

# ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© А.В. Ахмадеев, Л.Б. Калимуллина, 2006  
УДК 611.813.14.018:577.86.599.323.4

*А.В. Ахмадеев и Л.Б. Калимуллина*

## ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ НЕЙРОНОВ МИНДАЛЕВИДНОГО ТЕЛА МОЗГА У САМЦОВ И САМОК КРЫС НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ЭСТРАЛЬНОГО ЦИКЛА \*

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

Изучали ультраструктурные особенности нейроэндокринных нейронов дорсомедиального ядра (ДМЯ) миндалевидного тела мозга — одной из основных зон полового диморфизма — у 12 крыс линии Вистар с массой тела 250–300 г — у 3 самцов, а также у 9 самок, находящихся на различных стадиях эстрального цикла. У каждого животного, на основании ультраструктурных характеристик, проведен анализ функционального состояния в среднем 50 нейронов ДМЯ. Предложена морфофункциональная классификация, отражающая явления гормонально-зависимых колебаний активности нейронов. Установлено, что нейроны ДМЯ находятся в различных структурно-функциональных состояниях, которые могут быть классифицированы как состояния покоя, умеренной активности, повышенной активности, напряжения (пика активности), возврата в исходное состояние и апоптоза. На стадии эструса выявлено преобладание нейронов в состоянии повышенной активности (40% от общего числа клеток) и пика активности (26%). На стадии метэструса преобладают нейроны в состоянии снижения активности по первому типу (с увеличением содержания гетерохроматина в ядре — 30% клеток); в пике активности и в состоянии повышенной активности находятся 25% и 20% клеток соответственно. В диэструсе нейроны в состоянии покоя, умеренной и повышенной активности, пика активности и снижения активности по первому типу представлены примерно в одинаковых пропорциях (18%, 21%, 18%, 20% и 16% соответственно). У самцов в состоянии повышенной активности и пика активности находятся 35% и 22% нейронов соответственно. Гибель нейронов отмечена только у самцов.

**Ключевые слова:** миндалевидное тело мозга, дорсомедиальное ядро, нейроэндокринные нейроны, половой диморфизм, эстральный цикл.

Ранее было дано описание нейроэндокринных нейронов дорсомедиального ядра (ДМЯ) миндалевидного тела мозга, впервые выявленных нами на его территории, а также приведены сведения о происходящих в них перестройках между стадиями эструса и метэструса эстрального цикла (ЭЦ) [1, 2, 7, 13].

Цель данной работы — электронно-микроскопическая характеристика нейроэндокринных нейронов ДМЯ на основе анализа данных, полученных при их исследовании у самцов и самок крыс на различных стадиях ЭЦ.

**Материал и методы.** Исследования проведены на половозрелых белых крысах линии Вистар массой 250–300 г. Материал для электронно-микроскопического исследования взят у 12 крыс (по 3 самки на стадиях эструса, метэструса и диэструса, а также у 3 самцов) под контролем лупы МБС-9 с помощью специального устройства (патент РФ № 1679246). Стадии эстрального цикла определяли по картине влажных мазков. Небольшие кусочки мозга, содержащие ДМЯ, фиксировали методом погружения в охлажденный 2,5% раствор глутаральдегида на фосфатном буфере (рН 7,4). Срезы готовили на ультратоме ЛКВ III, контрастировали цитратом свинца и анализировали в электронном микроскопе JEM 200 EX (75 кВ). У каждого животного проведен анализ

функционального состояния в среднем 50 нейронов ДМЯ. Соотношение нейронов, находящихся в различных функциональных состояниях у самцов и самок на стадиях метэструса, диэструса и эструса, определяли, приняв за 100% общее количество изученных нейронов в группе.

**Результаты исследования.** Анализ ультраструктуры нейроэндокринных нейронов, проведенный с учетом показателей транскрипционной активности ядра, структурной организации ядрышка, характеристик состояния ядерных мембран, белок-синтезирующего аппарата цитоплазмы, митохондрий и вакуолярной системы, позволил выделить ряд их функциональных состояний.

Небольшое количество нейронов у самцов и на всех стадиях ЭЦ у самок находились в состоянии покоя. Для них было характерно наличие светлого, богатого эухроматином клеточного ядра с расположенным в его центральных зонах компактным ядрышком. Узкие каналы гранулярной эндоплазматической сети (ЭС), небольшие скопления полисом и умеренное количество митохондрий равномерно заполняли перикарион. Вблизи от комплекса Гольджи или около плазмолеммы находились отдельные пузырьки с электронно-

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

плотным центром, диаметр которых варьировал от 60 до 275 нм, первичные лизосомы и отдельные липофусциновые гранулы.

Состояние умеренной активности характеризовалось появлением в ядрах признаков транскрипционной активности, увеличением и разрыхлением ядрышка. Ядрышко было смещено к ядерной оболочке, в нем увеличено число плотных фибриллярных центров. Число ядерных пор увеличено, поверхность клеточного ядра неровная из-за отдельных инвагинаций. В нуклеоплазме присутствовали небольшие очаговые скопления интерхроматиновых гранул и пучки перихроматиновых фибрилл. Число канальцев гранулярной ЭС увеличено, имела место гипертрофия и гиперплазия темных митохондрий. Умеренная гипертрофия комплекса Гольджи проявлялась расширением просвета цистерн и увеличением числа транспортных пузырьков, а также появлением мелких и крупных осмиофильных гранул секрета. В цитоплазме определялось увеличенное число лизосом и липофусциновых гранул, а также пузырьков с электронно-плотным центром.

Для нейронов, которые мы классифицировали как клетки с повышенной активностью, было характерно содержание в ядре больших количеств рибонуклеопротеиновых (РНП-) гранул (интерхроматиновых и перихроматиновых). В ядрышке, которое располагалось эксцентрично, выявлялись плотные фибриллярные центры. Определялись складки ядерной оболочки. Вокруг ядра располагалось увеличенное количество гипертрофированных митохондрий. Наблюдалось очаговое расширение канальцев ЭС, которые преобразовывались в цистерны. В цитоплазме располагались большое количество свободных рибосом и полисом. Комплекс Гольджи был гипертрофирован. Определялось появление мультивезикулярных, а также мультиламеллярных телец. Количество пузырьков с электронно-плотным центром было увеличено по сравнению с таковым на стадии умеренной активности.

Состояние напряжения характеризовалось высокой электронной плотностью увеличенного в размерах ядра, в котором определялось не только большое количество гранулярного материала, но и осмиофильная мелкозернистая субстанция. Ядрышко было увеличено в размерах, с хорошо различимым гранулярным компонентом. Определялись большие по занимаемой площади скопления интерхроматиновых гранул. Выявлялись различные по величине и плотности участки гетерохроматина, около которых находились перихроматиновые гранулы. Перинуклеарное

пространство было равномерно расширено, размеры ядерных пор увеличены, поверхность ядра складчатая. Канальцы ЭС расширены, между ними лежали скопления полисом. Комплекс Гольджи достигал высокого уровня развития, около него определялось формирование секреторных пузырьков. Отмечались явления очагового вздутия ядерной оболочки. Имелось много гипертрофированных митохондрий, некоторые из них были с электронно-прозрачным матриксом. Часто встречались мультивезикулярные и мультиламеллярные тельца.

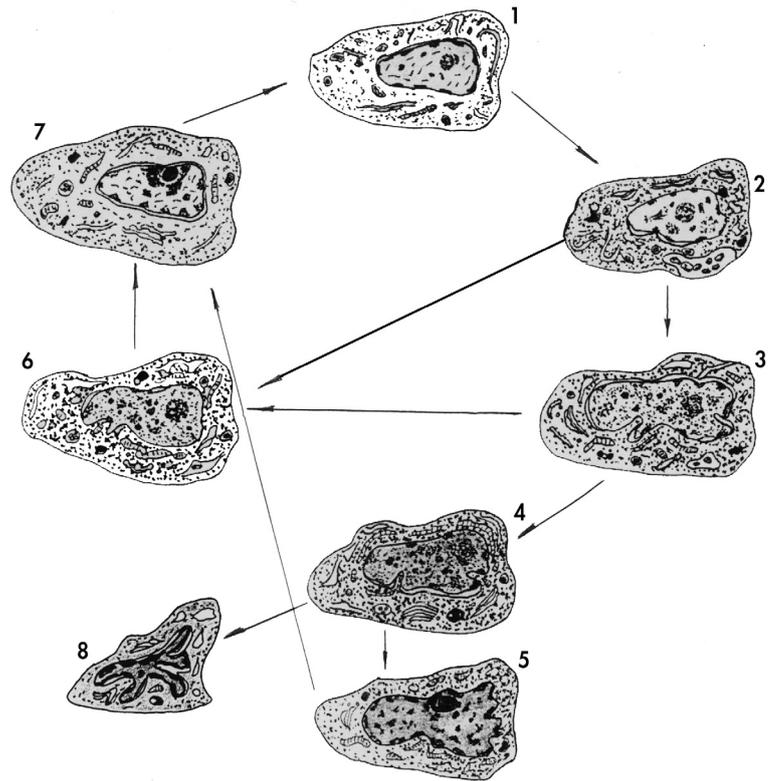
Структурно-функциональные изменения нейронов, свидетельствующие о снижении их активности, выражались в увеличении содержания гетерохроматина, уменьшении или полном исчезновении РНП-гранул при сохраняющейся осмиофилии нуклеоплазмы. Плотное, уменьшенное в размерах ядрышко, располагалось в таких нейронах эксцентрично, имея контакт с хорошо выраженным краевым хроматином. Снижение активности по охарактеризованному варианту (первый тип) следовало, очевидно, за стадией напряжения.

В другой группе нейронов (второй тип) появление показателей снижения их активности (укрупнение фибриллярных центров, уменьшение гранулярного компонента в ядрышке, исчезновение интерхроматиновых гранул и др.) не сопровождалось увеличением содержания гетерохроматина и осмиофильной пылевидной субстанции, нуклеоплазма была умеренно осмиофильной и содержала большое число перихроматиновых гранул. Эти нейроны, вероятно, снижали функциональную активность, не проходя стадии напряжения, переходя из состояния умеренной или повышенной активности.

Состояние возврата к исходному состоянию характеризовалось снижением функциональной активности, нейроны вновь приобретали вид светлых клеток. Для них была характерна сегрегация компонентов ядрышка, свидетельствующая о блокаде синтеза белка. Поверхность ядра могла сохранять складки, однако, в цитоплазме, которая впячивалась в ядро, отмечалось уменьшение плотности расположения полисом.

Кроме описанных выше, в составе ДМЯ у самцов крыс были найдены единичные пикноморфные нейроны, находившиеся в состоянии дегенерации и, вероятно, гибнущие путем апоптоза.

Итак, на основании проведенного исследования, мы выделили следующие функциональные состояния нейронов ДМЯ: 1 — покоя, 2 — умеренной активности, 3 — повышенной активности, 4 — пика активности или напряжения, 5 — сни-



Электронно-микроскопическая характеристика нейроэндокринных нейронов дорсомедиального ядра миндалевидного тела мозга крысы.

1 — стадия покоя; 2 — стадия умеренной активности; 3 — стадия повышенной активности; 4 — стадия напряжения; 5 — стадия снижения функциональной активности по первому типу; 6 — стадия снижения активности по второму типу; 7 — стадия возврата к исходному состоянию; 8 — апоптоз.

жение активности по первому типу, 6 — снижение активности по второму типу, 7 — возврата к исходному состоянию (рисунок). На различных стадиях ЭЦ можно найти все перечисленные разновидности, но количество нейронов, находящихся в том или ином состоянии, различается в зависимости от стадии ЭЦ. На стадии эструса преобладают нейроны в состоянии повышенной активности и пика активности, при этом общая доля этих нейронов составляет 66%. На стадии

метэструса самая большая доля нейронов (30%) находится в состоянии «снижения активности по первому типу» (таблица).

Обсуждение полученных данных. Наличие рецепторов половых стероидов в нейроэндокринных нейронах ДМЯ предопределяет изменение их функциональной активности в ответ на колебания содержания гормонов [16, 17]. При этом способность половых стероидов влиять на

**Относительное содержание нейронов, находящихся в различных функциональных состояниях в дорсомедиальном ядре миндалевидного тела у самцов и у самок крыс в динамике эстрального цикла (ЭЦ)**

Функциональное состояние нейронов	Самки на различных стадиях ЭЦ			Самцы
	Метэструс	Диэструс	Эструс	
Покой	2	18	0	3
Умеренная активность	10	21	21	16
Повышенная активность	20	18	40	35
Пик активности, напряжение	25	20	26	22
Снижение активности по первому типу	30	16	10	17
Снижение активности по второму типу	7	2	3	3
Возврат к исходному состоянию	6	5	0	3
Пикноморфный нейрон	0	0	0	1

Примечание. За 100% принято общее количество просчитанных нейронов.

матричные процессы в клетке [10] позволяет предполагать их ведущее значение в регуляции активности нейронов этого ядра, участвующих в обработке обонятельной информации, полового и социального поведения, регуляции репродуктивных центров гипоталамуса и выработке ряда нейропептидов [1].

Нами установлено, что нейроны ДМЯ находятся в различных структурно-функциональных состояниях, которые могут быть классифицированы как состояния покоя, умеренной активности, повышенной активности, напряжения, снижения активности, возврата в исходное состояние и апоптоза.

Структурная организация нейронов, находящихся в состоянии повышенной активности и напряжения, указывает на высокую интенсивность протекающих в них транскрипционных процессов [12]. Осмиофилия нуклеоплазмы, возможно, свидетельствует об увеличении содержания белков, принимающих участие как в транспорте в цитоплазму вновь синтезируемых РНК, так и включающихся в процессы конденсации хроматина [8, 11]. В таких клетках, вероятно, происходят усиленно и процессы внутриклеточной регенерации, на что указывает появление мультиламеллярных телец [5, 9].

Известно, что самые низкие содержания эстрадиола и лютеинизирующего гормона (ЛГ) имеют место в метэструсе, пик эстрогенов отмечен в 12 ч стадии проэструса, а ЛГ — в 18 ч этой же стадии ЭЦ [3]. Выброс ЛГ на фоне повышения концентрации эстрогенов приводит к овуляции, которая происходит в эструсе.

При исследовании относительного содержания нейронов в ДМЯ, находящихся в различных функциональных состояниях на различных стадиях ЭЦ, было выявлено преобладание нейронов в состоянии повышенной активности на стадии эструса, которая наступает вслед за пиковыми концентрациями эстрогенов и выбросом ЛГ [3]. Это согласуется с данными, выявившими увеличение размеров клеточных ядер нейронов ДМЯ и нарастание уровней связывания  $^3\text{H}$ -эстрадиола на стадии эструса [6, 14]. Также показано, что на этой стадии ЭЦ интенсивность включения  $^3\text{H}$ -уридина в нейроны ДМЯ [2] значительно выше, чем на стадиях метэструса и диэструса. Выявлена также положительная корреляция между уровнями  $17\beta$ -эстрадиола и экспрессией рецепторов эстрогена — ER $\alpha$ , который способен активизировать транскрипцию [15].

На стадии метэструса, для которой характерна низкая концентрация эстрадиола, преобладают

нейроны в состоянии снижения активности по первому типу (см. таблицу). Показателем снижения активности нейронов было увеличение содержания в ядре гетерохроматина. Его количество увеличивалось как в краевых зонах (под внутренней ядерной мембраной), так и в центральных участках нуклеоплазмы. Процесс конденсации хроматина, по-видимому, инициировался увеличением содержания прогестерона. Показано, что пик концентрации прогестерона в динамике ЭЦ наступает позднее, чем эстрадиола [3]. Повышение содержания прогестерона положительно коррелирует с интенсивностью экспрессии ER $\beta$ , которые снижают транскрипционную активность [10, 15]. По-видимому, динамика гормональных сдвигов, имеющая место в ЭЦ, формирует блокирующий транскрипцию механизм за счет экспрессии ER $\beta$ . Возможно, у самцов подобный механизм может осуществляться метаболитами тестостерона, образование которых происходит в миндалевидном теле при участии ароматазных и редуктазных ферментных комплексов [1].

Характерной особенностью нейронов, возвращающихся к исходному состоянию, являются картины сегрегации компонентов ядрышка, проявляющиеся их разобщением. Эти явления указывают на блокаду синтеза РНК в ядрышке [12].

Кроме описанных выше, в составе ДМЯ у самцов крыс найдены единичные пикноморфные нейроны, находящиеся в состоянии дегенерации и, вероятно, гибнущие путем апоптоза [4]. Гибель нейронов, выявленная только у самцов крыс и отсутствующая у самок крыс, может быть объяснена способностью эстрогенов оказывать нейрорепрессивное влияние [3].

Полученные результаты указывают на наличие функциональной гормонально-зависимой реверсии в структурно-функциональной организации нейронов ДМЯ, происходящей под влиянием половых стероидов. Впервые термин «функциональная реверсия» для характеристики пластических перестроек нейросекреторных клеток введен П.Е.Гарловым [5]. Мы считаем его адекватным и для обозначения всей совокупности структурно-функциональных перестроек, происходящих в популяции нейронов ДМЯ, предопределяемых изменяющимся содержанием половых стероидов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Акмаев И.Г. и Калимуллина Л.Б. Миндалевидный комплекс мозга: функциональная морфология и нейроэндокринология. М., Наука, 1993.
2. Ахмадеев А.В. и Калимуллина Л.Б. Темные и светлые клетки миндалевидного комплекса в динамике эстрального цикла. Цитология, 2004, т. 46, № 5, с. 45–49.

3. Бабичев В.Н. Нейроэндокринный эффект половых стероидов. Успехи физиол. наук, 2005, т. 36, № 1, с. 54–67.
4. Белушкина Н.Н. и Северин С.Е. Молекулярные основы патологии апоптоза. Успехи совр. биол., 2001, т. 35, № 2, с. 51–60.
5. Гарлов П.Е. Морфофункциональная основа пластичности нейросекреторных клеток. Цитология, 2002, т. 44, № 8, с. 747–767.
6. Калимуллина Л.Б. Реакция нейронов миндалевидного комплекса в динамике эстрального цикла. Пробл. эндокринолог., 1989, № 6, с. 60–64.
7. Калимуллина Л.Б., Ахмадеев А.В., Минибаева З.Р. и Нагаева Д.В. Цитологические характеристики «темных» и «светлых» клеток миндалевидного комплекса мозга. Цитология, 2000, т. 42, № 4, с. 343–349.
8. Кулинский В.Н. и Колесниченко Л.С. Молекулярные механизмы действия гормонов. II. Киназные системы. Системы с внутриклеточными рецепторами. Трансактивация СТС. Биохимия, 2005, т. 70, № 4, с. 476–492.
9. Поленов А.Л. Морфофункциональная организация нейросекреторных клеток гипоталамуса. В кн.: Нейроэндокринология. СПб., Наука, 1993, с. 31–70.
10. Смирнов А.Н. Мембранная локализация ядерных рецепторов: парадокс с важными последствиями. Росс. физиол. журн., 2005, т. 91, № 1, с. 31–45.
11. Шидловский Ю.С. и Набирочкина Е.Н. Влияние ремоделирования и модификаций хроматина на процесс инициации транскрипции РНК-полимеразой II. Генетика, 2005, т. 41, № 7, с. 884–893.
12. Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию. М., Академкнига, 2004.
13. Akhmadeev A.V. Amygdala: indexes of hormone-dependent reversion in neuroendocrine neurons. J. Europ. Acad. Nat. History, 2006, v. 1, № 1, p. 31.
14. Asribekova M.K. and Kalimullina L.B. Structural-functional organization of the brain amygdaloid complex in the dynamics of the estrous cycle. Bull. Exp. Biol. Med., 1989, v. 107, № 5, p. 748–750.
15. Isgor C., Huang G., Akil H. and Watson S. Correlation of estrogen beta-receptor messenger RNA with endogenous levels of plasma estradiol and progesterone in the female rat hypothalamus, the bed nucleus of stria terminalis and the medial amygdala. Brain Res. Mol. Brain Res., 2002, v. 106, № 4, p. 30–41.
16. Sato M., Moriya Y., Kiyama H. and Noguchi K. The distribution of the estrogen receptors in the rat forebrain: immunohistochemistry. Neurosci. Res., 1987, v. 5, № 1, p. 131–145.
17. Takeshita H. Evidence for soluble estradiol receptors in the amygdala of male and female rats. Yonago acta med., 1976, v. 20, № 3, p. 125–141.

Поступила в редакцию 04.04.2006 г.

### **ELECTRON MICROSCOPIC CHARACTERISTICS OF THE NEUROENDOCRINE NEURONS OF THE AMYGDALOID BODY OF THE BRAIN IN MALE AND FEMALE RATS AT DIFFERENT STAGES OF ESTROUS CYCLE**

*A.V. Akhmadeyev and L.B. Kalimullina*

Ultrastructural characteristics of neuroendocrine neurons were studied in amygdala dorsomedial nucleus (DMN), which is one of main zones of sexual dimorphism, in 12 Wistar rats with the body mass of 250–300 g, 3 males and 9 females at different stages of the estrous cycle. In each animal, an average of 50 DMN neurons were examined and their functional state was analyzed on the basis of their ultrastructural characteristics. Morpho-functional classification is proposed, that reflects hormone-dependent variations in neuronal activity. It was established that DMN neurons could be found in different structural and functional states, that may be classified as the state of rest, moderate activity, increased activity, stress (peak activity), decrease in activity (two types), return to an initial state and apoptosis. At the stage of estrus, the neurons in the state of increased activity (40% of the total population) and peak activity (26%) were found to prevail. In metestrus, most of the neurons were in the state of type I decrease in activity (with an increase in nuclear heterochromatin content — 30% of the cells); peak activity and increased activity were found in 25% and 20% of neurons, respectively. In diestrus, the neurons in the state of rest, moderate and increased activity, peak activity and type I decrease in activity were represented in approximately equal proportions (18%, 21%, 18%, 20% and 16%, respectively). In males, 35% and 22% of neurons, respectively, were found in the state of increased activity and peak activity. Neuronal death was detected only in males.

**Key words:** *amygdaloid body of the brain, dorsomedial nucleus, neuroendocrine neurons, sexual dimorphism, estrous cycle.*

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