

© А. В. Ахмадеев, Л. Б. Калимуллина, 2014
УДК 611.813.14.018:599.323.4

А. В. Ахмадеев и Л. Б. Калимуллина

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ CART-ПЕПТИД-ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ НЕЙРОНОВ МИНДАЛЕВИДНОГО ТЕЛА МОЗГА

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

Целью исследования явилось выявление особенностей структурно-функциональной организации нейронов дорсомедиального ядра миндалевидного тела (МТ) мозга, содержащих иммунореактивный CART-пептид. Исследование проведено на 15 крысах линии Вистар с использованием иммуноцитохимического выявления CART-пептида и метода Гольджи. Показано, что CART-пептид-экспрессирующие нейроны субependимной зоны ядра являются нейробластоформными, а расположенные в его центральных зонах — короткодендритными. Эти данные свидетельствуют о том, что экспрессирующие CART-пептид нейроны относятся к редковетвистой нейронной системе. На основании полученных результатов, анализа литературы и положений концепции А. Л. Поленова (1993) о происхождении и эволюции нейроэндокринных клеток и нейрогормональной регуляции Metazoa, есть основания полагать, что CART-пептид появился на ранних этапах становления регуляторной химической коммуникации многоклеточных.

Ключевые слова: CART-пептид, миндалевидное тело мозга, эволюция мозга, нейронная организация, нейроэндокринная система

Открытый в 1995 г. CART (cocaine-amphetamine-regulated transcript)-пептид [8] первоначально привлек к себе внимание возможным участием в механизмах наркомании [5, 18]. Однако последующие исследования показали, что этот пептид многофункционален [17]. Оказалось, что он присутствует не только в нервной системе, но и в периферических эндокринных органах [12, 19], участвует в процессах нейrogenеза [9], регенерации и blastomogenesis [6, 14, 15]. Столь широкие функции CART-пептида позволяют предполагать, что он вовлечен в обеспечение фундаментальных, жизненно важных процессов клеточного метаболизма, формирование которых произошло на ранних этапах исторического становления организмов.

Несмотря на то, что CART-пептид выявлен в различных центрах нервной системы и стал в последние два десятилетия объектом интенсивных исследований, до сих пор остается неизвестным какова нейронная организация экспрессирующих его клеток.

Цель настоящего исследования — выявление особенностей нейронной организации CART-пептид-иммунопозитивных нейронов дорсомедиального ядра миндалевидного тела (МТ) мозга.

Материал и методы. Исследования проведены на 15 белых половозрелых крысах-самках линии Вистар (голов-

ной мозг 6 крыс использован для выявления CART-пептида, 9 — для его обработки по методу Гольджи). Содержали животных и все экспериментальные манипуляции осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Иммуноцитохимическое выявление CART-пептида проводили на приготовленных в криостате CM 1510 (Leica, Германия) фронтальных срезах мозга толщиной 30 мкм, после перфузии его 1М фосфатным буфером (PBS, pH 7,4) и 4% раствором параформальдегида на 0,1 М PBS. После декапитации животных мозг был дофиксирован в том же фиксаторе в течение 4 ч при температуре 4 °C, затем его промыли в нескольких порциях 0,9% NaCl на 0,02 М PBS (pH 7,4) и с целью криопroteкции помещали в 30% раствор сахарозы на 0,02 М PBS при 4 °C до полного погружения. Реакцию проводили на свободно плавающих срезах одновременно для всех групп животных. 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 (Sigma, США) и 1% козий альбумин (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, PhoenixPharm., Incorp, США), разведенные 1:8000 на 1% BSA при 4 °C в течение 48 ч. Далее срезы промывали при комнатной температуре в трех порциях PBS с Tween по 20 мин и в течение 2 ч инкубировали во вторичных goat-anti-rabbit антителах, конъюгированных с авидиновым комплексом (ABC-kit 689321, ICN Biomedicals Inc., США). После промывания срезов в 3 порциях PBS с

Сведения об авторах:

Ахмадеев Азат Валерьевич (e-mail: mpha@ufanet.ru), Калимуллина Лилия Барыевна (e-mail: mpha@ufanet.ru),

кафедра морфологии и физиологии человека и животных, Башкирский государственный университет, 450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, д. 32

Tween их помещали на 2 ч в пероксидазо-антипероксидазный комплекс, конъюгированный со стрептавидином (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 (Sigma, США) с 0,015% перекисью водорода, разведенной на PBS. Вновь срезы промывали в нескольких порциях PBS, помещали на стекла с полилизинным покрытием (SuperFrost/plus, Menzel-Glazer, Германия) и высушивали при комнатной температуре. После обработки в 3 порциях 96° этанола и 3 порциях ксилола срезы заключали в канадский бальзам под покровное стекло.

Особенности нейронной организации структур исследовали на фронтальных срезах мозга толщиной 100 мкм, обработанных по методу Гольджи. Для этого мозг после фиксации в жидкости Мюллера и дополнительной фиксации в смеси двуххромовокислого калия и четырехокси осмия выдерживали в 1% растворе нитрата серебра 10 сут в термостате, после чего обезвоживали в нескольких порциях этанола возрастающей концентрации, заливали в целлоидин, и готовили срезы.

Микрофотографии изготавливали с помощью светового микроскопа Leica DMD 108 (Leica, Германия) со специализированным программным обеспечением для управления настройками микроскопа и захвата изображения с возможностью его сохранения на встроенной карте памяти 64 МВ. Полученные изображения экспортировали в компьютер SM1740 ASUS. Принадлежность нейронов к I или II типу по Гольджи определяли на основании классификационных признаков, разработанных Т.А.Леонтович [3] для подкорковых нейронов.

Результаты исследования. Дорсомедиальное ядро МТ находится в медиобазальном углу полушария конечного мозга, примыкая к нижнему рогу бокового желудочка. Оно образовано плотно расположенными нейронами преимущественно малого и среднего размера. CART-пептид-позитивные нейроны располагаются в различных его частях. Нейроны малого размера локализируются в субэпендимных зонах. Они имеют округло-овальные тела и 1 или 2 коротких отростка (рисунки, а, б). Если у нейронов выявляются 2 отростка, то они, как правило, отходят от противоположных полюсов перикариона и не ветвятся. В тех случаях, когда определяется 1 короткий отросток, недалеко от тела клетки он делится на 2 тонкие незначительной длины веточки. Нейроны среднего размера, дающие более интенсивную иммуноцитохимическую реакцию на CART-пептид (см. рисунок, в), занимают центральные зоны дорсомедиального ядра. Они обладают более массивными телами, формируют небольшие группы. CART-пептид выявляется в телах этих нейронов, маскируя клеточное ядро, или в одном из отростков.

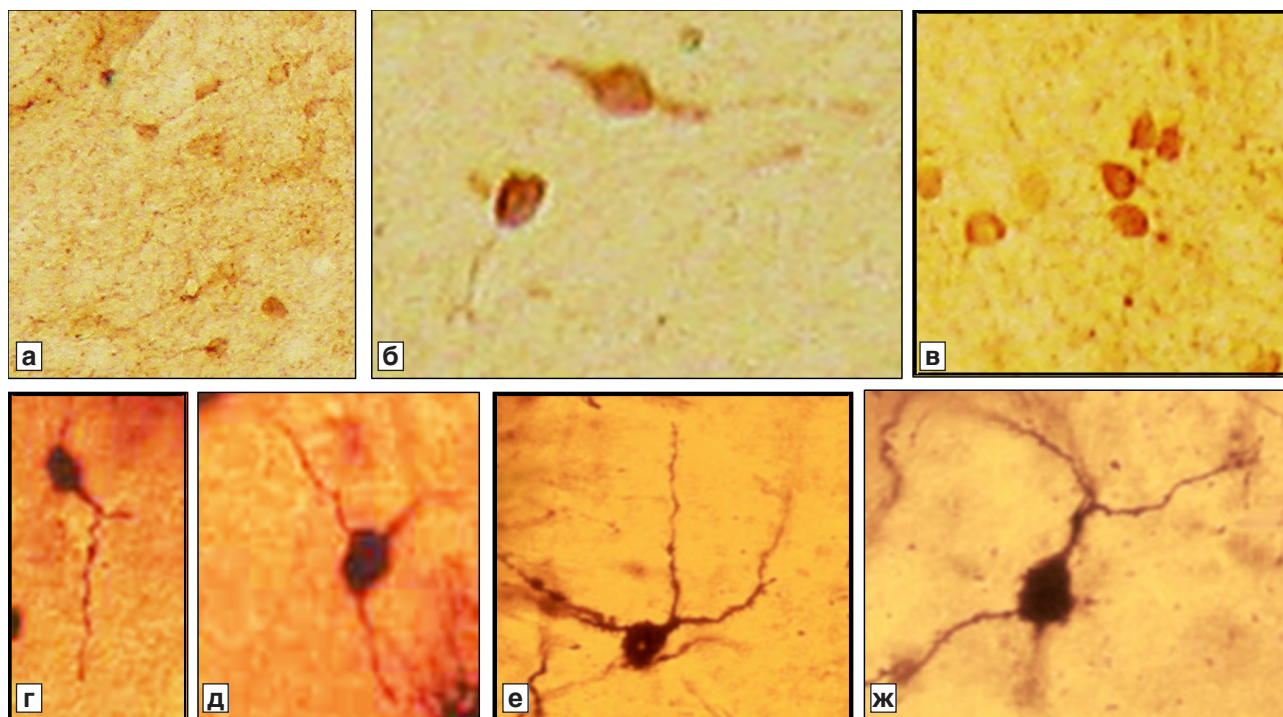
Исследование нейронной организации дорсомедиального ядра показало, что нейроны в субэпендимных зонах имеют характер нейробластоформных (см. рисунок, г, д), характеристика которых идентична CART-позитивным нейронам этой зоны дорсомедиального ядра. Для них харак-

терно небольшое тело и наличие не более двух неразветвленных дендритов. В центральных зонах ядра нейроны имеют характер короткодендритных. У них в импрегнированных нитратом серебра препаратах выявляются от 2 до 4 коротких первичных дендритов, которые отходят либо от полюсов тела (чаще всего в этих случаях 2 дендрита), либо от разных мест поверхности тела. На небольшом расстоянии от тела они разделяются на ветви, которые больше не ветвятся, и снабжены шипиками. Тело короткодендритных нейронов — округлой формы (см. рисунок, е, ж).

Наличие особенностей регионального распределения CART-пептид-позитивных нейронов и нейронов, выявленных методом Гольджи, позволяет заключить, что CART-пептид-позитивные нейроны субэпендимной зоны дорсомедиального ядра являются нейробластоформными, а дающие положительную реакцию на CART-пептид нейроны центральных зон — короткодендритными. Полученные результаты указывают на то, что CART-пептид экспрессируется в нейронах, относящихся к редковетвистой нейронной системе.

Обсуждение полученных данных. Учение о редко- и густоветвистой нейронной системах создано Т.А.Леонтович [3] на основе результатов исследований нейронной организации подкорковых центров мозга, выполненных на разных представителях позвоночных. Показано, что в филогенетически древних отделах нервной системы преобладают длинноаксонные редковетвистые нейроны, в отделах, формирование которых происходит на более поздних этапах эволюции мозга, вследствие возрастания интегративных свойств нейронов, преобладающим их типом становятся густоветвистые.

Согласно классификации Т.А.Леонтович [3], к длинноаксонным редковетвистым нейронам (I типа Гольджи) относятся нейробластоформные, короткодендритные и ретикулярные нейроны. Среди них самыми древними считаются нейробластоформные, получившие свое название на основании их визуального сходства с нейробластами. Характеристики этих нейронов указывают на то, что они являются эквивалентами прогениторных клеток. Это подтверждено результатами исследований А. Yachnis и соавт. [20], выявивших наличие частично коммитированных клеток-предшественников нейронов в перивентрикулярной зоне заднего отдела МТ человека, а также Y. Luo и соавт. [15], изучавших характеристики прогениторных клеток в ростральной части (расположенной под дорсальным гиппокампом) субвентрикулярной зоны крыс.



CART-пептид-иммунопозитивные (а—в), нейробластоформные (г, д) и короткодендритные (е, ж) нейроны дорсомедиального ядра миндалевидного тела мозга крысы.

а—в — иммуноцитохимическая реакция на CART-пептид, г—ж — метод Гольджи. а, в — об.10, ок.10; б — об.40, ок.10; г, д — об.50, ок.12,5; е, ж — об.25, ок.12,5

Короткодендритные нейроны, как подсказывает их название, имеют небольшую длину дендритов, крупнее нейробластоформных, на дендритах часто встречаются шипики. Эти нейроны распространены в гипоталамической области, которая, как известно, является одним из наиболее изученных нейроэндокринных центров мозга, а также выявлены и в медиальных зонах МТ [3]. Представители редковетвистой нейронной системы в примыкающих к гипоталамической области медиальных отделах МТ, выявленные указанным автором у собак, обнаружены и у крыс [1]. Результаты ранее проведенных электронномикроскопических исследований [2] показали, что нейроны дорсомедиального ядра МТ обладают характеристиками нейроэндокринных нейронов.

Известно, что CART-пептид, кроме ЦНС, периферического отдела нервной системы и ганглиев автономной нервной системы [16], экспрессируется в эндотелиальных эндокриноцитах диффузной гастроэнтеральной [7, 10, 12] и мочеполовой системы [11]. Показано, что в поджелудочной железе он выявляется не только в ее эндокринной части, но и в экзокринной [13], что свидетельствует о появлении CART-пептида на ранних этапах становления регуляторной химической коммуникации, так как экзокринная секреция рассматривается как наиболее филогенети-

чески древняя, исходная для всех эндокринных и нейроэндокринных элементов [4]. На основании предложенной этим автором концепции о путях становления в филогенезе Metazoa нейроэндокринной и эндокринной систем, можно полагать, что CART-пептид существовал у общего «предка» пронеуронов и проэндокриноцитов — малодифференцированных клеток протогормонального типа, т.е. присутствовал на раннем этапе прогормонального периода, характерного для Metazoa, еще не обладающих нервной системой. Именно такое представление дает ключ к пониманию столь широкого представительства CART-пептида в нейроэндокринной системе и снимает вопросы при интерпретации его функционального значения.

Итак, полученные нами данные свидетельствуют о том, что экспрессирующие CART-пептид нейроны дорсомедиального ядра МТ у крысы являются, по классификации Т.А.Леонтович [3], нейробластоформными и короткодендритными.

Работа выполнена при финансовой поддержке базовой части Госзадания Минобрнауки РФ, тема № 301-14.

ЛИТЕРАТУРА

- Ахмадеев А.В. и Калимуллина Л.Б. Древняя амигдала: цитоархитектоника, организация и цитологические характеристики нейронов. Морфология, 2004, т. 126, вып. 5, с. 15–19.

2. Калимуллина Л.Б., Ахмадеев А.В. и Нагаева Д.В. Электронно-микроскопическая характеристика дорсомедиального ядра миндалевидного тела мозга. *Морфология*, 1999, т. 115, вып. 3, с. 32–37.
3. Леонтович Т.А. Нейронная организация подкорковых образований переднего мозга. М., Наука, 1978.
4. Поленов А.Л. Общая характеристика нейросекреторных клеток. В кн.: *Нейроэндокринология*. СПб., Наука, 1993, с. 13–31.
5. Akhmadeev A.V. Localization of CART-positive neurons in the amygdaloid body and the relationship between their immunoreactivity and the sex steroid level. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 2010, v. 40, № 4, p. 435–439.
6. Brennan D.J., O'Connor D.P., Laursen H. et al. The cocaine- and amphetamine-regulated transcript mediates ligand-independent activation of ER α , and is an independent prognostic factor in node-negative breast cancer. *Oncogene*, 2012, v. 31, № 30, p. 3483–3494.
7. Burliński P.J. Inflammation- and axotomy-induced changes in cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide-like immunoreactive (CART-LI) nervous structures in the porcine descending colon. *Pol. J. Vet. Sci.*, 2012, v. 15, № 3, p. 517–524.
8. Douglass J., McKinzie A.A. and Couceyro P. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J. Neurosci.*, 1995, v. 15, № 3, p. 2471–2481.
9. Gaupale T.C., Subhedar N. and Bhargava S. Ontogeny of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide in brain of frog, *Microhyla ornata*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 2013, v. 181, p. 77–87.
10. Gonkowski S., Kamińska B., Landowski P. and Całka J. Immunohistochemical distribution of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide - like immunoreactive (CART-LI) nerve fibers and various degree of co-localization with other neuronal factors in the circular muscle layer of human descending colon. *Histol. Histopathol.*, 2013, v. 28, № 7, p. 851–858.
11. Janiuk I. and Kasacka I. Distribution of cocaine and amphetamine regulated transcript in ureters and urinary bladder of hypertensive rats. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.*, 2013, v. 27, № 2, p. 409–416.
12. Kasacka I., Janiuk I., Lewandowska A. et al. Distribution pattern of CART-containing neurons and cells in the human pancreas. *Acta Histochem.*, 2012, v. 114, № 7, p. 695–699.
13. Kasacka I., Piotrowska Z., Car H. et al. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript: identification and distribution in human gastrointestinal tract. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.*, 2012, v. 26, № 3, p. 419–428.
14. Landerholm K., Shcherbina L., Falkmer S.E. et al. Expression of cocaine- and amphetamine-regulated transcript is associated with worse survival in small bowel carcinoid tumors. *Clin. Cancer Res.*, 2012, v. 18, № 13, p. 3668–3676.
15. Luo Y., Shen H., Liu H.S. et al. CART peptide induces neuroregeneration in stroke rats. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.*, 2013, v. 33, № 2, p. 300–310.
16. Parker L.M., Kumar N.N., Lonergan T. and Goodchild A.K. Neurochemical codes of sympathetic preganglionic neurons activated by glucoprivation. *J. Comp. Neurol.*, 2013, v. 521, № 12, p. 2703–2718.
17. Subhedar N.K., Nakhate K.T., Upadhy M.A. and Kokare D.M. CART in the brain of vertebrates: Circuits, functions and evolution. *Peptides*, 2014, v. 54, p. 108–130.
18. Upadhy M.A., Nakhate K.T., Kokare D.M. et al. CART peptide in the nucleus accumbens shell acts downstream to dopamine and mediates the reward and reinforcement actions of morphine. *Neuropharmacology*, 2012, v. 62, № 4, p. 1823–1833.
19. Utrilla J.C., Morillo-Bernal J., Gordillo-Martínez F. et al. Expression of hypothalamic regulatory peptides in thyroid C cells of different mammals. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 2013, v. 187, p. 6–14.
20. Yachnis A., Porer S. and Love A. Bcl-2 immunoreactive cells with immature neonatal phenotype exist in nonepileptic adult human brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2000, v. 59, p. 113–119.

Поступила в редакцию 13.04.2014

Получена после доработки 30.05.2014

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ORGANIZATION OF CART PEPTIDE-EXPRESSING NEURONS IN BRAIN AMYGDALA

A.V. Akhmadeyev and L.B. Kalimullina

The aim of the study was to identify the specific features of structural and functional organization of the neurons in dorso-medial nucleus of amygdala containing immunoreactive CART peptide. The study was carried out on 15 Wistar rats using an immunocytochemical demonstration of CART peptide and Golgi method. CART peptide-expressing neurons in subependymal zone of the nucleus were shown to be neuroblastofomal, while those located in its central zones were short-dendritic. These data demonstrate that CART peptide-expressing neurons are belong to a sparsely branched neuronal system. The results obtained in this work together with the analysis of the literature and the provisions of A.L. Polenov (1993) concept on the origin and evolution of the neuroendocrine cells and neurohormonal regulation in Metazoa, suggest that CART peptide appeared during the early stages of the formation of the regulatory chemical communication in the multicellular organisms.

Key words: *amygdala, the evolution of the brain, neural organization, CART-peptide, neuroendocrine system*

Department of Human Physiology and Zoology, Bashkir State University, Ufa