

УДК 57.086.2, 57.087.1

Хисматуллина З.Р., Садртдинова И.И.,  
Федорова А.М., Файрушина А.И., Давлетбаева А.Р.

# **УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ CART-ПЕПТИДА В ЯДРАХ АМИГДАЛЫ МОЗГА КРЫС**

**Научный руководитель – д.б.н., профессор Хисматуллина З.Р.**

Уфимский университет науки и технологий, г. Уфа, Российская федерация

Целью данного исследования явилось определение уровня экспрессии CART-белка в структурах миндалевидного тела мозга крыс линии DAT-KO. Был определен уровень экспрессии белка в МТ мозга у линии DAT-KO (опытная группа) и проведен сравнительный анализ экспрессии CART – пептида с крысами контрольной линии Wistar. Результаты исследования показали, что концентрация нейропептида достоверно выше у DAT-KO исключительно в центральном ядре - Ce ( $p \leq 0,05$ ), что доказывает определение, что центральное ядро МТ является основной фигурой, регулирующей механизмы большинства важнейших витальных функций организма, включая дыхание, работу сердца и нейромедиаторную систем, а также подтверждает гипотезу о нейропротективном свойстве CART – пептида.

**Ключевые слова:** CART – пептид, амигдала, центральное ядро, крысы линии DAT-KO.

Khismatullina Z.R., Sadrtidinova I.I., Fedorova A.M., Fairushina A.I., Davletbaeva A.R.  
**EXPRESSION LEVEL OF CART-PEPTIDE IN THE AMYGDALA NUCLEIS IN THE  
BRAIN OF RATS**

**Scientific Advisor – Doctor of Biological Sciences, Professor Z.R. Khismatullina**

Ufa University of Science and Technology, Ufa, Russia

The purpose of this study was to determine the level of expression of CART protein in the structures of the amygdala of the brain of rats of the DAT-KO line. The level of protein expression in the brain MT in the DAT-KO line (experimental group) was determined and a comparative analysis of the expression of CART – peptide with rats of the Wistar control line was carried out. The results of the study showed that the concentration of neuropeptide was significantly higher in DAT-KO exclusively in the central nucleus ( $p < 0.05$ ), which proves the determination that the central core of MT is the main figure regulating the mechanisms of most important vital functions of the body, including respiration, heart function and neurotransmitter systems, and also confirms the hypothesis of neuroprotective the property of CART – peptide.

**Key words:** CART – peptide, amygdala, central nucleus, rats of the DAT-KO line.

CART - cocaine and amphetamine regulate transcript или кокаин-амфетаминовый регулируемый транскрипт – это пептидный нейротрансмиттер, который участвует во многих процессах регуляции организма, в том числе и в участии нейропептида в нейрогенезе, регенерации и бластоогенезе [4].

Миндалевидное тело (амигдала) мозга (МТ), поскольку оно является нейроэндокринным центром, регулирующим деятельность множества физиологических процессов (работа внутренних органов, репродуктивной функции, адаптивного и пищевого поведения) тесно связано с локализацией и функцией CART-пептида.

Амигдала играет значимую роль в поведении страха и стрессовых реакциях в комплексе с кортикостероидами, что позволяет рассматривать нейропептид как элемент и эндокринной системы [1].

В нервной ткани амигдалы обнаружено большое скопление различных ферментов и нейромедиаторов, включая дофамин и CART-пептид, регулирующих деятельность базовых систем организма. Однако, многие нейродегенеративные заболевания, такие как Синдром дефицита внимания и гиперактивности, Синдром Паркинсона, шизофрения и другие, имеют тенденцию к омоложению, чем обращают на себя большое внимание со стороны медицины, в то время как отделы МТ мозга все еще до конца не изучены морфологически в контексте нейропептида CART. Недавние исследования сообщали о нейропротективной функции белка при различных повреждениях лимбической системы [5]. Исследование МТ при помощи генетической модели животных с патологией дофаминергической системы (объект исследования) касательно этого свойства нейропептида, представляется новой ступенью развития знаний о механизмах деятельности амигдалы при нейродегенеративных заболеваниях.

Несмотря на известную структуру и многие известные функции пептидов CART, нейрональные мишени для пептидов CART до конца не изучены. Основная проблема заключается в том, что рецепторы (или партнеры по взаимодействию для пептидов CART) не определены анатомически. Причинами являются высокий уровень неспецифического связывания и низкоаффинный сайт связывания [4].

### **Цель работы**

Целью исследования явилось определение уровня экспрессии CART-белка в структурах миндалевидного тела мозга крыс линии DAT-KO.

### **Материал и методы**

В работе представлены результаты исследований, которые проведены на крысах линии Wistar (контрольная группа), линии DAT-KO (экспериментальная группа), которые характеризуются отсутствием гена обратного переносчика дофамина (SLC6A3), что проявляется в избыточной концентрации молекул дофамина в межклеточном пространстве, крайне низкой концентрации его внутри клетки и, в общей сложности, истощении пула дофамина в организме. Выборки животных составляли 7 половозрелых особей контрольной группы и 5 особей экспериментальной группы, которые включали в себя 45 и 36 повторности снимков МТ соответственно.

Работы выполнялись в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 года) и приказу МЗ РФ от 19.06.2003 № 267. До начала экспериментов животных содержали в вентилируемом помещении при температуре 20° С, на стандартном пищевом рационе вивария кафедры физиологии и общей биологии института природы и человека Уфимского университета науки и технологий при свободном доступе к

пище и воде. Проведено генотипирование животных – процесс, позволяющий выявлять характерные различия генотипов особей, при котором изучаемый генотип сравнивается с контрольным образцом или генотипом другой особи. Так, при помощи этого метода можно выяснить, какой генотип имеют экспериментальные животные линии DAT: гомозиготу по заданной мутации DAT-KO, гетерозиготу DAT-HET или же дикий тип.

При помощи иммуногистохимического анализа была достигнута визуализация нейропептида CART в нервной ткани МТ. Посредством морфологического метода при использовании микроскопа и сканнера компании 3DHISTECH Ltd были получены изображения необходимых областей МТ мозга, что позволило провести аналитическую оценку локализации CART-ергических нейронов. Рассматривалось расположение ядер кортико-медиальной группировки, в которую входили переднее кортикальное ядро (Coa<sub>1</sub>), передняя амигдаллярная область (AAA), ядро латерального обонятельного тракта (NTOL), а также медиальное ядро (Me), центральное ядро (Ce), переднее кортикальное ядро (Coa<sub>2</sub>) и ядро ложа добавочного обонятельного тракта (BAOT);

Программа Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health) позволила провести количественную оценку оптической плотности иммунореактивного вещества на стандартной площади захвата снимка для каждого ядра каждой линии животных, таким образом, визуально получив представление о концентрации нейропептида в различных областях МТ мозга крыс и соответственно, выявить характер экспрессии CART – пептида, характер экспрессии белка измерялся в процентном соотношении площади окрашенной части ткани к общей площади снимка.

### **Результаты и обсуждение**

На ростральном уровне при сравнительном анализе структур не было выявлено достоверно значимых различий, каждая из структур МТ имела схожую картину и характер распределения иммунореактивных нейронов и их волокон. Средние значения оптической плотности не превышали 50 % в толще структуры, тогда как на молекулярном уровне ее значение достигало практически 2/3 общей площади изображения. Высокий уровень концентрации нейропептида в молекулярных зонах может говорить о скоплении белка именно в отростках нервных клеток, которые предполагают проекции в другие зоны, проявляясь как обширная нейронная сеть.

Каудальный уровень переднего отдела характеризовался наличием статистически значимых различий в центральном ядре. Особенно высокая концентрация CART-волокон содержались в центральном ядре у крыс линии DAT-KO, которая превышала 65% окрашивания ткани. Предположительно поэтому, данный ядерный центр является наиболее значимой структурой во всем МТ, поскольку через него проходят прямые проекции. Так,

наиболее важная связь центрального ядра со стволом мозга, который участвует в регуляции висцеральных функций. Продолговатый мозг, входящий в состав ствола мозга, регулирует деятельность сердечно-сосудистой системы, работу желудочно-кишечного тракта и синтез психических процессов, таких как память, мышление и внимание. Неслучайно сообщались данные о нейропротективной функции CART-пептида при ишемической болезни сердца [17], анорексии и разрушении спинного мозга. Необходимо провести связь между обширной деятельностью мозга и морфологией центрального ядра крыс линии DAT-KO, как проявление нейропротекции в случае с патологией структур лимбической системы, затрагивающей регуляцию большинства важнейших функций, таких как память и работа нейромедиаторной системы (включая двигательную функцию, мотивационную).

Так, на рисунке 1 показана разница между значениями оптической плотности нейронов, содержащих CART-пептид в центральном ядре крыс линий Вистар и DAT-KO. Оптическая плотность позволяет охарактеризовать степень иммунореактивности нейронов. Для удобства интерпретации, ниже приведены средние значения оптической плотности посредством графика Plot в программе Statistica 12. Среднее значение оптической плотности в центральном ядре для линии DAT-KO составляет 66,8 %, тогда как для линии Wistar – 51,7%, что имеет достоверные различия при  $p \leq 0,05$ .

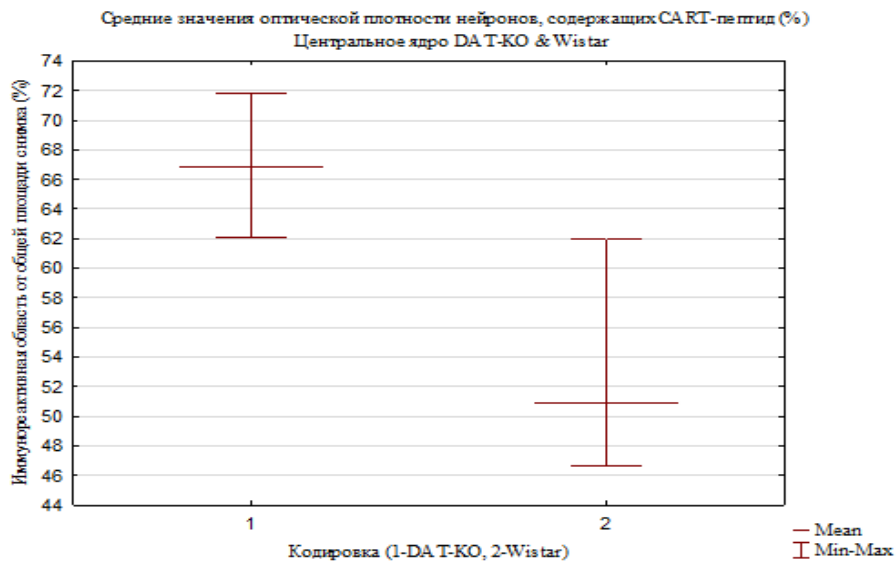


Рис.1. Средние значения оптической плотности CART- содержащих нейронов в центральном ядре

Мы определили уровень экспрессии белка в МТ мозга у линии DAT-KO и провели сравнительный анализ экспрессии CART – пептида с крысами контрольной линии. Результаты исследования показали, что концентрация нейропептида достоверно выше у DAT-KO исключительно в центральном ядре - Ce ( $p \leq 0,05$ ), что доказывает определение, что

центральное ядро МТ является основной фигурой, регулирующей механизмы большинства важнейших витальных функций организма, включая дыхание, работу сердца и нейромедиаторную систем, а также подтверждает гипотезу о нейропротективном свойстве CART – пептида.

### **Заключение и выводы**

Таким образом, кокаин-амфетаминовый транскрипт CART – это полифункциональный нейропептид, который участвует в стрессовом возбуждении, проявляясь как компенсаторная реакция, и может регулировать в том числе локомоторную активность в определенных ситуациях. Основной функцией пептида в прилежащем ядре считается местный гомеостаз, поскольку CART ингибирует эффекты экзогенных стимуляторов посредством подавления передачи сигналов дофаминовых рецепторов, усиленных стимуляторами, кальмодулин-зависимой передачи сигналов и экспрессию важнейших факторов транскрипции. Уровни мРНК CART экспериментально изменяются после приема психостимуляторов (гомеостатическая функция пептида), экзогенного лептина, липополисахаридов (известно, что ЛПС вызывают анорексию путем активации воспалительных цитокинов) и форсколина, как элемента, доказывающего, что регуляция мРНК CART происходит через путь вторичных посредников сигнальной системы клеток цАМФ/РКА/CREB *in vivo*. Другие препараты, включая никотин, алкоголь, опиоидные наркотики, и, вероятно кофеин, также могут влиять на уровни мРНК CART.

Несмотря на большое количество исследований, посвященных CART пептиду, его физиологическим функциям и генетике, общее представление о CART все же остается упрощенным. До сих пор не выявлены точные рецепторы к CART, не найдены специфические антагонисты и агонисты (кроме собственно кокаина или амфетамина) хотя работы в этом направлении продолжаются. Благодаря посттрансляционному процессингу в клетке сами пептиды CART существуют в виде отдельных фрагментов, что дополнительно усложняет их идентификацию [7]. По всем эти причинам понимание CART остается схематичным, но дает тем самым обширное поле для исследований в различных областях науки.

Миндалевидное тело представляет собой важнейшую эмоцигенную структуру головного мозга. Участвуя в формировании эмоций и мотивационно-поведенческих реакций, МТ неизбежно должно принимать участие в их вегетативных проявлениях. Например, доказано, что в развитии гипертензии, вызванной длительным стрессом, не последнюю роль играет центральное ядро МТ. Оно имеет проекции в ядра гипоталамуса и структуры рострального продолговатого мозга. Данные связи позволяют предполагать, что амигдала принимает участие в регуляции некоторых важнейших процессах, таких как дыхание,

сердечный ритм и др. [3]. Также известно, что центральное ядро получает проекции моноамин- и холинергических систем (за счет наличия большого количества кортиколиберина [6]) мозга и содержит ГАМК-ергические нейроны, таким образом участвуя в агрессивном, пищевом или оборонительном поведении [2].

За последние десятилетия было обнаружено наличие CART-пептида в амигдаллярной системе, как элемента, регулирующего деятельность дофаминергической системы. Посредством иммуногистохимического анализа реакция на данный нейропептид была зафиксирована в дофаминергических нейронах, иннервирующих ядра миндалевидного комплекса. Изучение участия CART-пептида в регуляции деятельности лимбической системы в настоящее время представляется возможным при помощи моделей животных DAT-KO, как моделей дегенерацией нервной системы. Нами были исследованы некоторые ядра МТ в сравнительном анализе с контролем и выявлена достоверно повышенная концентрация нейропептида в центральном ядре ( $U=0,019$  при  $p \leq 0,05$ ), как важнейшего передатчика прямых проекций области, регулирующие витальные функции организма.

Новые данные о понимании механизмов работы этого нейропептида как нейротрансмиттера, позволят применять эти знания в превентивной медицине или дизайне лекарственных препаратов, в первую очередь, при нейродегенеративных заболеваниях, при лечении наркомании, болезни Паркинсона, Синдроме дефицита внимания и гиперактивности, а также при заболеваниях, связанных с энергетическим обменом, в которые входят расстройства пищевого поведения – анорексия, ожирение и в том числе сахарный диабет.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ахмадеев А.В. Локализация CART-пептид содержащих нейронов в миндалевидном комплексе мозга крысы // Успехи современного естествознания. 2009. № 3. С. 26-28.
2. Ахмадеев А.В. Калимуллина Л.Б. Структурно-функциональная организация карт пептид экспрессирующих нейронов миндалевидного тела мозга // Оригинальные исследования. 2014. № 4. С. 11-14.
3. Маркин В.А. Роль ядер миндалевидного комплекса в регуляции деятельности сердечно-сосудистой системы на фоне развития стресс реакции у крыс / В.А. Маркин, Е.И. Бакулина, И.Д. Романова, Р.А. Зайнулин // Вестник молодых ученых и специалистов Самарского университета. 2019. №2. С. 39-52.
4. Романова И.В. Роль CART и AGRP в модуляции функциональной активности дофаминергических нейронов мозга: Автореф. И.В. Романовой, дис. д-ра биол. наук. – С. Петербург. 2012. – 42 с.
5. Романова И.В. Участие CART-пептида в репаративных процессах в головном мозге взрослой крысы после фокальной ишемии / И.В. Романова, А.Л. Михрина, Е.В. Михайлова, Л.О. Савельева // Гены & Клетки. 2017. №3. С. 208.

6. Шабанов П.В. Лебедев А.А. Морозов В.И. Участие рецепторов орексина структур расширенной миндалины в подкрепляющих эффектах спонтанной и активированной самостимуляции латерального гипоталамуса // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2019. №4. С. 5-18.
7. Janak PH, Tye KM. From circuits to behaviour in the amygdala // Nature. 2015. №517. P. 284-292.

***Сведения об авторах статьи:***

**Хисматуллина Зухра Рашидовна** – д.б.н, доцент ФГБОУ ВО Уфимский университет науки и технологий, г. Уфа

**Садртдинова Индира Илдаровна** - к.б.н., доцент, ФГБОУ ВО Уфимский университет науки и технологий, г. Уфа, e-mail: [indira.ildarovna@mail.ru](mailto:indira.ildarovna@mail.ru)

**Федорова Альбина Мубаракновна** - к.б.н., доцент, ФГБОУ ВО Уфимский университет науки и технологий, г. Уфа, e-mail: [albinamfedorova@mail.ru](mailto:albinamfedorova@mail.ru)

**Давлетбаева Айгуль Рамильевна** – ФГБОУ ВО Уфимский университет науки и технологий, г. Уфа