЮЩИХ И НЕ ПРЕДПОЧИТАЮЩИХ АЛКОГОЛЬ

¹ Кафедра безопасности жизнедеятельности и охраны окружающей среды (зав. — проф. Ю. А. Янбаев) ; ² кафедра физиологии человека и зоологии (зав. — д-р биол. наук З. Р. Хисматуллина), Башкирский государственный университет, г. Уфа

Анализ цитоархитектоники базолатерального (БЛ) ядра миндалевидного тела (МТ) выполнен на окрашенных крезильовым фиолетовым фронтальных парафиновых срезах головного мозга 10 предпочитающих алкоголь (ПА) и 10 не предпочитающих алкоголь (НА) крыс (при равном количестве самцов и самок в каждой группе). В БЛ-ядре выявлены крупные и мелкие нейроны. Большинство крупных нейронов у ПА-крыс имеют характер хромонейтральных и умеренно хромофильных, у НА-крыс — умеренно хромофобных. Использование метода Гольджи позволило выявить, что эквивалентами крупных нейронов являются длинноаксонные густоветвистые пирамидообразные нейроны, а нейронов малого размера — короткоаксонные. Определение соотношения крупных нейронов и нейронов малого размера показало, что у ПА-крыс доля последних составляет 12,3±0,6%, в то время как у НА-крыс их значительно больше — 19,70±0,23%. Результаты позволяют объяснить полученные ранее данные о большей удельной площади БЛ-ядра МТ у НА-крыс наличием в нем большего количества интернейронов, чем у ПА-крыс.

Ключевые слова: миндалевидное тело мозга, базолатеральное ядро, интернейроны, крысы, предпочитающие и не предпочитающие алкоголь, алкоголизм

Известно, что в развитии алкоголизма и его рецидивов большую роль играют аффективные расстройства, проявляющиеся повышенным уровнем тревожности и страха [10]. Установлено, что миндалевидное тело (МТ) и, прежде всего, его базолатеральное (БЛ) ядро является структурой, вовлеченной в функциональную систему формирования тревожности и страха [14]. Ведущее значение при этом имеют нарушения функционирования D₁- и D₂-рецепторов [6].

В ранее проведенном морфометрическом исследовании МТ у крыс, предпочитающих (ПА) и не предпочитающих (НА) алкоголь [1], было выявлено наличие большей удельной площади БЛ-ядра у НА-крыс, чем у ПА-крыс, в результате чего появилась необходимость детального анализа структурной организации этого ядра у крыс с разным предпочтением алкоголя.

Цель данной работы — анализ цитоархитектоники и нейронной организации БЛ-ядра МТ у ПА- и НА-крыс.

Материал и методы. Использованные в работе ПА- и НА-крысы получены из популяции крыс линии WAG/Rij (модель абсансной эпилепсии) после генотипирования локуса Taq 1A DRD2, скрещивания гомозиготных животных и выявления в последующем предпочтения алкоголя в тесте двух

поилок. Более подробно сведения об экспериментальных крысах приведены в ранее опубликованной работе [2].

Исследование цитоархитектоники и строения нейронов БЛ-ядра МТ проведено на 20 крысах (по 10 крыс в каждой группе при равном количестве самцов и самок). Всех крыс содержали в стандартных условиях вивария при постоянных температуре (20–22 °C) и влажности. Еду и питье животные получали *ad libitum*. Животных декапитировали с соблюдением основных требований к эвтаназии, изложенных в Приложении № 4 к «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных». Головной мозг 1 мес фиксировали в 10% нейтральном формалине и обычным способом заливали в парафин. Готовили серии фронтальных срезов мозга толщиной 20 и 10 мкм, которые окрашивали крезильовым фиолетовым. Морфофункциональную оценку состояния нейронов проводили согласно классификации [7], подразделяющей их на: 1) хромонейтральные; 2) умеренно хромофильные; 3) умеренно хромофобные; 4) гиперхромофобные; 5) гиперхромофильные. На основании измерения диаметров тел нейронов, подразделяли их на крупные и малого размера. На срезах толщиной 10 мкм в 10 полях зрения микроскопа МБИ-11 (ЛОМО, Россия) при об. 40, ок. 15 подсчитывали количество и определяли их соотношение у каждого животного группы ПА и НА.

Для выявления особенностей структурной организации нейронов крупного и малого размера был применен метод Гольджи и использованы крысы линии Вистар, которые с крысами линии WAG/Rij генетически однородны. Целесообразность такого решения обосновывает хорошо известный факт, что при разных формах невропатологии,

Сведения об авторах:

Ахмадеев Азат Валерьевич (e-mail: mpha@ufanet.ru), кафедра безопасности жизнедеятельности и охраны окружающей среды;
Калимуллина Лилия Барыевна, кафедра физиологии человека и зоологии, Башкирский государственный университет,
450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32

включая наркоманию, алкоголизм и эпилепсию (которым подвержены крысы линии WAG/Rij в отличие от крыс линии Вистар), происходят морфологические изменения в нейронах, сопровождающиеся их гибелью и затрагивающие, прежде всего, систему интернейронов [4]. Учитывая сказанное, при использовании метода Гольджи нельзя было бы получить у ПА- и НА-крыс достоверной картины представительства нейронов, прежде всего, относящихся к нейронам II типа Гольджи (короткоаксонным) — эквивалентам нейронов малого размера.

Нейронная организация БЛ-ядра изучена у 15 крыс-самцов. Для этого их мозг после фиксации в жидкости Мюллера и в смеси двухромовокислого калия и четырехокиси осмия выдерживали в 1% растворе нитрата серебра 10 сут в термостате, после чего обезжизивали, заливали в целлоидин и готовили фронтальные срезы толщиной 100 мкм. Принадлежность нейронов к I или II типу Гольджи определяли на основании классификационных признаков, разработанных Т.А.Леонтович [2].

Статистическую обработку морфологических данных проводили с помощью программы Statistica 6.0. Сравнение вариационных рядов осуществляли с помощью параметрического критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. В составе БЛ-ядра у ПА- и НА-крыс выявлены нейроны крупного (20×16 мкм) и малого (10×14 мкм) размеров. Тела крупных нейронов имеют полигональную форму, ядро крупное, светлое, с хорошо определяющимся ядрышком. Широкий ободок цитоплазмы содержит глыбки хроматофильного вещества. Тела нейронов малого размера имеют округло-овальную или угловатую форму, светлое ядро и небольшой ободок цитоплазмы с пылевидным хроматофильным веществом. Около некоторых крупных нейронов можно видеть 2–3 нейрона малого размера.

Сравнительный анализ цитоархитектоники и цитологических особенностей нейронов БЛ-ядра у ПА- и НА-крыс позволил выявить следующие различия: 1) у НА-крыс крупные нейроны при идентичной окраске препаратов воспринимают краситель менее интенсивно. Если крупные нейроны у ПА-крыс можно определить как хромонеутральные и умеренно хромофильные, то у НА-крыс они характеризуются как умеренно хромофобные (рисунк, а, б); 2) у НА-крыс обращает на себя внимание меньшая плотность расположения крупных нейронов, а также тенденция формировать группы; 3) малоклеточные зоны (нейропил), разделяющие крупные нейроны, шире у НА-крыс; 4) у НА-крыс нейроны малого размера встречаются в поле зрения микроскопа чаще, при этом они формируют группы около крупных нейронов и их количество больше, чем у ПА-крыс; 5) среди нейронов малого размера у НА-крыс встречаются гиперхромофильные и

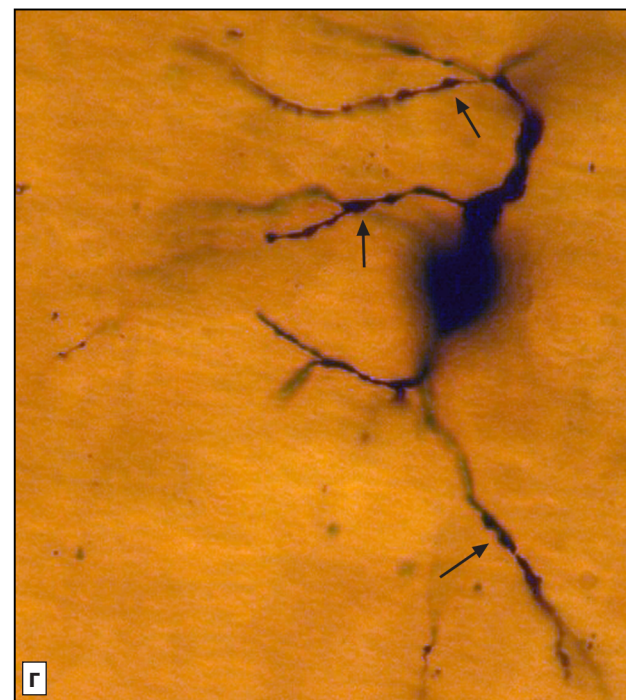
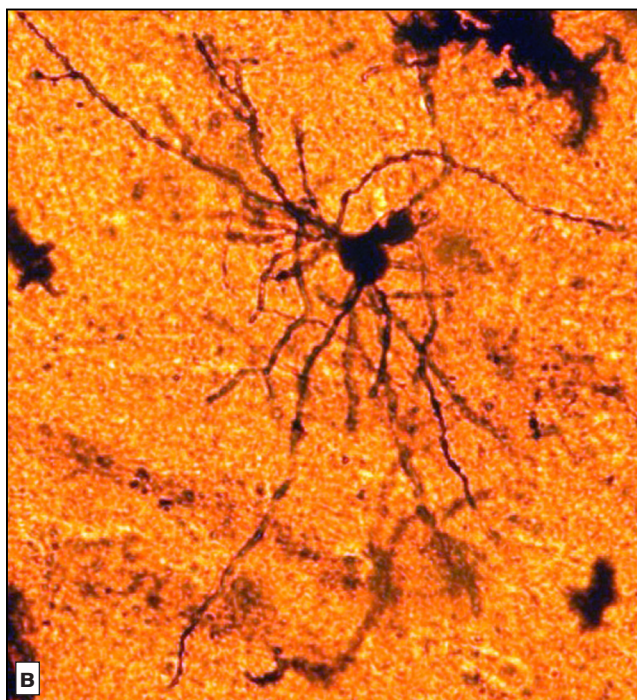
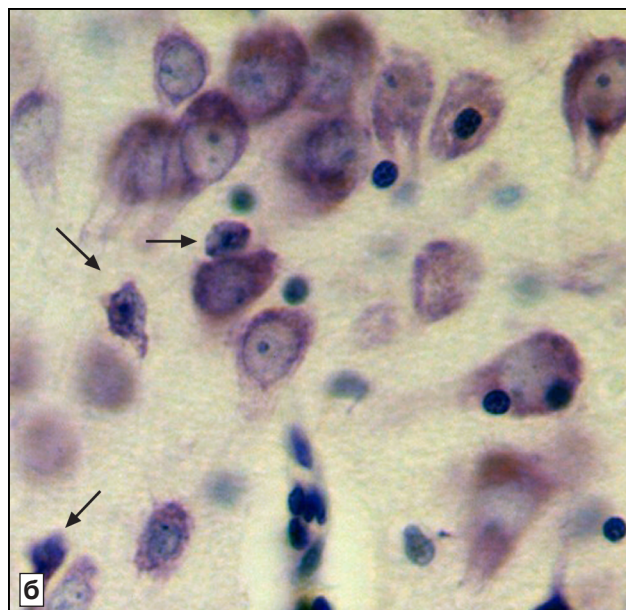
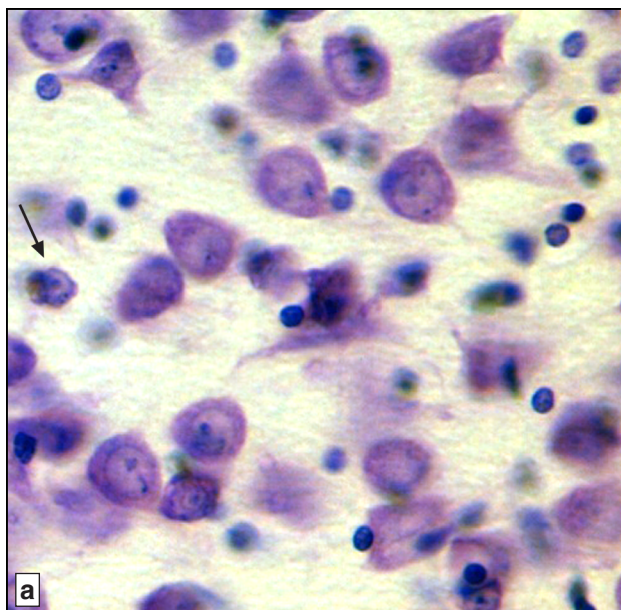
гиперхромофобные нейроны, что служит показателем различий их функционального состояния.

Изучение нейронной организации БЛ-ядра у крыс линии Вистар, проведенное с целью выявить эквиваленты нейронов крупного и малого размеров, показало, что крупные нейроны являются длинноаксонными густоветвистыми клетками древовидного типа, тела которых пирамидообразной формы. Нейроны малых размеров имеют характер короткоаксонных нейронов с обильным ветвлением терминалей аксона на территории, прилежащей к телу нейрона. По характеру строения дендритов большинство из них являются гладкодендритными, единичные нейроны имеют характер «лохматых» (термин Т.А.Леонтович) и нейронов с шипиками.

Результаты подсчета количества крупных нейронов (эквивалентов длинноаксонных густоветвистых нейронов, проекционных нейронов) и малого размера (эквивалентов короткоаксонных нейронов, интернейронов) и определения их соотношения показали, что доля нейронов малого размера у ПА-крыс составляет $12,3 \pm 0,6\%$, в то время как у НА-крыс их значимо больше — $19,70 \pm 0,23\%$ ($P < 0,01$).

Обсуждение полученных данных. Установлено, что крупные нейроны БЛ-ядра МТ, формирующие эфферентные связи с неокортексом, являются глутаматергическими [15], а интернейроны — ГАМК-ергическими [11]. Дофамин, поступающий в БЛ-ядро МТ по мезолимбической системе, модулирует активность эфферентных нейронов этого ядра путем активации пресинаптического D_2 -рецептора на интернейронах, что приводит к снижению выделения ГАМК [5]. Интернейроны прилежат к телам проекционных нейронов и формируют симметричные синапсы [9]. Уместно отметить, что формирование страха условными аверсивными стимулами сопровождается уменьшением содержания ГАМК в БЛ-ядре МТ, снижением активности синтезирующих ГАМК-энзимов, а также перестройками, происходящими во взаимоотношениях интернейронов [13].

Ранее было установлено, что у ПА-крыс содержание дофамина в МТ повышено по сравнению с таковым у НА-крыс [1]. Поэтому у ПА-крыс меньшее количество интернейронов и повышенное содержание дофамина будут предопределять ослабленное тормозное влияние интернейронов на эфферентные (проекционные) нейроны этого ядра. Повышение активности глутаматергических проекционных нейронов БЛ-ядра МТ, имеющих эфферентные связи со многими областями неокортекса [8], будет иметь следствием формиро-



Цитоархитектоника и нейронная организация базолатерального ядра миндалевидного тела мозга.

а — крупные и малого размера нейроны крыс, предпочитающих алкоголь; б — нейроны крыс, не предпочитающих алкоголь; стрелки — нейроны малого размера; в — длинноаксонный густоветвистый пирамидообразный нейрон; г — гладкодendrитный короткоаксонный нейрон; стрелки — варикозные утолщения. а, б — окраска крезилловым фиолетовым; в, г — метод Гольджи. а, г — об. 40, ок. 10; б — об. 50, ок. 10; в — об. 20, ок. 10

вание гиперактивности корковых формаций, проявляющейся усилением страха [12].

Опираясь на полученные нами данные у НА-крыс, а именно, меньшее содержание дофамина и большее представительство интернейронов, можно говорить, что у этой группы крыс тормозное влияние ГАМК на проекционные нейроны более выражено. Следовательно, усиление или ослабление тормозного влияния интернейронов на проекционные нейроны БЛ-ядра будет иметь

следствием разные уровни возбуждающего воздействия этого ядра на корковые формации.

В функциональной системе (префронтальная кора, МТ и гиппокамп) тревожности и страха БЛ-ядро МТ рассматривается как стратегически важное звено, координирующее взаимодействие структур, входящих в состав системы [3]. Взаимоотношения центров «страха» изменяются в процессе его инициации и торможения: при формировании информация поступает в МТ от вент-

ральной части гиппокампа и проецируется на префронтальную кору, а угасание «страха» осуществляется через прямые связи префронтальной коры с МТ.

Итак, полученные результаты позволяют объяснить большую удельную площадь БЛ-ядра у НА-крыс [1] наличием у них большего количества интернейронов, чем у ПА-крыс, выявляют структурные основы большего уровня тревожности ПА-крыс, в основе которой лежит дезингибирование глутаматергических проекционных нейронов БЛ-ядра МТ, приводящее к повышению уровня возбуждающего воздействия этого ядра на корковые формации.

В дальнейшем, учитывая актуальность изучения особенностей нейроэндокринных механизмов патогенеза женского и мужского алкоголизма, мы планируем исследовать половой диморфизм БЛ МТ, который на сегодняшний день недостаточно исследован.

Работа выполнена при финансовой поддержке базовой части Госзадания Министерства образования и науки, тема 1442.

ЛИТЕРАТУРА

- Ахмадеев А. В., Федорова А. М., Калимуллина Л. Б. Структурно-количественная характеристика миндалевидного тела и первичной соматосенсорной коры мозга предпочитающих и не предпочитающих алкоголь крыс // *Морфология*. 2014. Т. 145, вып. 1. С. 19–23.
- Леонтович Т. А. Нейронная организация подкорковых образований переднего мозга. М.: Медицина, 1978.
- Bienvenu T. C., Busti D., Magill P. J. et al. Cell-type-specific recruitment of amygdala interneurons to hippocampal theta rhythm and noxious stimuli in vivo // *Neuron*. 2012. Vol. 20, № 6. P. 1059–1074.
- Bissonette G. B., Bae M. H., Suresh T. et al. Prefrontal cognitive deficits in mice with altered cerebral cortical GABAergic interneurons // *Behav. Brain Res.* 2014. Vol. 259, № 3. P. 143–151.
- Chu H. Y., Ito W., Li J., Morozov A. Target-specific suppression of GABA release from parvalbumin interneurons in the basolateral amygdala by dopamine // *J. Neurosci.* 2012. Vol. 32, № 42. P. 14815–14820.
- De la Mora M. P., Gallegos-Cari A., Arizmendi-García Y. et al. Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis // *Prog. Neurobiol.* 2010. Vol. 90, № 2. P. 198–216.
- Einarson L., Krogh E. Variation in the basophilia of nerve cells associated with increased cell activity and functional stress // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 1955. Vol. 18. P. 1–12.
- McDonald A. J., Muller J. F., Mascagni F. Postsynaptic targets of GABAergic basal forebrain projections to the basolateral amygdala // *Neuroscience*. 2011. Vol. 183, № 2. P. 144–159.
- Muller J. F., Mascagni F., McDonald A. J. Pyramidal cells of the rat basolateral amygdala: synaptology and innervation by parvalbumin-immunoreactive interneurons // *J. Comp. Neurol.* 2006. Vol. 494, № 4. P. 635–650.
- Pandey S. C. Anxiety and alcohol abuse disorders: a common role for CREB and its target, the neuropeptide Y gene // *Trends Pharmacol. Sci.* 2003. Vol. 24, № 9. P. 456–460.
- Spampanato J., Polepalli J., Sah P. Interneurons in the basolateral amygdala // *Neuropharmacology*. 2011. Vol. 60, № 5. P. 765–773.
- Stafford J. M., Maughan D. K., Illovi E. C., Lattal K. M. Exposure to a fearful context during periods of memory plasticity impairs extinction via hyperactivation of frontal — amygdalar circuits // *Learn Mem.* 2013. Vol. 20, № 3. P. 156–163.
- Szinyei C., Narayanan R. T., Pape H. C. Plasticity of inhibitory synaptic network interactions in the lateral amygdala upon fear conditioning in mice // *Eur. J. Neurosci.* 2007. Vol. 25, № 4. P. 1205–1216.
- Toufexis D. Region- and sex-specific modulation of anxiety behaviours in the rat // *J. Neuroendocrinol.* 2007. Vol. 19, № 6. P. 461–473.
- Woodruff A. R., Sah P. Networks of parvalbumin-positive interneurons in the basolateral amygdala // *J. Neurosci.* 2007. Vol. 27, № 3. P. 553–563.

Поступила в редакцию 18.12.2015

Получена после доработки 17.03.2016

A. V. Akhmadiev¹, L. B. Kalimullina²

THE CYTOARCHITECTONICS AND NEURONAL ORGANIZATION OF THE BASOLATERAL NUCLEUS OF THE AMYGDALA OF THE BRAIN IN ALCOHOL-PREFERRING AND ALCOHOL-NONPREFERRING RATS

Analysis of cytoarchitectonics of the basolateral nucleus (BLN) of the brain amygdala was performed in cresyl violet-stained frontal paraffin sections of the brain in 10 alcohol-preferring (AP) and 10 alcohol-nonpreferring (ANP) rats (with an equal number of male and female animals in each group). The presence of large and small neurons was detected in BLN. Most of the large neurons in AP rats had the character of chromoneutral and moderately chromophilic cells, while in ANP rats these cells were moderately chromophobic. Application of Golgi method demonstrated that the equivalents of large neurons were long-axonal densely branched pyramid-like neurons, and those of small-sized neurons — short-axonal neurons. The determination of the ratio of large and small-sized neurons showed that in AP rats the proportion of latter was $12.3 \pm 0.6\%$, while in the ANP rats it was significantly greater — $19.70 \pm 0.23\%$. These results help to explain the previously obtained data on larger specific area of BLN in amygdala of ANP rats by the presence of greater number of interneurons than in AP rats.

Key words: *amygdala of the brain, the basolateral nucleus, interneurons, rats preferring and not preferring alcohol*

¹ Department of Life Safety and Environmental Protection;

² Department of Human Physiology and Zoology, Bashkir State University, Ufa