

© А. В. Ахмадеев, А. М. Федорова, Л. Б. Калимуллина, 2014
УДК 611.813:613.81:599.323.4

А. В. Ахмадеев, А. М. Фёдорова и Л. Б. Калимуллина

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ СТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИНДАЛЕВИДНОГО ТЕЛА И ПЕРВИЧНОЙ СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЫ МОЗГА КРЫС С РАЗЛИЧНЫМ ПРЕДПОЧТЕНИЕМ АЛКОГОЛЯ

Кафедра физиологии человека и зоологии (зав. — д-р биол. наук З. Р. Хисматуллина), Башкирский государственный университет, г. Уфа

Целью работы явилась структурная и планиметрическая характеристика ядер и межзачаточных формаций кортико-медиальной и базолатеральной группировок миндалевидного тела (МТ) и первичной соматосенсорной коры мозга предпочитающих (ПА — $n=10$) и не предпочитающих алкоголь (НА — $n=10$) крыс, а также выявление различий в содержании дофамина и его метаболита — 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) в МТ. Измерения абсолютных и удельных площадей изученных структур проведены на цитоархитектонических препаратах, окрашенных крезоловым фиолетовым по методу Ниссля. Между двумя исследованными группами крыс различий удельной площади кортико-медиальной и базолатеральной группировок структур МТ не выявлено. У НА-крыс обнаружены большая удельная площадь первичной соматосенсорной коры и удельная площадь МТ в левом полушарии, предопределенная большими размерами базолатеральной группировки. Анализ содержания ДОФУК в МТ выявил, что при почти равных его количествах дофамина значимо больше у крыс ПА. Соотношение ДОФУК/дофамин вдвое больше у крыс ПА, что указывает на его ускоренный метаболизм.

Ключевые слова: миндалевидное тело мозга, морфометрические показатели, предрасположенность к алкоголизму, дофамин

Миндалевидное тело (МТ) и соматосенсорная кора являются важными структурными компонентами мезокортико-лимбической дофаминергической системы мозга, деятельность которой нарушается при многих психоневрологических заболеваниях, включая алкоголизм. Ведущую роль в формировании дисфункции указанной нейромедиаторной системы мозга играют повреждение рецептора дофамина второго типа (DRD2), часто детерминированные генетическими факторами [6]. В ранее проведенных экспериментальных исследованиях была выявлена роль генотипа A_1/A_1 по локусу Taq 1A DRD2 в ускорении темпов развития толерантности к алкоголю и формирования психической зависимости [2]. Эти данные находят подтверждение в результатах генетических исследований [11, 18], показавших, что генотип A_1/A_1 предопределяет снижение экспрессии короткой изоформы (DRD2S), что, в свою очередь, приводит к повышению содержания внеклеточного дофамина [9, 16].

Цель данного исследования — структурная и количественная характеристика МТ и первичной соматосенсорной коры мозга крыс с различным предпочтением алкоголя, а также выявление раз-

личий в содержании дофамина и его метаболита — 3,4-диоксифенилуксусной кислоты в МТ.

Материал и методы. Исследование проведено на 20 половозрелых крысах (по 10 крыс в каждой группе, по 5 особей разного пола). Используемые в работе предпочитающие (ПА) и не предпочитающие алкоголь (НА) крысы получены из популяции крыс линии WAG/Rij после генотипирования локуса Taq 1A DRD2, скрещивания гомозиготных животных и выявления в последующем предпочтения алкоголя в тесте двух поилок [5]. Среди крыс, имевших генотип A_1/A_1 , для получения потомства были отобраны особи (самки и самцы), имевшие высокие темпы нарастания количества потребляемого спирта при принудительной алкоголизации в течение 2 нед и с установкой двух поилок (10% этанол и вода) на 3-й неделе эксперимента предпочитавшие пить спирт. В настоящем исследовании использовано 4-е поколение этих крыс, которые обозначены как крысы ПА. Среди крыс с генотипом A_2/A_2 для получения потомства использованы особи, которые после принудительной алкоголизации при установке двух поилок предпочитали пить воду. Эта группа крыс обозначена как НА. Всех использованных в работе крыс содержали в стандартных условиях вивария, характеризующихся постоянством комнатной температуры (20–22 °C) и уровнем влажности. Еду и питье крысы 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 ПА- и НА-крыс

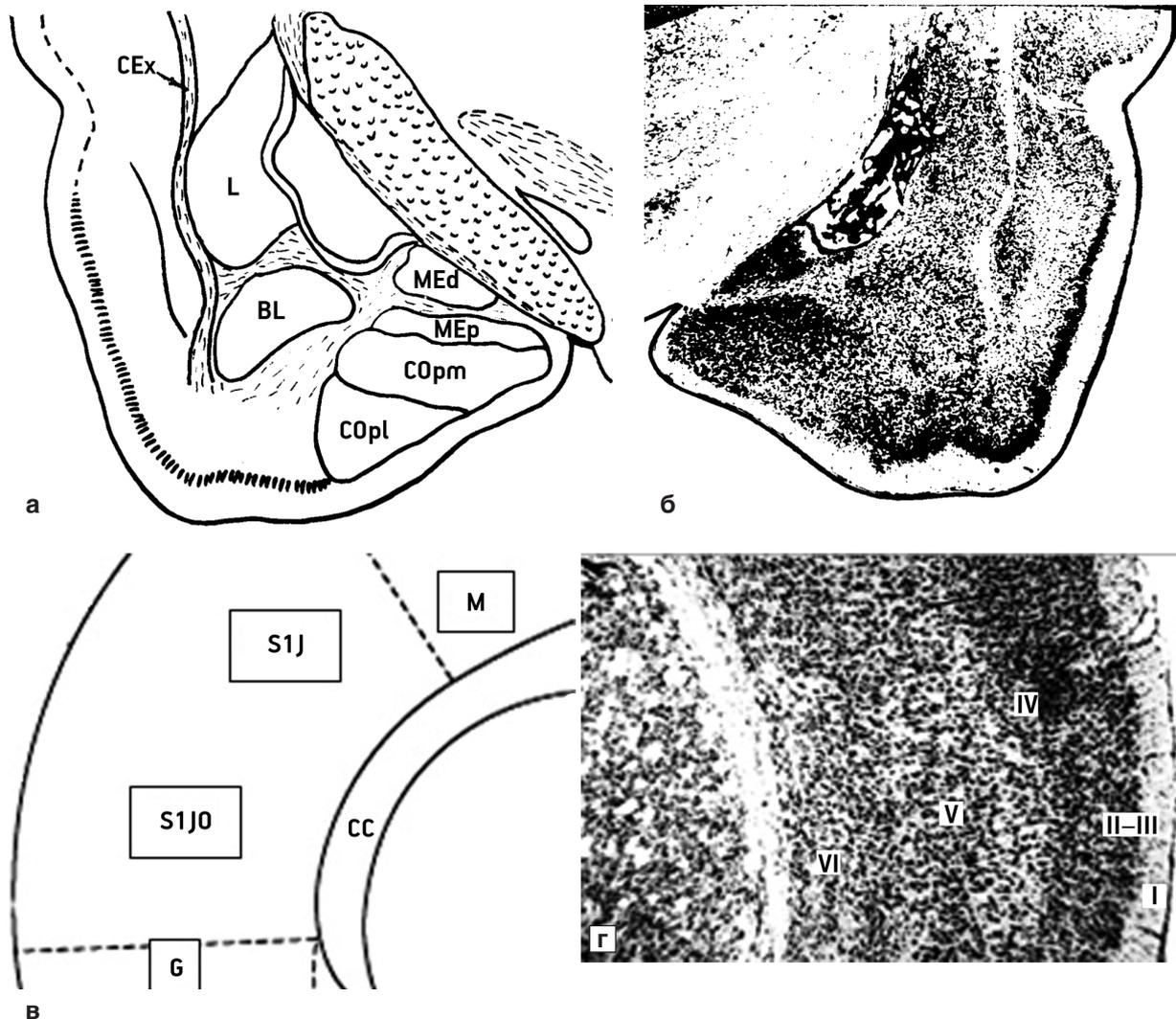
Сведения об авторах:

Ахмадеев Азат Валерьевич (e-mail: mpha@ufanet.ru), Федорова Альбина Мубаракровна (e-mail: marmishka-06@mail.ru), Калимуллина Лилия Барыевна (e-mail: mpha@ufanet.ru), кафедра физиологии человека и зоологии, Башкирский государственный университет, 450076, Уфа, ул. Заки Валиди, 32

извлекали из полости черепа и 1 мес фиксировали в 10% нейтральном формалине, промывали и обезживали в этаноле возрастающей концентрации, хлороформе и заливали в парафин, готовили серии фронтальных срезов толщиной 20 мкм, которые окрашивали крезильным фиолетовым по методу Ниссля [7].

Для измерения площади изучаемых структур заднего отдела МТ и периорального поля первичной соматосенсорной коры использовали фронтальные срезы, приготовленные указанным выше способом, и программу JimageJ 1.38 (США). Вычисляли абсолютные и удельные площади структур МТ в обоих полушариях головного мозга. Удельную площадь МТ определяли по отношению к площади всего соответствующего полушария мозга, удельные площади кортико-медиальной и базально-латеральной группировок структур МТ — по отношению к площади МТ. В соматосенсорной коре вычисляли удельную площадь V и VI слоев по отношению к общей площади периорального поля в правом полушарии.

Содержание дофамина и его метаболита — 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) в МТ (у 20 ПА- и 20 НА-крыс, у самцов и самок) определяли на высокоэффективном жидкостном хроматографе (Аквилон, Россия) со спектрофотометрическим детектором (UVV-104 М). Область МТ выделяли из нативного мозга [8] и гомогенизировали в 20 объемах холодной 0,1 М перхлорной кислоты (Sigma, США) и 1 пг/50 мкл дигидроксибензиламина гидробромида (Sigma, США) в качестве внутреннего стандарта. Гомогенизат центрифугировали при -20°C в течение 10 мин при 6000 об/мин. Супернатант подвергали микрофильтрации с помощью специальных наборов (Биохром, Россия). После повторного центрифугирования пробы анализировали на содержание моноаминов дофамина и ДОФУК. Методика, характеризующая генотипирование локуса Taq 1A DRD2, подробнее описана ранее [2]. При проведении статистической обработки полученных данных использовали программу «Statistica 5.5», с помощью которой определяли среднюю



Структурная организация миндалевидного тела (МТ) и соматосенсорной коры крыс.

а — схема цитоархитектоники МТ; б — цитоархитектоника МТ; в — схема цитоархитектоники соматосенсорной коры (по G. Paxinos и S. Watson [14] с дополнениями); г — цитоархитектоника соматосенсорной коры. MEd — дорсомедиальное ядро; MEp — заднее медиальное ядро; COpm — медиальная часть заднего кортикального ядра; COpl — латеральная часть заднего кортикального ядра; L — латеральное ядро; BL — базолатеральное ядро; CEx — наружная капсула; M — моторная кора; S1J — первичная соматосенсорная кора; S1JO — периоральное поле первичной соматосенсорной коры; G — инсулярная кора; CC — мозолистое тело; I–VI — слои коры. б, г — окраска крезильным фиолетовым по Ниссля. Ув.: б — 35; г — 50

арифметическую величину обрабатываемых вариационных рядов и ее стандартную ошибку. Сравнение вариационных рядов проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты исследования. В состав заднего отдела МТ входят ряд структур, формирующих кортико-медиальную и базолатеральную группировки. Основными структурами кортико-медиальной группировки являются дорсомедиальное, заднее медиальное и заднее кортикальное ядра (рисунк, а).

Дорсомедиальное ядро занимает самую дорсальную по сравнению с другими двумя ядрами (задним медиальным и задним кортикальным) позицию, имеет наибольшую плотность расположения нейронов, форма и размеры которых однородны. Оно находится около стенки бокового желудочка (см. рисунок, а, б). Заднее медиальное ядро располагается вентральнее дорсомедиального ядра, отделяясь от него узкой волокнистой прослойкой. Заднее кортикальное ядро — самое большое по площади среди рассматриваемых ядер. Оно выходит на базальную поверхность мозга, где под мягкой оболочкой находится его поверхностная зона. В составе заднего кортикального ядра есть медиальная и латеральная части (см. рисунок, а), отчетливо различающиеся по цитоархитектоническим признакам. Базолатеральная группировка структур заднего отдела МТ включает в себя базолатеральное и латеральное ядра (см. рисунок, а). Скопление этих ядер легко дифференцируется от остальных структур МТ, так как отграничено наружной капсулой и продольной ассоциативной связкой. Первичная соматосенсорная кора располагается на дорсолатеральной поверхности полушарий и включает в себя ряд областей (см. рисунок, в, г), одной из которых является периоральное поле. В его составе выделяют 6 слоев (см. рисунок, г).

Проведенный структурно-количественный анализ показал, что суммарные удельные площади

МТ у ПА- и НА-крыс не различаются. При сравнении удельной площади МТ в левом и правом полушариях мозга у исследованных групп крыс различий также не обнаружено. Сравнительный анализ удельных площадей кортико-медиальной и базолатеральной группировок МТ выявил, что удельная площадь базолатеральной группировки у НА-крыс значимо больше, чем у ПА-крыс. У НА-крыс также значимо больше удельная площадь МТ в левом полушарии, чем в правом. У них же значимо больше, чем у ПА площадь V–VI слоев первичной сенсомоторной коры (таблица).

Было выявлено, что при почти равном содержании ДОФУК в МТ дофамина значимо больше у крыс ПА ($P < 0,01$). Соотношение ДОФУК/дофамин вдвое больше у крыс ПА ($0,39 \pm 0,03$), чем у крыс НА ($0,17 \pm 0,03$), что указывает на его ускоренный метаболизм.

Обсуждение полученных данных. Большую роль в разработке ранних диагностических методов для выявления групп риска играют нейровизуализационные методы (компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, позитронно-эмиссионная томография). Они позволяют обнаружить обусловленные психоневрологическими отклонениями изменения в морфометрических и функциональных показателях структур мозга. Эти исследования проводятся как на людях, так и на животных. В литературе накоплено немало сведений, характеризующих изменения строения мозга при депрессии, височной эпилепсии и шизофрении, но в отношении болезней зависимости они немногочисленны и противоречивы. Так, исследования, проведенные с помощью ядерно-магнитного резонанса у людей, показали, что в норме различий объема МТ в правом и левом полушариях мозга не существует [10]. Другие авторы [12], наоборот, указывают, что имеющиеся в контроле различия этого показателя исчезают у наркоманов. Проведенный нами

Удельная площадь миндалевидного тела, его структур и сенсомоторной коры крыс, предпочитающих (ПА) и не предпочитающих (НА) алкоголь ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, %)

| Группа животных | Миндалевидное тело | | | | | Сенсомоторная кора |
|-----------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| | Суммарная удельная площадь | В левом полушарии мозга | В правом полушарии мозга | Кортико-медиальная группировка | Базолатеральная группировка | |
| ПА | 20,2±0,9 | 20,6±0,9 | 19,7±0,5 | 16,6±1,4 | 19,2±0,5 | 29,8±0,4 |
| НА | 19,4±0,4 | 20,1±0,6 | 18,7±0,4 [#] | 16,5±1,4 | 21,7±0,3 ^{**} | 32,3±0,4 [*] |

* Различие по сравнению с соответствующим показателем у крыс ПА значимо при $P < 0,05$; ** при $P < 0,001$; # различия значимы по сравнению с показателями в левом полушарии при $P < 0,05$.

сравнительный анализ удельной площади МТ у ПА- и НА-крыс как в левом, так и в правом полушариях не выявил различий. Однако у НА-крыс была обнаружена бо́льшая, чем у ПА-крыс, удельная площадь базолатеральной группировки. Следует также отметить, что удельная площадь кортико-медиальной группировки заднего отдела МТ, составляющей субстрат палеоамигдалы [3], у ПА- и НА-крыс не различалась.

Известно, что базолатеральная группировка структур МТ участвует в формировании эмоциональной памяти, тревожности и реакций страха, при этом ведущую роль играет DRD2 [13]. С использованием экспериментальных моделей установлено, что у мышей, проявляющих большую тревожность, базолатеральная группировка МТ имеет меньшие размеры по сравнению с таковыми у мышей, у которых проявления тревожности отсутствуют [17]. Это согласуется с результатами наших исследований поведения ПА- и НА-крыс в приподнятом крестообразном лабиринте и в установке «Открытое поле», которые показали наличие признаков тревожного поведения у ПА-крыс [4].

Имеющиеся в литературе сведения позволяют объяснить, как повышенный уровень катехоламинов в МТ, выявленный нами у ПА-крыс, может приводить к повышению уровня тревожности. В основе этого лежит изменение функциональной активности эфферентных (пирамидных) нейронов ядер базолатеральной группировки. Показано, что приходящие из ствола тирозин-гидроксилаза-содержащие терминалы контактируют не с пирамидными нейронами, а с ГАМК-ергическими интернейронами, формируя тормозные синапсы [15]. Повышенный приток катехоламинов в МТ в этих условиях приводит к дизингибции пирамидных нейронов, повышению активности в нервных кругах, составляющих субстрат формирования тревожного поведения, в состав которых входит и первичная соматосенсорная кора. У НА-крыс площадь базолатеральной группировки и площадь первичной соматосенсорной коры больше, чем у ПА-крыс, что можно предположительно объяснить увеличением в их составе представительства тормозных интернейронов, однако, это предположение должно быть выяснено в дальнейших исследованиях.

Базолатеральная группировка структур МТ появляется в филогенезе позвоночных как надстройка над кортико-медиальной группировкой. Ее развитие происходит параллельно с эволюцией новой коры, и этот процесс находит отражение в

особенностях ее нейронной организации. Она связана со структурами кортико-медиальной группировки и центрами конечного мозга. Известно, что эфферентные волокна от базолатерального и латерального ядер следуют к базальным ганглиям, в гиппокампулярную формацию, к различным областям неокортекса, включая поля фронтальной коры [1].

Итак, при проведенном структурно-количественном анализе МТ и первичной сенсомоторной коры у ПА- и НА-крыс было выявлено наличие асимметрии МТ у НА-крыс, предопределенной различием удельной площади базолатеральной группировки. У ПА-крыс асимметрия МТ отсутствовала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акмаев И.Г. и Калимуллина Л.Б. Миндалевидный комплекс мозга: функциональная морфология и нейроэндокринология. М., Наука, 1993.
2. Ахмадеев А.В. Экспериментальные подходы к исследованию роли генотипа по локусу Taq 1A дофаминового D₂ рецептора в наркотической зависимости. Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова, 2010, т.96, № 5, с. 513–520.
3. Ахмадеев А.В. и Калимуллина Л.Б. Древняя амигдала: цитоархитектоника, организация и цитологические характеристики нейронов. Морфология, 2004, т. 126, вып. 5, с. 15–19.
4. Ахмадеев А.В. и Калимуллина Л.Б. Исследование факторов предрасположенности к алкоголизму: сравнительный анализ поведенческих реакций и системы биогенных аминов у предпочитающих и не предпочитающих алкоголь крыс. Успехи соврем. естествознания, 2013, № 1, с. 15–20.
5. Борисова Е.В., Русаков Д.Ю. и Судаков С.К. Различия характеристик опиатных и катехоламинергических рецепторов стриатума и коры головного мозга крыс линий Fischer-344 и Wag/Gsto могут обуславливать различия в положительно-подкрепляющем действии морфина. Бюл. экспер. биол., 1992, № 9, с. 296–298.
6. Ещенко Н.Д. Биохимия психических и нервных заболеваний. СПб., Издательский дом Санкт-Петербургск. ун-та, 2004.
7. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. Л., Медицина, 1969.
8. Патент РФ № 2438193. Способ приготовления переживающих срезов пириформной доли мозга. А.В.Ахмадеев и Л.Б.Калимуллина. Заявка № 2007149137 от 25.12.2007 г. БИ, 2011, № 36, с. 215–220.
9. Bertolino A., Fazio L., Caforio G. et al. Functional variants of the dopamine receptor D2 gene modulate prefronto-striatal phenotypes in schizophrenia. Brain, 2009, v. 132, № 2, p. 417–425.
10. Goncalves-Pereira P.M., Oliveira E. and Insausti R. Quantitative volumetric analysis of the hippocampus, amygdala and entorhinal cortex: normative database for the adult Portuguese population. Rev. Neurol., 2006, v. 42, № 12, p. 713–722.

11. Jocham G., Klein T.A., Neumann J. et al. Dopamine DRD2 polymorphism alters reversal learning and associated neural activity. *J. Neurosci.*, 2009, v. 29, № 12, p. 3695–3704.
12. Makris N., Gasic G.P., Seidman L.J. et al. Decreased absolute amygdala volume in cocaine addicts. *Neuron*, 2004, v. 44, № 4, p. 729–740.
13. Oliveira A.R., Reimer A.E., de Macedo C.E. et al. Conditioned fear is modulated by D2 receptor pathway connecting the ventral tegmental area and basolateral amygdala. *Neurobiol. Learn Mem.*, 2011, v. 95, № 1, p. 37–45.
14. Paxinos G. and Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney, Academic., 1998.
15. Pinard C.R., Muller J.F., Mascagni F. and McDonald A.J. Dopaminergic innervation of interneurons in the rat basolateral amygdala. *Neuroscience*, 2008, v. 157, № 4, p. 850–863.
16. Usiello A., Baik J.H., Roug-Pont F. et al. Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature*, 2000, v. 408, № 6809, p. 199–203.
17. Yang R.J., Mozhui K., Karlsson R.M. et al. Variation in mouse basolateral amygdala volume is associated with differences in stress reactivity and fear learning. *Neuropsychopharmacology*, 2008, v. 33, № 11, p. 2595–2604.
18. Zhang Y., Bertolino A., Fazio L. et al. Polymorphisms in human dopamine D2 receptor gene affect gene expression, splicing, and neuronal activity during working memory. *J. List Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, v. 104, № 51, p. 349–378.

Поступила в редакцию 20.03.2013
Получена после доработки 06.11.2013

STRUCTURAL AND QUANTITATIVE CHARACTERISTICS OF THE AMYGDALA AND PRIMARY SOMATOSENSORY CORTEX OF ALCOHOL-PREFERRING AND ALCOHOL NON-PREFERRING RATS

A.V.Akhmadeyev, A.M.Fyodorova and L.B.Kalimullina

The aim of the study was the structural and planimetric characteristics of the nuclei and intermediate formations of corticomedial and basolateral groups of structures of the amygdala and the primary somatosensory cortex in 10 alcohol-preferring (AP) and 10 alcohol non-preferring (ANP) rats, as well as demonstration of the differences in concentration of dopamine and its metabolite — 3,4 dihydroxyphenylacetic acid (DOPAK) in the amygdala. Measurements of absolute and specific areas of the structures studied were conducted on the cytoarchitectonic slides stained using Nissl cresyl violet method. No differences in the specific area of corticomedial and basolateral amygdala groups of structures were detected between two groups of rats studied. In ANP rats higher specific areas of the primary somatosensory cortex and of the amygdala in the left hemisphere were found, predetermined by the larger sizes of basolateral group. Analysis of DOPAK concentration in the amygdala revealed it in nearly equal quantities in AP and ANP rats, while, concentration of dopamine was significantly greater in AP rats. DOPAK/dopamine ratio was twice greater in AP rats which is indicative of dopamine accelerated metabolism.

Key words: *amygdala, morphometric parameters, predisposition to alcoholism, dopamine*

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