

УДК 611.813.14.018: 599.323.4

## ЛОКАЛИЗАЦИЯ CART-ПЕПТИД СОДЕРЖАЩИХ НЕЙРОНОВ В МИНДАЛЕВИДНОМ КОМПЛЕКСЕ МОЗГА КРЫСЫ

Ахмадеев А.В.

*Башкирский государственный университет, г.Уфа*

**Дана характеристика локализации и цитологических особенностей CART-пептидсодержащих нейронов, выявленных на территории кортико-медиальной группировки миндалевидного комплекса мозга.**

CART (cocaine-amphetamine-regulated transcript) пептид впервые был открыт в одном из базальных ядер мозга (striatum) крысы путем выявления его м-РНК после введения кокаина и амфетамина в остром опыте [6]. В последующем многочисленными исследованиями было показано, что этот белок синтезируется и в других структурах мезо-кортико-лимбической системы мозга, нарушения деятельности которых составляют основу механизмов развития наркотической зависимости. Показано, что CART – пептид играет роль в развитии анксиогенных реакций при употреблении наркотиков [4], участвует в формировании наркотической зависимости. При этом он изменяет нейроэндокринные взаимосвязи, определяющие регуляцию пищевого и полового поведения, механизмы энергетического гомеостаза [5, 8, 10, 11, 13].

Миндалевидный комплекс мозга (МК) является нейроэндокринным центром, который играет важную роль в организации пищевого, полового и агрессивного оборонительного поведения т.е. тех его форм, формирование отклонений в которых весьма характерно для клиники наркомании. Выяснение вопроса - вовлечены ли МК в механизмы развития наркотической зависимости актуально и для разработки перспективных методов лечения, основанных на интраназальном пути введения лекарственных веществ.

Цель данной работы – охарактеризовать локализацию и цитологические особенности CART - позитивных нейронов, впервые выявленных на территории МК в ходе инспекционного исследования его структур.

Исследования проведены на белых половозрелых крысах линии Вистар обоего пола (общее количество 21), выращенных в стандартных условиях вивария. Стадии эстрального цикла определяли по цитологической картине влагалищных мазков. Иммуноцитохимическое выявление CART-пептида проводили на приготовленных в криостате, фронтальных срезах мозга толщиной 30 микрон, после перфузии его 1М фосфатным буфером (рН=7,4) и 4% раствором параформальдегида на 0,1 М фосфатном буфере. Реакцию проводили на свободно плавающих срезах одновременно для всех групп животных. После уда-

ления эндогенной пероксидазы и выдерживания срезов в блокирующем растворе, срезы инкубировали в растворе первичных антител, содержащих поликлональные rabbit-anti-CART (55-102) антитела (H-003-62, Phoenix Pharm., Incorp, Belmont, CA, США), разведенные 1: 8000 в течение 48 часов. После промывания, срезы инкубировали во вторичных goat-anti-rabbit антителах, конъюгированных с авеидиновым комплексом (ABC-kit 689321, ICN Biomedicals Inc., США). Затем их помещали на 2 часа в пероксидаза-антипероксидазный комплекс, конъюгированный со стрептовидином (ABC-kit 689321, ICN Biomedicals Inc., США). Далее срезы промывали и синхронно от всех групп животных помещали в 0,05% раствор диаминобензидина (DAB, Sigma, США) с 0,015% перекисью водорода, разведенные на фосфатном буфере. Срезы натягивали на стекла с полилизинным покрытием, высушивали, и заключали под покровное стекло с помощью канадского бальзама.

Идентификацию структур МК проводили в срезах, окрашенных по Нисслю, на основании критериев, разработанных для высокоинформативных срезов этого образования мозга [1]. Препараты изучали с помощью триокулярного светового микроскопа серии MC-300 (Австрия), пользуясь объективами 10 и 40. Микрофото получали с использованием цифрового фотоаппарата Nikon CoolPix 4500.

В состав МК входит большое число ядерных, палеокортикальных, межзоточных формаций и переходных зон, которые формируют две крупные функционально различные группировки – кортикомедиальную и базолатеральную. Анализ локализации содержащих CART- пептид нейронов показал, что они находятся в ряде структур (как у самцов, так и у самок крыс), входящих в состав только кортикомедиальной группировки.

Структурами МК, содержащими CART- пептид – позитивные нейроны, являются центральное, дорсомедиальное, заднее медиальное и заднее кортикальное ядра. При этом территория указанных ядер за счет иммуноцитохимической реакции не только в нейронах, но и в нейропиле, четко дифференцируется от прилежащих структур МК.

В центральном ядре CART- пептид- позитивные нейроны входят в состав его субъядер – медиального (Cem), латерального (Cel) и латеро-капсулярного (Celc).

В Cem CART- пептид выявляется в нейронах среднего и крупного размера, обладающих грушевидной и полигональной формой, определяя их окрашивание в коричневый цвет. Нейроны содержат различные количества иммунопозитивного осадка в цитоплазме, начальных сегментах первичных дендритов и в аксонах, при этом последние имеют варикозные расширения. Клеточное ядро на фоне выявленного в цитоплазме CART – пептида выглядит светлым, в некоторых ядрах определяется иммунопозитивное ядрышко. Определяется большая концентрация CART - иммунореактивных нейронов в вентральных зонах этого субъядра.

Нейроны Cel, содержащие CART – пептид, обладают средними по размеру телами и концентрируются в дорсальных и вентральных частях этого субъядра, при этом в центральных зонах выявляются лишь отдельные, дисперсно расположенные CART – пептид-позитивные нейроны со слабой иммунореактивностью.

В Celc выявляется наибольшая по сравнению с другими субъядрами концентрация CART-пептид-иммунопозитивных нейронов. Эти нейроны обладают полиморфизмом как по своим размерам, форме тел, а также по интенсивности содержания иммунореактивного осадка, определяющего окрашивание тел нейронов в коричневый цвет. В этом субъядре, в отличие от других субъядер центрального ядра, более интенсивно выявляется иммунореактивный осадок в нейропиле, в котором прослеживаются варикозные расширения аксонов приходящих афферентов.

В дорсомедиальном ядре нейроны малого и среднего размера с округлой формой тела, экспрессирующие CART – пептид, располагаются равномерно на всей его территории, формируя сеть с умеренно выраженной иммунореактивностью. На фоне нежной сети иммунореактивных нейронов этого ядра хорошо выделяются группы крупных нейронов с угловатыми телами, содержащие большое количество иммунореактивного осадка в виде мелкозернистых скоплений в перикарионе. Осадок выявляется не только в телах нейронов, но и в отходящих от них толстых первичных дендритах. Крупные нейроны с позитивной иммунореактивностью располагаются на вентральном полюсе ядра и в его латеральных зонах. В отдельных нейронах CART – пептид определяется в проксимальной части дендритов, а также в аксонах. При этом в аксонах выявляются варикозные расширения.

В заднем медиальном ядре морфология, содержащих CART-пептид нейронов различна. Он выявляется в нейронах среднего и крупного размера равномерно распределенных по территории ядра, форма тел которых может вариировать от овальных до конусовидных и полигональных, при этом в последних

часто определяется иммунореактивный осадок в начальных сегментах дендритов. Число выявляющихся дендритов в крупных полигональных нейронах – от трех до пяти. Интенсивность выявленного осадка различна – в одних нейронах осадка много и он экранирует клеточное ядро, в других – меньше, на фоне окрашенной цитоплазмы определяется светлое ядро.

Заднее кортикальное ядро содержит медиальную и латеральную части, при этом большая часть нейронов, дающих положительную реакцию на изучаемый пептид, локализуется в латеральной части ядра. Высокая интенсивность выявления CART-пептида отмечается в поверхностной зоне медиальной части заднего кортикального ядра, которая, как известно, содержит приходящие аксоны из добавочной обонятельной луковицы. Размеры иммунопозитивных нейронов варьируют от мелких до крупных. Они имеют разнообразную форму тел (овальные, веретеновидные и полигональные) и разную интенсивность выявляющегося иммунореактивного осадка. Содержащие CART-пептид нейроны располагаются не равномерно, а формируют небольшие скопления от двух - трех до десяти клеток. Кроме тел, CART-пептид определяется в дендритах, реже аксонах. В латеральной части заднего кортикального ядра, кроме поверхностной зоны, CART-пептид выявляется в группах нейронов поверхностно-клеточной и глубокой зон.

МК, входящий в состав мезо-кортико-лимбической системы мозга, претендует на роль ключевой структуры в функциональной системе наркозависимости. Это положение можно обосновать следующим: 1) МК является важной структурой мозга в организации адаптивного, включая и социальное, поведения [1]; 2) все клинические симптомы наркозависимости (негативные сдвиги в эмоциональном статусе, деградация личности, нарушение пищевого и питьевого поведения, дисфункция гормональной системы, ослабление иммунитета, энергетического обмена) представляют собой нейропсихологический синдром, обусловленный поражением МК [2]; 3) нейропсихологический синдром имеет сложную морфофизиологическую основу в виде многокомпонентной функциональной системы внутри МК, что диктует необходимость детального анализа механизмов его вовлечения в патогенез наркомании. Важность исследований МК в аспекте проблем наркомании продиктована и перспективными возможностями использования этих знаний для разработки качественно новых стратегий в лечении наркозависимости.

Исследование экспрессии CART-пептида на всей территории кортикомедиальной и базолатеральной группировок МК позволило выявить его в нейронах дорсомедиального, заднего медиального, заднего кортикального и центрального ядер. Эти данные позволяют предполагать, что указанный комплекс структур МК вовлечен в патогенетические механизмы развития наркотической зависимости и должен

быть в центре внимания при разработке перспективных методов ее коррекции.

Центральное ядро является важным интегративным центром МК, связь которого с другими образованиями лимбической системы осуществляется через его латеро-капсулярное субъядро. Также известно, что дорсомедиальное и заднее кортикальное ядра МК имеют прямые связи с рецепторными и проводниковыми центрами обонятельного анализатора [1], что может быть использовано для интраназального - неинвазивного и быстрого введения лекарственных веществ. Показано, что аппликация WGA, конъюгированного с пероксидазой хрена (WGA-HR), на обонятельный эпителий приводит к аксональному транспорту этого комплекса в ядерные и экранные структуры МК [9]. Интраназальный путь может быть использован для введения в мозг отдельных генов при помощи вирусных векторов-носителей [7, 12]. Данный подход позволяет осуществлять эффективную генную терапию, приводя к синтезу в отдельных областях мозга белков, недостаток которых вызвал патологию. Интраназальный путь введения новых генов в ЦНС является наиболее перспективным.

Выраженная иммунореактивность нейропилей структур МК, содержащих CART-позитивные нейроны, позволяет предположить, что кроме синтеза этого пептида *in situ*, он может поступать в МК по аксонам нейронов обонятельных луковиц, в которых обнаружены экспрессирующие CART-пептид нейроны [3, 10].

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента РФ – МК-865.2008.4

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Акмаев И.Г., Калимуллина Л.Б. Миндалевидный комплекс мозга: функциональная морфология и нейроэндокринология. М., 1993.
2. Холмская Е.Д. Нейропсихология. М., Питер, 2006.
3. Coucevro P.R., Koyle E.O., Kuhar M.J. // *J Chem Neuroanat.*, 1997, V. 12, № 4, p. 229.
4. Dandekar M., Singru P., Kokare D. et al. // *Neuropsychopharmacol.*, 2007, V.32, № 4, p. 546.
5. Dominguez G., Lakatos A., Kuhar M. // *J. Neurochem.*, 2002, V. 80, №.5. p.885.
6. Douglass J., McKinzie A., Couceyro P. // *J Neurosci.*, 1995, V.15, N.3, p.2471.
7. Draghia R., Caillaud C., Manicom R. et al. // *Gene Ther.*, 1995, V.2., № 7, p.418.
8. Hunter R.G., Lim M.M., Philpot K.B. et al. // *Brain Res.*, 2005, V.1048, № 1-2, p.12.
9. Itaya S.K. // *Brain Res.*, 1987, V.409, № 7, p.205.
10. Roubos E., Lazar G., Barendregt H. // *J Comp Neurol.*, 2008, V.507, N.4, p.1622.
11. Sen A., Lv L., Bello N. // *Mol. Endocrinol.*, 2008, V.148, N.9, P.4400.
12. Williams M.A., Turchan J., Lu Y. et al. // *Exp. Brain Res.*, 2005, V.165, № 9, p.383.
13. Xu Y, Zhang W., Klaus J et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, V.103, N.39, p.14489.

### LOCALIZATION OF CART-PEPTIDE CONTAINING NEURONS IN RAT'S AMYGDALA”

Akhmadeev A.V.

In this article presented characteristic and cytological peculiarities of CART-peptide containing neurons, which was revealed on the territory of cortico-medial group of Amygdala.