

# ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© А. В. Ахмадеев, Д. В. Нагаева, Л. Б. Калимуллина, 2012  
УДК 611.813.9:599.323.4

*А. В. Ахмадеев, Д. В. Нагаева и Л. Б. Калимуллина*

## ПАЛЕОАМИГДАЛА: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ У КРЫС ЛИНИИ WAG/Rij и Вистар

Кафедра морфологии и физиологии человека и животных (зав. — проф. З. Р. Хисматуллина),  
Башкирский государственный университет, г. Уфа

На 22 крысах-самцах линии WAG/Rij и Вистар с помощью световой микроскопии (окрашивание по методу Ниссля, морфометрический компьютерный анализ), электронной микроскопии (с использованием критериев оценки функционального состояния нейронов) и метода TUNEL для выявления апоптозных клеток проведен сравнительный анализ структурно-функциональной организации палеоамигдалы. Результаты анализа позволяют предполагать вовлеченность лимбических структур мозга в патогенез абсансной эпилепсии. Показано, что площадь, занимаемая на срезах миндалевидным телом, значимо больше у крыс линии WAG/Rij (модель абсансной эпилепсии). При оценке ультраструктурных характеристик нейронов всех структур палеоамигдалы (дорсомедиальное, заднее медиальное и заднее кортикальное ядра) у крыс линии WAG/Rij выявлены показатели снижения их функциональной активности. Кроме того, у крыс линии WAG/Rij увеличено число пикноморфных нейронов с признаками апоптоза, выявленного методом TUNEL, что свидетельствует о деструктивных процессах.

**Ключевые слова:** палеоамигдала, миндалевидное тело, лимбическая система, эпилепсия

Клинические и экспериментальные данные свидетельствуют о важной роли миндалевидного тела (МТ) в патогенезе эпилепсии человека [11, 21], однако, до сих пор остаются невыясненными причины низкого порога его судорожной активности, локализация мест инициации эпилепсии и механизмы ее генерализации. По мнению эпилептологов, существует вероятность того, что проявлению первичной генерализованной эпилепсии предшествует формирование очага в медиобазальных отделах височной доли мозга [6, 13], где локализируются структуры палеоамигдалы.

Крысы линии WAG/Rij являются инбредной линией с генетически детерминированной абсансной эпилепсией. Они широко используются в качестве адекватной модели для изучения механизмов генерализованной абсансной эпилепсии человека, причины возникновения которой остаются до настоящего времени неизвестными. Принимает ли участие МТ в механизмах абсансной эпилепсии неизвестно. По мнению ряда исследователей [14, 15, 25], лимбическая система не участвует в формировании пик-волновой активности, которая является основным показателем электроэнцефалограммы при этой форме эпилепсии. Другие авторы [18] не исключают возможность уча-

стия структур лимбической системы в патогенезе этого заболевания.

Имеющиеся в литературе данные о роли фактора пола в возникновении абсансной эпилепсии (чаще встречается у людей женского пола [5]), а также сведения о нарастании генерализованной пик-волновой активности во время менструации у пациенток, страдающих абсансной эпилепсией [7, 16], позволяют предположить, что в ее генез вовлечены нейроэндокринные репродуктивные центры мозга, к которым относится и палеоамигдала [2].

Цель данной работы — сравнительный анализ структурно-функциональной организации древней части МТ — палеоамигдалы у крыс линии WAG/Rij и Вистар.

**Материал и методы.** Цитоархитектонические и цитологические характеристики структур заднего отдела МТ изучены на 10 крысах линии WAG/Rij и Вистар в возрасте 6 мес (по 5 самцов каждой линии). Животных декапитировали с соблюдением основных требований к эвтаназии, изложенных в Приложении № 4 к «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных». Головной мозг извлекали из полости черепа и фиксировали в 10% нейтральном формалине. Готовили серии парафинных фронтальных срезов мозга толщиной 20 и 10 мкм, которые окрашивали крезоловым фиолетовым по методу

### Сведения об авторах:

*Ахмадеев Азат Валерьевич* (e-mail: mpha@ufanet.ru), *Нагаева Дина Валерьевна* (e-mail: nag\_dina@yahoo.com), *Калимуллина Лилия Барыевна* (e-mail: mpha@ufanet.ru), кафедра морфологии и физиологии человека и животных, ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», 450076 Уфа, ул. 3. Валиди, 32

Ниссля. Препараты изучали с помощью триокулярного светового микроскопа серии MC-300 (Micros, Австрия), пользуясь объективами 10 и 40. Микрофотографии получали с использованием цифрового фотоаппарата Nikon CoolPix 4500 (Nikon, Япония). Полученные изображения экспортировали в компьютер и проводили измерение абсолютных площадей полушарий конечного мозга, МТ и палеоамигдалы с помощью программы ImageJ 1.38 (National Institutes of Health, Bethesda, США, свободный доступ в интернете). У каждого животного измерения проводили на 7 срезах заднего отдела МТ из непрерывных серий фронтальных срезов головного мозга [1]. На основании соотношения величин абсолютных площадей полушарий, МТ и палеоамигдалы, получали данные об удельной площади МТ и палеоамигдалы, которые подвергали статистической обработке с помощью программы «Statistica 5.5». Сравнение вариационных рядов проводили с использованием критерия Стьюдента. Материал для электронно-микроскопического исследования был взят у 6 крыс (по 3 самца каждой линии). Кусочки ткани, содержащие структуры палеоамигдалы, извлекали из головного мозга под контролем микроскопа с помощью специального устройства [9]. Материал фиксировали погружением в охлажденный 2,5% раствор глутаральдегида на фосфатном буфере (рН 7,4) и дополнительно обрабатывали в 2% растворе  $OsO_4$ , обезвоживали в этаноле и заливали в эпон-812. Срезы готовили на ультратоме LKB III (LKB, Швеция), контрастировали цитратом свинца [23] и анализировали в электронном микроскопе JEM 200 EX при напряжении 75 кВ (Jeol, Япония).

Функциональное состояние нейронов определяли на основании их ультрамикроскопических характеристик согласно критериям, разработанным ранее для нейроэндокринных нейронов МТ [3, 4], используя подходы, описанные А. Л. Поленовым [10]. Критерии разработаны для самцов и самок крыс при сопоставлении данных электронно-микроскопических, автордиографических исследований с  $^3H$ -уридиновой меткой, а также определения уровней связывания  $^3H$ -эстрадиола у самок крыс на различных стадиях эстрального цикла. При этом первостепенное значение придавали характеристике клеточного ядра, опираясь на современные данные кариологии: анализировали соотношение гетеро- и эухроматина, оценивали состояние ядрышка (размеры, локализацию, плотность, количество и размеры крупных и мелких фибриллярных центров, наличие в них плотного фибриллярного компонента, соотношение гранулярного и фибриллярного компонента, характеристики околядрышкового гетерохроматина). Большое внимание уделяли состоянию структур интерхроматинового пространства (наличие и количество перихроматиновых фибрилл, перихроматиновых гранул, интерхроматиновых гранул) и ядерных мембран, учитывая динамику их качественных и количественных характеристик. При анализе состояния органелл цитоплазмы обращали внимание на их размеры, форму, локализацию в перикарионе, преобладание свободных или прикрепленных рибосом, регистрировали состояние крист и матрикса митохондрий, наличие контактов между митохондриями и между митохондриями и другими органеллами. Обращали внимание на наличие мультиламеллярных и мультивезикулярных телец, выпячиваний ядерной оболочки, на состояние компонентов комплекса Гольджи и характеристики пузырьков с электронно-плотным центром, лизосом. На основании проведенного анализа, нами были выявлены функциональные состояния нейронов [4], перечень которых приведен в табл. 1. Апоптотные клетки выявляли методом TUNEL. Для этого

головной мозг крыс (по 3 особи каждой линии) фиксировали в 4% параформальдегиде на 0,1 М фосфатно-солевом буфере (PBS, рН 7,3–7,4), заливали в парафин и готовили фронтальные срезы толщиной 5 мкм, которые помещали на предметные стекла, покрытые L-лизиним. Для выявления TUNEL-позитивных структур использовали набор реактивов ApopTag In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, США).

**Результаты исследования.** При сравнении удельной площади МТ по отношению к площади полушарий мозга и палеоамигдалы — к площади МТ у крыс исследованных линий обнаружено, что удельная площадь МТ у крыс линии WAG/Rij значимо больше, чем у крыс линии Вистар. При этом межлинейные различия в величине удельной площади палеоамигдалы отсутствуют (табл. 2).

Изучение нейронов на препаратах, окрашенных крезилловым фиолетовым по Нисслию, показало, что у крыс линии WAG/Rij во всех структурах палеоамигдалы (дорсомедиальное ядро, заднее медиальное и заднее кортикальное ядра) увеличено число нейронов с интенсивно окрашенным перикарионом, содержащим большие скопления хроматофильного вещества, которое часто экранировало клеточное ядро, а дендриты имели извитой вид.

Изучение ультраструктурных характеристик нейронов позволило выявить их различные функциональные состояния (рисунок).

У крыс с абсансной эпилепсией (крысы линии WAG/Rij) по сравнению с крысами Вистар во всех структурах палеоамигдалы увеличена доля нейронов, ультраструктура которых отражает состояние снижения активности. Так, в дорсомедиальном ядре у крыс линии Вистар доля нейронов, ультраструктура которых характеризует умеренную активность, повышенную активность и пик активности, суммарно равна 73%, а нейронов, демонстрирующих снижение активности вместе с пикноморфными нейронами, — всего 21%. У крыс линии WAG/Rij функционально активных нейронов 50%, а нейронов с показателями снижения активности — 41% (см. табл. 1).

Кроме того, обращает на себя внимание увеличение доли пикноморфных нейронов, в которых имеют место признаки апоптоза (по результатам реакции TUNEL). Такое же изменение соотношения функциональных состояний нейронов имеет место в заднем медиальном и заднем кортикальном ядрах.

**Обсуждение полученных данных.** Результаты морфометрического исследования показали, что крысы линии WAG/Rij имеют значимо большую удельную площадь МТ чем крысы линии Вистар, но удельная площадь палеоамигдалы

Таблица 1

**Доля (%) нейронов, находящихся в различных функциональных состояниях в палеоамигдале у самцов крыс линии WAG/Rij и Вистар**

Функциональное состояние нейронов	Ядра палеоамигдалы					
	дорсомедиальное		заднее медиальное		заднее кортикальное	
	Вистар	WAG/Rij	Вистар	WAG/Rij	Вистар	WAG/Rij
Покой	3	5	5	2	1	0
Умеренная активность	16	9	14	11	19	13
Повышенная активность	35	23	29	26	31	27
Пик активности	22	18	18	19	25	21
Снижение активности по первому типу	17	35	25	32	18	27
Снижение активности по второму типу	3	2	4	3	2	4
Возврат к исходному состоянию	3	4	5	4	2	3
Пикноморфные нейроны	1	4	0	3	2	5

лы у них одинакова. Полученные нами результаты согласуются с данными исследования, проведенного на крысах линии GAERS (Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg). У этих крыс также была обнаружена большая площадь, занимаемая МТ, по сравнению с таковой у неэпилептических крыс [12]. Подобных сведений у крыс линии WAG/Rij в литературе нет.

Согласно новой гипотезе, генерализованная абсансная эпилепсия является кортико-таламическим типом эпилепсии [8]. В ее формировании принимают участие такие структуры, как кора большого мозга с эпилептогенной зоной (находящейся в первичной соматосенсорной коре), вентробазальные и ретикулярные ядра таламуса. Известно, что палеоамигдала имеет связи с ретикулярным ядром таламуса [22], которое представляет собой скопление ГАМК-ергических нейронов и оказывает тормозное влияние на соматосенсорную кору и, очевидно, на другие связанные с ним структуры мозга. Кроме того, палеоамигдала имеет двусторонние связи с базолатеральным ядром МТ, получающим афферентные глутаматергические пути из соматосенсорной коры [20, 24]. Поскольку известно, что базолатеральное ядро оказывает на кортико-медиальную группу нейронов МТ ингибирующее влияние [11], можно предполагать, что возбуждение, приходящее из соматосенсорной коры к базолатеральному ядру, будет усиливать тормозное влияние этого ядра на палеоамигдалу, которая, как известно, является частью кортико-медиальной группы нейронов МТ.

Выявленные различия свидетельствуют о том, что у крыс линии WAG/Rij с абсансной эпилепсией по сравнению с крысами линии Вистар картина функциональных состояний нейронов отражает их меньшую транскрипционную, а следовательно, и функциональную активность. Вероятно, выявлен-

Таблица 2

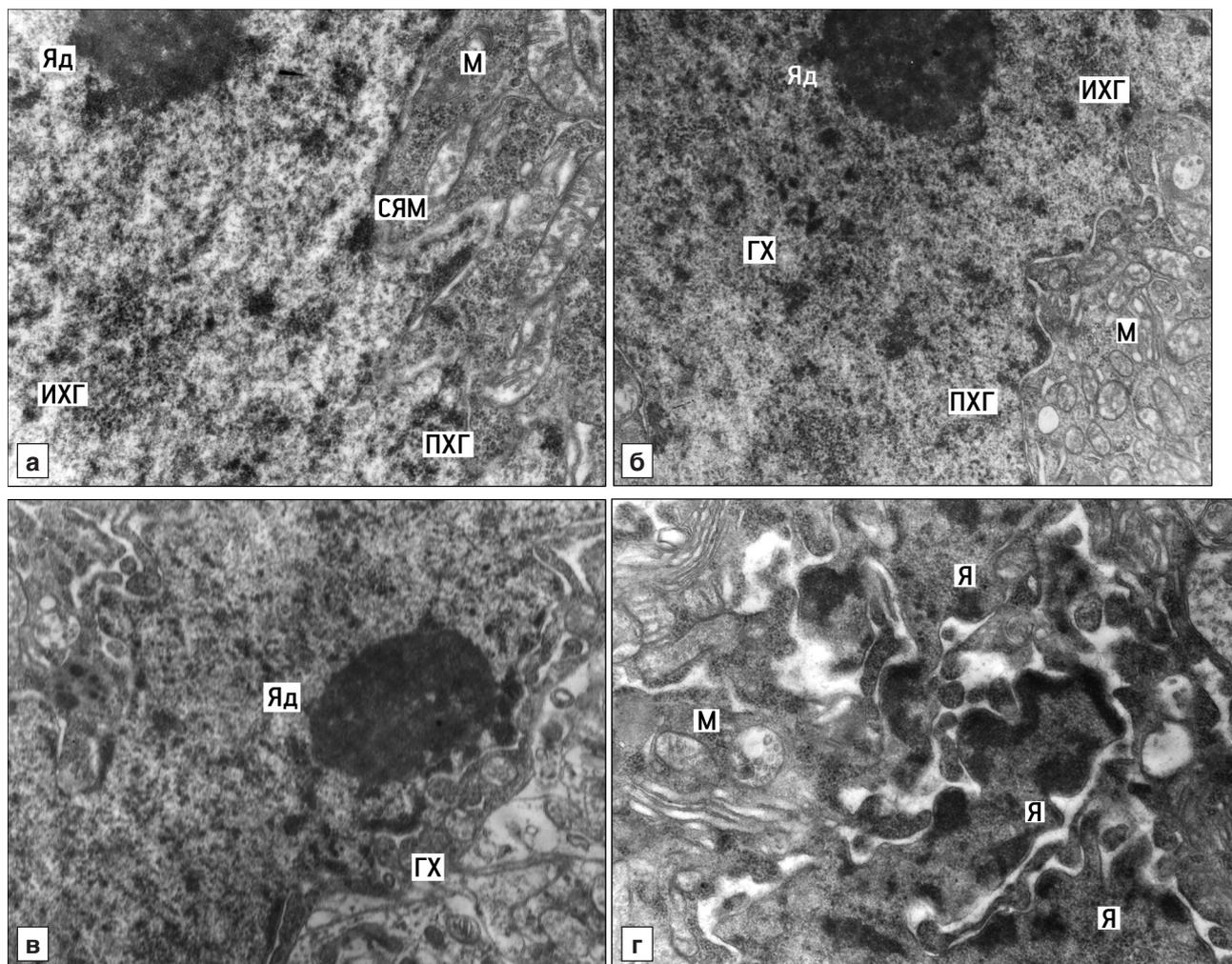
**Удельная площадь миндалевидного тела и палеоамигдалы у крыс линии WAG/Rij и Вистар**

Линия крыс	Миндалевидное тело	Палеоамигдала
WAG/Rij	22,6±0,5*	26,0±0,3
Вистар	21,2±0,4	26,02±0,24

\* Различия показателей у крыс линии WAG/Rij и Вистар значимы при  $P < 0,05$ .

ные ультраструктурные особенности популяции нейронов палеоамигдалы у крыс линии WAG/Rij можно трактовать как состояние охранительного торможения, формирующегося при циркуляции возбуждения по кортико-таламо-кортикальному кругу у крыс с абсансной эпилепсией, достигающего базолатерального ядра МТ и проявляющегося усилением тормозного влияния базолатеральной группы нейронов МТ на палеоамигдалу. Можно также предполагать, что при этом имеет значение и тормозное влияние на палеоамигдалу ретикулярного ядра таламуса.

Кроме того, обращает на себя внимание, что у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами линии Вистар увеличено число пикноморфных нейронов, появление которых свидетельствует о деструктивных процессах. Известно, что нейродеструктивные процессы, протекающие в эпилептическом очаге, являются следствием токсического действия глутамата на клетки-мишени и завершаются некрозом или апоптозом. Возможно, развивающиеся в палеоамигдале процессы сходны с теми, которые имеют место при киндлинге. ГАМК-ергическое торможение сначала усиливается, затем начинает градуально снижаться [19]. Объяснением этого может быть то, что первоначально гипервозбудимость приводит к усилению активации интернейронов и, следовательно, к повышению эффективности торможения. Затем



Ультраструктура клеточного ядра и перикариона нейронов палеоамигдалы, находящихся в различных функциональных состояниях.

а — состояние повышенной активности (крыса линии Вистар); б — состояние пика активности (крыса линии Вистар); в — снижение активности (крыса линии WAG/Rij); г — явления апоптоза (крыса линии WAG/Rij); Я — ядро; Яд — ядрышко; ИХГ — интерхроматиновые гранулы; ПХГ — перихроматиновые гранулы; М — митохондрии; ГХ — гетерохроматин; СЯМ — складка ядерной мембраны. Ув.: а, б — 19 000; в — 12 000; г — 14 000.

гипервозбудимость приводит к постепенной гибели интернейронов и градуальному снижению этой эффективности [17].

Сведения о связях палеоамигдалы с эпилептогенными очагами мозга при абсансной эпилепсии и полученные нами данные дают основание предполагать, что палеоамигдала вовлечена (первично или вторично) в патогенетические механизмы абсансной эпилепсии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Акмаев И. Г. и Калимуллина Л. Б. Миндалевидный комплекс мозга. Функциональная морфология и нейроэндокринология. М., Наука, 1993.
2. Ахмадеев А. В. и Калимуллина Л. Б. Древняя амигдала: цитоархитектоника, организация и цитологические характеристики нейронов. Морфология, 2004, т. 126, вып. 5, с. 15–19.

3. Ахмадеев А. В. и Калимуллина Л. Б. Показатели модулирующего влияния половых стероидов на ультраструктурные характеристики нейронов дорсомедиального ядра миндалевидного комплекса мозга. Цитология, 2006, т. 48, № 12, с. 971–979.
4. Ахмадеев А. В. и Калимуллина Л. Б. Электронно-микроскопическая характеристика нейроэндокринных нейронов миндалевидного тела мозга у самцов и самок крыс на различных стадиях эстрального цикла. Морфология, 2006, т. 130, вып. 6, с. 25–29.
5. Железнова Е. В. Нейроэндокринный аспект эпилепсии у женщин в работах последних двух десятилетий. Журн. невропатол. и психиатр., 2005, т. 105, № 2, с. 59–64.
6. Карлов В. А. Лекции по эпилепсии. М., Медицина, 1990.
7. Карлов В. А. и Власов П. Н. Клинические и электрофизиологические аспекты катамениальной эпилепсии. Журн. невропатол. и психиатр., 1993, т. 93, № 1, с. 8–12.
8. Меерен Х. К.М., ван Луителаар Е. Л. Дж., да Сильва Лопес и др. Кортикоталамическая теория происхождения генера-

- лизованных пик-волновых разрядов. Успехи физиол. наук, 2004, т. 35, № 1, с. 3–19.
9. Патент РФ № 2438193. Способ приготовления переживающих срезов пириформной доли мозга. А. В. Ахмадеев и Л. Б. Калимуллина. Заявка от 27.12.2011 г. Оpubл. в БИ, 2011, № 36, с. 215–220.
  10. Поленов А. Л. Морфофункциональная организация нейро-секреторных клеток гипоталамуса. В кн.: Нейроэндокринология. СПб., Наука, 1993, с. 31–70.
  11. Чепурнов С. А. и Чепурнова Н. Е. Миндалевидный комплекс мозга. М., Изд-во МГУ, 1981.
  12. Bouilleret V., Hogan R.E., Velakoulis D. et al. Morphometric abnormalities and hyperanxiety in genetically epileptic rats: a model of psychiatric comorbidity? *Neuroimage*, 2008, v. 389, p. 2321–2335.
  13. Chassagnon S., de Vasconcelos A., Ferrandon A. et al. Time course and mapping of cerebral perfusion during amygdala secondarily generalized seizures. *Epilepsia*, 2005, v. 46, p. 1178–1187.
  14. Inoue T., Koyama T. and Yamashita I. Effect of conditioned fear stress on serotonin metabolism in the rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1993, v. 44, p. 371–374.
  15. Kandel A., Bragin A., Carpi D. and Buzsaki G. Lack of hippocampal involvement in a rat model of petit mal epilepsy. *Epilepsy Res.*, 1996, v. 23, p. 123–127.
  16. Lin T. and Greenblatt M. Solomon H. A polygraphic study of one case of petit mal epilepsy: effects of medication and menstruation. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1952, v. 4, p. 335–355.
  17. McNamara J. Cellular and molecular basis of Epilepsy. *J. Neurosci.*, 1994, v. 14, p. 3413–3425.
  18. Midzyanovskaya I. Absence and mixed forms of epilepsy in WAG. Rij rats: characteristics and brain aminergic modulations. Nijmegen, Nijmegen Univ. Press, 2006.
  19. Oliver M. and Miller J. Alteration of inhibitory processes in the dentate gyrus following kindling-induced epilepsy. *Exp. Brain Res.*, 1985, v. 57, p. 443–447.
  20. Ottersen O. P. Connections of the amygdala of the rat: 4. Corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.*, 1982, v. 205, № 1, p. 30–48.
  21. Pitkanen A., Tuunanen J., Kalviainen R. et al. Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.*, 1998, v. 32, p. 233–253.
  22. Reardon F. and Mitrofanis J. Organization of the amygdalo-thalamic pathways in rat. *Anat. Embryol. (Berl.)*, 2000, v. 201, p. 75–84.
  23. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high ph as an electronopaque stain in the electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 1963, v. 7, p. 208–212.
  24. Sripanidkulchai K., Sripanidkulchai B. and Wyss J. The cortical projection of the basolateral amygdaloid nucleus in the rat: A retrograde fluorescent dye study. *Comp. Neurol.*, 1984, v. 229, № 3, p. 419–431.
  25. Van Luijckelaar G. and Coonen A. The WAG/Rij rat model of absence epilepsy. *Epilepsy Res.*, 1989, v. 1, p. 297–299.

Поступила в редакцию 13.10.2011

Получена после доработки 11.04.2012

#### PALEOAMYGDALA: A COMPARATIVE ANALYSIS OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ORGANIZATION IN WAG/Rij AND WISTAR RATS

*A. V. Akhmadeyev, D. V. Nagayeva and L. B. Kalimullina*

A comparative analysis of structural and functional organization of paleoamygdala was performed in 22 male WAG/Rij and Wistar rats using light microscopy (Nissl staining method and computer morphometric analysis), electron microscopy (using the criteria of the evaluation of the functional state of neurons) and the TUNEL method for apoptotic cell labeling. The results obtained suggest the involvement of the limbic brain structures in the pathogenesis of absence epilepsy. It was shown that the area occupied in the sections by amygdala was significantly greater in WAG/Rij rats (model of absence epilepsy). The assessment of ultrastructural characteristics of neurons in all the structures of paleoamygdala (dorsomedial, posterior medial and posterior cortical nuclei) has shown the signs of the reduction of their functional activity in WAG/Rij rats. In addition, WAG/Rij rats demonstrated the increased numbers of pyknomorphic neurons with the signs of apoptosis, as identified by the TUNEL method, which is indicative of the destructive processes.

**Key words:** *paleoamygdala, amygdala, limbic system, epilepsy*

Department of Human and Animal Morphology and Physiology, Bashkir State University, Ufa