

© А. В. Ахмадеев, Л. Б. Калимуллина, А. А. Нурутдинов, Е. Н. Елизарьева, 2018
УДК 611.813.8.018:616.831-005.1:599.323.4

А. В. Ахмадеев, Л. Б. Калимуллина, А. А. Нурутдинов, Е. Н. Елизарьева

ХАРАКТЕРИСТИКА CART-ПЕПТИД-ИММУНОПОЗИТИВНЫХ КЛЕТОК СУБВЕНТРИКУЛЯРНОЙ ЗОНЫ МОЗГА

Кафедра безопасности жизнедеятельности и охраны окружающей среды (зав. — проф. Ю. А. Янбаев),
ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», г. Уфа

Цель — исследовать цитоархитектуру, нейронную организацию и распределение CART-пептид-иммунопозитивных клеток в субвентрикулярной зоне головного мозга.

Материал и методы. Исследование проведено на фронтальных срезах головного мозга крысы (n=18) с помощью методов Ниссля, Гольджи и иммуногистохимического метода с антителами к CART (55–102). Препараты анализировали с применением световой микроскопии.

Результаты. Иммунопозитивные к CART-пептиду клетки выявлены в субвентрикулярной зоне нижнего рога бокового желудочка в составе палеоамигдалы. Они имеют округло-овальные тела, один или два коротких отростка и по своей нейронной организации являются нейробластоморфными нейронами.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о том, что клетки субвентрикулярной зоны палеоамигдалы экспрессируют CART-пептид в норме. Это предопределяет высокую эффективность нейрорегенеративной терапии, проводимой с его использованием.

Ключевые слова: палеоамигдала, миндалевидное тело мозга, CART-пептид, нейрорегенерация, ишемический инсульт

Открытый в нейронах стриатума CART (cocaine-amphetamine-regulated transcript)-пептид изучали для выяснения его участия в патогенезе наркомании [1]. Однако он широко распространен в центральной, периферической и автономной нервной системе позвоночных и вовлечен в обеспечение разнообразных функций [2].

Большой интерес вызвало сообщение Y. Luo и соавт. [5] о влиянии этого пептида на регенераторные процессы в нервной ткани. Авторы с помощью комплекса методов показали, что неинвазивное интраназальное введение CART-пептида взрослым крысам, у которых экспериментально, путем окклюзии средней мозговой артерии был создан очаг инсульта, усиливало пролиферацию эндогенных нейрональных прогениторных клеток субвентрикулярной зоны боковых желудочков. CART-пептид также способствовал их миграции к очагу ишемического инсульта, следствием чего являлась реиннервация очага деструкции коры большого мозга.

Между тем, способны ли нейрональные прогениторные клетки субвентрикулярной зоны в норме экспрессировать этот пептид, остается неизвестным. Выяснение этого вопроса явилось целью данного исследования.

Материал и методы. Исследования субвентрикулярной зоны нижнего рога бокового желудочка, входящего в состав заднего отдела миндалевидного тела крысы, про-

ведены на 18 белых половозрелых крысах-самках линии Вистар (головной мозг 3 крыс использован для изучения цитоархитектуры, 6 крыс — для выявления CART-пептида, 9 — для его обработки по методу Гольджи). Эвтаназию проводили с соблюдением правил гуманного обращения с экспериментальными животными, изложенных в Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123) от 18 октября 2006 г. Цитоархитектуру исследуемой области изучали на фронтальных парафиновых срезах толщиной 20 мкм, окрашенных по методу Ниссля крезиловым фиолетовым. Иммуногистохимическое выявление CART-пептида проводили на приготовленных в криостате (Leica, Германия) фронтальных срезах мозга толщиной 30 мкм после перфузии его 1 М фосфатным буфером (PBS, pH 7,4) и 4% раствором параформальдегида на 0,1 М PBS. После декапитации мозг был дополнительно фиксирован в том же фиксаторе в течение 4 ч при температуре 4 °С, затем его промывали в нескольких порциях 0,9% NaCl на 0,02 М PBS (pH 7,4) и с целью криопротекции помещали в 30% раствор сахарозы на 0,02 М PBS при 4 °С до полного погружения. До помещения срезов в 0,3% раствор перекиси водорода (для удаления эндогенной пероксидазы) они были промыты PBS и 0,1% Tween на 0,2 М PBS (Tween-20; Ferak, Германия). Затем в течение 1 ч срезы выдерживали в блокирующем растворе, который содержал 3% бычий сывороточный альбумин (BSA; Sigma, США) и 1% козий альбумин (GSA; Sigma, США), приготовленные на 0,1% Tween на 0,2 М PBS. После этого срезы инкубировали в растворе первичных поликлональных кроличьих антител к CART (55–102) (H-003–62, Phoenix Pharm., Incorp, Belmont, CA, США), разведенном 1: 8000 на 1% BSA при 4 °С в течение 48 ч. Далее срезы промывали при комнатной температуре в трех порциях PBS с Tween по 20 мин и в тече-

Сведения об авторах:

Ахмадеев Азат Валерьевич, Калимуллина Лилия Барыевна, Нурутдинов Азамат Анварович, Елизарьева Елена Николаевна (e-mail: mpha@ufanet.ru), кафедра безопасности жизнедеятельности и охраны окружающей среды, ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», 450074, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32

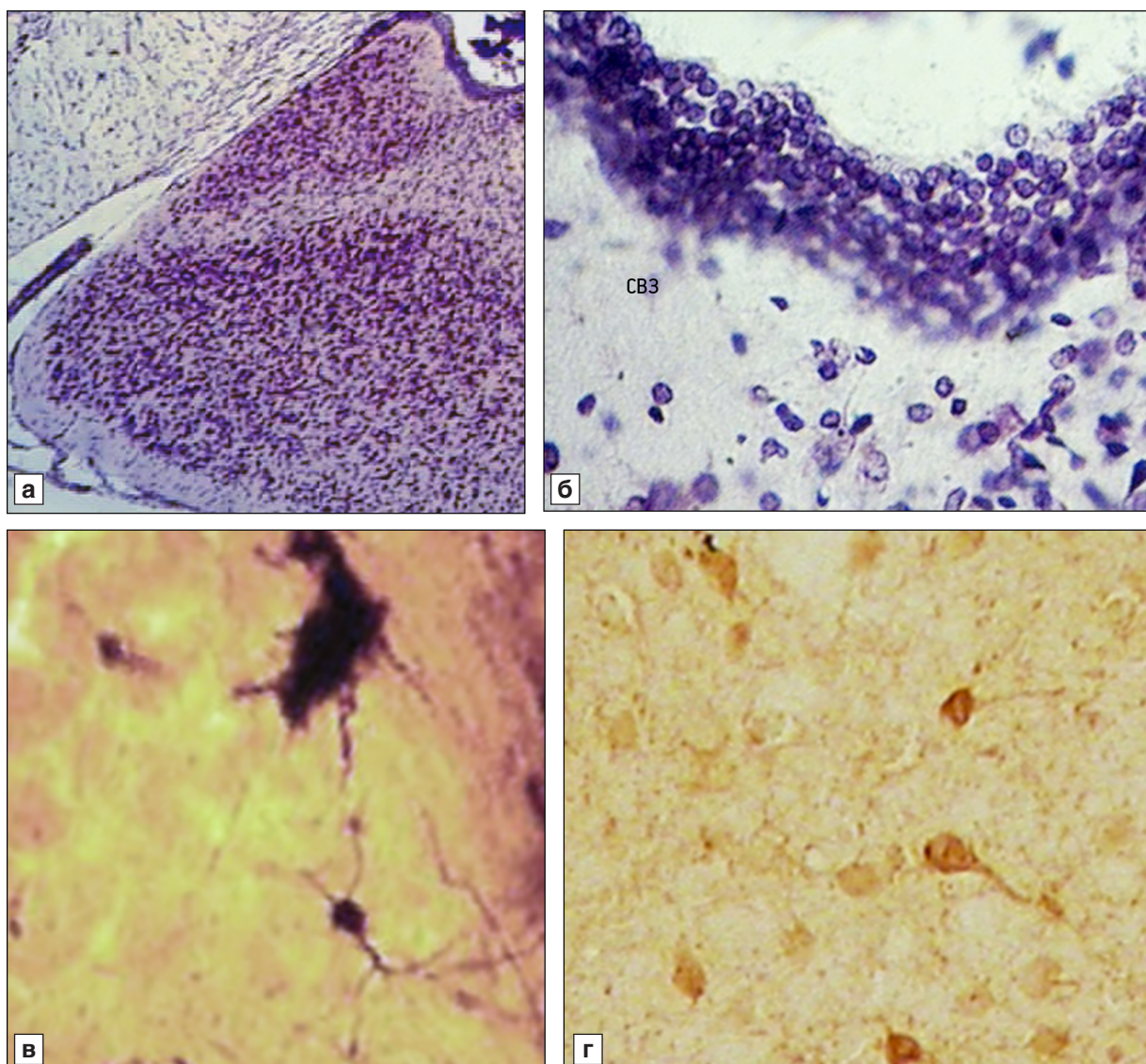
ние 2 ч инкубировали во вторичных антителах, конъюгированных с авеидиновым комплексом (ABC-kit 689321, ICN Biomedicals Inc., США). После промывания срезов в трех порциях PBS с Tween их помещали на 2 ч в пероксидаз-антипероксидазный комплекс, конъюгированный со стрептовидином (ABC-kit 689321, ICN Biomedicals Inc., США). Затем срезы промывали в 3 порциях PBS по 15 мин и помещали на 10 мин в 0,05% раствор диаминобензидина (DAB, Sigma, США) с 0,015% перекисью водорода, разведенной на PBS. Вновь срезы промывали в нескольких порциях PBS, помещали на стекла SuperFrost/plus (MENZEL-GLAZER, Германия) и высушивали при комнатной температуре. После обработки в трех порциях 96° этанола и трех порциях ксилола срезы заключали под покровное стекло с помощью канадского бальзама.

Для характеристики тел и отростков клеток субвентрикулярной зоны были использованы фронтальные срезы мозга толщиной 100 мкм, обработанные по методу Гольджи. Мозг после фиксации в жидкости Мюллера и дополнительной

фиксации в смеси двуххромовокислого калия и четырехокиси осмия выдерживали в 1% растворе нитрата серебра 10 сут в термостате, после чего обезвоживали в нескольких порциях этанола возрастающей концентрации и заливали в целлоидин.

Микрофотографии готовили с помощью светового микроскопа Leica DMD 108 (Германия), имеющего оригинальную цифровую камеру и специализированное программное обеспечение для управления настройками микроскопа и захвата изображения с возможностью его сохранения на встроенной карте памяти 64 MB. Пользовались объективами 10 и 50. Полученные изображения экспортировали в компьютер CM1740 компании ASUS и проводили визуальный анализ особенностей их строения.

Результаты исследования. CART-пептид-иммунопозитивные клетки выявляются в субвентрикулярной зоне нижнего рога бокового желудочка, который расположен в заднем отделе миндалевидного тела (*рисунк, а*) в составе



CART (cocaine-amphetamine-regulated transcript)-пептид-иммунопозитивные клетки субвентрикулярной зоны палеоамигдалы.

а — нижний рог бокового желудочка и структуры палеоамигдалы; б — эпендима и клетки субвентрикулярной зоны (СВЗ) нижнего рога бокового желудочка; в — нейробластоморфный нейрон в СВЗ; г — CART-пептид-иммунопозитивные клетки. а, б — окраска по Ниссли; в — метод Гольджи; г — иммуногистохимическая реакция. а — об. 3,5, ок. 10; б — об. 20, ок. 10; в, г — об. 50, ок. 12,5

древней ее части — палеоамигдалы. В субвентрикулярной зоне (см. рисунок, б) преобладают клетки малого размера. При иммуноцитохимической реакции у них обнаруживаются округло-овальные тела, 1 или 2 коротких отростка (см. рисунок, г). Однако неравномерность иммунопозитивного осадка в отростках этих клеток не позволяет более детально охарактеризовать их особенности. Исследование препаратов, импрегнированных нитратом серебра по методу Гольджи (см. рисунок, в), показало, что в субвентрикулярной зоне клетки имеют небольшое и округлое по форме тело. У них выявляется, как правило, один отросток, который разветвляется на небольшом расстоянии от тела клетки.

Обсуждение полученных данных. Клетки, выявленные нами при импрегнации нитратом серебра по Гольджи по морфологическим признакам согласно классификации Т. А. Леонтович [3], можно отнести к нейробластоморфным нейронам. Общеизвестно, что субвентрикулярная зона мозга у взрослых представляет собой важный отдел, содержащий прогениторные нейрональные клетки, который может быть использован при нейрорегенеративной терапии [4]. Считали, что генерация прогениторных нейрональных клеток представлена только в ее переднем отделе с последующей их миграцией по роstralному пути в обонятельную луковицу. В последующем было показано, что этот процесс происходит на всем протяжении субвентрикулярной зоны, прогениторные нейрональные клетки которой могут быть источником новых нейронов и клеток глии. Выявленная в нашей работе способность клеток субвентрикулярной зоны нижнего рога бокового желудочка, который входит в состав палеоамигдалы, экспрессировать CART-пептид показывает, что его синтез происходит в норме, и этот процесс является физиологическим. Интраназальное введение CART-пептида в мозг [5] приводит к стимуляции уже отработанного в эволюции физиологического механизма, что предопределяет высокую эффективность нейрорегенеративной терапии, проводимой с его использованием.

Полученные в нашей работе данные показывают, что синтез CART-пептида в клетках субвентрикулярной зоны нижнего рога бокового желудочка происходит в условиях нормы и, вероятно, отражает его участие в процессах физиологической регенерации.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: Л. Б. К., А. В. А.
Сбор и обработка материала: А. А. Н., А. В. А.

Анализ и интерпретация данных: Е. Н. Е., Л. Б. К.

Написание текста: А. В. А., Л. Б. К.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахмадеев А. В., Калимуллина Л. Б. Экспрессия CART-пептида в нейронах палеоамигдалы и ее зависимость от уровня половых стероидов // Бюл. экспер. биол. 2009. Т. 147, № 4. С. 374–376 [Akhmadeev A. V., Kalimullina L. B. Expression of CART peptide in paleoamygdala neurons and its relationship with sex hormone levels // Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny. 2009. Vol. 147, № 4. P. 394–396. In Russ.].
2. Ахмадеев А. В., Калимуллина Л. Б. Учение А. Л. Поленова об эволюции нейроэндокринной системы — ключ для понимания значения CART-пептида // Нейроэндокринология-2015: Материалы IX Всероссийской конференции. СПб.: ИЭФиБ РАН, 2015. С. 30–31 [Akhmadeev A. V., Kalimullina L. B. The doctrine of A. L. Polenov about the evolution of the neuroendocrine system — the key to understanding the significance of CART-peptide. Neurojendokrinologiya-2015: Materialy IX Vserossiiskoi konferentsii. SPb.: IEFiB RAN, 2015. P. 30–31. In Russ.].
3. Леонтович Т. А. Нейронная организация подкорковых образований переднего мозга. М: Медицина, 1978 [Leontovich T. A. Neuronal Organization of the Subcortical Formations of the Forebrain. M.: Meditsina, 1978. In Russ.].
4. Alvarez-Buylla A., Garcia-Verdugo J. Neurogenesis in adult subventricular zone // J. Neurosci. 2002. Vol. 22. P. 629–634.
5. Luo Y., Shen H., Liu H. et al. CART peptide induces neuroregeneration in stroke rats. // J. Cereb. Blood Flow. Metab. 2013. Vol. 33. P. 300–310.

Поступила в редакцию 20.06.2017

Получена после доработки 26.07.2017

CHARACTERIZATION OF CART PEPTIDE-IMMUNOPOSITIVE CELLS OF THE SUBVENTRICULAR ZONE OF THE BRAIN

A. V. Akhmadeyev, L. B. Kalimullina, A. A. Nurutdinov,
Ye. N. Yelizaryeva

Objective — to study cytoarchitectonics, neuronal organization and the distribution of CART peptide-immunopositive cells in the subventricular zone of the brain.

Material and methods. The study was performed on the frontal sections of the rat brain (n=18) using Nissle, Golgi methods and immunohistochemistry with antibodies against CART (55–102). The preparations were analyzed using light microscopy.

Results. CART peptide-immunopositive cells were detected in the subventricular zone of the lower horn of the lateral ventricle within the paleoamygdala. They have round-to-oval cell bodies, one or two short processes and, according to their neural organization, are neuroblastomorph neurons.

Conclusions. The data obtained indicate that cells of the subventricular zone express CART peptide under normal conditions. This predetermines high efficiency of neuroregenerative therapy conducted with its use.

Key words: paleoamygdala, corpus amygdaloideum of the brain, CART peptide, neuroregeneration, ischemic stroke

Department of Life Safety and Environmental Protection, Bashkir State University, 32 Zaki Validi St., Ufa 450074