

А.В. Ахмадеев

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА ПОЛА И НЕОНАТАЛЬНОЙ АНДРОГЕНИЗАЦИИ НА ДЕНДРОАРХИТЕКТонику НЕЙРОНОВ ДОРСОМЕДИАЛЬНОГО ЯДРА МИНДАЛЕВИДНОГО ТЕЛА МОЗГА*

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

Целью работы являлось выявление половых различий в дендроархитектонике нейронов дорсомедиального ядра миндалевидного тела и роли андрогенов в их формировании в периоде половой дифференциации мозга крыс. С использованием метода Гольджи показано, что количественные характеристики длинноаксонных редковетвистых нейронов всех классов — нейробластоформных, короткодendrитных и ретикулярных — отражают влияние пола. В частности, установлено, что длинноаксонные редковетвистые нейроны обладают большим числом ветвящихся первичных дендритов и большей общей длиной дендритов у взрослых самцов по сравнению с самками. У взрослых самок, неонатально андрогенизированных введением тестостерона пропионата в дозе 1250 мкг, на 5-е сутки после рождения, отмечены отличия характеристик нейронов от таковых у нормальных самок, причем они были еще более выраженными, чем у самцов.

Ключевые слова: мозг, миндалевидное тело, дорсомедиальное ядро, нейроны, дендроархитектоника.

Дорсомедиальное ядро (ДМЯ) находится в заднем отделе миндалевидного тела (МТ) и входит в состав палеоамигдалы [3]. В нем выявлены морфометрические, гистофизиологические и биохимические половые различия [2]. Установлено, что половой диморфизм (ПД) ДМЯ предопределен его участием в половой дифференциации мозга (ПДМ). Это подтверждено обнаружением на территории МТ активности ферментных систем, служащих маркерами нервных структур, на которые воздействуют половые стероиды в периоде ПДМ, определяя их метаболизм по ароматазному или редуктазному пути [7, 8]. Однако вопрос — существуют ли явления ПД в нейронной организации этого ядра — остается нерешенным.

Цель данной работы — выявление половых различий в дендроархитектонике нейронов ДМЯ и роли андрогенов в их формировании в периоде ПДМ.

Материал и методы. Исследования проведены на 50 половозрелых крысах линии Вистар, содержавшихся в условиях вивария при свободном доступе к корму и воде. 10 самкам на 5-е сутки после рождения однократно был введен тестостерона пропионат (ТП) в дозе 1250 мкг. Всех животных (20 самок, 20 самцов и 10 неонатально андрогенизированных самок) под эфирным наркозом декапитировали в возрасте 9 мес. Эксперименты проведены с соблюдением правил работы с лабораторными животными. Головной мозг был обработан по методу Гольджи. Для этого его после фиксации в жидкости Мюллера и дополнительной фиксации в смеси бихромата калия и четырехоксида осмия выдерживали в 1% растворе нитрата серебра 10 сут в термостате при 37°C, после чего обезвоживали в нескольких порциях этанола возрастающих концентраций, заливали в целлоидин и готовили фронтальные срезы толщиной 100 мкм.

Идентификация нейронов была проведена на основании классификации Т.А. Леонтович [5]. На рисунках нейронов ДМЯ, выполненных при увеличении в 200 раз, подсчитывали число первичных дендритов (d), число свобод-

ных концов всех дендритов (Bd), число всех точек ветвления дендритов нейрона (Gd), измеряли общую длину дендритов нейрона (Ld), определяли площадь дендритного поля (Sda), длину самого длинного дендрита (C) и подсчитывали число его свободных концов и точек ветвления (Bdc, Gc). Также измеряли длину самого разветвленного дендрита (Cr) и подсчитывали число свободных его концов и точек ветвления (Bdr, Cr). У всех нейронов определяли суммарную величину длины всех концевых веточек дендритов (Ldt). Использовали один производный параметр — отношение числа свободных концов дендритов нейронов к числу первичных дендритов (Bd/d). Величины, полученные при работе с курвиметром и планиметром, выражали в условных единицах. Статистическую обработку выполняли с использованием пакета программ «Statistica 5.5». Для оценки значимости различий цифровых данных использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты исследования. В составе ДМЯ как у самок, так и у самцов выявлены все виды длинноаксонных редковетвистых нейронов — нейробластоформные, короткодendrитные и ретикулярные.

Нейробластоформные нейроны у самок хорошо выявлялись тогда, когда материал для исследования был взят на стадии эструса. При этом часто обнаруживались их группы из 5–6 клеток. Нейроны с округлым или овальным телом имели 1 или 2 дендрита неравной длины, отходящих от тела в противоположные стороны. Лишь в одной клетке удалось увидеть 4 дендрита, идущих от различных частей поверхности тела. Количество первичных дендритов у самцов не превышало двух, но определялось ветвление одного из них с формированием 3 свободных концов. Анализ количественных характеристик дендритов нейробластоформных нейронов у самцов и самок крыс выявил статистически значимое увеличение числа свободных концов дендритов у самцов крыс. У неонатально андрогенизированных крыс дендриты нейробластоформных

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-1643.2005.4

Количественные характеристики дендритов длинноаксонных редковетвистых нейронов дорсомедиального ядра миндалевидного тела мозга у самцов, самок и неонатально андрогенизированных самок крыс линии Вистар ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Объект исследования	Параметры	Самцы (n=20)	Самки (n=20)	Андрогенизированные самки (n=10)
Дендриты нейробластоформных нейронов	d	2,0±0,4	2,28±0,28	2,60±0,24
	Bd	3,40±0,04	2,28±0,28*	4,0±0,4°
	Ld	7,2±1,2	6,0±0,6	10,0±0,7°
Дендриты короткодendrитных нейронов	d	3,2±0,4	2,40±0,24	3,0±0,3
	Bd	5,40±0,24	3,6±0,4*	6,8±0,9°
	Ld	9,8±1,0	6,8±1,0*	11,0±0,7°
	Sda	1280±60	1050±40*	1340±20°
	Gd	2,2±0,4	1,20±0,20	3,6±0,7°
	C	8,4±1,4	4,2±0,4**	6,6±0,8
	Gc	1,8±0,4	1,6±0,6	1,20±0,20
	Bdc	2,8±0,4	2,00±0,010	2,20±0,20
	Cr	8,4±1,4	4,2±0,4**	6,4±0,7
	Gr	1,8±0,4	1,6±0,6	1,8±0,4
	Bdr	2,8±0,4	2,00±0,010	2,8±0,4
	Ldt	8,8±1,0	3,8±0,6**	13,6±2,2°
	Bd/d	1,78±0,22	1,50±0,06	2,3±0,3
	d	4,0±0,4	3,8±0,6	4,2±0,4
Дендриты ретикулярных нейронов	Bd	10,4±0,4	8,6±0,9	9,6±0,9
	Ld	30,4±1,2	20,2±1,6***	30,8±2,7°
	Sda	4750±40	2790±40***	4760±34°
	Gd	6,2±0,5	4,4±0,5	5,4±0,7
	C	14,6±0,5	10,6±1,3*	16,0±1,4°
	Gc	3,2±0,5	2,40±0,24	2,6±0,4
	Bdc	4,4±0,5	3,40±0,24	4,0±0,3
	Cr	13,4±0,7	8,4±1,2*	16,8±1,6°
	Gr	3,6±0,4	2,40±0,24	2,80±0,20
	Bdr	4,4±0,5	3,20±0,20	3,8±0,4
	Ldt	24,2±0,8	16,0±1,9*	21,6±1,5
	Bd/d	2,78±0,20	2,4±0,3	2,3±1,1

Примечание. Обозначения параметров см. в разделе «Материал и методы». Различия значимы по сравнению с тем же показателем у самцов: * при P<0,05; ** при P<0,01; *** при P<0,001; различия значимы по сравнению с показателями у контрольных самок: ° при P<0,05; °° при P<0,01; °°° при P<0,001.

нейронов становились не только более разветвленными, но и более длинными (таблица).

Короткодendrитные нейроны у самок имели до трех первичных дендритов, из которых 1 был более разветвленным. Тела нейронов были овальной и полигональной формы, дендриты закручены, имели волнистый ход и на их поверхности присутствовали шипики. У самцов число первичных дендритов достигало четырех, при этом, как и у самок, 1 из них был более разветвленным. Статистический анализ количественных характеристик дендритов показал, что короткодendrитные нейроны различаются по большему числу параметров, чем нейробластоформные (см. таблицу). У самцов больше свободных концов дендритов; больше общая длина дендритов и площадь дендритного поля, а также длина концевых веточек дендритов. Влияние ТП на мозг крыс в критический период ПДМ проявляется у неонатально андрогенизированных самок не только увеличением ветвления дендритов (Bd, P<0,05; Gd, P<0,05), но и их удлинением, следствием чего явилось увеличение площади дендритного поля.

Ретикулярные нейроны имели крупные тела, от 2 до 5 первичных мощных дендритов, при этом переход от тела к началу дендрита был плавным, и это создавало трудность при определении их границы. Дендриты распространялись на далекие расстояния от тела нейронов, как правило, разветвляясь на концах. Для отдельных дендритов была характерна закрученность. На поверхности дендритов определялись палочковидные немногочисленные шипики, плотность их расположения была больше у самцов. Нейроны имели плохо выявляемые аксоны, удавалось обнаружить лишь их начальные сегменты. Сравнение количественных характеристик дендритов ретикулярных нейронов показало, что основные половые различия ограничивались большей длиной дендритов (Ld) у самцов, при этом число точек ветвления и число свободных концов значимо не изменялись.

У неонатально андрогенизированных крыс в ретикулярных нейронах определялась та же закономерность — изменения количественных характеристик отражали увеличение длины дендритов, при этом различия касались как самого длинного дендрита,

так и самого разветвленного. У ретикулярных нейронов самый длинный дендрит не всегда был самым разветвленным, как это имело место у короткодендритных нейронов.

Обсуждение полученных данных. Впервые сообщение о наличии в составе МТ зоны ПД ДМЯ, в частности, о различиях реактивных изменений его нейронов в ответ на гонадэктомию у самцов и самок крыс, было опубликовано в 1982 г. [1]; в 1986 г. это ядро было описано как зона ПД на основании половых различий его морфометрических характеристик [4]. Только в 1992 г. эта зона ПД была заново открыта группой, возглавляемой патриархом исследования ПД в нервной системе R.Gorski [17]. В последние годы интерес к ДМЯ резко возрос, так как показано его участие в регуляции многих нейроэндокринных функций, включая и модуляцию деятельности репродуктивных центров гипоталамуса [13–15, 25, 29].

Приведенные выше данные показывают, что ДМЯ состоит из длинноаксонных редковетвистых нейронов, дендроархитектоника которых имеет особенности, предопределенные фактором пола и neonатальной андрогенизацией в периоде ПДМ. Морфогенетический эффект андрогенов проявляется увеличением ветвления дендритов у нейробластоформных и короткодендритных нейронов, а также удлинением дендритов ретикулярных нейронов. Установлено, что нарастание длины дендритов происходит за счет их концевых ветвей, что подтверждает участие в реализации гонотропного влияния половых стероидов цитоскелета клетки, в частности, микротубулин-ассоциированного протеина-2 (MAP-2) [20].

Исследования, посвященные изучению половых различий в нейронной организации структур головного мозга, единичны. Известно, что эти различия имеют место у крыс в преоптической области [16], нейронах зубчатой извилины гиппокампа [21], а также в ядре, обладающем ПД, у канареек [28], вентромедиальном и аркуатном ядрах гипоталамической области [24].

В последнее время интенсивно исследуется механизм влияния половых стероидов на нейрогенез гиппокампальной формации. Показано, что в культуре ткани эстрадиол ускоряет интенсивность роста нейронов и темпы формирования аксона, дендритов, их число и разветвленность [11]. При этом 17β -эстрадиол оказывает свое влияние через рецептор эстрогенов типа α ($ER\alpha$), экспрессия которого в нейронах зубчатой извилины происходит параллельно с экспрессией маркеров пролиферирующих нейронов Ki-67 и мигрирующих и дифференцирующихся клеток — даблкортина [19]. Известно, что экспрессия рецепторов эстрогенов в преоптической области, гипоталамусе и медиальном ядре МТ осуществляется во время внутриутробного развития крыс [23].

Концептуальная модель андрогензависимой ПДМ [7,9] предполагает, что этот процесс начинается с ароматизации андрогенных стероидов, т. е. их превращения в эстрогены. Далее часть эстрогенов метаболизируются в катехолэстрогены. Именно они опосредуют действие тестостерона на содержание норадреналина в гипоталамусе в раннем постнаталь-

ном периоде, с которым, в свою очередь, связывают развитие ПДМ по мужскому типу. Этот эффект осуществляется через угнетение метаболической инактивации катехоламинов при участии катехол-О-метилтрансферазы [6, 7].

Экспрессия ароматазы в мозгу плодов и новорожденных животных индуцируется андрогенами, обладающими гонотропным свойством [10, 18, 27]. Определение мРНК ароматазы в развивающемся мозгу крыс методом гибридизации *in situ* [22] показало, что на 18–20-е сутки внутриутробного развития она обнаруживалась в преоптической области, гипоталамусе и лимбических структурах, причем содержание мРНК не зависело от половой принадлежности. Эти данные подтвердили ранее полученные результаты исследования активности ароматазы у плодов крыс, извлеченных на 21-е сутки беременности [8]. Со 2-х суток постнатального развития начинали выявляться половые различия в активности ароматазы в указанных выше областях мозга, которые исчезали в медиальном ядре МТ на 15-е сутки.

В тканях головного мозга ген ароматазы, катализирующей конверсию тестостерона в эстрадиол, обнаруживается исключительно в нейронах. Преобразование тестостерона в его активный метаболит, дигидротестостерон, протекает в нейронах головного мозга более интенсивно, чем в клетках глии [12].

В перестройках дендритов, происходящих под влиянием андрогенов, могли участвовать и астроциты, так как известно их участие в формировании отростков нейронов. В связи с этим следует отметить исследования [26], которые выявили ПД в экспрессии кислого фибриллярного белка в астроцитах заднего отдела МТ, т. е. в той же части МТ, которая была изучена в настоящей работе. Полагают, что в период ПДМ морфогенетическое влияние андрогена или его метаболитов может приводить к половой дифференциации глии [24].

ЛИТЕРАТУРА

1. Акмаев И.Г. и Калимуллина Л.Б. Миндалевидный комплекс гонадэктомированных крыс, реакция нейронов кортико-медиального отдела. Арх. анат., 1982, т. 83, вып. 12, с. 48–59.
2. Акмаев И.Г. и Калимуллина Л.Б. Миндалевидный комплекс мозга: функциональная морфология и нейроэндокринология. М., Наука, 1993.
3. Ахмадеев А.В. и Калимуллина Л.Б. Древняя амигдала: citoархитектоника, организация и цитологические характеристики нейронов. Морфология, 2004, т. 126, вып. 5, с. 15–19.
4. Калимуллина Л.Б. Зоны полового диморфизма в кортико-медиальной группе ядер миндалевидного комплекса. Арх. анат., 1986, т. 87, вып. 9, с. 22–27.
5. Леонтович Т.А. Нейронная организация подкорковых образований переднего мозга. М., Медицина, 1978.
6. Носенко Н.Д. Нейроэндокринные эффекты неонатального воздействия ингибитора катехол-О-метилтрансферазы и половых стероидов. Пробл. эндокринол., 1989, т. 35, №5, с. 64–68.
7. Резников А.Г. Половые гормоны и дифференциация мозга. Киев, Наук. думка, 1982.

8. Резников А.Г., Акмаев И.Г., Фиделина О.В. и др. Метаболизм тестостерона в дискретных областях мозга плодов крыс. Пробл. эндокринолог., 1990, т. 36, № 3, с. 57–61.
9. Резников А.Г., Пишак В.П., Носенко Н.Д. и др. Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология. Черновцы, Мед-академия, 2004.
10. Смирнов А.Н. Мембранная локализация ядерных рецепторов: парадокс с важными последствиями. Рос. физиол. журн., 2005, т. 91, № 1, с. 31–45.
11. Audesirk T., Kern C. and Audesirk G. β -estradiol influences differentiation of hippocampal neurons in vitro through an estrogen receptor-mediated process. *Neuroscience*, 2003, v. 121, № 4, p. 927–934.
12. Celotti F., Melcangi R., Negri-Cesi P. and Poletti A. Testosterone metabolism in brain cells and membranes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1991, v. 40, p. 673–678.
13. Choi G., Dong H., Murphy A. et al. Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron*, 2005, v. 46, № 4, p. 647–660.
14. Cooke B., Breedlove S.M. and Jordan C. Both estrogen receptors and androgen receptors contribute to testosterone-induced changes in the morphology of the medial amygdala and sexual arousal in male rats. *Horm. Beh.*, 2003, v. 43, № 2, p. 336–346.
15. Cushing B., Razzoli M., Murphy A. et al. Intraspecific variation in estrogen receptor alpha and the expression of male socio-sexual behavior in two populations of prairie voles. *Brain Res.*, 2004, v. 1016, № 2, p. 247–254.
16. Hammer R. and Jacobson C. Sex difference in dendritic development of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the rat. *Int. J. Develop. Neurosci.*, 1984, v. 2, № 1, p. 77–85.
17. Hines M., Allen L. and Gorski R. Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain Res.*, 1992, v. 579, p. 321–326.
18. Hutchison J., Beyer C., Hutchison R. and Wozniak A. Sexual dimorphism in the developmental regulation of brain aromatase. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 1995, v. 53, p. 307–313.
19. Isgor C. and Watson S. Estrogen receptor α and β mRNA expressions by proliferating and differentiating cells in the adult rat dentate gyrus and subventricular zone. *Neuroscience*, 2005, v. 134, № 3, p. 847–856.
20. Iwata M., Muneoka K., Shirayama Y. et al. 2 (MAP-2), in rats neonatally treated neurosteroids, pregnenolone and dehydroepiandrosterone (DHEA). *Neurosci. Lett.*, 2005, v. 386, № 3, p. 145–149.
21. Juraska J., Fitsh J., Hederson C. and Rivers N. Sex differences in the dendritic branching of dentate cells following differential experience. *Brain Res.*, 1985, v. 333, № 1, p. 73–80.
22. Lauber M., Sarasin A. and Lichtensteiger W. Transient sex differences of aromatase (CYP 19) mRNA expression in the developing rat brain. *Endocrinology*, 1997, v. 66, p. 173–180.
23. Mann Ph. and Babb J. Neural steroid hormone receptor gene expression in pregnant rats. *Mol. Brain Res.*, 2005, v. 142, № 1, p. 39–46.
24. Mong J.A., Glaser E. and McCarthy M. Gonadal steroids promote glial differentiation and alter neuronal morphology in the developing hypothalamus in a regionally specific manner. *J. Neurosci.*, 1999, v. 4, p. 1464–1472.
25. Osterlund M. and Hurd Y. Estrogen receptors in the human forebrain and the relation to neuropsychiatric disorders. *Prog. Neurobiol.*, 2001, v. 64, № 3, p. 251–267.
26. Rasia Filho A.A., dos Santos P., Gehlen G. and Achaval M. Glial fibrillary acidic protein immunodetection and immunoreactivity in the anterior and posterior medial amygdala of male and female rats. *Brain Res. Bull.*, 2002, v. 58, № 1, p. 67–75.
27. Takahashi Y. and Yamanaka H. The regulation system of brain aromatase activity: Distribution and changes with age of aromatase in rat brain. *Folia Endocrinol.*, 1987, v. 63, p. 862–869.
28. Voogd T.de and Nottebohm F. Gonadal hormones induce dendritic Growth in the adult avian brain. *Science*, 1981, v. 214, № 4517, p. 202–204.
29. Westenbroek C., Den Boer J. and Ter Horst G. Gender-specific effects of social housing on chronic stress-induced limbic FOS expression. *Neuroscience*, 2003, v. 121, № 1, p. 189–199.

Поступила в редакцию 25.12.2005 г.

EFFECT OF GENDER AND NEONATAL ANDROGENIZATION ON DENDROARCHITECTONICS OF NEURONS IN DORSOMEDIAL NUCLEUS OF AMYGDALA

A.V. Akhmedeyev

The aim of this study was to establish gender-associated differences in dendroarchitectonics of neurons in dorsomedial nucleus of amygdala and the role of androgens in their formation during the period of sexual differentiation of the brain. Using Golgi method, it was demonstrated that the quantitative characteristics of long-axon sparsely branched neurons of all classes – neuroblastiform, short-dendrite and reticular – reflected the influence of gender. Specifically, it was detected that long-axon sparsely branched neurons had more branching primary dendrites and greater total dendrite length in adult males as compared to females. In adult females, androgenized neonatally by injection of 1250 mg of testosterone propionate on their postnatal day 5, the neuronal characteristics were different from those in normal females, and these differences were even more pronounced in comparison with males.

Key words: *brain, amygdala, dorsomedial nucleus, neurons, dendroarchitectonics.*

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