

УЧАСТИЕ БАЗОЛАТЕРАЛЬНЫХ ОТДЕЛОВ МИНДАЛИНЫ МОЗГА В МЕХАНИЗМАХ УСТОЙЧИВОСТИ КРЫС К ЭМОЦИОНАЛЬНОМУ СТРЕССУ: РОЛЬ ОЛИГОПЕПТИДОВ

© 2019 г. Е. В. Коплик¹, А. А. Бахмет², Л. А. Ключева², *, С. В. Ключкова²

¹ФГБУ НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН, Москва, Россия

²Кафедра анатомии человека ФGAOУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

Поступила в редакцию 06.07.2018 г.

После доработки 02.10.2018 г.

Принята к публикации 26.10.2018 г.

С целью изучения роли структур латеральной миндалины мозга в пептидергических механизмах устойчивости крыс к стрессу определили содержание бета-эндорфина и вещества П в крови и гипоталамусе крыс, устойчивых и неустойчивых к стрессовому воздействию, в условиях эмоционального стресса на фоне функционального выключения базолатеральных отделов миндалины мозга методом анодической поляризации. Эмоциональный стресс моделировали путем иммобилизации крыс в тесном домике с дополнительным аperiодическим электрокожным раздражением. Определили, что латеральные области миндалины принимают значительное участие в механизме устойчивости крыс к стрессу. Их двухстороннее выключение снижает устойчивость к стрессу. Также в эксперименте выявлены реципроктные отношения в содержании пептидов (вещества П и бета-эндорфинов) в гипоталамусе и плазме крови, как у устойчивых и у неустойчивых к стрессу особей. Таким образом, пептидергические механизмы устойчивости к стрессу связаны с функцией миндалевидного тела.

Ключевые слова: поведенческая активность, латеральная миндалина, бета-эндорфин, вещество П, эмоциональный стресс, устойчивость к стрессу

DOI: 10.1134/S1027813319020043

ВВЕДЕНИЕ

Предшествующие исследования [1–4] показали, что в однотипных экспериментальных конфликтных ситуациях отчетливо выявляются животные устойчивые и предрасположенные к эмоциональному стрессу. Установлена различная генетическая и индивидуальная устойчивость различных функциональных систем животных к однотипному эмоциональному стрессу, а также принципиальная возможность модулируемости стресс-реакции [5]. Однако центральные механизмы формирования устойчивости организма к стрессорному воздействию во многих отношениях все еще остаются не изученными. В последние годы все больший интерес вызывает изучение участия эндогенных олигопептидов в нейрохимических механизмах отрицательных эмоциональных состояний. В работах [2, 6, 7] показано, что синтезирующиеся в мозгу эндогенные пептиды: субстанция П, и бета-эндорфин могут быть факторами, определяющими устойчивость организма к эмоциональному стрессу.

Исходя из этого, целью настоящей работы мы определили изучение роли структур латеральной миндалины мозга в пептидергических механизмах устойчивости к стрессу крыс Вистар. С этой целью был проведен сравнительный анализ содержания указанных эндогенных пептидов в гипоталамусе и плазме крови у крыс Вистар с различной прогностической устойчивостью к эмоциональному стрессу до и после выключения латеральной миндалины мозга.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная работа проведена на крысах-самцах Вистар в весенне-летний период. При работе с животными руководствовались “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”, утвержденными на заседании этической комиссии НИИ нормальной физиологии имени П.К. Анохина РАМН (протокол № 1, 3 сентября 2009 г.), требованиями Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных. Документация по исследованию рассмотрена на заседании Локального Коми-

* Адресат для корреспонденции: 125009 Россия, Москва, ул. Моховая, д. 11, стр. 10; e-mail: moloko1978@gmail.com.

тата по этике (протокол № 02-17 от 15.03.2017). Эксперименты проведены на 158 крысах-самцах Вистар с массой тела 250–300 г. Предварительное тестирование животных по поведенческим реакциям в тесте “Открытое поле” с помощью специальной компьютерной программы [1] позволило выделить 2 группы крыс: высоко активные (ВА) – 80 особей (прогностически устойчивые к стрессу с индексом активности ИА 2.25–5.8) и низко активные (НА) – 78 особей (прогностически предрасположенные к стрессу с ИА 0.25–0.79) [1]. ВА и НА крыс разделили на группы: 1 – контрольная (ложная операция); 2 – стрессовое воздействие; 3 – двухстороннее функциональное выключение методом анодической поляризации базолатеральной миндалины; 4 – двухстороннее выключение базолатеральной миндалины в сочетании со стрессовым воздействием (по 10 особей в каждой группе). В качестве модели острого эмоционального стресса применяли одночасовую иммобилизацию крыс в плексигласовом пенале с раздражением области спинки животного по стохастической схеме пороговыми значениями переменного тока, напряжением 4–6 В, частотой 50 Гц, длительностью импульса 1 мс продолжительность каждой стимуляции составляла 30 с или 1 мин.

Функциональное выключение латеральных отделов миндалины (ЛМ) проводили под внутривенным наркозом (раствор хлоралгидрата, 4 мг/100 г массы тела) методом анодической поляризации. Электроды вживлялись согласно координатам стереотаксического атласа мозга крыс. Индифферентный электрод помещали на спинку животного. Для выключения миндалины использовали ток 50 мкА в течение 30 с. Область выключения захватывала латеральное ядро миндалины, латеральную часть базального ядра миндалины и наружную капсулу [8–10].

Крыс брали в эксперимент на третьи сутки после двухстороннего выключения миндалины. После эксперимента опытных крыс декапитировали одновременно с крысами контрольной группы. Контрольной группой служили ложно оперированные крысы, которым проводилось только вживление электрода без использования тока. С результатами предварительного поведенческого тестирования сопоставляли с данными радиоиммунологического исследования содержания олигопептидов в крови и гипоталамусе у животных. У всех крыс определяли весовые показатели органов стресс-маркеров (надпочечников и тимуса) [6]. У всех крыс проводили забор крови, быстро извлекали мозг, выделяли гипоталамус и немедленно замораживали в жидком азоте для последующего определения вещества П (ВП) и бета-эндорфина (БЭ). Кровь центрифугировали в присутствии ЭДТА и получали плазму. Определение ВП и БЭ-ой иммунореактивности в пробах гипоталамуса и плазме проводили радиоиммунологически-

ми исследованиями с использованием стандартных наборов фирмы Amerchair T. Концентрации определяемых веществ рассчитывали методом преобразований. Анализ результатов проведен непараметрическим методом Mann–Whitney U-тест.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование изменения относительной массы органов-маркеров стресса у крыс с разными параметрами поведения в тесте “Открытое поле” после стрессорных нагрузок дополняют сведения о наличии индивидуальных особенностей периферических и центральных механизмов реализации стрессорного ответа у млекопитающих. Это иллюстрирует важность индивидуального подхода к анализу системной организации физиологических функций как в нормальных условиях, так и при отрицательных эмоциогенных воздействиях [11].

У ВА крыс контрольной группы вес органов стресс маркеров: надпочечников в среднем составлял 17 ± 3.4 мг/100 г веса, а тимуса 102 ± 21.4 мг/100 г веса. После стрессового воздействия вес надпочечников достоверно не изменялся, а тимуса – увеличивался по сравнению с контрольной группой ВА крыс в 2.55 раза (табл. 1). На 3 сут после выключения ЛМ у ВА крыс вес надпочечников составлял 15.4 ± 1.3 мг/100 г веса, а тимуса 85.6 ± 14 мг/100 г веса, достоверных отличий от контрольной группы не выявлено (табл. 1). В условиях эмоционального стресса в группе ВА животных с двухсторонним выключением ЛМ из 10 взятых в эксперимент погибли 2 крысы. Достоверных изменений веса надпочечников и тимуса у животных этой группы по сравнению с не стрессированными крысами с выключением латеральной миндалины не отмечено. При этом отмечается достоверное уменьшение весового показателя тимуса по сравнению с контрольной группой крыс в 1.76 раза (табл. 1).

У НА крыс контрольной группы после декапитации вес надпочечников в среднем составлял 19 ± 4.6 мг/100 г веса, а тимуса 75 ± 17.4 мг/100 г веса (табл. 1). В условиях эмоционального стресса в группе животных с двухсторонним выключением ЛМ из 10 НА крыс, взятых в эксперимент, погибли 4 крысы. Достоверных изменений веса надпочечников у животных этой группы по сравнению с не стрессированными крысами с выключением ЛМ не отмечено. При этом в 1.98 уменьшается весовой показатель тимуса по сравнению с контрольной группой крыс.

Таким образом, результаты проведенной работы свидетельствуют о том, что выключение ЛМ вызывает существенное снижение устойчивости животных к эмоциональному стрессу. При этом наблюдается снижение выживаемости животных

Таблица 1. Вес надпочечников и тимуса в контроле и в условиях стресса на фоне двухстороннего выключения латеральной миндалины у ВА и НА крыс

Группа	Надпочечники	Тимус
Контроль		
ВА ($n = 10$)	17 ± 3.4	102 ± 21
НА ($n = 9$)	19 ± 4.6	75.3 ± 17.4
Стресс		
ВА ($n = 10$)	$17 \pm 3.4^*$	$40 \pm 5.8^*$
НА ($n = 13$)	$22 \pm 2.8^*$	$43.2 \pm 8.2^*$
Выключение латеральной миндалины		
ВА ($n = 10$)	15 ± 1.3	85.6 ± 13
НА ($n = 10$)	23.2 ± 3.6	$46.0 \pm 7.6^*$
Выключение латеральной миндалины + стресс		
ВА ($n = 10$)	$17 \pm 2.6^*$	$58 \pm 11.4^{*\#}$
НА ($n = 10$)	25 ± 2.3	$38 \pm 4.2^*$

* $p < 0.05$ по отношению к контролю, # $p < 0.05$ по отношению к животным с выключенными миндалевидными телами.

Таблица 2. Содержание вещества П в гипоталамусе (нмоль/г) и плазме крови (нг/мл) на фоне двухстороннего выключения латеральной миндалины у ВА и НА крыс

Группа	Гипоталамус	Плазма крови
Контроль		
ВА ($n = 10$)	231.6 ± 17.8	32.5 ± 5.7
НА ($n = 10$)	164.0 ± 8.2	24.3 ± 5.0
Стресс		
ВА ($n = 10$)	$170.6 \pm 13.3^*$	$17.5 \pm 3.2^*$
НА ($n = 9$)	140.2 ± 15.6	$11.1 \pm 3.4^*$
Выключение латеральной миндалины		
ВА ($n = 9$)	$808 \pm 90.4^*$	31.7 ± 8.3
НА ($n = 10$)	$442.5 \pm 58.9^*$	$46.0 \pm 7.6^*$
Выключение латеральной миндалины + стресс		
ВА ($n = 10$)	$540 \pm 20.1^{*\#}$	$53.3 \pm 8.3^{*\#}$
НА ($n = 9$)	$310 \pm 43.6^{*\#}$	$37.0 \pm 1.7^{*\#}$

* $p < 0.05$ по отношению к контролю, # $p < 0.05$ по отношению к животным с разрушенными структурами миндалины.

в условиях острого стресса и реакция органов стресс-маркеров (тимуса) на стрессорную нагрузку.

Выявлено также различное содержание указанных олигопептидов в крови и гипоталамусе ВА и НА крыс.

Содержание ВП в гипоталамусе в контрольной группе ВА крыс было в 1.41 раза выше по сравнению с НА крысами (табл. 2). Содержание БЭ в крови у ВА крыс контрольной группы меньше в 2.06 раза по сравнению с НА особями (табл. 3). В условиях острого эмоционального стресса у ВА крыс содержание ВП и БЭ в гипоталамусе снижалось в 1.56 и в 2.1 раза, а у НА крыс – в 1.17 и в 1.4 раза соответственно, по отношению к контролю. В плазме крови в условиях острого эмоцио-

нального стресса у ВА крыс содержание ВП и БЭ снижалось соответственно в 1.86 и в 4.01 раза, а у НА – в 2.19 и в 1.4 раза соответственно, по отношению к контролю. Функциональное выключение латеральной миндалины вызвало повышение исходного содержания ВП в гипоталамусе ВА крыс в 3.49 раза и снижение содержания БЭ в 2.46 раза по сравнению с контролем. В плазме крови ВА крыс в условиях двухстороннего выключения латеральной миндалины содержание ВП достоверно не изменялось, в то время как содержание БЭ было снижено в 4.55 раза по сравнению с контролем (табл. 2 и 3).

У НА крыс, выключение ЛМ приводило к повышению содержания в гипоталамусе ВП в 2.67 раза, а

Таблица 3. Содержание бета-эндорфина в гипоталамусе (нмоль/г) и плазме крови (нг/мл) на фоне двухстороннего выключения латеральной миндалины у ВА и НА крыс

Группа	Гипоталамус	Плазма крови
	Контроль	
ВА ($n = 10$)	622 ± 43.5	33.7 ± 7.4
НА ($n = 9$)	571.3 ± 33.2	69.3 ± 0.9
	Стресс	
ВА ($n = 10$)	295.4 ± 14.2*	8.4 ± 2.4*
НА ($n = 10$)	408 ± 22.8	49.5 ± 7.1
	Выключение латеральной миндалины	
ВА ($n = 9$)	252.5 ± 10.3*	16 ± 1.3*
НА ($n = 10$)	434 ± 15	25.9 ± 0.9*
	Выключение латеральной миндалины + стресс	
ВА ($n = 10$)	540 ± 20.1*#	53.3 ± 8.3*#
НА ($n = 9$)	292.5 ± 14.9*#	27.2 ± 1.2

* $p < 0.05$ по отношению к контролю, # $p < 0.05$ по отношению к животным с разрушенными структурами миндалины.

содержание БЭ снижалось в 1.32 раза по сравнению с контролем. БЭ в плазме крови у НА в условиях выключения миндалины снижался в 2.67 раза, в то время как уровень ВП при этом увеличивался в 1.89 раза (табл. 2 и 3). В условиях эмоционального стресса и двухстороннего выключения латеральной миндалины у ВА крыс при сравнении с нестрессированными ВА животными с выключением миндалины отмечено снижение содержания ВП и повышение уровня БЭ в гипоталамусе в 1.5 и 2.14 раза соответственно. В плазме крови у этих крыс в условиях стресса содержание ВП и БЭ увеличивалось в 3.82 и в 3.33 раза соответственно. У НА крыс с двухсторонним выключением ЛМ в условиях эмоционального стресса в гипоталамусе отмечали снижение содержания ВП и БЭ по сравнению с не стрессированными крысами в 1.43 и в 1.48 раза соответственно. Содержание БЭ и ВП в плазме крови у этой группы крыс в условиях эмоционального стресса на фоне выключения миндалины практически не изменялось.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Миндалевидный комплекс (миндалины) относится к лимбической системе мозга. Миндалины участвуют в различных интегративных механизмах мозга благодаря ее двусторонним связям с корой головного мозга. Она осуществляет фазное надгипоталамическое управление и оказывает тоническое влияние на нейросекреторные клетки гипоталамуса [7]. Благодаря двусторонним связям со стволовыми структурами мозга миндалины участвуют и в интеграции вегетативных функций. Т. Бэн [10] классифицировал амигдаларные ядра по их эффекторным связям на медиальную часть (куда входят базальное ядро, медиальное ядро

миндалины и кортикальное ядро), посылающую аксоны через супракомиссуральную часть конечной полоски к вентромедиальному гипоталамусу, и на латеральную часть (куда входят крупноклеточные части базального ядра и латерального ядра), посылающие аксоны в перегородку, латеральный гипоталамус и к обонятельным структурам. Латеральная часть миндалины является источником волокон преоптической компоненты конечной полоски, вентро-амигдало-фугального пути (продольного ассоциативного пучка) и компоненты передней комиссуры. Структуры височной доли, в том числе и миндалины, регулируют эмоциональное поведение и повышают эмоциональную реактивность. Миндалины и поясная извилина принимают участие в осуществлении сдерживающих влияний на стволовые механизмы агрессивных реакций [9]. Показано, что эмоциональные поведенческие реакции страха, ярости и внимания связаны с филогенетически более молодой базолатеральной частью миндалины. Однако реакции агрессии и защиты осуществляются только с участием гипоталамических структур (или опосредуются через них), поскольку после разрушения соответствующих областей гипоталамуса, эти реакции при раздражении миндалины не возникают [7, 8].

Проведенные нами исследования показали, что в условиях эмоционального стресса содержание ВП и БЭ в гипоталамусе и крови у ВА и НА крыс уменьшается, что вполне объяснимо учитывая их участие в регуляции возбуждения и сдерживании симпат-адреналовой составляющей стресс-реакции. [12]. Особенно резко снижается содержание БЭ в крови у ВА крыс (в 4.01 раза). По-видимому, у этих животных нейропептид ак-

тивно связывается с рецепторами, приводя к полезному приспособительному результату.

Выключение латеральной миндалины вызывает повышение содержания ВП в гипоталамусе крыс с различной устойчивостью к эмоциональному стрессу (ВА и НА крыс), причем наиболее это выражено у ВА крыс (в 3.49 раза). Кроме того, у ПС крыс выключение латеральной миндалины повышает содержание ВП в плазме крови в 1.89 раза. Содержание БЭ меняется иным образом — уменьшается у ВА и НА животных в гипоталамусе и плазме крови (особенно в крови у ВА крыс — в 4.55 раза).

В целом, согласно нашим данным, выключение латеральной миндалины вызывает изменение уровня содержания нейрпептидов, типичные для стрессового воздействия. По данным научной литературы психогенный стресс повышает содержание субстанции Р в ЦНС [13]. Эмоциональный стресс на фоне двухстороннего разрушения латеральной миндалины у ВА и НА крыс вызывает уменьшение содержания ВП в гипоталамусе соответственно 1.5 раза и в 1.43 раза, тогда как в условиях стресса без отключения ЛМ содержание ВП снижается менее значительно — в 1.36 и в 1.17 раз. В то же время содержание ВП в крови у ВА крыс резко увеличивается в 3.82 раза, а у НА крыс не изменяется (при стрессе содержание ВП в крови у ВА и НА крыс уменьшается). Содержание БЭ в гипоталамусе и плазме крови у ВА крыс значительно возрастает (соответственно, в 2.14 и в 3.33 раза), тогда как при стрессе без выключения ЛМ оно снижается. У НА крыс содержание БЭ снижается в гипоталамусе и не изменяется в плазме крови по сравнению с нестрессированными животными с функционально выключенной миндалиной (при стрессе содержание БЭ у НА снижается в крови и гипоталамусе).

Анализируя уровни содержания ВП и БЭ в гипоталамусе и плазме крови можно говорить о реципрокных отношениях: в отношении ВП это больше выражено у устойчивых к эмоциональному стрессу крыс (УС), а в отношении БЭ — у предрасположенных к эмоциональному стрессу (ПС). Латеральная миндалина вместе с задней цингулярной корой и конечной полоской составляют так называемую “тормозную систему, активация которой помогает в сдерживании стрессорных стимулов” [9, 12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что структуры латеральной области миндалины принимают значительное участие в механизме устойчивости животных к эмоциональному стрессу. Двухстороннее выключение этих структур мозга снижает устойчивость животных к

стрессорным воздействиям. Это проявляется изменением содержания олигопептидов в гипоталамусе и плазме крови, являющихся медиаторами стресс-лимитирующей системы, а также увеличением смертности животных в условиях острого стресса в сочетании с функциональным выключением латеральной миндалины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Коплик Е.В.* // Вестник новых медицинских технологий. 2002. Т. 9. С. 16–18.
2. *Судаков К.В.* Избранные труды. Т. 3. Эмоции и эмоциональный стресс. М.: НИИ нормальной физиологии, 2012. 534 с.
3. *Судаков К.В., Умрюхин П.Е.* Системные основы эмоционального стресса. М.: Гэотар-Медиа, 2010. 105 с.
4. *Strekalova T., Markova N., Shevtsova E., Zubareva O., Bakhmet A., Harry M., Steinbusch H.M., Bachurin S., Lesch K.P.* // *Neural Plasticity*. 2016. V. 2016. P. 5098591.
5. *Couch Y., Trofimov A., Markova N., Nicolenko V., Steinbusch H.W., Chechonin V., Schroeter C., Lesch K.R., Anthony D.C., Strekalova T.* // *J. Neuroinflammation*. 2016. V. 13. № 1. P. 108.
6. *Салиева Р.М., Яновский К., Ратсак Р., Трофимова Я.И.* // Журн. высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 1991. Т. 41. № 3. С. 558–563.
7. *Zhao Z., Yang Y., Walker D.L., Devis M.* // *Neuropsychopharmacology*. 2009. V. 34. P. 331–340.
8. *Ахмадеев И.Г., Калимуллина Л.Б.* // Успехи современного естествознания. 2007. № 11. С. 11–14.
9. *Ченурнов С.А., Ченурнова Н.Е.* Миндалевидный комплекс мозга. М.: МГУ, 1981. 254 с.
10. *Ban T.* // *Med. J. Osaco University*. 1964. V. 15. № 1. P. 1–83.
11. *Перцов С.С., Григорчук О.С., Коплик Е.В., Абрамова А.Ю., Чекмарева Н.Ю., Чехлов В.В.* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т. 160. № 7. С. 25–29.
12. *Кукушкин М.Л., Табеева Г.Р., Подчуфарова Е.В.* // Болевой синдром: клиника, патогенез, лечение. / Под ред. Яхно Н.Н. М.: ИМА-ПРЕСС, 2011. 72 с.
13. *Geraciotti T.D., Jr, Carpenter L.L., Owens M.J., Baker D.G., Ekhtator N.N., Horn P.S., Strawn J.R., Sanacora G., Kinkead B., Price L.H., Nemeroff C.B.* // *Am. J. Psychiatry*. 2006. V. 163. № 4. P. 637–643.

Involvement of the Basolateral Amygdala in Mechanisms of Rat Resistance to the Emotional Stress: the Role of Oligopeptides

E. V. Koplik^a, A. A. Bakhmet^b, L. A. Klyueva^b, and S. V. Klochkova^b

^a*Anokhin Institute of Normal Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^b*Department of Human Anatomy, Sechenov Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia*

Received July 6, 2018;

Revised October 2, 2018;

Accepted October 26, 2018

In order to study the role of the structures of the lateral amygdala in the peptidergic mechanisms of stress resistance of rats, we measured the level of beta-endorphin and substance P in the blood and hypothalamus of stress-resistant and stress-prone rats under conditions of emotional stress associated with functional shutdown of the basolateral parts of the amygdala by anodic polarization. Emotional stress was modeled by immobilizing rats in a confined cell with additional aperiodic electrodermal stimulation. We found that the lateral regions of the amygdala are strongly involved in the mechanism of resistance of rats to stress. Their two-way shutdown reduces stress resistance. The experiment also revealed reciprocal relations in the content of peptides (substance P and beta-endorphins) in the hypothalamus and blood plasma, both in resistant and non-resistant rats. Thus, peptidergic mechanisms of stress resistance are associated with the functioning of the amygdala.

Keywords: behavioral activity, lateral amygdala, beta-endorphin, substance P, emotional stress, resistance to stress