

© А.В. Ахмадеев, 2009
УДК 616.813:612.018:599.323.4

А.В. Ахмадеев

ЛОКАЛИЗАЦИЯ CART-ПОЗИТИВНЫХ НЕЙРОНОВ В МИНДАЛЕВИДНОМ ТЕЛЕ МОЗГА И ЗАВИСИМОСТЬ ИХ ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ ОТ УРОВНЕЙ ПОЛОВЫХ СТЕРОИДОВ

Кафедра морфологии и физиологии человека и животных (зав. — проф. Л.Б. Калимуллина) Башкирского государственного университета, г. Уфа

Впервые в ходе исследования всех ядерных и палеокортикальных формаций миндалевидного тела (МТ) установлена локализация на его территории экспрессирующих CART-пептид (cocaine-amphetamine-regulated transcript) нейронов и показано влияние половых стероидов на их иммунореактивность. Иммуноцитохимическая реакция проведена на фронтальных срезах головного мозга половозрелых крыс (7 самок на стадии эструса, 7 самок на стадии метэструса, 7 самцов). На стадиях эструса и метэструса оценивали долю иммунореактивных нейронов по отношению к их количеству в прилежащих срезах, окрашенных по методу Ниссля. В дорсомедиальном, заднем кортикальном ядрах и латеро-капсулярном субъядре центрального ядра относительное количество иммунореактивных нейронов на стадии эструса значительно больше по сравнению с таковым на стадии метэструса. Полученные результаты свидетельствуют о вовлеченности обонятельных и интегративных центров МТ в патогенез наркомании и указывают на возможность разработки новых эффективных методов генной терапии с использованием интраназального пути введения лекарственных веществ.

Ключевые слова: миндалевидное тело мозга, CART-пептид, половые стероиды, наркотическая зависимость.

CART (cocaine-amphetamine-regulated transcript) -пептид является сигнальным белком, синтез которого происходит в определенных зонах мозга при действии кокаина и амфетамина. Показано, что CART-пептид играет роль в развитии анксиогенных реакций при употреблении наркотиков [13], участвует в формировании наркотической зависимости [27], принимает участие в регуляции пищевого поведения [14, 16], вовлечен в нейроэндокринные взаимосвязи [22].

Известно, что ведущую роль в развитии наркотической зависимости играют нарушения, формируемые в нейромедиаторных системах мезокортико-лимбической системы мозга [18]. Однако конкретные механизмы вовлечения в патогенез наркомании входящих в ее состав структур остаются не до конца раскрытыми. При этом, в миндалевидном теле (МТ) в аспекте указанной проблемы изучают роль только отдельных его ядер [12, 13, 19, 20, 26], а это недостаточно, учитывая, что МТ является сложным, неоднородным образованием, представляющим собой ядерно-палеокортикальный компонент мозга со сложной морфофункциональной организацией [1, 8]. Изложенное выше указывает на необходимость детального (предполагающего системный подход, а не ограничение рассмотрением отдельных ядер) анализа механизмов его вовлечения в патогенез наркомании.

МТ является ключевой структурой в функциональной системе наркозависимости, обоснованием служит следующее: во-первых, МТ является важной структурой мозга в организации адаптивного, включая и социальное, поведения [1]; во-вторых все клинические симптомы нарко-

зависимости (негативные сдвиги в эмоциональном статусе, деградация личности, нарушение пищевого и питьевого поведения, дисфункция гормональной системы, ослабление иммунитета, энергетического обмена) представляют собой нейropsychологический синдром, обусловленный поражением МТ [7]. Важность исследований МТ в аспекте проблем наркомании продиктована и перспективными возможностями использования этих знаний для разработки качественно новых стратегий в лечении наркозависимости путем интраназального введения в мозг отдельных генов с помощью вирусных векторов-носителей [15, 29].

Цель данной работы — установить локализацию экспрессирующих CART-пептид нейронов в ядерных и палеокортикальных формациях МТ и оценить влияние уровней половых стероидов на их иммунореактивность.

Материал и методы. Исследования проведены на белых половозрелых крысах линии Вистар (7 самок на стадии эструса, 7 самок на стадии метэструса, 7 самцов), выросших в стандартных условиях вивария. Стадии эстрального цикла определяли по цитологической картине влагалищных мазков. Содержание и все экспериментальные манипуляции проводили 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 (Leica, Германия) фронтальных срезах мозга толщиной 30 мкм, после перфузии его 1М фосфатным буфером (PBS, pH 7,4) и 4% раствором параформальдегида на 0,1М PBS. После декапитации мозг был дофиксирован в том же фиксаторе в течение 4 ч при температуре 4 °С. Затем его промыли в нескольких порциях 0,9% NaCl на 0,02М PBS (pH 7,4) и с целью криопротекции помещали в 30% раствор сахарозы на 0,02М PBS при 4 °С до полного погружения.

Реакцию проводили на свободно плавающих срезах одновременно у 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 0,2M 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 0,2M PBS. После этого срезы инкубировали в растворе первичных антител, содержащих поликлональные кроличьи антитела к CART (55–102) (H-003-62, Phoenix Pharm., Incorp, Belmont, CA, США), разведенные 1: 8000 на 1% BSA при 4 °C в течение 48 ч. Потом срезы промывали при комнатной температуре в трех порциях PBS с Tween по 20 мин. Далее в течение 2 ч срезы инкубировали во вторичных козих противокроличьих антителах, конъюгированных с авидиновым комплексом (ABC-kit 689321, ICN Biomedicals Inc., США). После промывания срезов в трех порциях PBS с Tween их помещали на 2 ч в пероксидазо-антипероксидазный комплекс, конъюгированный со стрептавидином (ABC-kit 689321, ICN Biomedicals Inc., США). Затем срезы промывали в трех порциях PBS по 15 мин и синхронно от всех групп животных помещали на 10 мин в 0,05% раствор диаминобензидина (DAB, Sigma, США) с 0,015% перекисью водорода, разведенный PBS. Срезы вновь промывали в нескольких порциях PBS, помещали на стекла с полилизинным покрытием (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 в канадский балзам.

Идентификацию структур МТ проводили в срезах, окрашенных толуидиновым синим по Нисслю, на основании критериев, разработанных для высокоинформативных срезов этого образования мозга [1]. Эти же срезы использовали для подсчета количества нейронов в ядерных и межзоточных формациях МТ, нейроны которых обладали положительной иммунореактивностью на CART-пептид. Препараты изучали с помощью триокулярного светового микроскопа серии MC-300 (Micros, Австрия), пользуясь объективами 10 и 40. Микрофото получали с использованием цифрового фотоаппарата Nicon CoolPix 4500. Полученные изображения экспортировали в компьютер и анализировали с помощью программы ImageJ 1.38 (США), позволяющей вычислить площадь изучаемых структур МТ. Подсчитывали количество нейронов на препаратах, окрашенных по Нисслю, и число CART-пептид-позитивных нейронов на препаратах после иммуноцитохимической реакции и определяли долю иммунопозитивных нейронов во всех исследуемых структурах МТ. Подсчет проводили при объективе 40 в поле зрения микроскопа, площадь которого составляла 35 000 мкм². В медиальном субъядре центрального ядра МТ, площадь среза которого составляла 2887×10² мкм², подсчет выполняли в 8 полях зрения, т. е. во всем субъядре. В латеральном субъядре центрального ядра МТ, площадь среза которого составляла 5774×10² мкм², т. е. включала 16 полей зрения микроскопа, количество нейронов считали в 8 полях зрения (через одно, в нечетных по порядку их нумерации), двигаясь по площади этого субъядра по выработанной стандартной траектории. В латеро-капсулярном субъядре центрального ядра, площадь которого составляет в среднем 8662×10² мкм², подсчет количества нейронов проводили в 8 полях зрения микроскопа, пропуская по 2 поля зрения между использовавшимися для указанной процедуры полями (т. е. в 1-, 4-, 7-м и т. д.) в дорсомедиальном ядре, имевшем площадь 218 600 мкм² в 6 полях зрения, в заднем медиальном ядре — 5107×10² в 7 полях зрения, в медиальной части заднего кортикального ядра (8164×10²) — в 11 полях зрения, в латеральной части заднего кортикального ядра (12242×10²) — в 11 полях зрения. Оценивали долю CART-пептид-содержащих иммунопозитивных нейронов от общего количества нейронов в соответствующих областях МТ. Математико-статистическую обработку

полученных данных проводили параметрическими методами, используя программу Statistica 5.5.

Результаты исследования. В состав МТ входят большое число ядерных, палеокортикальных, межзоточных формаций и переходных зон, которые формируют две крупные функционально различные группы — кортико-медиальную и базолатеральную. Анализ локализации нейронов, содержащих CART-пептид, показал, что они находятся в ряде структур, входящих в состав только кортико-медиальной группы. При этом локализация CART-пептид-иммунореактивных нейронов была тождественна у самцов и самок крыс, т. е. не имела половых различий.

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

В центральном ядре CART-пептид-позитивные нейроны входят в состав его субъядер: медиального, латерального и латеро-капсулярного.

В медиальном субъядре центрального ядра CART-пептид выявляется в нейронах среднего и крупного размера, имеющих грушевидную и полигональную форму тела, определяя их окрашивание в коричневый цвет. Нейроны содержат различные количества продукта реакции в цитоплазме, начальных сегментах первичных дендритов и в аксонах, при этом последние имеют варикозные расширения. Определяется большая концентрация CART-иммунореактивных нейронов в ventральных зонах этого субъядра.

Нейроны латерального субъядра, содержащие CART-пептид, имеют средние по размеру тела и концентрируются в дорсальной и ventральной частях этого субъядра, при этом в ventральной зоне выявляются лишь отдельные, дисперсно расположенные CART-пептид-позитивные нейроны со слабой иммунореактивностью.

В латеро-капсулярном субъядре центрального ядра выявляется наибольшая по сравнению с другими субъядрами концентрация CART-пептид-иммунопозитивных нейронов. Эти нейроны разнообразны как по размерам, форме тел, так и по количеству содержащегося продукта реакции. В этом субъядре, в отличие от других субъядер центрального ядра, более интенсивно окрашивается продукт реакции в нейрорпиле, в котором прослеживаются варикозно-расширенные аксоны приходящих афферентных волокон.

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 ней-

ронов выделяются группы крупных нейронов с угловатыми телами, содержащие большое количество продукта реакции в виде мелкозернистых скоплений в перикарионе. Крупные нейроны с позитивной иммунореактивностью располагаются в вентральной части ядра и в его латеральных зонах. В отдельных нейронах CART-пептид определяется в проксимальной части дендритов, а также в аксонах, у которых выявляются варикозные расширения.

В заднем медиальном ядре CART-пептид выявляется в нейронах среднего и крупного размера, форма тел которых может варьировать. В одних нейронах продукта реакции много, и он экранирует клеточное ядро, в других — меньше, на фоне окрашенной цитоплазмы определяется светлое ядро.

Заднее кортикальное ядро имеет медиальную и латеральную части, при этом большее количество нейронов, дающих положительную реакцию на изучаемый пептид, локализуются в латеральной части ядра. Высокая интенсивность выявления CART-пептида отмечается в поверхностной зоне медиальной части заднего кортикального ядра, которая содержит приходящие аксоны из добавочной обонятельной луковицы. Размеры иммунопозитивных нейронов варьируют от мелких до крупных, имеют разнообразную форму тел и разное количество продукта реакции. Содержащие CART-пептид нейроны располагаются не равномерно, а формируют небольшие скопления от 2–3 до 10 клеток. В латеральной части заднего кортикального ядра, кроме поверхностной зоны, CART-пептид выявляется в группах нейронов поверхностно-клеточной и глубокой зон.

Сведения о доле иммунореактивных CART-пептид-содержащих нейронов на стадиях эструса и метэструса приведены в таблице. Они свидетельствуют о том, что в латеро-капсулярном субъядре центрального ядра, дорсомедиальном ядре и в обеих частях заднего кортикального ядра изменение уровней половых стероидов в ходе эст-

рального цикла у крыс значительно влияет на число иммунореактивных нейронов.

Обсуждение полученных данных. Впервые CART-пептид, получивший свое название от вызывающих его экспрессию психомоторных стимуляторов, был выделен в 1995 г. из ткани стриатума мозга крыс [17]. Этими же исследователями методом гибридизации *in situ* было установлено, что, кроме стриатума, мРНК CART-пептида определяется в структурах мезокортико-лимбической системы, включая и МТ, и высказано предположение о том, что он является нейромодулятором катехоламинергической передачи, нарушения которой составляют основу формирования наркотической зависимости. Позднее эти данные нашли подтверждение в работах других авторов [21, 31].

Мы использовали реакцию на CART-пептид для выявления структур МТ, вовлеченных в патогенез наркомании. Исследование экспрессии CART-пептида позволило выявить его в нейронах дорсомедиального, заднего медиального, заднего кортикального и центрального ядер как у самцов, так и у самок крыс, показав отсутствие половых различий в локализации нейронов, содержащих CART-пептид.

На территории центрального ядра CART-пептид обнаружен в нейронах всех его субъядер, подробная характеристика которых приведена в ранее опубликованной работе [2]. Известно, что центральное ядро МТ является его важным интегративным центром [1], обширные связи которого с различными структурами мозга определяют его включение в состав функциональных систем, участвующих в организации стрессовых реакций. Показано, что CART-пептид синтезируется в паравентрикулярном ядре гипоталамуса, которое определяет деятельность гипофизарно-адреналовой системы, и в голубоватом месте ствола мозга [24] — центре симпатико-адреналовой системы стресса. При введении в организм CART-пептид

Доля иммунореактивных нейронов от общего количества нейронов в структурах миндалевидного тела (МТ) мозга крысы на разных стадиях эстрального цикла ($\bar{p} \pm s_{\bar{p}}$, %)

Структуры МТ	Эструс	Метэструс
Субъядра центрального ядра:		
медиальное	70,2±2,7	70±3
латеральное	55±3	56±4
латеро-капсулярное	77,0±1,8	64±3**
Дорсомедиальное ядро	62±4	39±4*
Заднее медиальное ядро	41,2±2,3	31,9±1,9
Заднее кортикальное ядро:		
медиальная часть	42,2±0,7	32,1±1,0***
латеральная часть	45,6±1,0	26,5±1,2***

* Различия значимы при $P < 0,05$.

** При $P < 0,01$.

*** При $P < 0,001$.

стимулирует выработку кортиколиберина, повышает секрецию адренокортикотропного гормона и глюкокортикоидов, которые, в свою очередь, усиливают транскрипционную активность гена CART-пептида [24].

В нашей работе мы смогли установить модулирующее влияние половых стероидов на экспрессию CART-пептида только в латеро-капсулярном субъядре центрального ядра. В этом субъядре на стадии эструса имело место значимое увеличение числа иммунопозитивных нейронов. Эти данные согласуются с результатами гистофизиологических исследований субъядер центрального ядра МТ в динамике эстрального цикла [9], выявивших реактивные изменения также только в нейронах латеро-капсулярного ядра. Важно при этом отметить, что связь центрального ядра с другими образованиями лимбической системы осуществляется через его латеро-капсулярное субъядро [1]. Наличие модулирующего влияния половых стероидов на экспрессию в нем CART-пептида, вероятно, может определять некоторые особенности, связанные с фактором пола и клинические проявления симптомов наркомании, касающиеся анксиогенных реакций [13]. Следует отметить, что модулирующее влияние половых стероидов на экспрессию CART-пептида в центральном ядре МТ установлено нами впервые.

Дорсомедиальное, заднее медиальное и заднее кортикальное ядра, в составе которых выявлена локализация CART-пептид-содержащих нейронов, составляют субстрат палеоамигдалы [5]. Последняя является нейроэндокринным центром мозга и играет важную роль в организации пищевого, полового и агрессивно-оборонительного поведения, т. е. тех его форм, формирование отклонений в которых весьма характерно для клиники наркомании.

Известно, что формирование палеоамигдалы в онтогенезе происходит под морфогенетическим действием половых стероидов, а ее деятельность во взрослом организме осуществляется под их активизирующим влиянием [3, 4, 6]. Поэтому естественно было предположить наличие модулирующего влияния половых стероидов на экспрессию CART-пептида в структурах палеоамигдалы. Полученные результаты показали, что в дорсомедиальном и заднем кортикальном ядрах изменение содержания половых стероидов значимо влияет на число иммунореактивных нейронов. Данные о влиянии половых стероидов на экспрессию CART-пептида в палеоамигдале получены впервые. О повышении транскрипционной активности гена CART-пептида под влиянием эстрогенов в нейронах репродуктивных центров гипоталамуса [10, 28], дофаминергических центров стриатума и прилежащего ядра [21, 31], а также кортикальных нейронов в культуре тканей [30] было известно ранее.

Экспрессия CART-пептида в палеоамигдале свидетельствует, что указанный комплекс струк-

тур МТ вовлечен в патогенетические механизмы развития наркотической зависимости и должен быть в центре внимания при разработке перспективных методов ее коррекции. Известно, что дорсомедиальное и заднее кортикальное ядра МТ 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 агглютиниана проростков пшеницы, конъюгированного с пероксидазой хрена, на обонятельный эпителий приводит к аксональному транспорту этого комплекса в ядерные и экранные структуры МТ [23]. Интраназальный путь может быть использован для введения в мозг отдельных генов при помощи вирусных носителей [15, 29]. Данный подход позволяет осуществлять эффективную генную терапию, приводя к синтезу в отдельных областях мозга белков, недостаток которых вызвал патологию.

Иммунореактивность нейропилля структур МТ, содержащих CART-позитивные нейроны, позволяет предположить, что, кроме синтеза этого пептида *in situ*, он может поступать в МТ по аксонам нейронов обонятельных луковиц, в которых обнаружены нейроны, экспрессирующие CART-пептид [11, 25].

Полученные результаты имеют научно-практическое значение. Они свидетельствуют о вовлеченности обонятельных и интегративных центров МТ в патогенез наркомании и указывают на возможность разработки новых эффективных методов генной терапии наркомании с использованием интраназального пути введения отдельных генов в мозг при помощи вирусных векторов-носителей.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Акмаев И.Г. и Калимуллина Л.Б. Миндалевидный комплекс мозга: функциональная морфология и нейроэндокринология. М., Наука, 1993.
2. Акмаев И.Г., Калимуллина Л.Б. и Шарипова Л.А. Центральное ядро миндалевидного тела мозга: цитоархитектоника, нейронная организация, связи. Морфология, 2003, т. 123, вып. 5, с. 515–523.
3. Ахмадеев А.В. Влияние фактора пола и неонатальной андрогенизации на дендроархитектонику нейронов дорсомедиального ядра миндалевидного тела мозга. Морфология, 2006, т. 129, вып. 3, с. 30–33.
4. Ахмадеев А.В. и Калимуллина Л.Б. Дендроархитектоника нейронов заднего кортикального ядра миндалевидного тела мозга крысы под влиянием фактора пола и неонатальной андрогенизации. Морфология, 2004, т. 125, вып. 2, с. 22–25.
5. Ахмадеев А.В. и Калимуллина Л.Б. Древняя амигдала: цитоархитектоника, организация и цитологические характеристики нейронов. Морфология, 2004, т. 126, вып. 5, с. 15–19.
6. Ахмадеев А.В. и Калимуллина Л.Б. Электронно-микроскопическая характеристика нейроэндокринных нейронов миндалевидного тела мозга у самцов и самок крыс на

- различных стадиях эстрального цикла. Морфология, 2006, т. 130, вып. 6, с. 25–29.
7. Холмская Е.Д. Нейропсихология. М., Питер, 2006.
 8. Чепурнов С.А. и Чепурнова Н.Е. Миндалевидный комплекс мозга. М., изд. МГУ, 1981.
 9. Шарипова Л.А., Калимуллина Л.Б. и Минибаева З.Р. Центральное ядро миндалевидного комплекса мозга: цитоархитектоника, нейронная организация и гистофизиология. Росс. физиол. журн., 2004, т. 90, № 2, с. 137–145.
 10. Cavalcante J.C. and Bittencourt J.C., Elias C.F. Female odors stimulate CART neurons in the ventral premammillary nucleus of male rats. *Physiol. Behav.*, 2006, v. 88, № 1–2, p. 160–166.
 11. Coucevro P.R., Koyle E.O. and Kuhar M.J. Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *J. Chem. Neuroanat.*, 1997, v. 12, № 4, p. 229–241.
 12. Covington H.E., Kikusui T., Goodhue J. et al. Brief social defeat stress: long lasting effects on cocaine taking during a binge and zif268 mRNA expression in amygdala and prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, 2005, v. 0, № 2, p. 310–321.
 13. Dandekar M.P., Singru P.S., Kokare D.M. et al. Importance of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide in central nucleus of amygdala in anxiogenic responses induced by ethanol withdrawal. *Neuropsychopharmacology*, 2007, v. 32, № 4, p. 546–556.
 14. Dayas C.V., McGranahan T.M., Martin-Fardon R. and Weiss F. Stimuli linked to ethanol availability activate hypothalamic CART and orexin neurons in a reinstatement model of relapse. *Biol. Psychiatry*, 2008, v. 63, № 2, p. 152–157.
 15. Draghia R., Caillaud C., Manicom R. et al. Gene delivery into the central nervous system by nasal instillation in rats. *Gene Ther.*, 1995, v. 2, № 7, p. 418–423.
 16. Dominguez G., Lakatos A. and Kuhar M.I. Characterization of the cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide gene promoter and its activation by a cyclic AMP-dependent signaling pathway in GH3 cells. *J. Neurochem.*, 2002, v. 80, № 5, p. 885–893.
 17. Douglass J., McKinzie A.A. and Coucevro 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.
 18. Fagergren P. and Hurd Y. CART mRNA expression in rat monkey and human brain: relevance to cocaine abuse. *Physiol. Behav.*, 2007, v. 92, № 1–2, p. 218–225.
 19. Floresco S.B. and Tse M.T. Dopaminergic regulation of inhibitory and excitatory transmission in the basolateral amygdala-prefrontal cortical pathway. *J. Neurosci.*, 2007, v. 27, № 8, p. 2045–2057.
 20. Fuchs R.A., Feltenstein M.W. and See R.E. The role of the basolateral amygdala in stimulus-reward memory and extinction memory consolidation and subsequent conditioned reinstatement of cocaine seeking. *Eur. J. Neurosci.*, 2006, v. 23, № 10, p. 2809–2813.
 21. Hubert G.W., Jones D.C., Moffett M.C. et al. CART peptides as modulators of dopamine and psychostimulants and interactions with the mesolimbic dopaminergic system. *Biochem. Pharmacol.*, 2008, v. 75, № 1, p. 57–62.
 22. Hunter R.G., Lim M.M., Philpot K.B. et al. Species differences in brain distribution of CART mRNA and CART peptide between prairie and meadow voles. *Brain Res.*, 2005, v. 1048, № 1–2, p. 12–23.
 23. Itaya S.K. Anterograde transsynaptic transport of WGA-HRP in the rat olfactory pathways. *Brain Res.*, 1987, v. 409, № 7, p. 205–214.
 24. Koyle E.O., Balkan B., Kuhar M.J. and Pogun S. Cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) and the stress response. *Peptides*, 2006, v. 27, № 8, p. 1956–1969.
 25. Lazar G., Calle M., Roubos E.W. et al. Immunohistochemical localization of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide in the central nervous system of the frog *Rana esculenta*. *J. Comp. Neurol.*, 2004, v. 477, № 3, p. 324–339.
 26. Ledford C.C., Fuchs R.A. and See R.E. Potentiated reinstatement of cocaine-seeking behavior following D-amphetamine infusion into the basolateral amygdala. *Neuropsychopharmacology*, 2003, v. 28, № 10, p. 1721–1729.
 27. Salinas A., Wilde J.D. and Maldve R.E. Ethanol enhancement of cocaine- and amphetamine-regulated transcript mRNA and peptide expression in the nucleus accumbens. *J. Neurochem.*, 2006, v. 97, № 2, p. 578–591.
 28. Vrang N. Anatomy of hypothalamic CART neurons. *Peptides*, 2006, v. 27, № 8, p. 1970–1980.
 29. Williams M.A., Turchan J., Lu Y. et al. Protection of human cerebral neurons from neurodegenerative insults by gene delivery of soluble tumor necrosis factor p75 receptor. *Exp. Brain Res.*, 2005, v. 165, № 9, p. 383–391.
 30. Xu Y., Zhang W., Klaus J. et al. Role of cocaine- and amphetamine-regulated transcript in estradiol-mediated neuroprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, v. 103, № 39, p. 14489–14494.
 31. Yang S.C. and Shich K.R. Gonadal hormones-mediated effects on the stimulation of dopamine turnover in mesolimbic and nigrostriatal systems by cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide in male rats. *Neuropharmacology*, 2007, v. 53, № 7, p. 801–809.

Поступила в редакцию 10.10.08

Получена после доработки 05.01.09

LOCALIZATION OF CART-POSITIVE NEURONS IN AMYGDALA AND THE DEPENDENCE OF THEIR IMMUNOREACTIVITY ON THE CONCENTRATION OF SEX STEROIDS

A.V. Akhmedeyev

During the study of all nuclear and paleocortical structures of amygdala, the CART-peptide (cocaine-amphetamine-regulated transcript) expressing neurons were for the first time demonstrated in this region, and their immunoreactivity was shown to be influenced by sex steroids. Immunocytochemical reaction was performed on frontal slices of adult rat brain (7 female rats in estrus stage, 7 female rats in metestrus stage and 7 male rats). The portion of immunopositive neurons in animals in estrus and metestrus was counted in relation to their numbers in adjoining slices (stained using Nissl's method). The relative number of immunoreactive neurons in dorsomedial, posterior cortical nuclei and latero-capsular subnucleus of the central nucleus was found to be significantly greater in estrus than in metestrus. The data obtained show that olfactory and integrative centers of amygdala may be involved in the pathogenesis of drug addiction and indicate the possibility of development of new effective methods of gene therapy with the application of an intranasal route of drug delivery.

Key words: *amygdala, CART-peptide, sex steroids, drug addiction.*

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