

СО Д Е Р Ж А Н И Е

От редактора специального выпуска

Новые перспективы в изучении гипоталамо-гипофизарной системы	665
--	-----

Обзорные и проблемные статьи

Гипоталамо-гипофизарная система: возраст и основные неинфекционные заболевания (злокачественные новообразования гормонозависимых тканей, сердечно-сосудистая патология и сахарный диабет 2 типа) <i>Л. М. Берштейн, Е. В. Цырлина</i>	667
Альфа-меланоцитстимулирующий гормон как регулятор гипоталамо-гипофизарной оси <i>О. В. Долотов</i>	683
Эндогенные и синтетические регуляторы периферических звеньев гипоталамо-гипофизарно-гонадной и -тиреоидной осей <i>А. О. Шпаков</i>	696

Экспериментальные статьи

Изменения экспрессии стероидогенного фактора 1 (SF-1) в нейронах вентромедиального ядра гипоталамуса крысы при старении <i>К. Ю. Моисеев, А. А. Спиричев, П. А. Вишнякова, А. Д. Ноздрачев, П. М. Маслюков</i>	720
Исследование влияния моноаминов на орексинергические нейроны гипоталамуса эмбрионов крысы <i>И. Ю. Морина, Е. В. Михайлова, И. В. Романова</i>	728
Зависимое от пола действие пренатального стресса на активность гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы крыс: роль кортикостероидных рецепторов мозга <i>Н. Э. Ордян, С. Г. Пивина, К. А. Баранова, В. В. Ракицкая, В. К. Акулова, Г. И. Холова</i>	740
Особенности ответов защитных систем мозга взрослых крыс на стрессоры и липополисахарид <i>Н. П. Комышева, Г. Т. Шишкина, Т. С. Калинина, Н. Н. Дыгало</i>	756
Когнитивная дисфункция у потомства крыс с экспериментальной преэклампсией на ранних и поздних этапах онтогенеза и ее коррекция производными ГАМК <i>Е. А. Музыка, Г. А. Ткачева, В. Н. Перфилова, К. В. Суворин, А. А. Нестерова, И. Н. Тюренков</i>	765
Взаимосвязь между уровнями адипокинов, их соотношением в фолликулярной жидкости и результативностью экстракорпорального оплодотворения у женщин с нормальной и повышенной массой тела <i>Ю. Р. Рыжов, А. О. Шпаков, Н. Н. Ткаченко, М. Р. Махмадалиева, И. Ю. Коган, А. М. Гзезян</i>	783

CONTENTS

Editorials

New Perspectives in Studies of Hypothalamic-Pituitary System	665
--	-----

Reviews and Topical Articles

Hypothalamic-Pituitary System: Age and Major Non-Infectious Diseases (Malignant Neoplasms of Hormone-Dependent Tissues, Cardiovascular Pathology and Type 2 Diabetes) <i>L. M. Berstein and E. V. Tsyrlina</i>	667
Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone as a Regulator of the Hypothalamic-Pituitary Axis <i>O. V. Dolotov</i>	683
The Endogenous and Synthetic Regulators of the Effector Components of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal and -Thyroid Axes <i>A. O. Shpakov</i>	696

Experimental Articles

Changes in the Expression of the Steroidogenic Factor 1 (SF-1) in Neurons of the Ventromedial Nucleus of the Rat Hypothalamus with Aging <i>K. Yu. Moiseev, A. A. Spirichev, P. A. Vishnyakova, A. D. Nozdrachev, and P. M. Masliukov</i>	720
Investigation of Monoamines Influence on Orexinergic Hypothalamic Neurons of Rat Embryons <i>I. Yu. Morina, E. V. Mikhailova, and I. V. Romanova</i>	728
Sex-Dependent Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Stress Reactivity after Prenatal Stress in Rats: Relevance of the Brain Corticosteroid Receptors Expression <i>N. E. Ordyan, S. G. Pivina, K. A. Baranova, V. V. Rakitskaya, V. K. Akulova, and G. I. Kholova</i>	740
Features of the Responses of Protective Systems in the Brain of Adult Rats to Stressors and Lipopolysaccharide <i>N. P. Komysheva, G. T. Shishkina, T. S. Kalinina, and N. N. Dygalo</i>	756
Cognitive Dysfunction in the Offspring from Rats with Experimental Preeclampsia at the Early and Late Stages of Ontogenesis and Its Correction by GABA Derivatives <i>E. A. Muzyko, G. A. Tkacheva, V. N. Perfilova, K. V. Suvorin, A. A. Nesterova, and I. N. Tyurenkov</i>	765
The Interrelation between the Adipokines Levels and Their Ratio in the Follicular Fluid and the Efficiency of <i>In Vitro</i> Fertilization in Women with the Normal and Increased Body Weight <i>J. R. Ryzhov, A. O. Shpakov, N. N. Tkachenko, M. R. Mahmatalieva, I. Yu. Kogan, and A. M. Gzgzyan</i>	783

ОТ РЕДАКТОРА
СПЕЦИАЛЬНОГО ВЫПУСКА

**НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ В ИЗУЧЕНИИ
ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНОЙ СИСТЕМЫ**

DOI: 10.31857/S0869813920060114

Еще сравнительно недавно гипоталамо-гипофизарную систему рассматривали как совокупность функциональных взаимосвязей между (1) гипоталамусом, специализированные нейроны которого секретируют небольшие по размеру рилизинг-факторы гипофизарных гормонов, (2) аденогипофизом – его специализированные клетки продуцируют полипептидные гормоны, и (3) периферическими звеньями, продуцирующими в кровотоке эффекторные гормоны, которые контролируют жизненно важные физиологические и биохимические процессы в большинстве органов и тканей, а также по механизму отрицательной обратной связи регулируют и модулируют активность начальных звеньев гипоталамо-гипофизарной системы. Наибольшее значение имеют три тесно взаимосвязанных между собой компонента гипоталамо-гипофизарной системы – гипоталамо-гипофизарно-гонадная (ГГГ), -тиреоидная (ГГТ) и -надпочечниковая (ГГН) оси.

ГГГ ось включает гипоталамические нейроны, экспрессирующие гонадолиберин, рилизинг-фактор гонадотропинов – лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов, гонадотропоциты аденогипофиза, продуцирующие гонадотропины, а также гонады – семенники у мужчин и яичники у женщин, воздействуя на которые лютеинизирующий и фолликулостимулирующий гормоны стимулируют процессы стероидогенеза, сперматогенеза, фолликулогенеза и оогенеза. ГГТ ось в качестве основных звеньев включает нейроны гипоталамуса, секретирующие трипептид тиролиберин, тиреотропоциты аденогипофиза, которые при воздействии на них тиролиберина продуцируют тиреотропный гормон, а также фолликулярные клетки щитовидной железы, воздействуя на которые тиреотропный гормон усиливает их рост и дифференцировку, а также стимулирует в них синтез тиреоидных гормонов. ГГН ось состоит из гипоталамических нейронов, в которых экспрессируется кортиколиберин, рилизинг-фактор адренкортикотропного гормона, кортикотропоциты аденогипофиза, осуществляющих синтез адренкортикотропного гормона в ответ на стимуляцию кортиколиберином, и коры надпочечников, которая в ответ на гипофизарный адренкортикотропный гормон продуцирует глюкокортикоиды.

Однако в последние годы обнаружено множество молекул, включая гормоны, нейротрансмиттеры, ростовые факторы, адипокины, витамины, нутриенты, которые опосредуют новые взаимодействия в гипоталамо-гипофизарной системе и обуславливают тесные взаимосвязи между нейроэндокринной регуляцией, с одной стороны, и гормональным, метаболическим и энергетическим статусом организма, с другой. Так, наряду с гонадолиберином и гонадотропинами важнейшими регуляторами ГГГ оси являются адипокины, в первую очередь, лептин и адипонектин, которые по нескольким механизмам влияют на активность гонадолиберин-экспрессирующих нейронов, стимулируя (лептин) или подавляя (адипонектин) их активность, модулируют секреторную активность гонадотропоцитов, регулируют процессы стероидогенеза, сперматогенеза и фолликулогенеза, непосредственно воздействуя на клетки семенников и яичников. Адипокины также способны кон-

тролировать функциональную активность различных звеньев ГГТ и ГГН осей. Эти данные свидетельствуют о том, что такие зависимые от адипокинов процессы, как пищевое поведение, энергетический обмен и накопление жировой ткани, самым непосредственным образом влияют на функциональное состояние всех основных компонентов нейроэндокринной системы.

В тематическом номере журнала рассмотрены различные аспекты функционирования гипоталамо-гипофизарной системы в норме, в условиях патологии, при старении и стрессовых воздействиях, обсуждаются возможные пути ее коррекции. Проанализирован ряд острых проблем, связанных с механизмами регуляции гипоталамического и периферического звеньев гипоталамо-гипофизарной системы и роли в этом эндогенных гормонов и нейромедиаторов, а также перспективам разработки новых фармакологических препаратов с активностью селективных регуляторов и модуляторов ГГТ, ГГТ и ГГН осей. Значительное внимание уделено гендерным особенностям функционирования и регуляции гипоталамо-гипофизарной системы, в том числе, зависимым от пола механизмам формирования ГГН оси в условиях стрессовых воздействий.

*Редактор специального выпуска,
доктор биологических наук
А.О. Шпаков*

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

**ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНАЯ СИСТЕМА: ВОЗРАСТ И ОСНОВНЫЕ
НЕИНФЕКЦИОННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ (ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ
НОВООБРАЗОВАНИЯ ГОРМОНОЗАВИСИМЫХ ТКАНЕЙ,
КАРДИОВАСКУЛЯРНАЯ ПАТОЛОГИЯ И САХАРНЫЙ ДИАБЕТ 2 ТИПА)**

© 2020 г. Л. М. Берштейн¹, *, Е. В. Цырлина¹

¹Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им Н.Н. Петрова МЗ РФ,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: levmb@endocrin.spb.ru

Поступила в редакцию 29.01.2020 г.

После доработки 15.03.2020 г.

Принята к публикации 03.04.2020 г.

Настоящий обзор содержит базовые сведения о гипоталамо-гипофизарной системе (ГГС) и ее значимых отделах; характеризует роль возраста (акцентируя внимание на старении) как фактора, с которым связаны изменения в состоянии ГГС, опосредующие ее участие в “подготовке” предрасположенности к рассматриваемым основным хроническим неинфекционным (non-communicable) заболеваниям человека, (в частности, таких новообразований, как рак молочной железы, эндометрия и рак предстательной железы; ишемическая болезнь сердца как ведущая кардиоваскулярная патология, сахарный диабет 2 типа) с подключением важного гормонально-метаболического комплекса на основе ожирения, инсулинорезистентности и снижения толерантности к глюкозе, а также взаимодействия инсулина, инсулиноподобного фактора роста-1 и их рецепторов) и выходом на репродуктивную и гипоталамо-гипофизарно-адреналовую систему. Приводятся сведения о контактах между подсистемами ГГС в условиях стресса, при нарушении физиологических ритмов и под влиянием гендерного фактора. Итог обзора подводит информация о возможных мерах по предупреждению основных неинфекционных заболеваний, основанных на учете роли ГГС и последствий нарушения ее функционирования. В обзоре также обсуждается тот факт, что наряду с широко признаваемым сходством гормонально-метаболических факторов, создающих платформу для развития основных неинфекционных заболеваний, имеются примеры и их несходства, это нуждается в дальнейшем изучении.

Ключевые слова: гипоталамо-гипофизарная система, возраст, основные неинфекционные заболевания человека, предрасположенность, подходы к предупреждению заболеваний

DOI: 10.31857/S0869813920060023

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ГГС И ЕЕ ОСНОВНЫХ ОТДЕЛАХ

Гипоталамо-гипофизарный комплекс, наряду с нейрогуморальными структурами коры головного мозга, является одним из главных регуляторных образований, обеспечивающих развитие и функционирование всех регуляторных систем организма. К основным из них относятся репродуктивная, надпочечниковая, тиреоидная, а также система регуляции углеводного обмена как компонент контроля метаболических процессов.

Гипофизарно-гонадная (репродуктивная) система человека включает в себя подкорковые центры гипоталамуса, гипофиз, женские и мужские гонады и зависящие от них органы мишени – матку, молочные железы и предстательную железу. Основными регуляторами функции репродуктивной системы являются гипоталамические рилизинг гормоны, контролирующие синтез гонадотропинов, которые, в свою очередь, стимулируют процессы стероидогенеза в гонадах [1]. Регуляторные взаимоотношения в репродуктивной системе, как и в ряде других, осуществляются по принципам отрицательной и положительной обратной связи, реализуемой за счет действия стероидов на специфические рецепторы центральных структур и чувствительности последних к тормозящим сигналам [2, 3]. Показано, что в гипофизе присутствуют рецепторы андрогенов [4], эстрадиола (РЭ α и РЭ β) и рецепторы гонадотропин-рилизинг гормона. Функционально РЭ α и РЭ β различаются между собой, в частности, по способности регулировать продукцию лютеинизирующего гормона [5]. Стероидогенез в яичниках обеспечивается за счет взаимодействия гонадотропинов с соответствующими рецепторами в гонадах [6]. Наряду со стероидами, в последнее время появляется все больше данных об участии в регуляции продукции гонадотропинов активинов, ингибинов, фоллистатина и адипокинов, в частности, лептина и адипонектина [7], что обеспечивает взаимосвязь между энергетическим балансом и функциональным состоянием репродуктивной системы [8]. Показано также, что на активность гипоталамо-гипофизарной системы (ГГС) на всех уровнях влияет висфатин, в частности, за счет потенцирования стимулирующего влияния инсулиноподобного фактора роста-1 [9, 10]. Достаточно широкую роль в регуляции ГГС (причем, не только ее “чисто репродуктивной” составляющей) могут играть и рецепторы андрогенов. Например, позитивный контроль и активация глюкокортикоидных рецепторов в культуре клеток гипофиза крыс с ожирением реализовались при участии рецепторов андрогенов [4], и число примеров такого рода может быть увеличено.

Гипоталамо-гипофизарно-адреналовая система (ГГАС) представляет собой комплекс нейроэндокринных структур, осуществляющих регуляцию функции надпочечников по принципу обратной связи. ГГАС включает в себя паравентрикулярное ядро гипоталамуса, в нейронах которого экспрессируется кортикотропин-рилизинг гормон (КРГ) и аргинин-вазопрессин (антидиуретический гормон), накапливающийся в задней доле гипофиза. В передней доле гипофиза продуцируется адренотропный гормон (АКТГ), который стимулирует синтез стероидов в коре надпочечников. Основным стимулятором продукции АКТГ является КРГ, хотя в стрессорной ситуации сходную функцию выполняет аргинин-вазопрессин, поскольку он непосредственно воздействует на специфические для него рецепторы (в частности, V1B) и демонстрирует синергию с эффектами гипоталамического КРГ.

ГГАС является главным звеном в обеспечении интегрального ответа организма на физические и психологические воздействия различной степени, включая стресс. КРГ образуется в гипоталамусе, однако гормон обнаруживается и в других отделах ЦНС, где выполняет роль медиатора, участвуя в ответной реакции на различные стрессоры. АКТГ, вырабатываемый под влиянием КРГ, имеет базальную и импульсную секрецию и также секретируется в больших количествах в ответ на стресс. Определенную регулирующую роль в отношении ГГАС играют галанин-подобный пептид (Galp) и аларин (Ала) – два новых представителя пептидов семейства галанинов, которые регулируют многие физиологические процессы, включая энергетический и осмотический гомеостаз, репродукцию, потребление пищи и секрецию АКТГ. мРНК Galp обнаружена в аркуатном ядре гипоталамуса. Экспрессия гена пептида Ала обнаружена во всех органах ГГАС системы [11]. ГГАС тесно связана с со всеми другими регуляторными системами и, в первую оче-

редь, с метаболической и репродуктивной. ГГАС нередко способствует подавлению функций репродуктивной системы, что обеспечивается, не в последнюю очередь, участием КРГ [12, 13]. Рецепторы КРГ обнаруживаются в яичнике, матке, плаценте, благодаря чему реализуется его супрессивное влияние на многие процессы, происходящие в этих органах. Так, вырабатываемые под влиянием КРГ проопиомеланокортиновые пептиды подавляют секрецию гонадотропин-рилизинг-гормона в гипоталамусе, глюкокортикоиды тормозят секрецию лютеинизирующего гормона в гипофизе и секрецию эстрогенов и прогестерона в яичниках, а также снижают чувствительность различных тканей к эстрадиолу [14].

ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО ТИРЕОИДНАЯ СИСТЕМА (ГГТС)

Регуляция тиреоидной функции осуществляется тиреотропным гормоном гипофиза (ТТГ), синтез которого находится под влиянием тиреотропин-рилизинг гормона гипоталамуса (ТРГ). Продукция и секреция ТТГ и ТРГ существенно зависит от гормонов щитовидной железы – тироксина и трийодтиронина [15]. В “стандартных” условиях синтезируемые в щитовидной железе гормоны по принципу “отрицательной обратной связи” взаимодействуя с рецептором ТТГ на поверхности тироцитов и нейронах гипоталамуса, тормозят выброс и эффект тропных гормонов [16] и действуют также практически на все ткани организма, присоединяясь к ядерным рецепторам и меняя экспрессию многих продуктов соответствующих генов. Тиреоидные гормоны необходимы для нормального развития головного мозга и соматических тканей у плода и новорожденного, развития гранулезных клеток и в любом возрасте регулируют белковый, углеводный, жировой обмен и иммунную систему [17, 18]. Нейроны, продуцирующие ТРГ, воспринимают не только тиреоидные, но и другие нервные и гуморальные сигналы, что обеспечивает участие ГГТС в адаптации организма к окружающей среде, включая процессы, связанные с голоданием и снижением температуры [19]. Участие в регуляции продукции ТРГ и β -субъединицы ТТГ, которая обеспечивает специфичность молекулы ТТГ, принимают и стероидные гормоны (кортикостероиды, эстрогены, тестостерон). Описано также влияние лептина. Считается, что именно за счет снижения уровня лептина у голодающих животных и, возможно, человека наблюдается падение продукции ТТГ [20]. Под влиянием тиреоидных гормонов отмечены снижение уровня гликемии, повышение чувствительности тканей к инсулину и нормализация уровня цитокинов параллельно с ослаблением воспалительных реакций у крыс с ожирением [21].

ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-СОМАТОТРОПНАЯ СИСТЕМА (ГГСС)

Гормон роста – мультифункциональный фактор, который регулирует рост, метаболизм (в частности, метаболизм липидов), репродуктивную систему, иммунитет, осмотический статус и ряд других, важных для физиологии и патофизиологии параметров и компонентов обеспечения жизнедеятельности. Действие гормона роста осуществляется через его рецепторы, которые имеются во всех тканях [22], и вслед за этим – за счет стимуляции под влиянием этого гормона продукции в печени и в мышцах инсулино-подобного фактора роста 1 (ИФР-1) и – отчасти – ассоциированной с его эффектами гормон-чувствительной липазы [23]. Гормон роста, как полагают, индуцирует два основных следствия – анаболическое – влияние на рост и катаболическое – воздействие на липолиз. Продукция и активность гормона роста зависят от ряда факторов и, в первую очередь, от инсулина, который влияет на выработку в нейронах рилизинг гормона – гормона роста и соматостатина и, соответственно, на секрецию гормона роста, а также на чувствительность к сигналам рецепторов этого гормона и состояние пострецепторного сигнального пути (GHR/JAK2/STATs, GHR/JAK2/SHC/MAPK и гормон роста/субстрат–рецептор-ин-

сулина, ИРС/PI3K/Akt-путь [24]). Уровень ИФР-1 в крови зависит от действия на печень не только гормона роста, но также половых стероидов, тиреоидных гормонов, глюкокортикоидов [25]. При этом андрогены и эстрогены повышают секрецию ИФР-1 в печени, а глюкокортикоиды ее снижают.

Инсулин, гормон роста и ИФР-1 являются главными регуляторами жирового и углеводного обмена. Роль инсулина важна в перипрандиальных (связанных с приемом пищи) условиях, а роль гормона роста и его упомянутого эффектора — при голодании и стрессе, где важным является такой эффект этого гормона, как усиление липолиза. Во многих отношениях гормон роста выступает антагонистом инсулина, взаимодействуя с инсулином на уровне IRS-1, PI-3 киназы и способствуя в результате развитию инсулинорезистентности [26].

Представленный выше взгляд на функционирование гипоталамо-гипофизарной системы, преимущественно, с физиологических позиций, несомненно, следует учитывать, когда речь идет об основных хронических неинфекционных заболеваниях человека (в частности, онкологических, кардиоваскулярных, сахарного диабета 2 типа), развитие которых нередко и достаточно справедливо связывают с возрастным фактором. Возраст является одним из базовых компонентов, при котором такие заболевания как нарушение толерантности к глюкозе, инсулинорезистентность, ожирение, метаболический синдром в дополнительной степени способствуют формированию условий для развития основных неинфекционных заболеваний.

Хотя эти опосредующие метаболические сигналы способны действовать в указанном направлении и помимо “возрастного фактора”, идея о значимой и представляющей объединяющей роли возраста базируется на точке зрения о том, что развитие эндокринных и метаболических сдвигов в процессе старения может происходить по определенным законам [27].

В процессе функционирования различные гомеостатические системы организма находятся в постоянном взаимодействии. Основным регулятором этого взаимодействия является рассмотренная выше применительно к ее разделам ГГС, которая, как говорилось, обеспечивает функционирование основных процессов жизнедеятельности (в том числе, эндокринных и других регуляторных систем), онтогенез, а также защиту организма и его адаптацию к действию внешним факторов. Одна из главных особенностей в функционировании ГГС — интеграция ответов нервной и эндокринной систем на внутренние и внешние воздействия за счет многоуровневой регуляции по принципу отрицательной и положительной обратной связи. В процессе функционирования ГГС может изменяться уровень рилизинг-факторов и тропных гормонов, а также особенности циркадного и импульсного характера их продукции. Ритмические свойства выброса гипоталамических, гипофизарных и, следовательно, и периферических гормонов регулируется у млекопитающих “водителем циркадного ритма”, расположенным в супрахиазматическом ядре гипоталамуса [28]. Механизмы ритмической секреции регулирующих гормонов достаточно сложны и продолжают изучаться. Ритмической секреции отдельных гормонов присущи индивидуальные особенности, но большинство нарушений имеет, как полагают, достаточно общую и характерную черту — относительно низкий уровень базальной секреции обсуждаемых гормонов в сочетании с их нерегулярными ритмическими выбросами. Гипоталамо-гипофизарная ритмическая секреция гормонов меняется под влиянием различных факторов: упоминавшегося возраста на разных этапах онтогенеза и, в частности, по мере старения, а также в зависимости от пола, периодов сна, бодрствования, приема пищи, светового воздействия, стресса [28] и порога чувствительности к периферическим гормонам.

Рассматривая возрастные изменения регуляторных систем организма, можно выделить ряд факторов (модифицируемых и немодифицируемых), к которым в силу их значимости и распространенности у современного человека на уровне обще-

признанных эпидемий относятся ожирение, нарушение толерантности к глюкозе и инсулинорезистентность. Особое место в развитии метаболических расстройств подобного рода есть все основания отнести ожирению.

Ожирение как важный пусковой механизм этих нарушений (или, по крайней мере, стимул к их развитию) может быть следствием как избыточного характера питания (что наблюдается, в частности, в развитых странах с высоким уровнем жизни), так и результатом гормональных сдвигов, сопряженных, в том числе, с состоянием ГГС, о чем речь еще пойдет ниже. Жировая ткань является хранилищем избытка жиров, благодаря увеличению размеров адипоцитов — гипертрофическому — чаще всего абдоминальному ожирению, которое коррелирует с предрасположенностью к диабету, эктопической (за пределами традиционных жировых депо) аккумуляции жира и метаболическому синдрому [29, 30]. Имеется два типа жировой ткани с различной функциональной характеристикой. Белая жировая ткань представляет собой энергетический резерв, тогда как функция коричневой жировой ткани — это окисление жиров и выработка тепла. Белая жировая ткань является своего рода эндокринным органом, который вырабатывает различные субстраты с аутокринной, паракринной и эндокринной функцией. Сама белая жировая ткань тоже не является однородной, имея в своем составе различные типы клеток — включая преадипоциты, макрофаги, нейтрофилы, лимфоциты и эндотелиальные клетки. Размеры адипоцитов и соотношение перечисленных типов клеток между собой, как полагают, так или иначе связано с развитием метаболического синдрома [31] и инсулинорезистентности. Gustafson, Hedjazifar и соавт. разделяют ту точку зрения, что определенную роль в развитии инсулинорезистентности при ожирении играют ассоциированные с ним молекулярные нарушения на уровне чувствительных к инсулину тканей и органов (скелетные мышцы, жировая ткань и печень) [29]. Установлено, что повышение уровня липидов вызывает инсулинорезистентность за счет активации различных сигнальных путей, включая протеинкиназу C [32]. Немалую роль в формировании типичного гормонально-метаболического фона в процессе старения играют изменения в продукции гормонов упоминавшейся выше гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы. Эта система играет ведущую роль в управлении в организме регуляторными механизмами, в том числе, в период стресса [33]. При этом отмечается, как уже говорилось, резкое увеличение секреции АКТГ, что в свою очередь приводит к выбросу из коркового слоя надпочечников в кровь большого количества стероидных гормонов, которые, с одной стороны, способствуют адаптации организма к повреждающим воздействиям, а с другой, приводят к появлению метаболических сдвигов и повышению артериального давления. Повторные стрессы на протяжении жизни с постоянными выбросами повышенных количеств кортизола приводят к десенситизации глюкокортикоидных рецепторов и нарушению ритма выброса продуцируемых надпочечниками гормонов [33, 34]. В силу этого, хронический стресс рассматривается как один из возможных механизмов развития возрастных метаболических изменений [35]. Помимо влияния стресса, отмечены изменения в функции гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы, зависящие не только от возраста, но и от пола. Уровень в плазме АКТГ, кортизола и аргинин-вазопрессина у мужчин достигает при стрессе более высоких значений, чем у женщин. В то же время эстрогены при определенных условиях могут влиять на степень стрессорной реакции за счет их влияния на промоторные области гена кортикотропин-рилизинг гормона [36]. С другой стороны, показано, что секреция гормонов в ответ на стимуляцию (в частности, парасимпатиками) у пожилых людей была выше, чем у молодых, но при этом не было выявлено различий между женщинами и мужчинами [37], что свидетельствует о более сильном глюкокортикоидном влиянии, которое испытывают люди старшего возраста [38].

В развитии ожирения и инсулинорезистентности активно участвуют гипоталамо-гипофизарные изменения уровня гормона роста и стимулированной им секреции ИФР-1 [39], что в клинике наблюдается, в частности, при акромегалии, способствуя увеличению риска хронических заболеваний и сокращению продолжительности жизни [40]. Негативная ассоциация между соматотропным гормоном и ИФР-1 и продолжительностью жизни показана и на мышах [41]. На людях данные по влиянию гормона роста и ИФР-1 на снижение продолжительности жизни и возникновение болезней изучены в меньшей степени, хотя и имеются указания такого рода [42], в чем определенную роль может играть участие гормона роста в развитии инсулинорезистентности [43]. Инсулинорезистентность возникает в результате утраты чувствительности тканей к инсулину. Активность инсулина определяется его связью с мембранным рецептором клеток в тканях-мишенях (мышечной, печени и других органах), которые играют важную роль в утилизации и хранении глюкозы [44]. Под интегральным “путем” к инсулинорезистентности нередко понимается модель, в которой участвуют несколько механизмов, возникающих, в частности, в ответ на увеличение содержания жира в теле [44]. Среди них рассматриваются механизмы, облегчающие накопление жира и участвующие в активации макрофагов жировой ткани, что способствует прогрессированию легкого хронического воспаления [45–47]. Не следует также забывать при этом об уже отмечавшейся роли избыточного питания. Все это создает порочный круг (комбинацию инсулинорезистентности и компенсаторной гиперинсулинемии), что ведет в конечном итоге к недостаточности бета-клеток [48] и нарушению усвоения глюкозы. Как следствие, с возрастом повышается уровень глюкозы в крови, увеличиваясь на 0.25–0.55 ммоль/л в каждую декаду жизни, и одновременно нарушается по частоте и амплитуде ритмическая продукция инсулина [49]. В конечном итоге, эти нарушения — сочетающиеся с возрастной прибавкой содержания жира в теле — приводят к развитию сахарного диабета 2 типа.

Сочетание ожирения, инсулинорезистентности, артериальной гипертензии, провоспалительных и протромботических факторов, дислипидемии — важный фон, на котором формируется метаболический синдром, приоритетную роль в развитии которого, как уже отмечалось, играет ожирение. Составляющие жировую ткань адипоциты, о чем уже тоже говорилось, неодинаковы по своей функции и морфологии, они делятся на белые, коричневые и бежевые. Бежевые и коричневые адипоциты содержат в цитоплазме большее количество митохондрий, обогащенных разобщающим белком-1 (UCP1), и способны вырабатывать больше тепла [50, 51]. Помимо того, что адипоциты являются депо энергетических субстратов, в них вырабатывается немало гормонов, способных влиять на аппетит, ощущение насыщения и метаболизм. К этим гормонам относятся лептин, адипонектин и другие адипокины [52–54]. В частности, лептин может влиять на гипоталамо-гипофизарно-адреналовую систему, снижая ее активность в отношении стимуляции глюко-неогенеза; кроме того, лептин подавляет секрецию глюкагона, способствуя нарастанию гипергликемии [55].

Метаболический синдром с высокой частотой встречается у людей старшего возраста, будучи выявлен, в частности, у 35% взрослого населения США [56].

Развивающиеся с возрастом изменения метаболизма представляют собой во многих случаях, что подчеркивалось неоднократно ранее, сочетание инсулинорезистентности, ожирения (центральный тип), нарушений толерантности к глюкозе, повышения уровня триглицеридов, жирных кислот, липопротеинов низкой плотности, холестерина, связанных с этими нарушениями воспалительных изменений и возможного усиления клеточной пролиферации в некоторых тканях-мишенях, что может быть одним из факторов предрасположенности к возникновению онкологических заболеваний как значимого элемента в перечне основных неинфекци-

онных заболеваний человека, частота которых, как хорошо известно, выраженно нарастает с возрастом.

Прежде чем более подробно поговорить об основных неинфекционных заболеваниях, следует рассмотреть в дополнение к сказанному выше об отдельных разделах ГГС, изменения с возрастом со стороны репродуктивной системы. Это касается, в первую очередь, особенностей продукции половых гормонов, в частности, эстрогенов, повышение активности которых и изменение соотношения их фракций могут играть роль в развитии опухолей молочной железы и тела матки. Как правило, считается, что уровень гонадотропинов у женщин вырастает с выключением функции яичников. Яичник после утраты фолликулов больше не производит эстрогенов и ингибина В, которые регулировали в репродуктивном периоде продукцию гонадотропинов; в результате в менопаузальном возрасте снижается содержание эстрогенов и растет уровень гонадотропинов. Однако до наступления менопаузы, начиная с 45 лет (когда могут быть инициированы процессы канцерогенеза, которые проявятся через несколько лет), на фоне сохраненной функции яичников наблюдаются изменения в регулярности менструального цикла. Это происходит за счет снижения числа примордиальных фолликулов, а затем малых фолликулов и продуцируемого в них ингибина В [57]. Это позволяет думать, что еще до наступления менопаузы в т.н. позднем пременопаузальном репродуктивном периоде в гипоталамусе уже могут происходить изменения в продукции гонадотропинов. При сравнении уровня гонадотропинов у женщин в возрасте 23–30 и 48–49 лет показано, что уровень фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов, измеренный на 6-ой день фолликулярной фазы, был выше во втором случае. При последующем анализе было показано, что подъем уровня фолликулостимулирующего гормона на фоне сохраненного цикла начинался за 5–6 лет, а лютеинизирующего гормона за 3–4 года до наступления менопаузы [58]. Может ли некоторая стимуляция функции яичников в течение 5–6 лет до наступления менопаузы быть причиной относительной гиперэстрогении в этот период, требует дополнительного изучения. В то же время следует подчеркнуть, что раннее повышение уровня фолликулостимулирующего гормона (и в меньшей степени лютеинизирующего) расценивается как фактор, предрасполагающий к развитию предиабета, диабета и инсулинорезистентности [59], что может рассматриваться как еще одно звено связи состояния ГГС с развитием основных неинфекционных заболеваний.

При исследовании в сопоставлении с гонадотропинами уровня эстрадиола и прогестерона у женщин 19–39 и 40–50 лет было показано, что у женщин старшей группы менструальный цикл был короче, хотя различий в уровне фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов отмечено не было [60]. В то же время в работе Brink и соавт. было продемонстрировано, что при наличии нарушений в лютеиновой фазе цикла (персистенция желтого тела) в группе позднего (45–55 лет) репродуктивного возраста по сравнению с женщинами 18–35 лет был повышен уровень эстрадиола (184 нг/л против 79 нг/л) и ингибина В (25.3 нг/л против 12.7 нг/л) и снижен уровень прогестерона (6.98 мкг/л против 13.8 мкг/л) [61].

Может рассматриваться и такой феномен, как относительная гиперэстрогения, чему способствует “перевесу” фолликулостимулирующего гормона над ингибином В и эстрадиола над прогестероном [62]. Добавим, что удаление яичников у женщин в постменопаузе не влияет на секрецию гонадотропин-рилизинг гормона, т.е. в этот период яичники не являются доминантным регулятором ГГС [63].

В то же время синтез эстрогенов в жировой ткани продолжается и в менопаузе, что затрагивает и такое депо как “адипозный орган” молочной железы, повышая при этом риск развития маммарной карциномы [64].

В мужском организме, в отличие от женского (в случае эстрогенов), как правило, не наблюдается резкого снижения продукции андрогенов в каком-то опреде-

ленном возрасте. Этот процесс может идти очень медленно, и у части мужчин уровень тестостерона до старости сохраняется в нормальных пределах. Тем не менее, у большинства мужчин имеет место снижение продукции андрогенов по мере старения. Согласно некоторым исследованиям, механизм этого снижения не совсем ясен. Высказывались соображения, что ведущим является уменьшение центральной регуляции за счет снижения гонадотропин-рилизинг гормона, а также уменьшение чувствительности клеток Лейдига к действию лютеинизирующего гормона и нарушение отрицательной обратной связи между “периферией” и гонадотропинами. Какой из этих трех механизмов является первичным, требует уточнения [65].

Тем не менее, следует подчеркнуть, что главную роль в развитии и прогрессии рака предстательной железы играют андрогены (не обязательно в высокой концентрации) и рецепторы андрогенных гормонов в клетках простаты. Это доказывает ся, в первую очередь, эффективностью в лечении рака простаты антиандрогенных препаратов и агонистов рецепторов гонадотропин-рилизинг гормона, вызывающих снижение продукции эндогенных тестикулярных гормонов.

Однако прямых доказательств гиперандрогении тестикулярного происхождения у пациентов с опухолями предстательной железы не получено. С одной стороны, с возрастом снижается уровень свободного тестостерона и биологическая активность андрогенов в тканях-мишенях, что влечет за собой уменьшение мышечной массы и минеральной плотности костей и увеличение объема висцерального жира [66]. В то же время снижение уровня этой фракции тестостерона может быть незначительным, хотя следует отметить, что секреция лютеинизирующего гормона при этом повышается, и это повышение достоверно положительно коррелирует с возрастом [67]. Существенную роль в создании относительной гиперандрогении может играть возникающее по мере старения нарушение циркадного ритма продукции тестостерона, что, главным образом, зависит от изменений на уровне гипоталамо-гипофизарной регуляции [68, 69]. В частности, это показано и по изменению характера выброса лютеинизирующего гормона у пожилых людей в ответ на стимуляцию лютеинизирующего гормона – рилизинг гормона [70]. В работе роттердамской группы исследователей, проведенной на 3048 мужчинах с опухолями предстательной железы и на здоровых лицах, продемонстрировано, что при раке простаты все же повышено содержание в крови свободного тестостерона, но также и ДЭА-сульфата [71].

Отметим, что определенную роль в генезе рака предстательной железы могут играть, наряду с ДЭА-сульфатом, и другие фракции андрогенов надпочечников – как источник гормонов после орхиэктомии, а также и активность фермента 5 α -редуктазы, обеспечивающего синтез дигидротестостерона [72] непосредственно в ткани опухоли.

Отдавая должное проблеме потенциальных взаимосвязей состояния ГГС и периферических эндокринных желез в формировании риска возникновения опухолей гормонозависимых тканей, следует отметить, что злокачественные новообразования, наряду с атеросклерозом, предшествующим сосудистой патологии (кардиоваскулярной и цереброваскулярной), и сахарным диабетом 2 типа, нередко рассматриваются на единой платформе ведущих неинфекционных заболеваний на том основании, что они развиваются и выявляются особенно активно по мере старения и, как полагают, на фоне сходных возраст-ассоциированных метаболических и гормональных изменений [27, 73]. При всей значимости подобных заключений, поддерживаемых многими исследователями, справедливости ради следует отметить, что постепенно накапливаются свидетельства и определенного несходства в этом отношении отдельных основных неинфекционных заболеваний между собой [74], что, как видно, заслуживает дополнительного анализа.

Говоря об отдельных неинфекционных заболеваниях, достаточно хорошо известно, что ведущее место среди основных причин смертности занимает ишемиче-

ская болезнь сердца (ИБС). По определению комиссии ВОЗ, ИБС представляет собой острую или хроническую дисфункцию, возникающую в результате абсолютного или относительного уменьшения снабжения миокарда артериальной кровью. К факторам риска ИБС, наряду с атеросклерозом, относят также артериальную гипертензию, сахарный диабет, ожирение и возраст. Отмечены и определенные гендерные различия заболеваемости. По данным московской клиники, в которую обращались пациенты с ИБС, показано, что 71% пациентов имел возраст старше 60 лет и число заболевших мужчин было в 2.8 раза выше, чем число женщин [75]. Результаты, представленные ВОЗ по нескольким странам, включая Россию, а также Китай и Мексику, свидетельствуют о том, что ИБС и инсульт являются ведущими причинами смерти. Стандартизированное по возрасту распространение ИБС в России составило 47.5% по сравнению с 9.5% в Южной Африке [76], указывая на возможную роль этнических особенностей и образа жизни.

Максимальный уровень совокупной онкологической заболеваемости в популяции России отмечается в возрасте 75–79 лет. Соотношение показателей мужского и женского населения различается в разных возрастных группах – в 50–59 лет оно равно 1.0, в 60–69 – 1.6, в 70–79 лет – 1.9. В возрастной группе 60 лет и старше у мужчин доминируют опухоли легких (17.3%), предстательной железы (18.4%) и кожи (12.4%), у женщин опухоли кожи (20.2%), молочной железы (18.1%), ободочной кишки (8.9%) и тела матки (7.5%) [77].

Заболеваемость раком молочной железы растет после 50 лет и половина новых случаев выявления этой патологии отмечается в 65 лет и старше [78, 79]. Учитывая дальнейший рост числа пожилых людей в популяции, в частности, в США к 2030 г. ожидают экспоненциальный рост пожилых женщин с опухолями молочной железы [80].

Второе место после рака молочной железы по частоте возникновения у женщин и первое среди злокачественных новообразований гинекологической области занимает рак эндометрия. Возникновение рака эндометрия, как правило, также связано с возрастным фактором. В работе 2016 г. приводятся данные, что за предшествующие 20 лет смертность от рака эндометрия выросла более, чем на 100%. Средний возраст больных раком эндометрия составляет 63 года и подчеркивается, что 100% опухолей обнаруживаются после 50 лет [81]. В России максимальное число случаев рака эндометрия выявляется в возрасте 55–69 лет (средний возраст 62.4 года), хотя определенный уровень заболеваемости отмечается и в репродуктивном периоде [82], когда состояние ГГС, как говорилось выше, отличается от особенностей функционирования этой системы в менопаузе. По степени гормонозависимости ранее выделяли 2 типа рака эндометрия – I и II, причем I тип наблюдался у 60–70% больных и помимо гиперэстрогении при нем выявлялись такие присущие пожилому возрасту нарушения, как ожирение, сахарный диабет 2 типа и гипертоническая болезнь [83]. Однако более поздние исследования показали, что и при втором типе рака эндометрия, который характеризуется более агрессивным течением, также имеется связь с ожирением и диабетом [84]. С ожирением связывают 57% от всех случаев рака эндометрия, зарегистрированных в США [85]. В недавнее время все чаще используется подразделение рака эндометрия не на два, а на четыре молекулярно-биологических типа [86], и хотя первые сравнительные сопоставления гормонально-метаболического статуса (включая частоту диабета) у женщин с отдельными типами этого рака уже проводились [87], оценка состояния ГГС при этих типах еще подлежит изучению.

К опухолям, возникающим преимущественно в пожилом возрасте, относится и рак предстательной железы. При анализе 349517 больных раком предстательной железы, заболевших в США с 2007 по 2012 гг. показано, что 89.7% пациентов имели возраст старше 55 лет [88]. В России рак предстательной железы в 2004 г. составлял

6.9%, а в 2009 г. — уже 10.7% среди всех злокачественных новообразований мужского населения [89].

Особенностью рака предстательной железы, отличающей его от ряда других новообразований, является инверсная связь между заболеваемостью карциномой простаты и частотой развития сахарного диабета 2 типа [90], причины чего продолжают изучаться. Тем не менее, факторы, сопряженные с метаболическим синдромом, являются факторами риска рака предстательной железы, возможно, за счет других элементов, составляющих основу этого синдрома, включая инсулинорезистентность и висцеральное (центральное ожирение), при котором нарушения в состоянии ГГС и некоторые другие особенности выражены в большей степени, чем при превалировании подкожного жирового депо [91]. В результате эти изменения способствуют развитию хронического воспалительного процесса, сопровождающегося продукцией провоспалительных цитокинов адипоцитами и иммунными клетками, что создает среду, благоприятную для развития опухолей [92]. Предполагается, что метаболические нарушения могут быть первичными в снижении уровня тестостерона, так как негативная связь между параметрами, характеризующими метаболический синдром, и уровнем тестостерона, по некоторым данным, может возникать и независимо от возраста [93].

Необходимо учитывать также роль ИФР-1 и других ростовых факторов и гормонов, влияющих на процессы пролиферации, что следует сопоставить с данными о том, что во многих опухолях и, в частности, в ткани рака молочной железы и простаты обнаружены рецепторы инсулина и ИФР-1, объясняющие передачу как метаболического, так и пролиферативного сигнала [94, 95].

Наряду с инсулином и рядом ростовых факторов, глюкоза также может участвовать в реализации процессов канцерогенеза. Показано, что помимо влияния на клеточное размножение, глюкоза может обладать и прогенотоксическим действием. Подобный эффект глюкозы может объясняться ее способностью стимулировать образование в митохондриях реактивных форм кислорода, которые оказывают воздействие, постепенно приводящее к геномным и хромосомным повреждениям [96, 97].

По аналогии с событиями, выявленными при болезни Альцгеймера, когда нарушенный метаболизм глюкозы сочетался с дисфункцией митохондрий и оксидативным повреждением ДНК в клетках головного мозга [98], можно ожидать, что такие же процессы могут быть свойственны и “традиционным” возрастным изменениям состояния ГГС, приводя, как следствие, в том числе, к выраженным метаболическим сдвигам и предрасположенности к развитию некоторых обсуждавшихся выше основных неинфекционных заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поскольку возрастные изменения метаболических показателей, проявляющиеся ожирением, резистентностью к инсулину, гиперлипидемией и зачастую индуцируемые изменением состояния ГГС, связаны в немалом числе случаев с развитием патологии, которая, будучи обозначена как основные неинфекционные заболевания, в сегодняшнем мире является основной причиной смертности, несомненно, следует считать оправданными меры по предупреждению или ослаблению проявлений обсуждавшихся обменных нарушений путем изменения особенностей питания, физической активности, некоторых фармакологических препаратов (типа антидиабетических бигуанидов [27, 99], глифлозинов, ряда гиполипидемических средств [100]) и отказа от курения (в частности, потому, что в результате курения возрастает частота сахарного диабета 2 типа, прогрессируют его осложнения, меняется состояние ГГС, приводящее к ранней менопаузе, и т.д. [101, 102]).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Статья подготовлена при поддержке РФФИ (проект № 18-015-00026).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Шпаков А.О.* Гонадотропины: от теории к клинической практике. СПб. Политех-Пресс. 2018. [*Shpakov A.O.* Gonadotropins: from the theory to clinical practice. SPb. Politech-Press. 2018. (In Russ)].
2. *Gooren L.* Androgens and estrogens in their negative feedback action in the hypothalamo-pituitary-testis axis: site of action and evidence of their interaction. *J. Steroid. Biochem.* 33: 757–761. 1989.
3. *Dilman V.M., Anisimov V.N.* Hypothalamic mechanisms of ageing and of specific age pathology-I. Sensitivity threshold of hypothalamo-pituitary complex to homeostatic stimuli in the reproductive system. *Exp. Gerontol.* 14(4): 161–174. 1979.
4. *Miyamoto J., Matsumoto T., Shiina H., Inoue K., Takada I., Ito S., Itoh J., Minematsu T., Sato T., Yanase T., Nawata H., Osamura Y.R., Kato S.* The pituitary function of androgen receptor constitutes a glucocorticoid production circuit. *Mol. Cell. Biol.* 27: 4807–4814. 2007.
5. *Proietto S., Yankelovich L., Villarreal F.M., Inserra P., Charif S.E., Schmidt A.R., Cortasa S.A., Corso M.C., Di Giorgio N.P., Lux-Lantos V., Vitullo A.D., Halperin J., Dorfman V.B.* American plains vizcacha, *Lagostomus maximus* Rodentia, Caviomorpha. *Gen. Comp. Endocrinol.* 273: 40–51. 2019.
6. *Rimon-Dahari N., Yerushalmi-Heinemann L., Alyagor L., Dekel N.* Ovarian Folliculogenesis Results. *Probl. Cell. Differ.* 58: 167–190. 2016.
7. *Шпаков А.О., Деркач К.В.* Новые достижения в изучении эндогенных регуляторов синтеза и секреции гонадотропинов. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 12: 1409–1427. 2018. [*Chpakov A.O., Derkach K.V.* New achievements in studying of the endogenous regulators of synthesis and secretion of gonadotropins. *Russ. J. Physiol.* 12: 1409–1427. 2018. (In Russ)].
8. *Xu Y., Xie J., Wan L., Wang M., Xu Y., Wang H., Dong M.* Follistatin-like 3, an activin A binding protein, is involved in early pregnancy loss. *Biomed. Pharmacother.* 121: 109577. 2020.
9. *Шпаков А.О.* Висфатин и его роль в регуляции репродуктивной системы. *Трансляц. мед.* 2: 225–236. 2019. [*Shpakov A.O.* Visfatin and its role in regulation of reproductive system. *Translat. med.* 2: 225–236. 2019. (In Russ)].
10. *Darabi H., Ostovar A., Raeisi A., Kalantarhormozi M.R., Assadi M., Akbarzadeh S., Momeni S., Dobaradaran S., Vahdat K., Nabipour I.* The correlation between insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and novel adipocytokines in postmenopausal women: A population-based study. *Endocr. Res.* 42(3): 191–197. 2017.
11. *Tyczewska M., Milecka P., Szyszka M., Celichowski P., Jopek K., Komarowska H., Malendowicz L.K., Ruciński M.* Expression profile of Galp, alarin and their receptors in rat adrenal gland. *Adv. Clin. Exp. Med.* 28(6): 737–746. 2019.
12. *Makrigiannakis A., Vrekoussis T., Zoumakis E., Navrozoglou I., Kalantaridou S.N.* CRH Receptors in Human Reproduction. *Curr. Mol. Pharmacol.* 11(1): 81–87. 2018.
13. *Robert J., Handa R.J., Weiser M.J.* Gonadal Steroid Hormones and the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. *Front. Neuroendocrinol.* 35(2): 197–220. 2014.
14. *Kalantaridou S.N., Makrigiannakis A., Zoumakis E., Chrousos G.P.* Reproductive functions of corticotropin-releasing hormone; research and potential clinical utility of antalarmins CRH receptor type 1 antagonists. *Am. J. Reprod. Immunol.* 51(4): 269–74. 2004.
15. *Ortiga-Carvalho T.M., Chiamolera M.I., Pazos-Moura C.C., Wondisford F.E.* Hypothalamus-Pituitary-Thyroid axis. *Compar. Physiol.* 6(3): 1387–4283. 2016.
16. *Hoermann R., Midgley J.E.M., Larisch R., Dietrich J.W.* The role of functional thyroid capacity in pituitary thyroid feedback regulation. *Eur. J. Clin. Invest.* 48(10): e13003. 2018.
17. *Di Paolo V., Mangialardo C., Zacà C., Barberi M., Sereni E., Borini A., Centanni M., Cotichio G., Verga-Falzacappa C., Canipari R.* Thyroid hormones T3 and T4 regulate human luteinized granulosa cells, counteracting apoptosis and promoting cell survival. *J. Endocrinol. Invest.* 2020 <https://doi.org/10.1007/s40618-019-01169-5>
18. *Van der Spek A.H., Surovtseva O.V., Jim K.K., van Oudenaren A., Brouwer M.C., Vandembroucke-Grauls C.M.J.E., Leenen P.J.M., van de Beek D., Hernandez A., Fliers E., Boelen A.* Regulation of Intracellular Triiodothyronine Is Essential for Optimal Macrophage Function. *Endocrinology.* 159(5): 2241–2252. 2018.
19. *Fekete C., Lechan R.M.* Central Regulation of Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis Under Physiological and Pathophysiological Conditions. *Endocrin. Rev.* 30(2): 159–194. 2014.
20. *Ghamari-Langroudi M., Srisai D., Cone R.D.* Multinodal regulation of the arcuate/paraventricular nucleus circuit by leptin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108: 355–360. 2011.

21. *Panveloski-Costa A.C., Serrano-Nascimento C., Bargi-Souza P., Poyares L.L., de S. Viana G., Nunes M.T.* Beneficial effects of thyroid hormone on adipose inflammation and insulin sensitivity of obese Wistar rats. *Physiol. Rep.* 6(3): e13550. 2018.
22. *Bergan-Roller H.E., Sheridan M.A.* The growth hormone signaling system: Insights into coordinating the anabolic and catabolic actions of growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 258: 119–133. 2018.
23. *Bergan-Roller H.E., Ickstadt A.T., Kittilson J.D., Sheridan M.A.* Insulin and insulin-like growth factor-1 modulate the lipolytic action of growth hormone by altering signal pathway linkages. *Gen. Comp. Endocrinol.* 248: 40–48. 2017.
24. *Qiu H., Yang J.K., Chen C.* Influence of insulin on growth hormone secretion, level and growth hormone signalling. *Sheng Li Xue Bao.* 69(5): 541–556. 2017.
25. *Mazziotti G., Giustina A.* Glucocorticoids and the regulation of growth hormone secretion. *Nat. Rev. Endocrinol.* 9(5): 265–276. 2013.
26. *Huffman D.M., Farias Quipildor G., Mao K., Zhang X., Wan J., Apontes P., Cohen P., Barzilai N.* Central insulin-like growth factor-1 (IGF-1) restores whole-body insulin action in a model of age-related insulin resistance and IGF-1 decline. *Aging Cell.* 1: 181–186. 2016.
27. *Дильман В.М.* 4 модели медицины. Л. Медицина. 1987. [*Dilman V.M.* Four Models of Medicine. L. Medicine. 1987. (In Russ)].
28. *Gan E.H., Quinton R.* Physiological significance of the rhythmic secretion of hypothalamic and pituitary hormones. *Prog. Brain Res.* 181: 111–126. 2010.
29. *Gustafson B., Hedjazifar S., Gogg S., Hammarstedt A., Smith U.* Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* 4: 193–200. 2015.
30. *Gustafson B., Nerstedt A., Smith U.* Reduced subcutaneous adipogenesis in human hypertrophic obesity is linked to senescent precursor cells. *Nat. Commun.* 10(1): 2757. 2019.
31. *Ráfols E.M.* Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinol. Nutr.* 61(2): 100–112. 2014.
32. *Cignarelli A., Genchi V.A., Perrini S., Natalicchio A., Laviola L., Giorgino F.* Insulin and Insulin Receptors in Adipose Tissue Development. *Int. J. Mol. Sci.* 20(3): 759. 2019.
33. *Oyola M.G., Handa R.J.* Hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress.* 20(5): 476–494. 2017.
34. *Gaffey A.E., Bergeman C.S., Clark L.A., Wirth M.M.* Aging and the HPA axis: Stress and resilience in older adults. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 68: 928–945. 2016.
35. *Xiong F., Zhang L.* Role of the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis in Developmental Programming of Health and Disease. *Front. Neuroendocrinol.* 34(1): 27–46. 2013.
36. *Vamvakopoulos N.C., Chrousos G.P.* Evidence of direct estrogenic regulation of human corticotropin-releasing hormone gene expression. Potential implications for the sexual dimorphism of the stress response and immune/inflammatory reaction. *J. Clin. Invest.* 92: 1896–1902. 1993.
37. *Rubin R.T., Rhodes M.E., O’Toole S., Czambel R.K.* Sexual diergism of hypothalamo-pituitary-adrenal cortical responses to low-dose phytostigmine in elderly vs. young women and men. *Neuropsychopharmacology.* 26(5): 672–681. 2002.
38. *Ferrari E., Magri F.* Role of neuroendocrine pathways in cognitive decline during aging. *Ageing Res. Rev.* 7: 225–233. 2008.
39. *Gan E.H., Quinton R.* Physiological significance of the rhythmic secretion of hypothalamic and pituitary hormones. *Prog. Brain Res.* 181: 111–126. 2010.
40. *Ayuk J., Sheppard M.C.* Does acromegaly enhance mortality? *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 9: 33–39. 2008.
41. *Miller R.A., Harper J.M., Galecki A., Burke D.T.* Big mice die young: early life body weight predicts longevity in genetically heterogeneous mice. *Aging Cell.* 1: 22–29. 2002.
42. *Aguiar-Oliveira M.H., Oliveira F.T., Pereira R.M., Oliveira C.R., Blackford A., Valenca E.H., Santos E.G., Gois-Junior M.B., Meneguz-Moreno R.A., Araujo V.P., Oliveira-Neto L.A., Almeida R.P., Santos M.A., Farias N.T., Silveira D.C., Cabral G.W., Calazans F.R., Seabra J.D., Lopes T.F., Rodrigues E.O., Porto L.A., Oliveira I.P., Melo E.V., Martari M., Salvatori R.* Longevity in untreated congenital growth hormone deficiency due to a homozygous mutation in the GHRH receptor gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95: 714–21. 2010.
43. *Jørgensen J.O., Krag M., Jessen N., Nørrelund H., Vestergaard E.T., Møller N., Christiansen J.S.* Growth hormone and glucose homeostasis. *Horm. Res.* 62: 51–55. 2004.
44. *Petersen M.C., Shulman G.I.* Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol. Rev.* 98(4): 2133–2223. 2018.
45. *Hotamisligil G.S.* Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell.* 140: 900–917. 2010.
46. *Lackey D.E., Olefsky J.M.* Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12: 15–28. 2016.

47. Olefsky J.M., Glass C.K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 72: 219–246. 2010.
48. Petersen K.F., Dufour S., Befroy D., Lehrke M., Hendler R.E., Shulman G.I. Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 54: 603–608. 2005.
49. van den Beld A.W., Kaufman J.M., Zillikens M.C., Lamberts S.W.J., Egan J.M., van der Lely A.J. The physiology of endocrine systems with ageing. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 6(8): 647–658. 2018.
50. Yoneshiro T., Aita S., Matsushita M., Kayahara T., Kameya T., Kawai Y., Iwanaga T., Saito M. Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J. Clin. Invest.* 123: 3404–3408. 2013.
51. Berstein L.M. Cancer and heterogeneity of obesity: a potential contribution of brown fat. *Future Oncol.* 8(12): 1537–1548. 2012.
52. Adameczak M., Wiecek A. The adipose tissue as an endocrine organ. *Semin. Nephrol.* 33(1): 2–13. 2013
53. Saklayen M.G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* 20(2): 12. 2018.
54. Шпаков А.О. Адипокины и их роль в регуляции репродуктивных функций. СПб. Политех-Пресс. 2018. [*Shpakov A.O. Adipokines and their role in regulation of reproductive functions. SPb. Politech-Press. 2018. (In Russ)*].
55. Wang M.Y., Chen L., Clark G.O., Lee Y., Stevens R.D., Ilkayeva O.R., Wenner B.R., Bain J.R., Charron M.J., Newgard C.B., Unger R.H. Leptin therapy in insulin-deficient type I diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 4813–4819. 2010.
56. Alberti K.G., Eckel R.H., Grundy S.M., Zimmet P.Z., Cleeman J.I., Donato K.A., Fruchart J.C., James W.P., Loria C.M., Smith S.C. Jr; *International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity.* Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 120: 1640–1645. 2009.
57. Burger H.G., Hale G.E., Dennerstein L., Robertson D.M. Cycle and hormone changes during perimenopause: the key role of ovarian function. *Menopause.* 15(4 Pt 1): 603–612. 2008.
58. Lenton E.A., Sexton L., Lee S., Cooke I.D. Progressive changes in LH and FSH and LH: FSH ratio in women throughout reproductive life. *Maturitas.* 10(1): 35–43. 1988.
59. Stefanska A., Cembrowska P., Kubacka J., Kuligowska-Prusinska M., Sypniewska G. Gonadotropins and Their Association with the Risk of Prediabetes and Type 2 Diabetes in Middle-Aged Postmenopausal Women. *Dis. Markers.* 2019: 2384069. 2019.
60. Reame N.E., Kelche R.P., Beitins I.Z., Yu M.Y., Zawacki C.M., Padmanabhan V. Age effects of follicle-stimulating hormone and pulsatile luteinizing hormone secretion across the menstrual cycle of premenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81(4): 1512–1518. 1996.
61. Vanden Brink H., Robertson D.M., Lim H., Lee, Chizen D., Harris G., Hale G., Burger H., Baerwald A. Associations Between Antral Ovarian Follicle Dynamics and Hormone Production Throughout the Menstrual Cycle as Women Age. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 100(12): 4553–4562. 2015.
62. Prior J.C. Ovarian aging and the perimenopausal transition: the paradox of endogenous ovarian hyperstimulation. *Endocrine.* 26(3): 297–300. 2005.
63. Dafopoulos K.C. FSH and LH responses to GnRH after ovariectomy in postmenopausal women. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 60(1): 120–124. 2004.
64. Gérard C., Brown K.A. Obesity and breast cancer – Role of estrogens and the molecular underpinnings of aromatase regulation in breast adipose tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.* 466: 15–30. 2018.
65. Veldhuis J.D. Aging and Hormones of the Hypothalamo-Pituitary Axis: gonadotropic axis in men and somatotrophic axes in men and women. *Ageing Res. Rev.* 7(3): 189–208. 2008.
66. Gooren L.J. Endocrine aspects of ageing in the male. *Mol. Cell. Endocrinol.* 145(1–2): 153–159. 1998.
67. Neaves W.B., Johnson L., Porter J.C., Parker C.R. Jr., Petty C.S. Leydig cell numbers, daily sperm production, and serum gonadotropin levels in aging men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59(4): 756–763. 1984.
68. Bremner W.J., Vitiello M.V., Prinz P.N. Loss of circadian rhythmicity in blood testosterone levels with aging in normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56(6): 1278–1281. 1983.
69. Luboshitzky R., Shen-Orr Z., Herer P. Middle-aged men secrete less testosterone at night than young healthy men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88(7): 3160–3166. 2003.

70. *Winters S.J., Troen P.* Episodic luteinizing hormone (LH) secretion and the response of LH and follicle-stimulating hormone to LH-releasing hormone in aged men: evidence for coexistent primary testicular insufficiency and an impairment in gonadotropin secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 55(3): 560–565. 1982.
71. *Siemes C., Visser L.E., de Jong F.H., Coebergh J.W., Uitterlinden A.G., Hofman A., Stricker B.H., van Schaik R.H.* Cytochrome P450 3A gene variation, steroid hormone serum levels and prostate cancer-The Rotterdam Study. *Steroids.* 75(12): 1024–1032. 2010.
72. *Barnard M., Mostaghel E.A., Auchus R.J., Storbeck K.H.* The role of adrenal derived androgens in castration resistant prostate cancer. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 197: 105506. 2019.
73. *Eyre H., Kahn R., Robertson R.M., ACS/ADA/AHA Collaborative Writing Committee.* Preventing cancer, cardiovascular disease, and diabetes: a common agenda for the American Cancer Society, the American Diabetes Association and the American Heart Association. *CA: Cancer J. Clin.* 54(4): 190–207. 2004.
74. *Berstein L.M.* Dissimilar associations of same metabolic parameters with main chronic noncommunicable diseases (cancer vs some other NCDs). *Future Oncol.* 15(35): 4003–4007. 2019.
75. *Александрова Е.Б.* Хроническая сердечная недостаточность у больных гипертонической болезнью и ишемической болезнью сердца: возрастные и гендерные аспекты. *Кардиология.* 53 (7): 40–44. 2013. [*Aleksandrova E.B.* Chronic heart failure in patients with arterial hypertension and ischemic heart disease: age and gender characteristics. *Kardiologia.* 53(7): 40–44. 2013 (In Russ)].
76. *Ruan Y., Guo Y., Zheng Y., Huang Z., Sun S., Kowal P., Shi Y., Wu F.* Cardiovascular disease (CVD) and associated risk factors among older adults in six low-and middle-income countries: results from SAGE Wave 1. *BMC Public Health.* 18(1): 778. 2018.
77. *Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. (Ред.)* Злокачественные опухоли в России в 2018 г. (Заболееваемость и смертность). МНИОИ им П.А.Герцена, филиал ФГБУ “НМИЦ радиологии” Минздрава России. Москва. 2019. [*Kaprin A.D., Starinski V.V., Petrova G.V. (Eds.)*. Malignant Tumors in Russia in 2018 (Morbidity and Mortality). P.A. Herzen Institute of oncology, branch of FSBI “NMRC of Radiology”, Ministry of Health of Russia. Moscow. 2019. (In Russ)].
78. *Siegel R., DeSantis C., Virgo K., Stein K., Mariotto A., Smith T., Cooper D., Gansler T., Lerro C., Fedewa S., Lin C., Leach C., Cannady R.S., Cho H., Scoppa S., Hachey M., Kirch R., Jemal A., Ward E.* Cancer treatment and survivorship statistics. *CA: Cancer J. Clin.* 62: 220–241. 2012.
79. *Barginear M.F., Muss H., Kimmick G., Owusu C., Mrozek E., Shahrokni A., Ballman K., Hurria A.* Breast cancer and aging: results of the U13 conference breast cancer panel. *Breast Cancer Res. Treat.* 146(1): 1–6. 2014.
80. *Smith B.D., Smith G.L., Hurria A., Hortobagyi G.N., Buchholz T.A.* Future of cancer incidence in the United States: burdens upon an aging, changing nation. *J. Clin. Oncol.* 27: 2758–2765. 2009.
81. *Braun M.M., Overbeek-Wager E.A., Grumbo R.J.* Diagnosis and Management of Endometrial Cancer. *Am. Fam. Physician.* 93(6): 468–474. 2016.
82. *Максимов С.Я., Хаджимба А.В., Вышинская Е.А., Соболев И.В., Ильин А.А.* Рак органов репродуктивной системы в молодом возрасте. Практическая онкология. 18(2): 185–196. 2017. [*Maximov S.Y., Hadjimba A.V., Vichinskaya E.A., Sobolev I.V., Ilyin A.A.* Reproductive system cancer at a young age. *Practical Oncology.* 18(2): 185–196. 2017. (In Russ)].
83. *Бохман Я.В.* Руководство по онкогинекологии. Л. Медицина. 1989. [*Bohman Ya.V.* Gynecological oncology Handbook. L. Medicine. 1989. (In Russ)].
84. *Setiawan V.W., Yang H.P., Pike M.C., McCann S.E., Yu H., Xiang Y.B., Wolk A., Wentzensen N., Weiss N.S., Webb P.M., van den Brandt P.A., van de Vijver K., Thompson P.J., Australian National Endometrial Cancer Study Group, Strom B.L., Spurdle A.B., Soslow R.A., Shu X.O., Schairer C., Sacerdote C., Rohan T.E., Robien K., Risch H.A., Ricceri F., Rebbeck T.R., Rastogi R., Prescott J., Polidoro S., Park Y., Olson S.H., Moysich K.B., Miller A.B., McCullough M.L., Matsuno R.K., Magliocco A.M., Lurie G., Lu L., Lissowska J., Liang X., Lacey J.V. Jr., Kolonel L.N., Henderson B.E., Hankinson S.E., Håkansson N., Goodman M.T., Gaudet M.M., Garcia-Closas M., Friedenreich C.M., Freudenheim J.L., Doherty J., De Vivo I., Courneya K.S., Cook L.S., Chen C., Cerhan J.R., Cai H., Brinton L.A., Bernstein L., Anderson K.E., Anton-Culver H., Schouten L.J., Horn-Ross P.L., Yang H.P., Pike M.C., McCann S.E.* Type I and II Endometrial Cancers: Have They Different Risk Factors? *J. Clin. Oncol.* 31(20): 2607–2618. 2013.
85. *Onstad M.A., Schmandt R.E., Lu K.H.* Addressing the Role of Obesity in Endometrial Cancer Risk, Prevention, and Treatment. *J. Clin. Oncol.* 34(35): 4225–4230. 2016.
86. *Talhok A., McConechy M.K., Leung S., Yang W., Lum A., Senz J., Boyd N., Pike J., Anglesio M., Kwon J.S., Karnezis A.N., Huntsman D.G., Gilks C.B., McAlpine J.N.* Confirmation of ProMisE: A simple, genomics-based clinical classifier for endometrial cancer. *Cancer.* 123(5): 802–813. 2017.

87. *Berstein L.M., Iyevleva A.G., Ivantsov A.O., Vasilyev D.A., Poroshina T.E., Berlev I.V.* Endocrinology of obese and nonobese endometrial cancer patients: is there role of tumor molecular-biological type? *Future Oncol.* 15(12): 1335–1346. 2019.
88. *Herget K.A., Patel D.P., Hanson H.A., Sweeney C., Lowrance W.T.* Recent decline in prostate cancer incidence in the United States, by age, stage, and Gleason score. *Cancer Med.* 5(1): 136–114. 2016.
89. *Чиссов В.И., Русаков И.Г.* Заболеваемость раком предстательной железы в Российской Федерации. Экспер. клин. урол. 2–3: 6–7. 2011 [*Chissov V.I., Rusakov I.G.* Incidence of prostate cancer in the Russian Federation. *Exp. Clin. Urology.* 2–3: 6–7. 2011. (In Russ)].
90. *Dankner R., Boffetta P., Keinan-Boker L., Balicer R.D., Berlin A., Olmer L., Murad H., Silverman B., Hoshen M., Freedman L.S.* Diabetes, prostate cancer screening and risk of low- and high-grade prostate cancer: an 11 year historical population follow-up study of more than 1 million men. *Diabetologia.* 59(8): 1683–1691. 2016.
91. *Esposito K., Chiodini P., Colao A., Lenzi A., Giugliano D.* Metabolic Syndrome and Risk of Cancer A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care.* 35(11): 2402–2411. 2012.
92. *Harvey A.E., Lashinger L.M., Hursting S.D.* The growing challenge of obesity and cancer: an inflammatory issue. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1229: 45–52. 2011.
93. *Hong D., Kim Y.S., Son E.S., Kim K.N., Kim B.T., Lee D.J., Kim K.M.* Total testosterone and sex hormone-binding globulin are associated with metabolic syndrome independent of age and body mass index in Korean men. *Maturitas.* 74(2): 148–153. 2013.
94. *Singh P., Alex J.M., Bast F.* Insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R) signaling systems: novel treatment strategies for cancer. *Med. Oncol.* 31(1): 805. 2014.
95. *Nandeesh H.* Insulin: a novel agent in the pathogenesis of prostate cancer. *Int. Urol. Nephrol.* 41(2): 267–272. 2009.
96. *Berstein L.M.* Role of endocrine-genotoxic switchings in cancer and other human diseases: basic triad. *Adv. Exp. Med. Biol.* 630: 35–51. 2008.
97. *Kasperski A., Kasperska R.* Bioenergetics of life, disease and death phenomena. *Theory Biosci.* 137(2): 155–168. 2018.
98. *Abolhassani N., Leon J., Sheng Z., Oka S., Hamasaki H., Iwaki T., Nakabeppu Y.* Molecular pathophysiology of impaired glucose metabolism, mitochondrial dysfunction, and oxidative DNA damage in Alzheimer's disease brain. *Mech. Ageing Dev.* 161: 95–104. 2017.
99. *Anisimov V.N.* Metformin for aging and cancer prevention. *Aging (Albany NY).* 2(11): 760–777. 2010.
100. *Berstein L.M.* Clinical usage of hypolipidemic and antidiabetic drugs in the prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett.* 224(2): 203–212. 2005.
101. *Zhu P., Pan X.F., Sheng L., Chen H., Pan A.* Cigarette Smoking, Diabetes, and Diabetes Complications: Call for Urgent Action. *Curr. Diab. Rep.* 17(9): 78. 2017.
102. *Zhu D., Chung H.F., Pandeya N., Dobson A.J., Cade J.E., Greenwood D.C., Crawford S.L.* Relationships between intensity, duration, cumulative dose, and timing of smoking with age at menopause: A pooled analysis of individual data from 17 observational studies. *PLoS Med.* 15(11): e1002704. 2018.

**Hypothalamic-Pituitary System: Age and Major Non-Infectious Diseases
(Malignant Neoplasms of Hormone-Dependent Tissues,
Cardiovascular Pathology and Type 2 Diabetes)**

L. M. Berstein^{a, *} and E. V. Tsyrlina^a

^a*Petrov National Medical Research Center of Oncology, RF Ministry of Health,
St. Petersburg, Russia*

^{*}*e-mail: levmb@endocrin.spb.ru*

This review contains basic information about the hypothalamo-pituitary system (HPS) and its parts; characterizes the role of age (focusing on aging) as a factor associated with changes in the state of HPS mediating predisposition to the chronic non-communicable human diseases, NCDs (in particular, such tumors as breast cancer, endometrial and prostate cancer; coronary heart disease as the leading cardiovascular pathology and type 2 diabetes) with the involvement of an important hormonal-metabolic complex based on obesity, insulin resistance, glucose intolerance, insulin-like growth factor-1 and shifts in the reproductive and hypothalamic-pituitary-adrenal system. Additionally, changes of HPS

status under stress, in case of disturbances of physiological rhythms and under the influence of a gender factor are mentioned. The review is summarized by information on possible measures to prevent NCDs, based on taking into account – among other approaches – the role of the HPS and the consequences of disruption of its functioning. The text of the review also touches upon the fact that, along with the widely recognized similarity of hormonal and metabolic factors that create a platform for the development of different NCDs, there are examples of their dissimilarities, which needs further research.

Keywords: hypothalamo-pituitary system, age, main non-communicable diseases, predisposition, approaches to prevention to diseases

ЦИТИРОВАТЬ:

Берштейн Л.М., Цырлина Е.В. Гипоталамо-гипофизарная система: возраст и основные неинфекционные заболевания (злокачественные новообразования гормонозависимых тканей, кардиоваскулярная патология и сахарный диабет 2 типа). Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(6): 667–682.

DOI: 10.31857/S0869813920060023

TO CITE THIS ARTICLE:

Berstein L.M., Tsyrlina E.V. Hypothalamic-Pituitary System: Age and Major Non-Infectious Diseases (Malignant Neoplasms of Hormone-Dependent Tissues, Cardiovascular Pathology and Type 2 Diabetes). Russian Journal of Physiology. 106(6): 667–682.

DOI: 10.31857/S0869813920060023

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

АЛЬФА-МЕЛАНОЦИТСТИМУЛИРУЮЩИЙ ГОРМОН
КАК РЕГУЛЯТОР ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНОЙ ОСИ

© 2020 г. О. В. Долотов*

Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

**E-mail: dolotov@img.ras.ru*

Поступила в редакцию 29.01.2020 г.

После доработки 15.03.2020 г.

Принята к публикации 15.03.2020 г.

Альфа-меланоцитстимулирующий гормон (α -МСГ) обладает широким спектром биологических активностей и продуцируется в гипофизе, гипоталамусе, стволе мозга, гиппокампе и ряде периферических тканей. α -МСГ и активируемые им рецепторы критически вовлечены в процессы регуляции энергетического баланса и массы тела. Существует очень тесная взаимосвязь на функциональном и нейроанатомическом уровнях между системой регуляции энергетического баланса и нейроэндокринного стрессового ответа. Обзор сфокусирован на вовлеченности α -МСГ в регуляцию гипоталамо-гипофизарной оси (ГГО). Данные, полученные с помощью центрального введения α -МСГ и его аналогов и с использованием генетически модифицированных животных, свидетельствуют о том, что α -МСГ аркуатного ядра гипоталамуса активирует ГГО как напрямую, так и через ряд промежуточных структур мозга, в том числе, через медиальную область миндалины. В связи с важнейшей ролью миндалины в интеграции стрессового ответа на нейроэндокринном и поведенческом уровнях, очевидно, что α -МСГ является важным участником этого процесса. Роль этого пептида в регуляции ГГО другими лимбическими структурами, гиппокампом и префронтальной корой остается неисследованной. Хотя основную роль в регуляции активности ГГО, по-видимому, играют меланокортиновые рецепторы MC4R, ряд данных указывает на возможное участие и рецепторов MC3R или MC5R. Известная противовоспалительная активность α -МСГ проявляется в его способности ослаблять вызванную центральным воспалением активацию ГГО. Гипофизарный α -МСГ секретируется в кровотоки при стрессовом ответе, однако, в отличие от АКТГ его секреция не тормозится глюкокортикоидами и стимулируется адреналином. Роль циркулирующего α -МСГ в стрессовом ответе остается неясной, но его возможной функцией является независимая от глюкокортикоидов негативная регуляция ГГО.

Ключевые слова: альфа-меланоцитстимулирующий гормон, гипоталамо-гипофизарная ось, стресс, аркуатное ядро, меланокортины, кортиколиберин, тиреолиберин

DOI: 10.31857/S0869813920060047

Альфа-меланоцитстимулирующий гормон (α -МСГ) является пептидом, состоящим из 13 аминокислотных остатков (Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂) и соответствующим N-концевой трети (последовательности 1–13) адренотропного гормона (АКТГ). В 1916 г. было обнаружено, что удаление гипофиза у головастиков приводит к потере ими темно-коричневой

окраски, и поиск гипофизарных факторов с меланоцитстимулирующей активностью привел к выделению в 1955 г. пептида, получившего свое название в связи со способностью вызывать потемнение меланоцитов (меланофоров) у земноводных, рептилий и рыб [1], и затем к идентификации родственных пептидов β -МСГ и трех видов γ -МСГ, различающихся длиной аминокислотной цепи [2]. В дальнейшем для α -МСГ, продуцирующегося у всех позвоночных, был показан очень широкий спектр биологических активностей, в том числе поведенческие, когнитивные, нейрорепрессорные, противовоспалительные и антимикробные эффекты [2–4], что делает этот пептид интересным объектом исследования как с точки зрения его роли в разнообразных физиологических процессах, так и с точки зрения использования его или родственных ему соединений для воздействия на различные патологии. Интерес к α -МСГ и активируемому им рецепторам существенно возрос в связи с его критической вовлеченностью в процессы регуляции энергетического баланса и массы тела [5]. В то же время, существует очень тесная взаимосвязь на функциональном и нейроанатомическом уровнях между системой регуляции энергетического баланса и нейроэндокринного стрессового ответа, что отражается, в частности, в высокой коморбидности связанных с ожирением патологий и связанных со стрессом психических расстройств [6]. Целью данного обзора являлось рассмотрение накопленных к настоящему времени данных о роли α -МСГ в функционировании гипоталамо-гипофизарной оси (ГГО).

Периферический α -МСГ. α -МСГ в организме продуцируется в гипофизе (главным образом, в промежуточной доле у грызунов и в дистальной части у человека), в мозге (преимущественно, в гипоталамусе) и в периферических тканях, в том числе в иммунных клетках, кератиноцитах и клетках желудочно-кишечного тракта [2, 7]. Наиболее интенсивная продукция α -МСГ происходит в гипофизе – сравнение концентраций пептида в тканях гипофиза и мозга крысы показывает, что уровни α -МСГ в задней доле гипофиза на 2–3 порядка выше, чем в передней доле (области продукции АКТГ), и на четыре порядка выше, чем в гипоталамусе и эпифизе [8]. Из промежуточной доли гипофиза α -МСГ секретируется в кровоток, причем при стрессовом ответе секреция резко усиливается [9–13]. Стимулирующий секрецию АКТГ из гипофиза пептидный фактор CRF (corticotrophin-releasing factor; другие его названия – corticotrophin-releasing hormone (CRH) и кортиколиберин) вызывает выброс также и α -МСГ, при этом глюкокортикоиды ингибируют выброс АКТГ, но не ингибируют выброс α -МСГ [14]. Аналогичное влияние глюкокортикоидов на секрецию АКТГ и α -МСГ обнаружено при иммобилизационном стрессе [13]. Активация при стрессе симпатoadреналовой системы и соответствующее повышение уровней адреналина стимулирует выброс α -МСГ, но не АКТГ [12, 13]. Таким образом, несмотря на то, что стрессовый ответ включает выброс в кровоток из гипофиза и α -МСГ и АКТГ, регуляция их секреции существенно различается.

Рецепторы α -МСГ. Клеточные рецепторы, активируемые α -МСГ, активируются также и АКТГ и образуют семейство меланокортиновых рецепторов (MCR), состоящее из пяти известных к настоящему времени подтипов. Меланокортиновые рецепторы являются семидоменными трансмембранными белками, сопряженными с G-белками [15]. α -МСГ активирует четыре подтипа (MC1R, MC3R, MC4R, MC5R) [2, 3, 15], а рецепторы MC2R, ответственные за адренокортикотропную активность АКТГ, активируются только АКТГ и его фрагментами длиннее, чем 1–16 [16]. В мозге обнаружена экспрессия меланокортиновых рецепторов MC3R, MC4R и MC5R [15, 17]. Сродство α -МСГ ко всем активируемым им меланокортиновым рецепторам выше, чем у АКТГ [18]. Наиболее высокую аффинность α -МСГ имеет к MC1R (K_i в субнанолярном диапазоне), более низкую к MC3R (K_i в нанолярном диапазоне – более 10 нмоль/л) и MC4R (K_i в субмикромольном диапазоне – более 200 нмоль/л) и наименьшую – к MC5R (K_i находится в микролярном диа-

пазоне) [18]. К эндогенным антагонистам MCR относится белок агути (131 аминокислотных остатка), экспрессирующийся в периферических тканях и являющийся антагонистом MC1R и MC4R, и родственный ему белок, AGRP (Agouti Gene-Related Protein, 112 аминокислотных остатка), экспрессирующийся в гипоталамусе и являющийся мощным антагонистом (или обратным агонистом) MC3R и MC4R с аффинностью в наномолярном диапазоне [2, 15, 19]. Интересно, что эндогенными агонистами активируемых α -МСГ меланокортиновых рецепторов в микромолярном диапазоне концентраций являются представители подсемейства β -дефензинов – коротких (38–42 аминокислотных остатка) многофункциональных пептидов с выраженными антимикробными свойствами и имеющих отличное от α -МСГ происхождение [20]. β -дефенсины экспрессируются, в частности, в мозге [21] и проявляют центральные эффекты – так, показано, что внутрижелудочковое введение этих пептидов снижает после голодания потребление корма и массу тела у мышей и крыс [20, 22]. Таким образом, этот третий класс эндогенных лигандов меланокортиновых рецепторов может играть важную (но пока малоисследованную) роль в функционировании меланокортиновой системы мозга в норме и при различных патологиях.

Продукция α -МСГ. α -МСГ практически не проникает через гематоэнцефалический барьер [23]. В отличие от анорексигенных эффектов центрального α -МСГ до настоящего времени не обнаружено такого же влияния периферического α -МСГ. Удаление гипофиза не снижает, но повышает уровни α -МСГ в гипоталамусе по меньшей мере на протяжении трех недель [8], что свидетельствует об автономном источнике α -МСГ в мозге. α -МСГ продуцируется из прогормона-белка проопио-меланокортина (ПОМК), являющегося предшественником целого ряда биологически активных пептидов, причем в разных тканях посттрансляционный процессинг ПОМК различен [2, 24, 25]: в передней доле гипофиза образуются N-терминальный фрагмент ПОМК, АКТГ, β -липотропин и в небольшом количестве γ -липотропин и β -эндорфин; в промежуточной доле, головном мозге и коже происходит дальнейший процессинг АКТГ с образованием α -МСГ и кортикотропиноподобного пептида промежуточной доли (CLIP), процессинг β -липотропина до β -МСГ и β -эндорфина, и образование γ -МСГ из N-терминального фрагмента. Важным, но недостаточно исследованным моментом является вероятная модификация эффектов меланоцитстимулирующих гормонов другим продуктом ПОМК, эндогенным опиоидом β -эндорфином. Например, показано, что при центральном введении этого пептида происходит стимуляция гипоталамической продукции и секреции CRF [26]. При процессинге ПОМК происходят дополнительные модификации пептидов, такие как ацетилирование, амидирование, фосфорилирование и метилирование, которые могут существенно влиять на активность и стабильность пептидов [24, 25]. В промежуточной доле гипофиза и стволе мозга (в ядре одиночного пути, nucleus tractus solitarius) происходит ацетилирование α -МСГ с N-конца и амидирование с C-конца, однако предполагается, что в гипоталамусе преимущественно присутствует дезацетилированная форма α -МСГ [24], имеющая более высокую аффинность к MC3R, MC4R и MC5R, чем ацетилированная [18]. В мозге α -МСГ продуцируется в экспрессирующих ПОМК нейронах (ПОМК-нейроны), причем значительная их часть является также и ГАМК-ергическими или глутаматергическими [27], часть является холинергическими [28], и почти все ПОМК-нейроны продуцируют пептид CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) [27]. Таким образом, передача сигнала α -МСГ осуществляется во взаимодействии с классическими нейротрансмиттерами, что может существенно модифицировать их действие [29].

ПОМК и α -МСГ в мозге. В отличие от AGRP, экспрессирующегося в мозге исключительно в аркуатном (дугообразном) ядре [30, 31], α -МСГ продуцируется по меньшей мере в нескольких отделах мозга – аркуатном ядре, ядре одиночного пути [32, 33]

и гиппокампе [34]. Экспрессия ПОМК обнаружена также и в миндалине [35], медиальной префронтальной коре, прилежащем ядре (nucleus accumbens), вентральной области покрышки (ventral tegmental area, VTA) и ряде других областей мозга [36, 37]. Наиболее высокие уровни α -МСГ найдены в аркуатном ядре, в других отделах мозга уровни α -МСГ значительно ниже [38]. Оценка числа ПОМК-нейронов в мозге мыши указывает на преимущественное их нахождение в аркуатном ядре — более 3000 нейронов и около 200 ПОМК-нейронов в ядре одиночного пути [32].

Ядро одиночного пути, аркуатное ядро, α -МСГ и гипофизотропные нейроны. Ядро одиночного пути, находящееся в стволе мозга, и аркуатное (инфундибулярное у приматов) ядро гипоталамуса являются тесно связанными друг с другом ведущими центрами, участвующими в поддержании энергетического баланса [39, 40]. Эти же области мозга играют важную роль в регуляции активности ГГО [41]. Аркуатное ядро примыкает к срединному возвышению (median eminence), лишенному гематоэнцефалического барьера, что позволяет нейронам аркуатного ядра быстро реагировать на изменения состава крови, в частности, на уровни циркулирующих факторов, контролируемых энергетический баланс [5, 42]. Более того, показано, что ПОМК- и AGRP-нейроны аркуатного ядра имеют проекции во внешнюю зону срединного возвышения [43]. Кроме того, аркуатное ядро служит важным центром регуляции болевых ощущений [44]. Ядро одиночного пути через волокна блуждающего нерва получает информацию от внутренних органов, и такие стрессоры, как болевые раздражители, гиповолемия и воспаление вызывают активацию норадренергических нейронов этого отдела. Группы норадренергических и адренергических нейронов ядра одиночного пути иннервируют область паравентрикулярного ядра гипоталамуса (PVN), содержащую продуцирующие CRF гипофизотропные нейроны, которые проецируются во внешнюю зону срединного возвышения и секретируют CRF в капилляры, соединяющие гипоталамус с гипофизом, осуществляя стимуляцию выброса АКТГ в ответ на острые системные стрессоры [29, 45]. Некахоламинергические нейроны ядра одиночного пути также участвуют в активации ГГО, главным образом, в ответ на психогенные стрессоры и в регуляции ее активности при хроническом стрессе [46]. В то же время нет данных о прямой иннервации синтезирующих CRF нейронов PVN нейронами ядра одиночного пути, экспрессирующих ПОМК. Однако показана тесная связь между ПОМК нейронами ядра одиночного пути и аркуатного ядра [47], причем две трети содержащегося в ядре одиночного пути α -МСГ имеет происхождение из ПОМК-нейронов аркуатного ядра [48]. В целом, несмотря на тесную связь и ядра одиночного пути и аркуатного ядра с PVN, по-видимому, наибольшая роль в прямой регуляции функций PVN принадлежит α -МСГ, имеющему происхождение из аркуатного ядра.

Аркуатное ядро тесно связано с PVN — показана значительная иннервация PVN аксонами нейронов аркуатного ядра [49, 50], и, в частности, иннервация ПОМК- и AGRP-нейронами аркуатного ядра нейронов PVN, синтезирующих CRF [51, 52] и тиреолиберин (TRH) [53]. Функциональность этой иннервации подтверждается тем, что внутрижелудочковое введение α -МСГ повышает уровень фосфорилирования (активации) регулирующего транскрипцию генов, кодирующих CRF и TRH, фактора CREB в гипофизотропных CRH- и TRH-продуцирующих нейронах PVN [54]. Введение в PVN NDP-МСГ, более стабильного аналога α -МСГ, приводило к повышению уровней в крови АКТГ и кортикостерона [55]. Аналогичный эффект вызывало и внутрижелудочковое введение α -МСГ [56]. Внутрижелудочковое введение во время эфирного стресса синтетического аналога α -МСГ меланотан-II, активирующего те же подтипы меланокортиновых рецепторов, что и α -МСГ, вызывало существенное повышение стимулированного уровня кортикостерона в крови [57]. Введение α -МСГ ослабляло базальную и стимулированную принудительным плаванием секрецию пролактина, но повышало уровень базальной секреции лютеинизирующего гормона [58]. Таким образом, центральное введение α -МСГ

оказывает активирующее влияние на ГГО. Однако важным моментом является то, что эти эффекты наблюдались на фоне функционирующей системы саморегуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГНО), осуществляемой, в первую очередь, глюкокортикоидами и оказывающих тормозящее действие на активность оси на центральном и периферическом уровнях [41, 59, 60]. В условиях отсутствия глюкокортикоидной регуляции ГГО (удаление надпочечников) внутрижелудочковое введение α -МСГ крысам, наоборот, ослабляло повышенную по сравнению с ложнооперированными животными секрецию АКТГ и секрецию CRF [61]. В связи с этим, при интерпретации данных о влиянии α -МСГ и других соединений на активность элементов ГГО в моделях *in vitro*, по-видимому, необходимо принимать во внимание возможное изменение эффекта и его направленности в зависимости от наличия в изучаемой системе глюкокортикоидного ингибирования.

Трансгенные мыши с повышенной экспрессией N-концевой части ПОМК, что обеспечивало повышение уровней α -МСГ и γ_3 -МСГ (агонист преимущественно MC3R), также проявляли пониженный базальный и вызванный иммобилизационным стрессом уровни пролактина при неизменных базальном и стимулированном уровнях кортикостерона [62]. В данной модели повышенная продукция меланоцитстимулирующих гормонов имела место не только в мозге, но и во всех других тканях, в связи с чем наблюдалась более темная окраска мышей [63]. Так как повышенная продукция меланоцитстимулирующих гормонов происходила и в гипофизе, отсутствие влияния повышенных уровней α -МСГ и γ_3 -МСГ в мозге на уровни кортикостерона, возможно, связано с тормозящим влиянием увеличенных количеств циркулирующих МСГ на активность ГГО.

Роль α -МСГ аркуатного ядра в регуляции функций PVN подтверждается изменениями энергетического баланса и ответа на острый стресс у животных с повреждением связей между аркуатным ядром и PVN [64]. Крысы с поврежденными связями по сравнению с ложнооперированными имели более высокий прирост массы тела, более высокое потребление корма и пониженный уровень АКТГ в плазме после острого иммобилизационного стресса, проведенного через неделю после операции. При этом у крыс с повреждением связей наблюдалось обеднение PVN пептидами α -МСГ и нейропептид Y (NPY), их накопление перед местом повреждения и снижение экспрессии CRF в PVN.

Интересно, что трансгенные мыши с нарушенной экспрессией ПОМК в нейронах мозга и нормальной экспрессией ПОМК в гипофизе имели повышенную экспрессию CRF в PVN, повышенные базальные уровни АКТГ и кортикостерона в крови, гипертрофированную кору надпочечников и демонстрировали более низкие уровни АКТГ при остром иммобилизационном стрессе [65]. Таким образом, хроническое отсутствие агониста меланокортиновых рецепторов в мозге стимулирует базальную активность ГГО, но ослабляет ее активацию при иммобилизационном стрессе. Механизмы этого явления требуют дальнейших исследований, однако, блокирование центральных меланокортиновых рецепторов MC3R и MC4R у обезьян внутрижелудочковым введением AGRP также вызывало повышение уровней АКТГ и кортикостерона [66], и аналогичный эффект наблюдался при введении AGRP в PVN крысы [55]. Меланокортиновые рецепторы обладают высокой конститутивной активностью и могут находиться в активированном состоянии в отсутствие связанного агониста [67]. Возможно, что базальная активность ГГО определяется диапазоном уровней активации центральных меланокортиновых рецепторов (находящихся, например, в участвующих в стрессовом ответе PVN или миндалине [45]), но выход как за верхнюю, так и за нижнюю границы вызывает активацию ГГО. Однако мутация в гене, кодирующем MC4R, вызывающая потерю функциональности рецептора, не приводила к изменениям базальных уровней АКТГ и кортикостерона в крови, но приводила к значительному снижению индуцированных острым иммобилизационным стрессом уровней этих гормонов [68].

Меланокортиновые рецепторы и эффекты α -МСГ на PVN. Важен вопрос о рецепторах, через которые α -МСГ аркуатного ядра воздействует на CRF-нейроны в PVN. Показано, что только 10–15% CRF-нейронов PVN крысы экспрессирует мРНК для MC4R [69]. Однако внутрижелудочковое введение α -МСГ повышало фосфорилирование CREB в 54% CRF-нейронов PVN [54]. Кроме того, введение меланотана II приводило к генерализованному повышению экспрессии CRF в PVN крысы [69], что противоречит тому, что относительно небольшое количество CRF-нейронов экспрессирует MC4R [69]. Более того, в PVN взрослого человека вообще не было обнаружено CRF-нейронов, экспрессирующих MC4R [70]. Интересно, что в этом же исследовании обнаружена экспрессия MC4R в нейронах PVN, экспрессирующих аргинин-вазопрессин (АВП) и окситоцин, хотя и в значительно меньшем числе нейронов, чем в супраоптическом ядре. Такие профили экспрессии MC4R в PVN ставят вопрос о том, какой подтип меланокортиновых рецепторов ответствен за стимуляцию α -МСГ продукции CRF в PVN. α -МСГ является агонистом четырех из пяти известных в настоящее время подтипов меланокортиновых рецепторов. В PVN крысы обнаружена экспрессия трех из них как на уровне мРНК, так и на уровне белка – MC3R, MC4R и MC5R, причем рецепторы на белковом уровне экспрессируются в соизмеримых количествах [17]. Таким образом, существует возможность того, что стимуляция α -МСГ CRF-нейронов PVN осуществляется не только через подтип MC4R, но и через MC3R или MC5R. Интересно, что сообщалось об отсутствии влияния внутрижелудочкового введения крысам агониста MC3R на уровни АКТГ и кортикостерона [71] и отсутствия экспрессии мРНК для MC3R и в мелких, и в крупных нейросекреторных клетках PVN [72], что повышает интерес к роли MC5R в регуляции активности ГГО. Требуется дальнейшее исследование роли различных подтипов меланокортиновых рецепторов в стимуляции CRF-нейронов PVN, но биологическое значение участия в стимуляции нескольких подтипов рецепторов может состоять в усилении гибкости ответа на стимуляцию α -МСГ, осуществляемой за счет активации рецепторов разной аффинности к α -МСГ в различных CRF-нейронах при достижении его различных концентраций в синаптической щели. Другое объяснение, также требующее дальнейших исследований, может состоять в более значительной роли АВП по сравнению с CRF (например, у человека) при осуществляемой α -МСГ активации ГГО. Несмотря на то, что ведущим фактором стимуляции выброса АКТГ из гипофиза считается CRF, показано, что ведущую роль может играть и АВП [41, 73].

Кроме того, показано, что менее половины TRH-продуцирующих мелкоклеточных нейронов PVN экспрессируют MC4R [74], однако внутрижелудочковое введение α -МСГ вызывает повышение экспрессии TRH во всех нейронах этого типа [75]. ПОМК-нейроны аркуатного ядра проецируются во многие гипоталамические и экстрагипоталамические области мозга [76, 77], и роль α -МСГ аркуатного ядра в стимуляции CRF- и TRH-продуцирующих нейронов PVN может быть и не прямой, то есть включать в себя передачу стимулирующих эти нейроны сигналов через другие отделы мозга. Действительно, нейроанатомические исследования свидетельствуют о том, что значительное количество нейронов дорсомедиального ядра гипоталамуса, иннервирующих PVN, ассоциированы с аксональными терминалями, содержащими α -МСГ [78]. Таким образом, сигналы аркуатного ядра, передаваемые с помощью α -МСГ, могут обрабатываться в дорсомедиальном ядре и через неэкспрессирующие ПОМК нейроны поступать к CRF-и TRH-нейронам PVN.

Эмоциональный стресс и α -МСГ. ПОМК-нейроны аркуатного ядра иннервируют не только области гипоталамуса и ствола мозга, но и другие структуры мозга, причем иннервация ПОМК- и AGRP-нейронами практически идентична [79, 80]. Однако такими метаболическими стрессорами, как голодание и глюкозная депривация, преимущественно активируются AGRP-нейроны аркуатного ядра, и происходит по-

давление активности ПОМК-нейронов [81, 82]. Напротив, значительно большая доля ПОМК-нейронов аркуатного ядра по сравнению с AGRP-нейронами быстро активируется в ответ не только на системные стрессоры, но и на стрессоры, имеющие эмоциональную составляющую, такие как принудительное плавание и иммобилизация [82], что означает участие в активации лимбических областей мозга таких как миндалина, гиппокамп, префронтальная кора [45]. ПОМК-нейронами иннервированы различные области миндалины [79, 80], играющей важнейшую роль в интеграции нейроэндокринного и поведенческого ответов на стрессоры [45]. Показано, что при эмоциональном стрессе (иммобилизация) активация ГГО нарушается после повреждения медиальной области миндалины, но не ее центрального ядра, в большей степени участвующего в ответе на системные стрессоры, такие как, например, системное введение [83]. В медиальной области миндалины обнаружена значительная экспрессия мРНК для MC4R [72, 84]. Острый иммобилизационный стресс вызывает активацию нейронов этой области, экспрессирующих MC4R, что с учетом иннервации медиальной области ПОМК-нейронами аркуатного ядра [79, 80] указывает на их активацию под действием α -МСГ аркуатного ядра [85]. При этом введение селективного агониста рецепторов MC4R в медиальную область миндалины вызывало повышение уровня кортикостерона в крови, а введение антагониста SHU9119, являющегося антагонистом MC3R и MC4R, не влияло на базальный уровень кортикостерона, но при остром иммобилизационном стрессе ускоряло снижение его повышенного уровня до базальных значений [85]. Таким образом, предполагается, что при действии эмоционального стрессора (иммобилизация) под действием α -МСГ происходит активация меланокортиновых рецепторов MC4R нейронов медиальной области миндалины, иннервируемых аксонами ПОМК-нейронов аркуатного ядра, и это повышает активацию ГГО, что приводит к повышению уровня кортикостерона в крови. В настоящее время неясно, как в этом случае происходит активация секреторных CRF-нейронов в PVN, так как миндалина и другие лимбические структуры не имеют проекций в PVN или имеют их в малой степени [86, 87]. Предполагается, что активация является не прямой и включает активацию нейронов ядра ложа концевой пластинки (bed nucleus of stria terminalis, BNST) [68, 85, 88], играющей важнейшую роль в обработке сигналов от лимбических структур при действии эмоциональных стрессоров и активации ГГО [86, 87]. При этом важным нерешенным вопросом остается выяснение молекулярных и нейроанатомических путей, приводящих к активации ПОМК-нейронов аркуатного ядра при воздействии эмоциональных стрессоров.

Воспалительная активация ГГО и α -МСГ. Хорошо известно, что ГГО активируется в ответ на системные и центральные воспалительные процессы [89, 90]. В то же время α -МСГ обладает мощной противовоспалительной активностью [3, 7], и можно было бы ожидать его влияния на активность ГГО в условиях нейровоспаления. Действительно, внутрижелудочковое введение провоспалительного цитокина IL-1 β вызывало повышение уровня кортикостерона в крови, которое ослаблялось при внутрижелудочковом введении α -МСГ [91]. Интересно, что аналогичный эффект наблюдался при введении γ -МСГ, это указывает на вовлеченность подтипа MC3R в ослабляющем влиянии α -МСГ на активность ГГО при нейровоспалении [91]. Влияние α -МСГ на активность оси при нейровоспалении подтверждается и тем, что внутрижелудочковое введение крысам антител против α -МСГ повышало стимулированные центральным введением IL-1 β уровни АКТГ и кортикостерона в крови [92]. Таким образом, в условиях нейровоспаления продуцируемый в мозге α -МСГ выступает как негативный регулятор активности ГГО.

Циркулирующий α -МСГ и ГГО. Если роль циркулирующих глюкокортикоидов в регуляции активности ГГО хорошо исследована [41, 59, 60], то неизвестно, есть ли влияние на нее циркулирующего α -МСГ. Как указывалось выше, α -МСГ выбра-

сывается из гипофиза при стрессовом ответе, однако, его биологическая роль при этом остается неясной. Как и АКТГ и глюкокортикоиды, α -МСГ обладает мощными противовоспалительными активностями, проявляет противомикробные эффекты, и его присутствие в кровотоке может быть реакцией на повреждения или подготовкой к ним. В отличие от АКТГ, циркулирующий α -МСГ не стимулирует секрецию глюкокортикоидов из коры надпочечников и не проявляет их метаболических эффектов и, таким образом, является защитным фактором без выраженных негативных эффектов, сопровождающих длительное или чрезмерное повышение уровней глюкокортикоидов. Кроме того, одной из функций циркулирующего α -МСГ потенциально может являться регуляция активности нейронов аркуатного ядра. ПОМК- и AGRP-нейроны аркуатного ядра имеют проекции во внешнюю зону срединного возвышения [43], а в терминалях срединного возвышения обнаружены специфические связывающие центры АКТГ и α -МСГ [93]. В то же время показана негативная обратная регуляция экспрессии CRF в PVN, осуществляемая циркулирующим АКТГ [94], а меланокортиновые рецепторы MC2R, активируемые только АКТГ, не экспрессируются во взрослом мозге [3, 15]. Таким образом, возможен механизм тормозящего влияния циркулирующего α -МСГ на активность ГГО. Косвенным свидетельством в пользу этого предположения могут служить полученные нами данные о предотвращении развития ангедонии и снижения массы тела у крыс в условиях длительной гиперактивации ГГО (хронический непредсказуемый стресс) системным введением α -МСГ [95]. В связи с дерегуляцией ГГО при связанных со стрессом патологиях, таких как депрессивные расстройства, изучение механизмов регуляции циркулирующим α -МСГ активности оси могло бы способствовать развитию новых подходов к лечению этих патологий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Существующие данные свидетельствуют о том, что α -МСГ аркуатного ядра способен активировать ГГО как напрямую, так и через ряд промежуточных структур мозга, в том числе, через медиальную область миндалины. В связи с важнейшей ролью миндалины в интеграции стрессового ответа на нейроэндокринном и поведенческом уровнях, очевидно, что α -МСГ является важным участником этого процесса. Роль α -МСГ в регуляции ГГО другими лимбическими структурами, гиппокампом и префронтальной корой остается неисследованной. Хотя основную роль в регуляции активности ГГО играют меланокортиновые рецепторы MC4R, ряд данных указывает на возможное участие и рецепторов MC3R или MC5R. Известная противовоспалительная активность α -МСГ проявляется в его способности ослаблять вызванную центральным воспалением активацию ГГО. Гипофизарный α -МСГ секретируется в кровоток при стрессовом ответе, однако, в отличие от АКТГ его секреция не тормозится глюкокортикоидами и стимулируется адреналином. Роль периферического α -МСГ в стрессовом ответе остается неясной, но его возможной функцией является независимая от глюкокортикоидов негативная регуляция ГГО.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания ИМГ РАН в области фундаментальных научных исследований по теме АААА-А19-11902(2790047-0).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. LaHoste G.J., Olson G.A., Kastin A.J., Olson R.D. Behavioral effects of melanocyte stimulating hormone. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 4(1): 9–16. 1980.
2. Левицкая Н.Г., Каменский А.А. Меланокортиновая система. *Успехи физиол.наук.* 40(1): 44–65. 2009. [Levitskaya N.G., Kamensky A.A. Melanocortin system. *Usp. Fisiol. Nauk.* 40(1): 44–65. 2009. (In Russ)].

3. *Getting S.J.* Targeting melanocortin receptors as potential novel therapeutics. *Pharmacol. Ther.* 111(1): 1–15. 2006.
4. *Catania A., Colombo G., Rossi C., Carlin A., Sordi A., Lonati C., Turcatti F., Leonardi P., Grieco P., Gatti S.* Antimicrobial properties of alpha-MSH and related synthetic melanocortins. *Sci. World J.* 6: 1241–1246. 2006.
5. *Lee M., Wardlaw S.L.* The central melanocortin system and the regulation of energy balance. *Front. Biosci.* 12: 3994–4010. 2007.
6. *Ulrich-Lai Y.M., Ryan K.K.* Neuroendocrine circuits governing energy balance and stress regulation: functional overlap and therapeutic implications. *Cell Metabol.* 19(6): 910–925. 2014.
7. *Catania A., Airaghi L., Colombo G., Lipton J.M.* Alpha-melanocyte-stimulating hormone in normal human physiology and disease states. *Trends Endocrinol. Metab.* 11(8): 304–308. 2000.
8. *Oliver C., Porter J.C.* Distribution and Characterization of α -Melanocyte-Stimulating Hormone in the Rat Brain. *Endocrinology.* 102(3): 697–705. 1978.
9. *Carr J.A., Saland L.C., Samora A., Desai S., Benevidez S.* Stress-induced peptide release from rat intermediate pituitary. An ultrastructural analysis. *Cell Tissue Res.* 261(3): 589–593. 1990.
10. *Usategui R., Oliver C., Vaudry H., Lombardi G., Rozenberg I., Mourre A.M.* Immunoreactive alpha-MSH and ACTH levels in rat plasma and pituitary. *Endocrinology.* 98(1): 189–196. 1976.
11. *Vecsernyes M., Julesz J.* Specific radioimmunoassay of alpha-melanocyte-stimulating hormone in rat plasma. *Exp. Clin. Endocrinol.* 93(1): 45–51. 1989.
12. *Kvetnansky R., Tilders F.J., van Zoest I.D., Dobrakovova M., Berkenbosch F., Culman J., Zeman P., Smeilik P.G.* Sympathoadrenal activity facilitates beta-endorphin and alpha-MSH secretion but does not potentiate ACTH secretion during immobilization stress. *Neuroendocrinology.* 45(4): 318–324. 1987.
13. *Berkenbosch F., Vermes I., Tilders F.J.* The beta-adrenoceptor-blocking drug propranolol prevents secretion of immunoreactive beta-endorphin and alpha-melanocyte-stimulating hormone in response to certain stress stimuli. *Endocrinology.* 115(3): 1051–1059. 1984.
14. *Proulx-Ferland L., Labrie F., Dumont D., Cote J., Coy D.H., Sveiraf J.* Corticotropin-releasing factor stimulates secretion of melanocyte-stimulating hormone from the rat pituitary. *Science.* 217(4554): 62–63. 1982.
15. *Catania A., Gatti S., Colombo G., Lipton J.M.* Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacol. Rev.* 56(1): 1–29. 2004.
16. *Chen M., Aprahamian C.J., Kesterson R.A., Harmon C.M., Yang Y.* Molecular identification of the human melanocortin-2 receptor responsible for ligand binding and signaling. *Biochemistry.* 46(40): 11389–11397. 2007.
17. *Shukla C., Koch L.G., Britton S.L., Cai M., Hruby V.J., Bednarek M., Novak C.M.* Contribution of regional brain melanocortin receptor subtypes to elevated activity energy expenditure in lean, active rats. *Neuroscience.* 310: 252–267. 2015.
18. *Schioth H.B., Muceniec R., Larsson M., Wikberg J.E.* The melanocortin 1, 3, 4 or 5 receptors do not have a binding epitope for ACTH beyond the sequence of alpha-MSH. *J. Endocrinol.* 155(1): 73–78. 1997.
19. *Chai B.X., Neubig R.R., Millhauser G.L., Thompson D.A., Jackson P.J., Barsh G.S., Dickinson C.J., Li J.Y., Lai Y.M., Gantz I.* Inverse agonist activity of agouti and agouti-related protein. *Peptides.* 24(4): 603–609. 2003.
20. *Ericson M.D., Singh A., Tala S.R., Haslach E.M., Dirain M.L.S., Schaub J.W., Flores V., Eick N., Lensing C.J., Freeman K.T., Smeester B.A., Adank D.N., Wilber S.L., Speth R., Haskell-Luevano C.* Human β -Defensin 1 and β -Defensin 3 (Mouse Ortholog mBD14) Function as Full Endogenous Agonists at Select Melanocortin Receptors. *J. Med. Chem.* 61(8): 3738–3744. 2018.
21. *Froy O., Hananel A., Chapnik N., Madar Z.* Differential expression of rat beta-defensins. *IUBMB Life.* 57(1): 41–43. 2005.
22. *Nix M.A., Kaelin C.B., Ta T., Weis A., Morton G.J., Barsh G.S., Millhauser G.L.* Molecular and functional analysis of human β -defensin 3 action at melanocortin receptors. *Chemistry & Biology.* 20(6): 784–795. 2013.
23. *Wilson J.F.* Low permeability of the blood-brain barrier to nanomolar concentrations of immunoreactive alpha-melanotropin. *Psychopharmacology.* 96(2): 262–266. 1988.
24. *Harno E., Ramamoorthy T.G., Coll A.P., White A.* POMC: The Physiological Power of Hormone Processing. *Physiol. Rev.* 98(4): 2381–2430. 2018.
25. *Slominski A., Wortsman J., Luger T., Paus R., Solomon S.* Corticotropin Releasing Hormone and Proopiomelanocortin Involvement in the Cutaneous Response to Stress. *Physiol. Rev.* 80(3): 979–1020. 2000.
26. *Hegadoren K.M., O'Donnell T., Lanius R., Coupland N.J., Lacaze-Masmonteil N.* The role of beta-endorphin in the pathophysiology of major depression. *Neuropeptides.* 43(5): 341–353. 2009.
27. *Mercer A.J., Hentges S.T., Meshul C.K., Low M.J.* Unraveling the central proopiomelanocortin neural circuits. *Front. Neurosci.* 7: 19–19. 2013.
28. *Meister B., Gomuc B., Suarez E., Ishii Y., Durr K., Gillberg L.* Hypothalamic proopiomelanocortin (POMC) neurons have a cholinergic phenotype. *Eur. J. Neurosci.* 24(10): 2731–2740. 2006.

29. *Herman J.P., McKlveen J.M., Ghosal S., Kopp B., Wulsin A., Makinson R., Scheimann J., Myers B.* Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Comprehen. Physiol.* 6(2): 603–621. 2016.
30. *Nilsson I., Johansen J.E., Schalling M., Hokfelt T., Fetissov S.O.* Maturation of the hypothalamic arcuate agouti-related protein system during postnatal development in the mouse. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 155(2): 147–154. 2005.
31. *Wilson B.D., Bagnol D., Kaelin C.B., Ollmann M.M., Gantz I., Watson S.J., Barsh G.S.* Physiological and anatomical circuitry between Agouti-related protein and leptin signaling. *Endocrinology.* 140(5): 2387–2397. 1999.
32. *Huo L., Grill H.J., Bjorbaek C.* Divergent regulation of proopiomelanocortin neurons by leptin in the nucleus of the solitary tract and in the arcuate hypothalamic nucleus. *Diabetes.* 55(3): 567–573. 2006.
33. *Perello M., Stuart R.C., Nillni E.A.* Differential effects of fasting and leptin on proopiomelanocortin peptides in the arcuate nucleus and in the nucleus of the solitary tract. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* 292(5): E1348–E1357. 2007.
34. *Shen Y., Tian M., Zheng Y., Gong F., Fu A.K.Y., Ip N.Y.* Stimulation of the Hippocampal POMC/MC4R Circuit Alleviates Synaptic Plasticity Impairment in an Alzheimer's Disease Model. *Cell Reports.* 17(7): 1819–1831. 2016.
35. *Yamano Y., Yoshioka M., Toda Y., Oshida Y., Chaki S., Hamamoto K., Morishima I.* Regulation of CRF, POMC and MC4R Gene Expression after Electrical Foot Shock Stress in the Rat Amygdala and Hypothalamus. *J. Veterin. Med. Sci.* 66(11): 1323–1327. 2004.
36. *Lerliche M., Cote-Velez A., Mendez M.* Presence of pro-opiomelanocortin mRNA in the rat medial prefrontal cortex, nucleus accumbens and ventral tegmental area: studies by RT-PCR and in situ hybridization techniques. *Neuropeptides.* 41(6): 421–431. 2007.
37. *Mountjoy K.G.* Pro-Opiomelanocortin (POMC) Neurons, POMC-Derived Peptides, Melanocortin Receptors and Obesity: How Understanding of this System has Changed Over the Last Decade. *J. Neuroendocrinol.* 27(6): 406–418. 2015.
38. *Brownstein M.* Localizing peptides in the central nervous system: a progress report. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 21: 365–371. 1980.
39. *Schwartz G.J.* The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. *Nutrition.* 16(10): 866–873. 2000.
40. *Grill H.J.* Distributed neural control of energy balance: contributions from hindbrain and hypothalamus. *Obesity (Silver Spring).* 14 Suppl 5: 216S–221S. 2006.
41. *Herman J.P., McKlveen J.M., Ghosal S., Kopp B., Wulsin A., Makinson R., Scheimann J., Myers B.* Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Compar. Physiol.* 6(2): 603–621. 2016.
42. *Rodriguez E.M., Blazquez J.L., Guerra M.* The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides.* 31(4): 757–776. 2010.
43. *Horvath T.L.* The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. *Nat. Neurosci.* 8(5): 561–565. 2005.
44. *Tsigos C., Chrousos G.P.* Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosom. Res.* 53(4): 865–871. 2002.
45. *Ulrich-Lai Y.M., Herman J.P.* Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Rev. Neuroscience.* 10(6): 397–409. 2009.
46. *Herman J.P.* Regulation of Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Responses to Stressors by the Nucleus of the Solitary Tract/Dorsal Vagal Complex. *Cell Mol. Neurobiol.* 38(1): 25–35. 2018.
47. *Wang D., He X., Zhao Z., Feng Q., Lin R., Sun Y., Ding T., Xu F., Luo M., Zhan C.* Whole-brain mapping of the direct inputs and axonal projections of POMC and AgRP neurons. *Front. Neuroanat.* 9: 40–40. 2015.
48. *Zheng H., Patterson L.M., Rhodes C.J., Louis G.W., Skibicka K.P., Grill H.J., Myers M.G., Jr., Berthoud H.-R.* A potential role for hypothalamomedullary POMC projections in leptin-induced suppression of food intake. *Am. J. Physiol. Regulat., Integrat. Compar. Physiol.* 298(3): R720–R728. 2010.
49. *Baker R.A., Herkenham M.* Arcuate nucleus neurons that project to the hypothalamic paraventricular nucleus: neuropeptidergic identity and consequences of adrenalectomy on mRNA levels in the rat. *J. Compar. Neurol.* 358(4): 518–530. 1995.
50. *Sawchenko P.E., Swanson L.W.* The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J. Compar. Neurol.* 218(2): 121–144. 1983.
51. *Liposits Z., Sievers L., Paull W. K.* Neuropeptide-Y and ACTH-immunoreactive innervation of corticotropin releasing factor (CRF)-synthesizing neurons in the hypothalamus of the rat. An immunocytochemical analysis at the light and electron microscopic levels. *Histochemistry.* 88(3–6): 227–234. 1988.
52. *Mihaly E., Fekete C., Lechan R.M., Liposits Z.* Corticotropin-releasing hormone-synthesizing neurons of the human hypothalamus receive neuropeptide Y-immunoreactive innervation from

- neurons residing primarily outside the infundibular nucleus. *J. Compar. Neurol.* 446(3): 235–243. 2002.
53. *Liao N., Bulant M., Nicolas P., Vaudry H., Pelletier G.* Anatomical interactions of proopiomelanocortin (POMC)-related peptides, neuropeptide Y (NPY) and dopamine beta-hydroxylase (D beta H) fibers and thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons in the paraventricular nucleus of rat hypothalamus. *Neuropeptides.* 18(2): 63–67. 1991.
 54. *Sarkar S., Legradi G., Lechan R.M.* Intracerebroventricular administration of alpha-melanocyte stimulating hormone increases phosphorylation of CREB in TRH- and CRH-producing neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res.* 945(1): 50–59. 2002.
 55. *Dhillon W.S., Small C.J., Seal L.J., Kim M.S., Stanley S.A., Murphy K.G., Ghatei M.A., Bloom S.R.* The hypothalamic melanocortin system stimulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in vitro and in vivo in male rats. *Neuroendocrinology.* 75(4): 209–216. 2002.
 56. *Ludwig D.S., Mountjoy K.G., Tatro J.B., Gillette J.A., Frederich R.C., Flier J.S., Maratos-Flier E.* Melanin-concentrating hormone: a functional melanocortin antagonist in the hypothalamus. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* 274(4): E627–E633. 1998.
 57. *Бажан Н.М., Куликова Е.В., Макарова Е.Н., Яковлева Т.В., Казанцева А.Ю.* Исследования роли меланокортиновых рецепторов мозга в подавлении потребления пищи при эфирном стрессе у мышей. *Рос. физиол. журн. им И.М. Сеченова.* 101(12): 1337–1346. 2015. [*Bazhan N.M., Kulikova E.V., Makarova E.N., Yakovleva T.V., Kazantseva A.Yu.* Studying the role of brain melanocortin receptors in the suppressing of food intake under ether stress in mice. *Russ. J. Physiol.* 101(12): 1337–1346. (In Russ)].
 58. *Newman C.B., Wardlaw S.L., Frantz A.G.* Suppression of basal and stress-induced prolactin release and stimulation of luteinizing hormone secretion by alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Life Sci.* 36(17): 1661–1668. 1985.
 59. *de Kloet E.R., Joels M., Holsboer F.* Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6(6): 463–475. 2005.
 60. *Zunszain P.A., Anacker C., Cattaneo A., Carvalho L.A., Pariante C.M.* Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression. *Progr. Neuro-psychopharmacol. & Biol. Psychiatry.* 35(3): 722–729. 2011.
 61. *Tozawa F., Suda T., Dobashi I., Ohmori N., Kasagi Y., Demura H.* Central administration of alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits corticotropin-releasing factor release in adrenalectomized rats. *Neurosci. Lett.* 174(1): 117–119. 1994.
 62. *Dutia R., Kim A.J., Mosharov E., Savontaus E., Chua S.C., Jrardlaw S.L.* Regulation of prolactin in mice with altered hypothalamic melanocortin activity. *Peptides.* 37(1): 6–12. 2012.
 63. *Savontaus E., Breen T.L., Kim A., Yang L.M., Chua S.C., Jr., Wardlaw S.L.* Metabolic effects of transgenic melanocyte-stimulating hormone overexpression in lean and obese mice. *Endocrinology.* 145(8): 3881–3891. 2004.
 64. *Bell M.E., Bhatnagar S., Akana S.F., Choi S., Dallman M.F.* Disruption of Arcuate/Paraventricular Nucleus Connections Changes Body Energy Balance and Response to Acute Stress. *J. Neurosci.* 20(17): 6707–6713. 2000.
 65. *Smart J.L., Tolle V., Otero-Corchon V., Low M.J.* Central Dysregulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Neuron-Specific Proopiomelanocortin-Deficient Mice. *Endocrinology.* 148(2): 647–659. 2007.
 66. *Xiao E., Xia-Zhang L., Vulliamoz N.R., Ferin M., Wardlaw S.L.* Agouti-related protein stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and enhances the HPA response to interleukin-1 in the primate. *Endocrinology.* 144(5): 1736–1741. 2003.
 67. *Holst B., Schwartz T.W.* Molecular mechanism of agonism and inverse agonism in the melanocortin receptors: Zn(2+) as a structural and functional probe. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 994: 1–11. 2003.
 68. *Ryan K.K., Mul J.D., Clemmensen C., Egan A.E., Begg D.P., Halcomb K., Seeley R.J., Herman J.P., Ulrich-Lai Y.M.* Loss of melanocortin-4 receptor function attenuates HPA responses to psychological stress. *Psychoneuroendocrinology.* 42: 98–105. 2014.
 69. *Lu X.-Y., Barsh G.S., Akil H., Watson S.J.* Interaction between alpha-melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses. *J. Neurosci.* 23(21): 7863–7872. 2003.
 70. *Stiljee J.E., Umehopa U.A., Kalsbeek A., Swaab D.F., Fliers E., Alkemade A.* Melanocortin 4 receptor distribution in the human hypothalamus. *Eur. J. Endocrinol.* 168(3): 361–369. 2013.
 71. *Von Frijtag J.C., Croiset G., Gispén W.H., Adan R.A., Wiegant V.M.* The role of central melanocortin receptors in the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal-axis and the induction of excessive grooming. *Br. J. Pharmacol.* 123(8): 1503–1508. 1998.
 72. *Mountjoy K.G., Mortrud M.T., Low M.J., Simerly R.B., Cone R.D.* Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol. Endocrinol.* 8(10): 1298–1308. 1994.
 73. *Familiari M., Smith A.I., Smith R., Funder J.W.* Arginine vasopressin is a much more potent stimulus to ACTH release from ovine anterior pituitary cells than ovine corticotropin-releasing factor. I. In vitro studies. *Neuroendocrinology.* 50(2): 152–157. 1989.

74. Harris M., Aschkenasi C., Elias C.F., Chandrankunnel A., Nillni E.A., Bjoorbaek C., Elmquist J.K., Flier J.S., Hollenberg A.N. Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J. Clin. Invest.* 107(1): 111–120. 2001.
75. Fekete C., Légrádi G., Mihály E., Huang Q.H., Tatro J.B., Rand W.M., Emerson C.H., Lechan R.M. alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. *J. Neurosci.* 20(4): 1550–1558. 2000.
76. King C.M., Hentges S.T. Relative number and distribution of murine hypothalamic proopiomelanocortin neurons innervating distinct target sites. *PLoS One.* 6(10): e25864–e25864. 2011.
77. Eskay R.L., Giraud P., Oliver C., Brown-Stein M.J. Distribution of alpha-MSH-containing cells in the arcuate region send projections to extrahypothalamic areas. *Brain Res.* 178(1): 55–67. 1979.
78. Singru P.S., Fekete C., Lechan R.M. Neuroanatomical evidence for participation of the hypothalamic dorsomedial nucleus (DMN) in regulation of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) by alpha-melanocyte stimulating hormone. *Brain Res.* 1064(1–2): 42–51. 2005.
79. Bagnol D., Lu X.Y., Kaelin C.B., Day H.E., Ollmann M., Gantz I., Akil H., Barsh G.S., Watson S.J. Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *J. Neurosci.* 19(18): RC26–RC26. 1999.
80. O'Donohue T.L., Miller R.L., Jacobowitz D.M. Identification, characterization and stereotaxic mapping of intraneuronal alpha-melanocyte stimulating hormone-like immunoreactive peptides in discrete regions of the rat brain. *Brain Res.* 176(1): 101–123. 1979.
81. Coppola A., Liu Z.-W., Andrews Z.B., Paradis E., Roy M.-C., Friedman J.M., Ricquier D., Richard D., Horvath T.L., Gao X.-B., Diano S. A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell Metabolism.* 5(1): 21–33. 2007.
82. Liu J., Garza J.C., Truong H.V., Henschel J., Zhang W., Lu X.-Y. The melanocortinergic pathway is rapidly recruited by emotional stress and contributes to stress-induced anorexia and anxiety-like behavior. *Endocrinology.* 148(11): 5531–5540. 2007.
83. Dayas C.V., Buller K.M., Day T.A. Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not the central amygdala. *Eur. J. Neurosci.* 11(7): 2312–2322. 1999.
84. Kishi T., Aschkenasi C.J., Lee C.E., Mountjoy K.G., Saper C.B., Elmquist J.K. Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *J. Compar. Neurol.* 457(3): 213–235. 2003.
85. Liu J., Garza J. C., Li W., Lu X.Y. Melanocortin-4 receptor in the medial amygdala regulates emotional stress-induced anxiety-like behaviour, anorexia and corticosterone secretion. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16(1): 105–120. 2013.
86. Lebow M.A., Chen A. Overshadowed by the amygdala: the bed nucleus of the stria terminalis emerges as key to psychiatric disorders. *Mol. Psychiatry.* 21(4): 450–463. 2016.
87. Herman J.P., Ostrander M.M., Mueller N.K., Figueiredo H. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 29(8): 1201–1213. 2005.
88. Feldman S., Conforti N., Weidenfeld J. Limbic pathways and hypothalamic neurotransmitters mediating adrenocortical responses to neural stimuli. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 19(2): 235–240. 1995.
89. Walker K.A., Ficek B.N., Westbrook R. Understanding the Role of Systemic Inflammation in Alzheimer's Disease. *ACS Chem. Neurosci.* 10(8): 3340–3342. 2019.
90. Turnbull A.V., Rivier C.L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol. Rev.* 79(1): 1–71. 1999.
91. Cragolini A.B., Perello M., Schioth H.B., Scimonelli T.N. alpha-MSH and gamma-MSH inhibit IL-1beta induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis through central melanocortin receptors. *Regul. Pept.* 122(3): 185–190. 2004.
92. Papadopoulos A.D., Wardlaw S.L. Endogenous alpha-MSH modulates the hypothalamic-pituitary-adrenal response to the cytokine interleukin-1beta. *J. Neuroendocrinol.* 11(4): 315–319. 1999.
93. Van Houten M., Khan M.N., Walsh R.J., Baquiran G.B., Renaud L.P., Bourque C., Sgro S., Gauthier S., Chretien M., Posner B. I. NH2-terminal specificity and axonal localization of adrenocorticotropin binding sites in rat median eminence. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 82(4): 1271–1275. 1985.
94. Sawchenko P.E., Arias C. Evidence for short-loop feedback effects of ACTH on CRF and vasopressin expression in parvocellular neurosecretory neurons. *J. Neuroendocrinol.* 7(9): 721–731. 1995.
95. Markov D.D., Yatsenko K.A., Inozemtseva L.S., Grivennikov I.A., Myasoedov N.F., Dolotov O.V. Systemic N-terminal fragments of adrenocorticotropin reduce inflammation- and stress-induced anhedonia in rats. *Psychoneuroendocrinology.* 82: 173–186. 2017.

Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone as a Regulator of the Hypothalamic-Pituitary Axis

O. V. Dolotov*

Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

**e-mail: dolotov@img.ras.ru*

Alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) has a wide range of biological activities and is produced in the pituitary, hypothalamus, brain stem, hippocampus and periphery. α -MSH and its receptors are critically involved in the regulation of energy balance and body weight. At the functional and neuroanatomical levels, there is a very close overlap between the regulation of energy balance and neuroendocrine stress response. The review focuses on the involvement of α -MSH in the regulation of the hypothalamic-pituitary (HP) axis. The effects of centrally administered α -MSH and its analogues, and the data obtained from genetically altered animals indicate that α -MSH from the arcuate nucleus both directly and indirectly, via the medial amygdala, activates the HP axis. Since the amygdala plays a crucial role in the integration of behavioral and neuroendocrine responses to stress, it is obvious that α -MSH is an important participant in this process. The role of α -MSH in the regulation of the HP axis by other limbic structures, such as the hippocampus and prefrontal cortex, remains unexplored. The melanocortin MC4R receptor plays the main role in the activation of the HP axis. However, some data indicate the possible involvement of MC3R or MC5R receptors. The well-known anti-inflammatory effects of α -MSH are consistent with its ability to attenuate neuroinflammation-induced activation of the HP axis. Like adrenocorticotrophic hormone (ACTH), pituitary α -MSH is secreted into the bloodstream during the stress response. However, unlike ACTH, α -MSH secretion is stimulated by epinephrine, and not inhibited by glucocorticoids. The role of circulating α -MSH in the stress response remains unclear, but may involve glucocorticoid-independent negative regulation of the HP axis.

Keywords: alpha-melanocyte-stimulating hormone, hypothalamic-pituitary axis, stress, arcuate nucleus, melanocortins, corticotropin-releasing factor, thyrotropin-releasing hormone

ЦИТИРОВАТЬ:

Долотов О.В. Альфа-меланоцитстимулирующий гормон как регулятор гипоталамо-гипофизарной оси. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(6): 683—695.

DOI: 10.31857/S0869813920060047

TO CITE THIS ARTICLE:

Dolotov O.V. Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone as a Regulator of the Hypothalamic-Pituitary Axis. Russian Journal of Physiology. 106(6): 683—695.

DOI: 10.31857/S0869813920060047

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

ЭНДОГЕННЫЕ И СИНТЕТИЧЕСКИЕ РЕГУЛЯТОРЫ
ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ ЗВЕНЬЕВ
ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-ГОНАДНОЙ И -ТИРЕОИДНОЙ ОСЕЙ

© 2020 г. А. О. Шпаков*

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: alex_shpakov@list.ru*

Поступила в редакцию 06.03.2020 г.
После доработки 17.03.2020 г.
Принята к публикации 03.04.2020 г.

Активность периферических звеньев гипоталамо-гипофизарно-гонадной и -тиреоидной осей регулируется гипофизарными гормонами — гонадотропинами и тиреотропным гормоном (ТТГ), которые секретируются специализированными клетками аденогипофиза. Лютеинизирующий гормон (ЛГ) и его гомолог хорионический гонадотропин (ХГ) свои стероидогенные эффекты реализуют посредством связывания с рецепторами ЛГ/ХГ, расположенными на поверхности клеток Лейдига в семенниках и клеток теки и гранулы зрелого фолликула в яичниках. Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) связывается с рецепторами ФСГ, локализованными на поверхности клеток Сертоли в семенниках и клеток гранулы примордиальных и созревающих фолликулов в яичниках, контролируя процессы фолликулогенеза, сперматогенеза и стероидогенеза. ТТГ через активацию рецептора ТТГ стимулирует синтез тиреоидных гормонов тироцитами щитовидной железы. Гонадотропины (ЛГ, ХГ, ФСГ) и ТТГ, которые с высоким сродством связываются с внеклеточным доменом специфических к ним G-белок-сопряженных рецепторов, активируют сразу несколько сигнальных каскадов, реализуемых через различные типы G-белков и β -аррестинов. Применяемые для лечения репродуктивных дисфункций и во вспомогательных репродуктивных технологиях рекомбинантные и выделенные из природных источников гонадотропины имеют ряд недостатков, вследствие чего ведется разработка пептидных и низкомолекулярных регуляторов рецепторов ЛГ/ХГ и ФСГ, взаимодействующих с аллостерическими сайтами, локализованными в трансмембранном или цитоплазматическом доменах рецепторов. Широкие перспективы в регуляции репродуктивных функций и контроле фертильности открывает использование адипокинов, пептидов инсулинового и релаксинового семейств, антидиабетического препарата метформина, которые не только регулируют и модулируют ответ гонад на гонадотропины, но и сами влияют на стероидогенез и созревание гамет. В случае рецепторов ТТГ наиболее остро стоит проблема снижения их повышенной активности при аутоиммунных и онкологических заболеваниях щитовидной железы и при эндокринной офтальмопатии. Наиболее перспективными в этом отношении являются разрабатываемые в настоящее время низкомолекулярные инверсионные агонисты и нейтральные антагонисты, которые взаимодействуют с аллостерическим сайтом, расположенным в трансмембранном домене рецептора ТТГ. Настоящий обзор посвящен современным достижениям в области разработки и изучения эндогенных и синтетических регуляторов и модуляторов рецепторов гонадотропинов и ТТГ, а также их влиянию на периферические компоненты гипоталамо-гипофизарно-гонадной и -тиреоидной осей.

Ключевые слова: гонадотропин, тиреотропный гормон, G-белок-сопряженный рецептор, аллостерический регулятор, лептин, низкомолекулярный агонист, щитовидная железа

DOI: 10.31857/S0869813920060126

Функции репродуктивной системы регулируются через посредство гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси (ГГГ оси), которая включает три основных звена — гипоталамические нейроны, экспрессирующие гонадолиберин, рилизинг-фактор гонадотропинов — лютеинизирующего (ЛГ) и фолликулостимулирующего (ФСГ) гормонов, гонадотропоциты передней доли гипофиза, продуцирующие гонадотропины, а также периферические (эффektorные) звенья гонадной оси — яичники у женщин и семенники у мужчин, в которых осуществляется синтез половых стероидных гормонов — прогестерона, тестостерона и эстрадиола, а также происходит созревание генеративных клеток. Основными регуляторами стероидогенеза, фолликулогенеза и сперматогенеза в гонадах являются гонадотропины, ЛГ и ФСГ, а также различные формы хорионического гонадотропина (ХГ), который вырабатывается на протяжении всего репродуктивного периода у мужчин и женщин в гонадотропоцитах гипофиза вместе с ЛГ (гипофизарная форма) или у женщин в первом триместре беременности (плацентарная форма) [1–4].

ЛГ и ХГ свои регуляторные эффекты оказывают через специфичный к ним рецептор ЛГ/ХГ, локализованный в клетках теки и гранулезы фолликулов яичников или в клетках Лейдига семенников, в то время как эффекты ФСГ реализуются через связывание с рецептором ФСГ, который преимущественно локализован в клетках гранулезы яичников и в клетках Сертоли семенников. Оба рецептора относятся к суперсемейству G-белок-сопряженных рецепторов (GPCR), характерной особенностью которых является наличие трансмембранного домена, включающего семь гидрофобных спирализованных участков, пронизывающих плазматическую мембрану, соединенных тремя внеклеточными и тремя цитоплазматическими гидрофильными петлями, а также наличие N-концевого внеклеточного и C-концевого цитоплазматического доменов [2, 5–8]. В процессе активации рецепторов ЛГ/ХГ и ФСГ гонадотропинами стимулируются сразу несколько внутриклеточных сигнальных каскадов, что обусловлено множественностью их активных конформаций, в каждой из которых рецепторы гонадотропинов могут эффективно взаимодействовать с каким-то одним типом гетеротримерных G-белков (G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$), с регуляторными белками β -аррестинами или с адапторными белками APLL-семейства [7, 9–11]. Через посредство G_s -белков гонадотропины стимулируют активность аденилатциклазы и цАМФ-зависимые сигнальные пути, которые являются главной мишенью для ЛГ, ХГ и ФСГ и играют определяющую роль в регуляции процессов стероидогенеза, фолликулогенеза, пролиферации и дифференцировки клеток репродуктивной системы. Через посредство $G_{q/11}$ -белков осуществляется активация фосфоинозитид-специфичной фосфолипазы β и регулируются сигнальные каскады, зависимые от ионов кальция и различных изоформ протеинкиназы C, в то время как через посредство активации β -аррестинов осуществляется контроль эндоцитоза лиганд-рецепторных комплексов и регулируется активность 3-фосфоинозитидного пути и каскада митогенактивируемых протеинкиназ (МАПК), ответственных за выживаемость и рост овариальных и тестикулярных клеток. Важно отметить, что такой множественный ответ клеток репродуктивной системы на гонадотропины отмечается не только у человека и млекопитающих, но и у других представителей позвоночных животных, что свидетельствует об его консервативности и раннем происхождении в эволюции позвоночных животных [12].

Стимулирующее влияние гонадотропинов на зависимые от них внутриклеточные сигнальные каскады в клетках-мишенях осуществляется посредством их связывания с высокоаффинным ортостерическим сайтом, расположенном в значительном по размеру внеклеточном домене рецепторов ЛГ/ХГ и ФСГ [5, 7]. Альтернативным вариантом регуляции, как стимуляции, так и ингибирования, активности этих рецепторов является разработка низкомолекулярных регуляторов и модуляторов их аллостерического сайта, локализованного в трансмембранном домене, в котором в подавляющем большинстве GPCR располагается ортостерический сайт [2, 13]. Наряду с этим функциональная активность зависимых от гонадотропинов сигнальных каскадов в гонадах может регулироваться опосредованно пептидами инсулинового и релаксинавого семейств, в первую очередь инсулиноподобным фактором роста-1 (ИФР-1), различными адипокинами, ингибиторами ароматазы, ответственной за конверсию андрогенов в эстрогены, витамином D₃, антидиабетическим препаратом метформином [2].

Важную роль в регуляции энергетического обмена, термогенеза, функционирования костной ткани и нервной системы играет гипоталамо-гипофизарно-тиреоидная ось, которая, как и ГГГ ось, включает три основных звена – гипоталамические нейроны, секретирующие трипептид тиролиберин, рилизинг-фактор тиреотропного гормона (ТТГ), тиреотропоциты аденогипофиза, продуцирующие ТТГ в ответ на их стимуляцию тиролиберином, а также тироциты щитовидной железы, являющиеся эффекторным компонентом ГГГ оси, в которых осуществляется синтез тироксина из тиреоглобулина и дальнейшая его конверсия в трийодтиронин с помощью дейодиназ [14–16]. Стимулирующий эффект ТТГ на синтез тиреоидных гормонов реализуется через посредство связывания гормона с рецептором ТТГ, который также относится к суперсемейству GPCR и по структурно-функциональной организации сходен с рецепторами гонадотропинов. Высокоаффинное связывание ТТГ осуществляется с ортостерическим сайтом, который формируется внеклеточным доменом рецептора ТТГ. В отсутствие гормона внеклеточный домен стабилизирует неактивную конформацию рецептора, но после связывания с ТТГ ингибирующее влияние внеклеточного домена на трансмембранный домен снимается, что приводит к активации рецептора ТТГ и запуску зависимых от него внутриклеточных каскадов [17]. Наряду с ТТГ, активность рецептора ТТГ может регулироваться специфичными к нему аутоантителами, которые способны ее как стимулировать, так и ингибировать, и это является одной из причин аутоиммунных заболеваний щитовидной железы и эндокринной офтальмопатии [18]. Гиперактивация рецептора ТТГ, с одной стороны, приводит к быстрой его десенситизации и развитию резистентности тироцитов к ТТГ, и, с другой, может стать причиной развития онкологических заболеваний щитовидной железы или ряда других тканей, где также экспрессируются рецепторы ТТГ [19, 20]. Все это заставляет разрабатывать как низкомолекулярные, так и полипептидные регуляторы рецептора ТТГ, которые способны влиять на его функциональную активность, взаимодействуя с аллостерическими сайтами рецептора, одни из которых расположены в спейсерном участке между внеклеточным доменом и первым гидрофобным трансмембранным участком, другие, как в случае рецепторов ЛГ/ХГ и ФСГ, в трансмембранном домене.

Настоящий обзор посвящен современному состоянию проблемы регуляции рецепторов гонадотропинов и ТТГ с помощью лигандов ортостерического и аллостерического сайтов, а также влиянию на активность периферических звеньев ГГГ и ГГГ осей других эндогенных регуляторов, включая адипокины и пептиды инсулинового и релаксинавого семейств.

ГОНАДОТРОПИНЫ И ДРУГИЕ ЭНДОГЕННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ТЕСТИКУЛЯРНОГО И ОВАРИАЛЬНОГО СТЕРОИДОГЕНЕЗА, ФОЛЛИКУЛОГЕНЕЗА И СПЕРМАТОГЕНЕЗА

Гонадотропины, их природные и рекомбинантные формы

Гонадотропины, ЛГ, ХГ и ФСГ представляют собой гликопротеиновые гетеродимерные гормоны, состоящие из двух типов субъединиц – общей для каждого из них α -субъединицы, кодируемой одним геном, и структурно различающихся β -субъединиц, которые определяют типовую принадлежность гонадотропина [5, 7, 21, 22]. Для ЛГ и ФСГ имеется по одному гену, кодирующему β -субъединицу, в то время как для ХГ – шесть генов, кодирующих высокомолекулярные β -субъединицы, которые различаются по механизмам регуляции транскрипции кодирующих их генов. При формировании гетеродимера α - и β -субъединицы переплетаются между собой с образованием узловой структуры, стабилизированной внутримолекулярными, но не межмолекулярными, дисульфидными связями. Основной посттрансляционной модификацией молекул гонадотропинов является их *N*-гликозилирование, мишенями которого являются два аспарагин-содержащих сайта в молекуле α -субъединицы и еще один (ЛГ) или два (ФСГ, ХГ) таких сайта в молекуле β -субъединицы. Структура модифицирующих α - и β -субъединицы *N*-гликанов, в том числе степень их разветвленности и заряд концевых гликозильных остатков, сильно варьируют в зависимости от набора и функциональной активности гликозилтрансфераз и гликозидаз в клетках, где синтезируются гонадотропины [22–25]. Так, в лютеотропоцитах, где синтезируются ЛГ и гипофизарный ХГ, набор ферментов *N*-гликозилирования таков, что *N*-гликаны, модифицирующие их α - и β -субъединицы, слабо разветвлены (в основном гибридные или двухантенные) и содержат значительное число сильнокислых остатков сульфатированного *N*-ацетилгалактозамина, сопоставимое с числом менее кислых остатков сиаловой кислоты. В фолликулотропоцитах, где синтезируется ФСГ, преобладают ферменты *N*-гликозилирования, катализирующие синтез сильно разветвленных *N*-гликанов (преимущественно двух-, трех- и четырехантенных) с преобладанием умеренно кислых остатков сиаловой кислоты [22, 23]. В свою очередь, ХГ негипофизарного происхождения, который синтезируется в эмбрионе и плаценте, обогащен слабо разветвленными *N*-гликанами с низким содержанием сульфатированного *N*-ацетилгалактозамина. Необходимо отметить, что в С-концевой области ХГ имеются четыре сайта для *O*-гликозилирования, которые также модифицируются олигосахаридными цепями, что влияет как на стабильность $\alpha\beta$ -гетеродимерного комплекса ХГ, так и на его устойчивость к биодеградации [21, 26].

N-гликозилирование гонадотропинов определяет их биологическую активность, поскольку расположенные на поверхности узловой $\alpha\beta$ -гетеродимерной структуры *N*-гликаны влияют как на способность гонадотропинов взаимодействовать с ортостерическим лиганд-связывающим сайтом рецепторов ЛГ/ХГ и ФСГ, так и на стабильность и соотношение активных конформаций рецепторов, контролируя тем самым функциональный ответ клетки-мишени на гонадотропин. Более высокая степень гликозилирования и повышенная степень ветвления *N*-гликанов создают стерические препятствия для взаимодействия гонадотропина с рецептором, снижая его эффективность и аффинность, в то время как более низкая степень *N*-гликозилирования, напротив, способствует более эффективной стимуляции рецептора гонадотропином [22, 23, 25]. Следует, однако, отметить, что повышение активационного потенциала слабо гликозилированных форм гонадотропинов приводит к снижению селективности их действия в отношении внутриклеточных сигнальных каскадов и повышает риски для запуска процессов десенситизации и интернализации рецепторов [2].

Механизмы *N*-гликозилирования подвержены влиянию различных факторов и существенно меняются в процессе онтогенеза. У женщин отмечаются значительные изменения степени *N*-гликозилирования ЛГ и ФСГ в течение менструального цикла, что предопределяет их специфическую активность в различные фазы цикла. Так, в раннюю фолликулярную и позднюю лютеиновую фазы превалируют сильно гликозилированные и, соответственно, менее активные формы ЛГ и ФСГ, которые характеризуются относительно высокой селективностью в отношении эффекторных систем клеток-мишеней, что обеспечивает тонкую регуляцию стероидогенных процессов после фазы овуляции и нормальное развитие и созревание фолликулов. Во время овуляторной фазы отмечается снижение степени *N*-гликозилирования ЛГ и ФСГ, что приводит к повышению их сродства к рецепторам и усиливает их стимулирующее влияние на зависимые от гонадотропинов внутриклеточные сигнальные каскады, это обеспечивает разрыв фолликула и подготовку яйцеклетки к оплодотворению. При этом снижается селективность действия гонадотропина и отмечается транзиторное снижение к нему чувствительности клеток-мишеней [23, 25]. С возрастом у женщин и мужчин повышается не только концентрация гонадотропинов в крови, но и возрастает доля сильно гликозилированных их форм, что способствует снижению их активности и тем самым защищает стареющий организм от возможных рисков при гиперактивации зависимых от ЛГ, ФСГ и гипофизарного ХГ сигнальных каскадов как в гонадах, так и в некоторых других тканях, где экспрессируются рецепторы гонадотропинов [22].

В физиологических условиях концентрация гонадотропинов, соотношение их гликозилированных форм и скорость деградации циклично меняются в зависимости от гормонального и метаболического статуса и воздействия внешних факторов. В то же время подходов, позволяющих оптимизировать специфическую активность и селективность фармакологических препаратов гонадотропинов при их использовании для коррекции репродуктивных дисфункций и во вспомогательных репродуктивных технологиях (ВРТ), в настоящее время не разработано [4]. Реализация таких подходов осложняется тем, что оба класса фармакологических препаратов гонадотропинов — изолированные из природных источников и полученные генно-инженерным путем, характеризуются целым рядом существенных недостатков, ограничивающих их применение в клинике и при проведении ВРТ [1, 2, 4, 26]. Природные формы ФСГ и ХГ человека, которые получают из мочи постменопаузальных (ФСГ) или беременных (ХГ) женщин, характеризуются гетерогенностью состава изоформ гонадотропинов, включая их деградированные формы, и могут содержать биологически активные примеси [1, 27]. Важно отметить, что активность ФСГ выделяемого из мочи постменопаузальных женщин, у которых репродуктивная функция угасает, существенно ниже таковой для ФСГ, который вырабатывается у женщин репродуктивного возраста. Это обусловлено более высокой степенью *N*-гликозилирования и повышенной кислотностью ФСГ в постменопаузальный период. Более низкая активность сильно гликозилированных природных форм ФСГ, с одной стороны, снижает способность препаратов ФСГ, выделенных из мочи, стимулировать фолликулогенез у женщин со слабым ответом яичников на гонадотропины. С другой стороны, она повышает селективность воздействия ФСГ, выделенного из мочи, на внутриклеточные сигнальные каскады в фолликулярных клетках и способствует более мягкой активации фолликулогенеза у женщин с нормальным ответом яичников на гонадотропины [22, 25]. В физиологических условиях мишенью плацентарного ХГ, выделяемого из мочи беременных женщин, являются не созревающие фолликулы, а развивающийся эмбрион, вследствие чего его применение для контроля фолликулогенеза, на первый взгляд, представляется нелогичным. При этом ХГ эффективно стимулирует активность аденилатциклазы и цАМФ-зависимых эффекторных белков и транскрипционных факторов, что приво-

дит к усилению стероидогенеза, способствует нормальному протеканию фолликулогенеза у женщин и сперматогенеза у мужчин и является ключевым триггером контролируемой индукции овуляции при проведении ВРТ [2, 26].

Альтернативой формам гонадотропинов, выделенных из мочи, являются рекомбинантные ЛГ, ФСГ и ХГ человека, которые получают с помощью генной инженерии в клетках-реакторах, среди которых наиболее перспективными являются те культуры клеток, которые наиболее близки по своим характеристикам гонадотропоцитам гипофиза человека [10, 28, 29]. В отличие от форм гонадотропинов, выделенных из мочи, препараты рекомбинантных гонадотропинов характеризуются большей гомогенностью, содержат меньшее количество нежелательных примесей, в большей степени стандартизированы по специфической биологической активности [29]. В то же время они сильно отличаются от природных форм по посттрансляционным модификациям, в первую очередь, по паттерну *N*-гликозилирования. Фундаментальной причиной этого являются значительные различия в экспрессии и функциональной активности ферментов *N*-гликозилирования между гонадотропоцитами гипофиза и клетками-реакторами, в которых осуществляется наработка рекомбинантных форм гонадотропинов. Сравнительно низкая степень *N*-гликозилирования, а также низкая степень ветвления *N*-гликанов, с одной стороны, приводят к значительному повышению активности гонадотропинов, что в наибольшей степени проявляется в случае рекомбинантного ФСГ, но, с другой стороны, снижают их селективность, вызывая целый ряд побочных эффектов [24]. В результате повышенная активность рекомбинантных форм гонадотропинов является причиной быстрой десенситизации рецепторов ЛГ/ХГ и ФСГ, что ведет к ослаблению и постепенному затуханию их стимулирующих эффектов на стероидогенез и созревание гамет. Наряду с этим, при использовании рекомбинантных форм при проведении ВРТ повышается риск развития синдрома гиперстимуляции яичников, что может стать причиной бесплодия у женщин, и ослабляется система естественного отбора фолликулов, это снижает качество ооцитов, используемых в дальнейшем для экстракорпорального оплодотворения [2, 4].

Все это заставляет искать другие эндогенные регуляторы функций гонад, а также создавать новые классы регуляторов и модуляторов рецепторов ЛГ/ХГ и ФСГ.

Адипокины

Среди эндогенных регуляторов наибольший интерес представляют адипокины, в первую очередь лептин и его функциональный антагонист адипонектин. Длительное время считали, что регуляторные эффекты лептина и адипонектина на активность ГГГ оси реализуются в основном через посредство их влияния на экспрессирующие гонадолиберин гипоталамические нейроны, причем, лептин оказывает на продукцию гонадолиберина стимулирующее воздействие [30, 31], в то время как адипонектин, напротив, ее подавляет [32, 33]. В последние годы появились данные о том, что как сами эти адипокины, так и основные компоненты их сигнальных систем, включая лептиновый рецептор и адипонектиновые рецепторы 1-го и 2-го типов, экспрессируются в различных типах клеток семенников и яичников [34–38]. Важно отметить, что лептин и адипонектин достаточно легко в отличие от гематоэнцефалического барьера преодолевают гематотестикулярный и гематофолликулярный барьеры [34, 39–41]. Общий пул этих адипокинов в гонадах, таким образом, складывается из лептина и адипонектина, которые синтезируются адипоцитами и поступают в семенники и яичники из кровотока и которые синтезируются клетками репродуктивной системы *in situ*, причем во втором случае лептин и адипонектин играют роль ауто- и паракринных регуляторов.

Лептин оказывает стимулирующее влияние на стероидогенез в тестикулярных клетках Лейдига и в фолликулярных клетках яичников, а также положительно влияет на созревание фолликулов и сперматозоидов, действуя, тем самым, однонаправлено с гонадотропинами [42, 43]. При дефиците лептина в кровотоке, что может быть следствием голодания или липидодистрофии, характерной для сахарного диабета 1-го типа, а также в условиях тяжелой длительной гиперлептинемии, развивающейся при ожирении и сахарном диабете 2-го типа, с характерным для нее ослаблением лептинового сигналинга в тканях-мишенях, активность лептиновых рецепторов и зависимых от них сигнальных каскадов в клетках репродуктивной системы существенно снижается. Это является одной из причин нарушения репродуктивных функций и снижения фертильности [42, 44, 45]. Нормализация пищевого поведения, массы тела и метаболических показателей, ведущих к нормализации уровня лептина в кровотоке и его поступления в семенники и яичники, способна восстановить репродуктивный потенциал. Для улучшения лептинового сигналинга могут быть использованы фармакологические препараты лептина и его модифицированные аналоги, а также активаторы лептинового сигналинга, в том числе ингибиторы фермента протеинфосфотирозинфосфатазы 1В, являющегося негативным регулятором активности лептиновых рецепторов и функционально сопряженной с ними нерепепторной тирозинкиназы JAK2 [46].

Действие адипонектина на тестикулярную и овариальную функции в значительной степени зависит от его концентрации в фолликулярной и интратестикулярной жидкости. При высоких концентрациях адипонектин их подавляет, а в низких концентрациях, напротив, способствует нормальному протеканию стероидогенеза, фолликулогенеза и сперматогенеза [42]. При введении самцам мышей низких доз адипонектина наблюдается значительное усиление продукции тестостерона [47], в то время как в более высоких концентрациях он снижает как базальный, так и стимулированный гонадотропинами уровень тестостерона. В основе этого лежит гиперактивация фермента ERK1/2, ключевого эффекторного компонента каскада MAPK [35, 36]. Существенную роль в регуляции стероидогенеза, сперматогенеза и фолликулогенеза играют и некоторые другие адипокины, включая апелин, висфатин и резистин [48–51].

Пептиды инсулинового и релаксинового семейств

Наряду с адипокинами важную роль в регуляции функций гонад играет ИФР-1. Его действие на клетки-мишени реализуется через наделенный собственной тирозинкиназной активностью рецептор ИФР-1, родственный рецептору инсулина, и сопряженные с ним компоненты 3-фосфоинозитидного пути и каскада MAPK. ИФР-1 и структурно близкий ему ИФР-2 являются мощными стимуляторами стероидогенеза, сравнимыми по активности с гонадотропинами, которые не только усиливают стероидогенную активность в семенниках и яичниках, но также контролируют выживаемость и дифференцировку генеративных клеток [52–54]. В основе стероидогенного эффекта ИФР-1 и ИФР-2 лежат как усиление экспрессии генов, кодирующих стероидогенные белки, включая транспортный белок StAR, переносящий холестерин в митохондрии (начальная, скорость-лимитирующая стадия стероидогенеза), так и стимуляция активности ферментов, осуществляющих синтез прогестерона и конверсию тестостерона в эстрогены [52, 54–56]. ИФР-1 и ИФР-2 усиливают пролиферацию клеток репродуктивной системы и повышают их выживаемость, подавляя функциональную активность промоторов апоптоза [54, 56]. Они контролируют механизмы селекции доминантных фолликулов и процесс агрегации некачественных фолликулов, являясь, тем самым, важнейшими регуляторами отбора качественных фолликулов, входящих впоследствии в цикл овуляции [55, 57].

Поскольку уровни свободных форм ИФР-1 и ИФР-2 определяются содержанием ИФР-связывающих белков, которые специфично связывают ИФР-1 и ИФР-2, включая их из сигнальной трансдукции, то присутствующие в фолликулярной и интратестикулярной жидкости ИФР-связывающие белки также функционируют как регуляторы и модуляторы репродуктивных функций. В пользу этого свидетельствуют данные о том, что ИФР-связывающий белок 2-го типа включен в процессы роста, дифференцировки и деградации фолликулов, в основе чего лежит его способность модулировать вызываемые ИФР1 стимуляцию стероидогенеза и активацию экспрессии гена ароматазы [58].

Значительный интерес представляет участие в контроле стероидогенеза и гаметогенеза инсулиноподобного фактора-3 (INSL3) и других пептидов релаксинавого семейства, которые структурно близки инсулину и ИФР-1, но в отличие от них реализуют свои эффекты через GPCR, а не через рецепторы с тирозинкиназной активностью [59–61]. INSL3, продуцируемый клетками Лейдига, с одной стороны, функционирует как аутокринный фактор, контролирующий синтез тестостерона и его транспорт в семенных жидкостях, и, с другой, действует на клетки Сертоли, регулируя тем самым процесс созревания сперматозоидов. Поскольку уровень INSL3 в крови хорошо коррелирует со стероидогенной активностью клеток Лейдига, то его можно использовать как биомаркер для мониторинга полового созревания и компетентности стероидогенных клеток к гонадотропинам, а также для диагностики гипогонадотропных состояний у мужчин [59, 60]. При этом имеются данные, что регуляторные эффекты INSL3 на функциональное состояние и стероидогенную активность клеток Лейдига могут осуществляться независимо от гонадотропинов с ЛГ-активностью и включать сигнальные пути, находящиеся под контролем остеокальцина, который не только отвечает за протекание метаболических процессов в костной ткани, но также влияет на синтез тестостерона клетками Лейдига. Отмечается положительная корреляция между экспрессией INSL3 и остеокальцина и между уровнями этих регуляторов и тестостерона в крови [61].

Аллостерические регуляторы рецепторов гонадотропинов

Многообещающим подходом для создания высокоселективных регуляторов репродуктивной системы является разработка лигандов аллостерических сайтов рецепторов ЛГ/ХГ и ФСГ, которые могут быть расположены либо внутри их трансмембранного канала, либо формироваться цитоплазматическими петлями этих рецепторов. Ранее нами были разработаны пептидные аллостерические регуляторы рецептора ЛГ/ХГ, которые структурно соответствуют С-концевому сегменту его третьей цитоплазматической петли и модифицированы гидрофобными пальмитоильным или деканоильным радикалами с С-конца, где в полноразмерном рецепторе расположен гидрофобный трансмембранный участок. В пользу их эффективно-го взаимодействия с аллостерическим сайтом рецептора ЛГ/ХГ свидетельствует то, что они в отсутствие гонадотропина селективно стимулировали зависимость от ЛГ аденилатциклазную сигнальную систему в тестикулярных мембранах, а пальмитоилированное производное при интратестикулярном введении самцам крыс повышало у них уровень тестостерона в крови [62, 63]. Однако при внутривнутреннем и подкожном введении эффективность разработанных пептидов была выражена слабо, что, как мы полагаем, обусловлено их низкой биодоступностью и деградацией в кровотоке. Значительно больший интерес представляют низкомолекулярные гетероциклические соединения, которые взаимодействуют с аллостерическим сайтом, который локализован в трансмембранном домене рецептора ЛГ/ХГ. Наиболее активными и специфичными среди них являются производные тиено[2,3-*d*]пиримидина — *N*-трет-бутил-5-амино-4-(3-метоксифенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пи-

римидин-6-карбоксамид (Org 41841) и его аналог Org 43553 [64]. Они активны как в условиях *in vitro*, стимулируя рецептор ЛГ/ХГ в культурах клеток, так и в условиях *in vivo* при парентеральном и пероральном введении самкам и самцам грызунов [65–67]. Однократное пероральное введение Org 43553 (50 мг/кг) самкам мышей и крыс вызывало у них овуляцию, причем полученные яйцеклетки были хорошего качества и при имплантации давали жизнеспособные эмбрионы. Высокая эффективность Org 43553 при его пероральном введении обусловлена устойчивостью этого соединения в желудочно-кишечном тракте и его высокой биодоступностью, которая составила 79% у крыс и 44% у собак, что сопоставимо с биодоступностью Org 43553 при парентеральном способе введения [66].

В сравнении с гонадотропинами Org 43553 в крови деградировал быстрее — у крыс период его полувыведения составил 3.4 ч, в то время как для ХГ человека он был существенно выше — 6.6 ч [65]. Снижение времени полувыведения имеет большое практическое значение, поскольку позволяет снизить риск развития синдрома гиперстимуляции яичников в ходе экстракорпорального оплодотворения и при других ВРТ. При однократной обработке половозрелых крыс гонадотропинами наблюдаются типичные признаки синдрома гиперстимуляции яичников — значительное увеличение размеров яичников, повышение проницаемости сосудов, гиперсекреция клетками гранулезы фактора роста эндотелия сосудов. При пероральном введении Org 43553 как однократном, так и длительном, признаки этого синдрома отсутствовали, что во многом обусловлено снижением, а не повышением, уровня экспрессии фактора роста эндотелия сосудов [66]. Успешные эксперименты с животными позволили перейти к клиническим испытаниям Org 43553 [67]. В дозе 300 мг это соединение вызывало овуляцию у 83% женщин репродуктивного возраста, не оказывая на них каких-либо побочных эффектов, включая отсутствие синдрома гиперстимуляции яичников.

Основываясь на представленных выше результатах, нами на протяжении шести лет ведется разработка и изучение новых тиено[2,3-*d*]пиримидиновых производных с активностью аллостерических регуляторов рецептора ЛГ/ХГ, в результате чего созданы несколько высокоактивных соединений с активностью полных агонистов этого рецептора, в том числе 5-амино-*N*-(*трет*-бутил)-4-(3-(изоникотинамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТП01), 5-амино-*N*-*трет*-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТП03) и 5-амино-*N*-(*трет*-бутил)-4-(3-(1-метил-1*H*-пирозол-4-карбоксамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТП04) [68–71], а также 5-амино-*N*-(*трет*-бутил)-2-(метилтио)-4-[3-(2-(этиламино)никотинамидо)-фенил]тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТП31) с активностью инверсионного агониста рецептора ЛГ/ХГ [72]. Нами показано, что в условиях *in vitro* соединения ТП01, ТП03 и ТП04 дозозависимо стимулируют активность аденилатциклазы в тестикулярных и овариальных мембранах крыс, действуя специфично через рецептор ЛГ/ХГ и G_s -белок, а также повышают продукцию тестостерона и усиливают экспрессию и функциональную активность стероидогенных белков, включая транспортный белок StAR, в первичной культуре клеток Лейдига крысы [68–70, 73]. По стероидогенной активности тиено[2,3-*d*]пиримидиновые производные ТП01, ТП03 и ТП04 уступают ХГ человека, но действуют селективно в отношении G_s -белков, практически не влияя на активность других сигнальных путей, которые реализуются через $G_{q/11}$ - и $G_{i/o}$ -белки и β -аррестины. Этим во многом обусловлен тот факт, что при длительном внутрибрюшинном или пероральном введении самцам крыс они, в отличие от ХГ, не вызывают десенситизации ткани семенников к эндогенным гонадотропинам. Более того, их стероидогенный эффект не снижается при длительном воздействии, как это имеет место в случае гонадотропинов с ЛГ-активностью, что позволяет поддерживать уровни ан-

дрогенов в крови на умеренно высоком уровне в течение срока, который сопоставим по продолжительности с курсами лечения гонадотропинами репродуктивных дисфункций в клинике [74].

Имеются данные, что низкомолекулярные аллостерические агонисты рецептора ЛГ/ХГ, будучи гидрофобными веществами, способны легко проникать через плазматическую мембрану и специфично связываться с еще незрелыми молекулами рецепторов, которые локализованы внутри клетки и еще не готовы к транслокации в плазматическую мембрану [75]. Связываясь с аллостерическим сайтом рецептора ЛГ/ХГ, низкомолекулярные агонисты не только активируют рецептор, но и стабилизируют ту его конформацию, в которой он с высокой эффективностью транслоцируется в плазматическую мембрану, где становится доступным для взаимодействия с эндогенными гонадотропинами. В условиях старения или эндокринной патологии экспрессия и посттрансляционные модификации рецептора ЛГ/ХГ нарушаются, что приводит к снижению количества его зрелых форм и уменьшению плотности функционально активных молекул рецептора на плазматической мембране стероидогенных клеток. Все это является причиной развития резистентности тканей-мишеней к гонадотропинам и приводит к недостаточности половых стероидных гормонов и снижению репродуктивного потенциала. Использование гонадотропинов для компенсации дефицита андрогенов и эстрогенов в этом случае не столь эффективно, поскольку они не могут активировать незрелые формы рецептора ЛГ/ХГ, расположенные внутри клетки. Нами показано, что при старении или при сахарном диабете 1-го типа тиено[2,3-*d*]пиримидиновое производное ТПОЗ по стероидогенной активности не только сопоставимо с ХГ человека, но и превосходит его. В ходе длительного лечения самцов крыс ТПОЗ не усугубляет резистентность ткани семенников к эндогенным гонадотропинам, сохраняя экспрессию гена рецептора ЛГ/ХГ на нормальном уровне или даже повышая ее [76, 77].

Разработка аллостерических инверсионных агонистов и нейтральных антагонистов рецептора ЛГ/ХГ необходима для лечения опухолей, зависимых от гонадотропинов и половых стероидных гормонов, для коррекции таких состояний, как гирсутизм и синдром поликистозных яичников у женщин и преждевременное половое созревание у мальчиков [78, 79]. Нами разработаны два низкомолекулярных инверсионных агониста рецептора ЛГ/ХГ — на основе тиено[2,3-*d*]пиримидина (ТПЗ1) и пиридо[3,4-*d*]пиримидина (РР17) [72]. В экспериментах *in vitro* соединение ТПЗ1, взятое в микромолярных концентрациях, подавляло стимулирующие эффекты ХГ человека и аллостерического агониста ТПОЗ на активность аденилатциклазы в тестикулярных мембранах крысы, причем его действие в наибольшей степени проявлялось в отношении стимулирующих эффектов ТПОЗ. Это обусловлено большей селективностью ТПЗ1 в отношении цАМФ-зависимых каскадов в стероидогенных клетках Лейдига, активируемых ТПОЗ и реализуемых через G_s -белки. Соединение РР17 в одинаковой степени ингибировало стимулирующие эффекты ХГ и ТПОЗ на активность аденилатциклазы, но было менее активным в сравнении с ТПЗ1. При интратестикулярном (10 мг/кг) и внутрибрюшинном (45 мг/кг) введении самцам крыс соединения ТПЗ1 и РР17 снижали базовый уровень тестостерона в крови и подавляли продукцию тестостерона, стимулированную ХГ человека (100 МЕ/крысу), причем ингибирующий эффект ТПЗ1 был выражен сильнее. Эти результаты свидетельствуют о том, что разработанное нами соединение ТПЗ1, специфично связываясь с аллостерическим сайтом рецептора ЛГ/ХГ, делает его малодоступным для аллостерических агонистов и нарушает передачу гормонального сигнала через рецептор ЛГ/ХГ, что указывает на перспективность разработки на его основе селективных ингибиторов ЛГ-зависимых стероидогенных путей [72]. Необходимо отметить, что молекулярные механизмы действия соединения РР17 могут затрагивать как блокирование аллостерического сайта рецептора ЛГ/ХГ, так и влиять на

доступность для гонадотропинов и конформационные характеристики его ортостерического сайта; изучение этих механизмов требует дальнейшего изучения.

Успехи в разработке низкомолекулярных аллостерических регуляторов рецептора ФСГ не столь впечатляющие в сравнении с таковыми рецептора ЛГ/ХГ. Первый аллостерический агонист рецептора ФСГ, пиперидинкарбоксамид, был разработан в 2001 г. [80]. Однако, несмотря на его способность стимулировать аденилатциклазную систему в клетках, в которых были экспрессированы рецепторы ФСГ, он не был активен как стимулятор стероидогенеза в условиях *in vivo*. В дальнейшем были разработаны различные классы низкомолекулярных соединений с активностью полных и инверсионных агонистов и нейтральных антагонистов, действующих на аллостерический сайт рецептора ФСГ, расположенный в его трансмембранном домене. Среди них производные тиазолидинов, *N*-алкилированные сульфанилпиперазины, замещенные γ -лактамы, тетрагидрохинолины, гексагидрохинолины, тиенопиримидины, замещенные бензамиды [13, 81–84]. Наибольший интерес представляют тиазолидиновые производные, модифицированные γ -лактамной группой и алкильными заместителями в пятом положении гетероциклического кольца, которые были активны не только в условиях *in vitro*, повышая активность аденилатциклазы и продукцию стероидных гормонов в клетках гранулезы яичников крысы, но в условиях *in vivo* стимулировали развитие преовуляторных фолликулов и повышали количество ооцитов при индукции овуляции у самок крыс [81, 82]. Однако эти соединения не были устойчивы в желудочно-кишечном тракте, что снижало их биодоступность при пероральном способе введения, оказывали нежелательные эффекты на генетическую стабильность ооцитов, а в высоких концентрациях вели себя не как полные агонисты, а как негативные аллостерические регуляторы, подавляя ФСГ-зависимый стероидогенез [85, 86].

Большие надежды связывали с гексагидрохинолиновыми производными. Одно из них, соединение Org214444-0, не только само с высокой селективностью стимулировало стероидогенные каскады в клетках гранулезы яичников человека и крысы, но и усиливало соответствующий эффект ФСГ, функционируя одновременно как позитивный аллостерический модулятор и полный аллостерический агонист [87]. Это соединение было активным при пероральном способе введения, однако препятствием для его применения в клинике стала высокая липофильность, создающая серьезные проблемы с растворимостью. Попытки повысить растворимость Org214444-0 с помощью введения гидрофильных групп привели к полной потере его специфической активности [87, 88]. Таким образом, в отличие от низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ/ХГ в настоящее время не разработано аллостерических агонистов рецептора ФСГ с высокой специфической активностью и биодоступностью в условиях *in vivo*, которые могли бы стать прототипами для фармакологических препаратов, действующих на зависимые от ФСГ физиологические процессы.

ТТГ И ДРУГИЕ РЕГУЛЯТОРЫ СИНТЕЗА ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ В ТИРОЦИТАХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

ТТГ, тиростимулин и аутоантитела к рецептору ТТГ

Регуляция синтеза тиреоидных гормонов осуществляется через посредство высокоаффинного связывания рецептора ТТГ с $\alpha\beta$ -гетеродимерной формой ТТГ, которая секретируется тиреотропоцитами гипофиза в ответ на стимуляцию тиролиберинном. Как и в случае гонадотропинов, обе субъединицы ТТГ подвергаются *N*-гликозилированию, что в значительной степени предопределяет функциональную активность гормона. Дегликозилированный ТТГ, хотя и сохраняет способность связываться с рецептором, но не активирует его, вследствие чего нарушение *N*-гликози-

лирования ТТГ блокирует его биологическую активность [89]. Более того, лишённые *N*-гликанов формы ТТГ функционируют как инверсионные агонисты, снижая стимулирующие эффекты нормально гликозилированных форм ТТГ и стимулирующих рецептор ТТГ антител на синтез тиреоидных гормонов. Важным для биологической активности ТТГ является баланс в олигосахаридной части гормона определенных типов гликозильных остатков. Так, повышение содержания сиаловых кислот или снижение содержания остатков фукозы являются одними из причин развития первичного (гипоталамо-гипофизарного) гипотиреоза [90]. Необходимо отметить, что ТТГ в клинике практически не используется, за исключением того случая, когда требуется усилить поглощение радиоактивного йода при радиационной терапии рака щитовидной железы. Для этого используют рекомбинантные формы ТТГ, причем препарат вводят однократно, во избежание его возможного онкогенного воздействия на чувствительные к ТТГ ткани-мишени [91, 92].

В основе ТТГ-опосредуемой активации рецептора ТТГ лежит стабилизация последнего в активной, “открытой” конформации при его связывании с $\alpha\beta$ -гетеродимерной формой гормона [20]. Молекула ТТГ различными своими субдоменами связывается как с лиганд-связывающим сайтом, расположенным во внеклеточной части рецептора ТТГ, содержащей обогатенные остатками лейцина повторы, образующие подобие лестницы из β -складчатых структур, так и со спейсерным субдоменом рецептора (hinge region), который образует стабилизированную дисульфидными связями и содержащую остаток сульфатированного тирозина гидрофильную петлю, соединяющую эктодомен с первым трансмембранным участком. Сульфатированный тирозин является важнейшей молекулярной детерминантой ортостерического сайта рецептора ТТГ и играет ключевую роль в его высокоаффинном связывании с гормоном, обеспечивая конформационные перестройки эктодомена и трансмембранного домена, что необходимо для активации сопряженных с рецептором G-белков и β -аррестинов. Необходимо отметить, что пептиды, соответствующие различным сегментам спейсерного субдомена, влияют на функциональную активность рецептора ТТГ, являясь его позитивными или негативными модуляторами [17, 93, 94]. Так, декапептид, который соответствует по первичной структуре высококонсервативному в рецепторах ТТГ, ЛГ/ХГ и ФСГ сегменту, предшествующему первому трансмембранному участку, функционирует как агонист, вызывая стимуляцию рецептора ТТГ в условиях *in vitro* и стимулируя продукцию тиреоидных гормонов в условиях *in vivo*. При этом замены в нем ряда аминокислотных остатков, как и соответствующие мутации в рецепторе ТТГ, приводят к изменению активности пептида, делая его инверсионным агонистом, снижающим активацию рецептора эндогенными лигандами [94]. Регуляторные эффекты ТТГ как в фолликулярных клетках щитовидной железы, так и в нетиреоидных тканях, могут в значительной степени усиливаться пептидами инсулинового семейства, в первую очередь ИФР-1 [95, 96]. При этом этот эффект может реализовываться как на уровне гипоталамуса и аденогипофиза, вследствие усиления секреции тироберина гипоталамическими нейронами и продукции ТТГ тиреотропоцитами, так и при непосредственном воздействии на клетки, мишени ТТГ [97, 98].

В гипофизе человека открыт структурный и функциональный гомолог ТТГ – гликопротеиновый гормон тиростимулин, который также способен, активируя рецептор ТТГ, стимулировать синтез и секрецию тиреоидных гормонов [99]. Тиростимулин, подобно ТТГ, состоит из двух типов субъединиц – $\alpha 2$ (GPA2) и $\beta 5$ (GPB5), которые имеют существенную гомологию первичной структуры с α - и β -субъединицами ТТГ. Имеются основания полагать, что тиростимулин может замещать неактивные изоформы ТТГ у пациентов с первичным гипотиреозом [100]. Функционально тиростимулин отличается от ТТГ, на что указывает паттерн экспрессии субъединиц GPA2 и GPB5. У человека гетеродимер присутствует в основном в се-

менниках, яичниках, сетчатке глаз, в то время как в гипофизе экспрессируется в основном GPA2-субъединица. У крыс гетеродимерная форма тиростимулина обнаружена в яичниках, где он специфично связывается с рецепторами ТТГ, расположенными на поверхности клеток гранулезы [101].

Наряду с ТТГ, стимулирующее влияние на тироциты оказывают специфичные к рецептору ТТГ активирующие аутоантитела TSAbs. Они с высокой аффинностью связываются с эктодоменом рецептора ТТГ и переводят его в гиперактивированное состояние, результатом чего является повышение уровня тиреоидных гормонов в кровотоке, нарушение функционирования гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси и, как следствие, развитие аутоиммунного гипертиреоза (болезни Грейвса) [18]. Длительное воздействие аутоантител TSAbs на тироциты приводит к даун-регуляции рецепторов ТТГ и развитию их резистентности к эндогенному ТТГ, индуцируя аутоиммунный гипотиреоз. Как это не парадоксально, регуляторные эффекты стимулирующих аутоантител по своим последствиям имеют черты сходства с таковыми ингибирующих аутоантител к рецептору ТТГ [102]. Следует отметить, что в настоящее время отсутствуют фармакологические препараты, способные блокировать или ослаблять негативное влияние стимулирующих и ингибирующих аутоантител на рецепторы ТТГ в тироцитах щитовидной железы и в ретро-орбитальных фибробластах, которые получают из соединительной ткани сетчатки больных офтальмопатией Грейвса, и предупреждать, тем самым, развитие болезни Грейвса и других аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, а также эндокринной офтальмопатии [103]. Это обусловлено тем, что используемые подходы направлены не на ингибирование рецептора ТТГ, а на ослабление синтеза тиреоидных гормонов в щитовидной железе. Эти подходы не только не позволяют контролировать тиреоидный статус при болезни Грейвса, но и совершенно не эффективны в отношении эндокринной офтальмопатии [104]. Одним из возможных путей для выхода из создавшейся ситуации является разработка низкомолекулярных регуляторов рецептора ТТГ, способных взаимодействовать с аллостерическим сайтом, расположенным в его трансмембранном домене, а также пептидинов, внутриклеточных пептидных регуляторов рецептора ТТГ, структурно соответствующих его цитоплазматическим петлям.

Аллостерические регуляторы рецептора ТТГ

Низкомолекулярные лиганды рецептора ТТГ были открыты при изучении аллостерических агонистов рецептора ЛГ/ХГ, чей аллостерический сайт структурно и функционально близок таковому в рецепторе ТТГ. В связи с этим не удивительно, что первым классом низкомолекулярных регуляторов рецептора ТТГ стали тиено[2,3-*d*]пиримидины, которые и в настоящее время представляют большой интерес для разработки фармакологических препаратов с активностью агонистов и антагонистов рецептора ТТГ [105]. В дальнейшем были выявлены и другие классы низкомолекулярных соединений, в основном гетероциклической природы, являющиеся селективными лигандами аллостерического сайта рецептора ТТГ, активные *in vitro* и *in vivo* [20, 84, 106–111].

Среди полных аллостерических агонистов рецептора ТТГ, наряду с тиено[2,3-*d*]пиримидиновыми производными, высокой активностью характеризуются соединения NCGC00168126-01 и его аналог NCGC00165237-01, *N*-(4-(5-(3-бензил-5-гидрокси-4-оксо-1,2,3,4-тетрагидрохиназолин-2-ил)-2-метоксибензилокси)фенил)-ацетамид, которые в наномолярном диапазоне концентраций стимулируют рецептор ТТГ и сопряженные с ним цАМФ-зависимые пути [107, 112]. В микромолярных концентрациях соединение NCGC00165237-01 повышало экспрессию генов, вовлеченных в синтез тиреоидных гормонов, в первичной культуре тироцитов человека, а при

внутрибрюшинном и пероральном способах введения мышам повышало у них продукцию тироксина. В основе этого эффекта была индуцированная NCGC00165237-01 экспрессия генов тиреоглобулина, прекурсора тиреоидных гормонов, и тиреопероксидазы, катализирующей связывание йода с остатками тирозина в тиреоглобулине [112].

Низкомолекулярные аллостерические агонисты рецептора ТТГ активируют мутантные формы рецептора с аминокислотными заменами в ортостерическом сайте эктодомена, которые делают рецептор неспособным связываться с ТТГ. Это позволяет использовать аллостерические агонисты для регуляции тиреоидогенеза у пациентов с субклиническим гипотиреозом, вызванным сниженной чувствительностью тироцитов к действию ТТГ [113]. Агонист С2, производное тиено[2,3-*d*]пиримидина, стимулировал аденилатциклазу в клетках с экспрессированным в них мутантным рецептором ТТГ с заменами остатков Cys⁴¹ и Leu²⁵² на остатки серина и пролина соответственно что делало мутантный рецептор нечувствительным к стимуляции гормоном. Необходимо отметить, что агонист NCGC00165237-01 стимулировал рецептор ТТГ, полностью лишенный эктодомена, что указывает на независимый от внеклеточных субдоменов механизм аллостерической регуляции рецептора [107, 112].

Задача селективного ингибирования повышенной базальной или избыточно стимулированной ТТГ и TSAbs-антителами активности рецептора ТТГ является более актуальной, чем стимуляция рецептора ТТГ, но для большинства ассоциированных с гиперактивацией рецептора ТТГ патологий она до сих пор не решена. Для предотвращения гиперактивации рецептора ТТГ и ослабления продукции тиреоидных гормонов тироцитами обычно используют хирургические и радиоизотопные методы, которые снижают число функционально активных тироцитов, но при этом приводят к тяжелым побочным эффектам и рецидивам [114]. При аутоиммунном гипотиреозе с повышенным уровнем ТТГ применяют терапию тиреоидными гормонами, которые, однако, негативно влияют на функции сердечно-сосудистой и нервной систем и опорно-двигательного аппарата. При болезни Грейвса используют антигипотиреоидные препараты – пропилтиоурацил и метимазол, которые также приводят к побочным эффектам, нарушая функции печени и формирования костной ткани [104, 115]. При этом все перечисленные выше подходы практически не влияют на сигнальные пути, активируемые через рецепторы ТТГ, и не блокируют негативные эффекты TSAbs-антител, в том числе стимуляцию ими рецепторов ТТГ в нетиреоидных тканях, где эти рецепторы также присутствуют. Значительные проблемы связаны с лечением эндокринной офтальмопатии, поскольку использование как антигипотиреоидных препаратов, так и тиреоидных гормонов не влияет на эту аутоиммунную патологию [116]. В большинстве случаев малоэффективным является применение антагонистов рецептора ИФР-1, который функционирует синергично с рецептором ТТГ, и иммуномодуляторов [117–120].

Для подавления гиперактивации рецептора ТТГ в различных тканях-мишенях TSAbs-антителами, а также снижения базальной активности рецептора ТТГ, повышенной в результате активирующих мутаций, могут быть применены аллостерические регуляторы с активностью инверсионных агонистов, антагонистов и негативных модуляторов рецептора ТТГ [116, 121]. Первым эффективным инверсионным агонистом рецептора ТТГ, способным подавлять его стимуляцию ТТГ и антителами TSAbs, было соединение NIDDK/СЕВ-52, (*E*)-*N*-мет-бутил-5-амино-4-(4-(3-метоксипроп-1-енил)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид, но оно в небольшой степени влияло на активность рецептора ЛГ/ХГ [122]. В дальнейшем был разработан более эффективный инверсионный агонист NCGC00229600 (2-{3-[(2,6-диметилфенокси)метил]-4-метоксифенил}-3-(пиридин-3-илметил)-2,3-дигидрохиназолин-4(*1H*)-он), который ингибировал как стимулированную ТТГ и ан-

тителами активность рецептора ТТГ, так и его базальную активность, будучи высокоселективным в отношении рецептора ТТГ [123]. NCGC00229600 подавлял активность рецептора ТТГ в ретро-орбитальных фибробластах, что важно в плане его возможного применения для лечения эндокринной офтальмопатии.

Наряду с разработкой инверсионных агонистов, определенные успехи были достигнуты и при создании нейтральных антагонистов рецептора ТТГ. В 2013–2014 гг. были разработаны соединения NCGC00242595 и его более активный аналог NCGC00242364 (*N*-[4-[[5-[3-(фуран-2-илметил)-4-оксо-1,2-дигидрохиназолин-2-ил]-2-метоксифенил]метокси]-3,5-диметилфенил]ацетамид), которые подавляли ТТГ-индуцированную стимуляцию аденилатциклазной системы в клеточных культурах, а при введении мышам снижали стимулированные тиролиберинем повышение уровня тиреоидных гормонов и усиление экспрессии генов тироидогенеза [109, 124]. Важными преимуществами этих соединений является то, что они не снижают базальные уровни тиреоидных гормонов и не индуцируют гипотиреоз, что является неизбежным побочным эффектом при использовании инверсионных агонистов [107, 109]. В 2019 г. был разработан селективный в отношении рецептора ТТГ антагонист S37a, который с высокой эффективностью блокировал активацию рецептора ТТГ гормоном и различными типами стимулирующих аутоантител, включая TSAb M22 (человек) и KSAb1 (мышь), а также подавлял стимулирующее влияние на рецептор его низкомолекулярного аллостерического агониста C2 [125, 126]. Высокая селективность соединения S37a обусловлена наличием в его структуре семи хиральных центров, которые формируют жесткую изогнутую структуру со сложной стереометрией [126]. Антагонист S37a был активен не только в условиях *in vitro* и *ex vivo*, но при введении мышам предотвращал у них индуцированную ТТГ продукцию тиреоидных гормонов, демонстрируя высокую (53%) биодоступность при пероральном введении [125].

Еще одним подходом для разработки аллостерических регуляторов является создание пептидов — модифицированных липофильными радикалами пептидов, соответствующих участкам цитоплазматических петель рецептора ТТГ, взаимодействующих с гетеротримерными G-белками и β -аррестинами. Нами разработан и исследован пептид, соответствующий функционально важному для активации G_s-белка C-концевому участку третьей цитоплазматической петли рецептора ТТГ. Показано, что в условиях *in vitro* он стимулирует аденилатциклазную систему в мембранах щитовидной железы крыс, а в условиях *in vivo* при интраназальном введении повышает уровни тиреоидных гормонов в крови крыс [127–129]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что пептид функционирует как внутриклеточный агонист рецептора ТТГ, действующий на расположенные в цитоплазматических петлях аллостерические сайты этого рецептора [129].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что гонадотропины являются ключевыми регуляторами стероидогенеза, фолликулогенеза и сперматогенеза, их эффекты в яичниках и семенниках в значительной степени зависят от активности других сигнальных каскадов, регулируемых адипокинами и пептидами инсулинового и реаксинового семейств. Эти каскады имеют ряд общих звеньев с гонадотропиновой сигнальной системой. Функциональное взаимодействие между сигнальными каскадами в значительной степени влияет на способность гонадотропинов активировать рецепторы ЛГ/ХГ и ФСГ и сопряженные с ними G-белки, β -аррестины, ферменты, генераторы вторичных посредников, и компоненты каскада МАПК, а также на способность гонадотропинов активировать транскрипционные факторы, контролируемые экспрессию генов, ответственных за продукцию половых стероидных гормонов, рост

и дифференцировку клеток репродуктивной системы, созревание фолликулов и сперматозоидов. В условиях ослабления сигнальных путей, активируемых лептином, ИФР-1 и INSL3, или при гиперактивации адипонектиновых сигнальных каскадов регуляторные эффекты гонадотропинов нарушаются, что, в конечном итоге, становится причиной репродуктивных дисфункций. Вследствие этого для нормализации функционирования яичников и семенников наиболее перспективным является комбинированное использование фармакологических препаратов, восстанавливающих интегративные связи между различными сигнальными путями, вовлеченными в регуляцию стероидогенеза, фолликулогенеза и гаметогенеза. Однако при некоторых эндокринных и метаболических заболеваниях, а также при ряде генетических нарушений ключевой причиной снижения чувствительности гонад к гонадотропинам является нарушение процессинга рецепторов ЛГ/ХГ и ФСГ и их транслокации в плазматическую мембрану, вследствие чего они оказываются недоступными для эндогенных гонадотропинов. Эффективными в этом случае являются низкомолекулярные аллостерические агонисты, которые не только сами стимулируют активность рецепторов ЛГ/ХГ и ФСГ, но и, функционируя как низкомолекулярные шапероны, способствуют встраиванию их активных форм в плазматическую мембрану. Аллостерические агонисты характеризуются высокой селективностью в отношении внутриклеточных сигнальных каскадов, что позволяет их использовать для избирательной регуляции определенных физиологических функций, например, стероидогенной активности. Вследствие этого совместное применение гонадотропинов, действующих на ортостерический сайт рецептора, и низкомолекулярных регуляторов, связывающихся с аллостерическим сайтом, который не перекрывается с ортостерическим сайтом, может обеспечить их более высокую селективность и эффективность действия и, по крайней мере, частично, предотвратить побочные эффекты, характерные для гонадотропиновой терапии.

В отличие от рецепторов гонадотропинов, эндогенными стимуляторами рецептора ТТГ, наряду с самим ТТГ, являются его функциональный гомолог тиростимулин и, в условиях активации аутоиммунных процессов, стимулирующие аутоантитела TSAbs. При этом ни один из них не нашел применения в медицине как стимулятор опосредуемой через рецептор ТТГ продукции тиреоидных гормонов, исключая ограниченное применение рекомбинантного ТТГ для стимуляции поглощения радиоактивного йода при лечении рака щитовидной железы. Необходимо подчеркнуть, что в настоящее время наиболее остро стоит проблема создания селективных ингибиторов рецептора ТТГ, поскольку его повышенная базальная активность вследствие активирующих мутаций или его длительная гиперактивация TSAbs-аутоантителами приводят к онкологическим и аутоиммунным заболеваниям щитовидной железы и к тяжелым формам офтальмопатии. Основным направлением решения этой проблемы является расшифровка структуры аллостерических сайтов рецептора ТТГ и разработка высокоселективных аллостерических лигандов с активностью нейтральных антагонистов и инверсионных агонистов на основе низкомолекулярных гетероциклических соединений и пептидов, производных функционально важных участков рецептора ТТГ. Многие из этих лигандов активны в условиях *in vivo*, что указывает на перспективность их разработки как прототипов лекарств, предназначенных для лечения болезни Грейвса (аутоиммунного гипертиреоза) и практически неизлечимой эндокринной офтальмопатии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана грантом РФФИ (№ 19-75-20122).

Автор данной статьи сообщает об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ezcurra D., Humaidan P.* A review of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin when used in assisted reproductive technology. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12: 95. 2014. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-95>
2. *Шпаков А.О.* Гонадотропины – от теории к клинической практике. Санкт-Петербург. ПОЛИТЕХ-ПРЕСС. 2018. eLIBRARY ID: 3642381. [*Shpakov A.O.* Gonadotropins - from theory to clinical practice. St. Petersburg. Polytech-Press. 2018. eLIBRARY ID: 3642381 (In Russ)].
3. *Szymańska K., Kalařut J., Rivero-Müller A.* The gonadotropin system, lessons from animal models and clinical cases. *Minerva Ginecol.* 70(5): 561–587. 2018. <https://doi.org/10.23736/S0026-4784.18.04307-1>
4. *Lunenfeld B., Bilger W., Longobardi S., Alam V., D'Hooghe T., Sunkara S.K.* The Development of Gonadotropins for Clinical Use in the Treatment of Infertility. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 10: 429. 2019. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00429>
5. *Puett D., Li Y., DeMars G., Angelova K., Fanelli F.* A functional transmembrane complex: The luteinizing hormone receptor with bound ligand and G protein. *Mol. Cell. Endocrinol.* 260–262: 126–136. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.05.009>
6. *Puett D., Angelova K., da Costa M.R., Warrenfeltz S.W., Fanelli F.* The luteinizing hormone receptor: insights into structure-function relationships and hormone-receptor-mediated changes in gene expression in ovarian cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 329(1–2): 47–55. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.04.025>
7. *Ulloa-Aguirre A., Dias J.A., Bousfield G., Huhtaniemi I., Reiter E.* Trafficking of the follitropin receptor. *Methods Enzymol.* 521: 17–45. 2013.
8. *Lizneva D., Rahimova A., Kim S.M., Atabiekov I., Javaid S., Alamouh B., Taneja C., Khan A., Sun L., Azziz R., Yuen T., Zaidi M.* FSH Beyond Fertility. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 10: 136. 2019. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00136>
9. *Ulloa-Aguirre A., Crepieux P., Poupon A., Maurel M.C., Reiter E.* Novel pathways in gonadotropin receptor signaling and biased agonism. *Rev. Endocr. Metab. Disorders.* 12: 259–274. 2011.
10. *Riccetti L., De Pascali F., Gilioli L., Potì F., Giva L.B., Marino M., Tagliavini S., Trenti T., Fanelli F., Mezzullo M., Pagotto U., Simoni M., Casarini L.* Human LH and hCG stimulate differently the early signalling pathways but result in equal testosterone synthesis in mouse Leydig cells in vitro. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 15(1): 2. 2017. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0224-3>
11. *Riccetti L., Yvinec R., Klett D., Gallay N., Combarnous Y., Reiter E., Simoni M., Casarini L., Ayoub M.A.* Human luteinizing hormone and chorionic gonadotropin display biased agonism at the LH and LH/CG receptors. *Sci. Rep.* 7(1): 940. 2017.
12. *Hollander-Cohen L., Böhm B., Hausken K., Levavi-Sivan B.* Ontogeny of the specificity of gonadotropin receptors and gene expression in carp. *Endocr. Connect.* 8(11): 1433–1446. 2019. <https://doi.org/10.1530/EC-19-0389>
13. *Anderson R.C., Newton C.L., Millar R.P.* Small Molecule Follicle-Stimulating Hormone Receptor Agonists and Antagonists. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 9: 757. 2019. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00757>
14. *Patel J., Landers K., Li H., Mortimer R.H., Richard K.* Thyroid hormones and fetal neurological development. *J. Endocrinol.* 209:1–8. 2011.
15. *Fekete C., Lechan R.M.* Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocrin. Rev.* 35: 159–194. 2014.
16. *Шпаков А.О.* Тиреоидная система в норме и при сахарном диабете 1-го и 2-го типов. Санкт-Петербург. Изд-во Политехнического университета. 2016. eLIBRARY ID: 29744259. [*Shpakov A.O.* The thyroid system is normal and with type 1 and type 2 diabetes. St. Petersburg. Polytechnic Univer. Publ. 2016. eLIBRARY ID: 29744259. (In Russ)].
17. *Kleinau G., Worth C.L., Kreuchwig A., Biebertmann H., Marcinkowski P., Scheerer P., Krause G.* Structural-functional features of the thyrotropin receptor: A class A G-protein-coupled receptor at work. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 8: 86. 2017. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00086>
18. *Rapoport B., McLachlan S.M.* The thyrotropin receptor in Graves' disease. *Thyroid.* 17: 911–922. 2007.
19. *Hwangbo Y., Park Y.J.* Genome-Wide Association Studies of Autoimmune Thyroid Diseases, Thyroid Function, and Thyroid Cancer. *Endocrinol. Metab. (Seoul).* 33(2): 175–184. 2018. <https://doi.org/10.3803/EnM.2018.33.2.175>
20. *Krause G., Marcinkowski P.* Intervention Strategies into Glycoprotein Hormone Receptors for Modulating (Mal-)function, with Special Emphasis on the TSH Receptor. *Horm. Metab. Res.*

- 50(12): 894–907. 2018.
<https://doi.org/10.1055/a-0749-6528>
21. *Fournier T.* Human chorionic gonadotropin: Different glycoforms and biological activity depending on its source of production. *Ann. Endocrinol. (Paris)*. 77(2): 75–81. 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.ando.2016.04.012>
 22. *Bousfield G.R., Harvey D.J.* Follicle-Stimulating Hormone Glycobiology. *Endocrinology*. 160(6): 1515–1535. 2019.
<https://doi.org/10.1210/en.2019-00001>
 23. *Davis J.S., Kumar T.R., May J.V., Bousfield G.R.* Naturally Occurring Follicle-Stimulating Hormone Glycosylation Variants. *J. Glycomics Lipidomics*. 4(1): e117. 2014.
 24. *Шпаков А.О.* Гликозилирование гонадотропинов как важнейший механизм регуляции их активности. *Рос. физиол. журн им. И.М. Сеченова*. 103(9): 1004–1021. 2017. [*Shpakov A.O.* Glycosylation of gonadotropins as an important mechanism for regulating their activity. *Ros. Fiziol. Zh. Im. I.M. Sechenova*. 103(9): 1004–1021. 2017. (In Russ)].
 25. *Bousfield G.R., May J.V., Davis J.S., Dias J.A., Kumar T.R.* In Vivo and In Vitro Impact of Carbohydrate Variation on Human Follicle-Stimulating Hormone Function. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 9: 216. 2018.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00216>
 26. *Nwabuobi C., Arlier S., Schatz F., Guzeloglu-Kayisli O., Lockwood C.J., Kayisli U.A.* hCG: Biological Functions and Clinical Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 18(10): pii: E2037. 2017.
<https://doi.org/10.3390/ijms18102037>
 27. *Casarini L., Brigante G., Simoni M., Santi D.* Clinical Applications of Gonadotropins in the Female: Assisted Reproduction and Beyond. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 143: 85–119. 2016.
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.08.002>
 28. *Wang H., May J., Butnev V., Shuai B., May J.V., Bousfield G.R., Kumar T.R.* Evaluation of *in vivo* bioactivities of recombinant hypo-(FSH^{21/18}) and fully-(FSH²⁴) glycosylated human FSH glycoforms in Fshb null mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 437: 224–236. 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.08.031>
 29. *Simon L.E., Liu Z., Bousfield G.R., Kumar T.R., Duncan F.E.* Recombinant FSH glycoforms are bioactive in mouse preantral ovarian follicles. *Reproduction*. 158(6): 517–527. 2019.
<https://doi.org/10.1530/REP-19-0392>
 30. *Manfredi-Lozano M., Roa J., Ruiz-Pino F., Piet R., Garcia-Galiano D., Pineda R., Zamora A., Leon S., Sanchez-Garrido M.A., Romero-Ruiz A., Dieguez C., Vazquez M.J., Herbison A.E., Pinnilla L., Tena-Sempere M.* Defining a novel leptin-melanocortin-kisspeptin pathway involved in the metabolic control of puberty. *Mol. Metab.* 5: 844–857. 2016.
 31. *Egan O.K., Inglis M.A., Anderson G.M.* Leptin signaling in AgRP neurons modulates puberty onset and adult fertility in mice. *J. Neurosci.* 37: 3875–3886. 2017.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3138-16.2017>
 32. *Kusminski C.M., McTernan P.G., Schraw T., Kos K., O'Hare J.P., Ahima R., Kumar S., Scherer P.E.* Adiponectin complexes in human cerebrospinal fluid: Distinct complex distribution from serum. *Diabetologia*. 50: 634–642. 2007.
 33. *Wen J.P., Liu C., Bi W.K., Hu Y.T., Chen Q., Huang H., Liang J.X., Li L.T., Lin L.X., Chen G.* Adiponectin inhibits KISS1 gene transcription through AMPK and specificity protein-1 in the hypothalamic GT1-7 neurons. *J. Endocrinol.* 214: 177–189. 2012.
 34. *Caprio M., Fabbri E., Isidori A., Aversa A., Fabbri A.* Leptin in reproduction. *Trends Endocrinol. Metab.* 12: 65–72. 2001.
 35. *Caminos J.E., Nogueiras R., Gaytán F., Pineda R., González C.R., Barreiro M.L., Castaño J.P., Malagón M.M., Pinnilla L., Toppari J., Dieguez C., Tena-Sempere M.* Novel expression and direct effects of adiponectin in the rat testis. *Endocrinology*. 149: 3390–3402. 2008.
 36. *Pfaehler A., Nanjappa M.K., Coleman E.S., Mansour M., Wanders D., Plaisance E.P., Judd R.L., Akingbemi B.T.* Regulation of adiponectin secretion by soy isoflavones has implication for endocrine function of the testis. *Toxicol. Lett.* 209: 78–85. 2012.
 37. *Kadivar A., Heidari Khoei H., Hassanpour H., Golestanfar A., Ghanaei H.* Correlation of adiponectin mRNA abundance and its receptors with quantitative parameters of sperm motility in rams. *Int. J. Fertil. Steril.* 10: 127–135. 2016.
 38. *Landry D.A., Sormany F., Haché J., Roumaud P., Martin L.J.* Steroidogenic genes expressions are repressed by high levels of leptin and the JAK/STAT signaling pathway in MA-10 Leydig cells. *Mol. Cell. Biochem.* 433: 79–95. 2017.
 39. *Banks W.A., McLay R.N., Kastin A.J., Sarmiento U., Scully S.* Passage of leptin across the blood-testis barrier. *Am. J. Physiol.* 276: E1099–E1104. 1999.
 40. *Thomas S., Kratzsch D., Schaab M., Scholz M., Grunewald S., Thiery J., Paasch U., Kratzsch J.* Seminal plasma adipokine levels are correlated with functional characteristics of spermatozoa. *Fertil. Steril.* 99: 1256–1263. 2013.

41. *Heinz J.F., Singh S.P., Janowitz U., Hoelker M., Tesfaye D., Schellander K., Sauerwein H.* Characterization of adiponectin concentrations and molecular weight forms in serum, seminal plasma, and ovarian follicular fluid from cattle. *Theriogenology*. 83: 326–333. 2015.
42. *Roumaud P., Martin L.* Roles of leptin, adiponectin and resistin in the transcriptional regulation of steroidogenic genes contributing to decreased Leydig cells function in obesity. *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.* 24: 25–45. 2015.
43. *Yi X., Gao H., Chen D., Tang D., Huang W., Li T., Ma T., Chang B.* Effects of obesity and exercise on testicular leptin signal transduction and testosterone biosynthesis in male mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 312: R501–R510. 2017.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00405.2016>
44. *Atia N., Caprio S., Jones T.W., Heptulla R., Holcombe J., Silver D., Sherwin R.S., Tamborlane W.V.* Changes in free insulin-like growth factor-1 and leptin concentrations during acute metabolic decompensation in insulin withdrawn patients with type 1 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84:2324–2328. 1999.
45. *Isidori A.M., Caprio M., Strollo F., Moretti C., Frajese G., Isidori A., Fabbri A.* Leptin and androgens in male obesity: evidence for leptin contribution to reduced androgen levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84(10): 3673–3680. 1999.
46. *Sorokoumov V.N., Shpakov A.O.* Protein phosphotyrosine phosphatase 1B: Structure, function, role in the development of metabolic disorders and their correction by the enzyme inhibitors. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 53(4): 259–270. 2017.
<https://doi.org/10.1134/S0022093017040020>
47. *Landry D., Paré A., Jean, S., Martin L.J.* Adiponectin influences progesterone production from MA-10 Leydig cells in a dose-dependent manner. *Endocrine*. 48: 957–967. 2015.
48. *Gurusubramanian G., Roy V.K.* Expression of visfatin in alloxan-induced diabetic rat testis. *Acta Histochem.* 116: 1462–1468. 2014.
49. *Riammer S., Garten A., Schaab M., Grunewald S., Kiess W., Kratzsch J., Paasch U.* Nicotinamide phosphoribosyltransferase production in human spermatozoa is influenced by maturation stage. *Andrology*. 4: 1045–1053. 2016.
50. *Tekin S., Erden Y., Sandal S., Etem Onalan E., Ozyalin F., Ozen H., Yilmaz B.* Effects of apelin on reproductive functions: relationship with feeding behavior and energy metabolism. *Arch. Physiol. Biochem.* 123: 9–15. 2017.
51. *Elfassy Y., Bastard J.P., McAvooy C., Fellahi S., Dupont J., Levy R.* Adipokines in semen: Physiopathology and effects on spermatozoas. *Int. J. Endocrinol.* 2018: 3906490. 2018.
<https://doi.org/10.1155/2018/3906490>
52. *Spicer L.J., Aad P.Y.* Insulin-like growth factor (IGF) 2 stimulates steroidogenesis and mitosis of bovine granulosa cells through the IGF1 receptor: role of follicle-stimulating hormone and IGF2 receptor. *Biol. Reprod.* 77(1): 18–27. 2007.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.058230>
53. *Reverchon M., Maillard V., Froment P., Ramé C., Dupont J.* Adiponectin and resistin: a role in the reproductive functions? *Med. Sci.* 29:417–424. 2013.
doi: 10.1051/medsci/2013294016.
54. *Wang T., Liu Y., Lv M., Xing Q., Zhang Z., He X., Xu Y., Wei Z., Cao Y.* miR-323-3p regulates the steroidogenesis and cell apoptosis in polycystic ovary syndrome (PCOS) by targeting IGF-1. *Gene*. 683: 87–100. 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.10.006>
55. *Kristensen S.G., Mamsen L.S., Jeppesen J.V., Botkjær J.A., Pors S.E., Borgbo T., Ernst E., Macklon K.T., Andersen C.Y.* Hallmarks of Human Small Antral Follicle Development: Implications for Regulation of Ovarian Steroidogenesis and Selection of the Dominant Follicle. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 8: 376. 2018.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00376>
56. *Sirotkin A., Alexa R., Kádasi A., Adamcová E., Alwasel S., Harrath A.H.* Resveratrol directly affects ovarian cell sirtuin, proliferation, apoptosis, hormone release and response to follicle-stimulating hormone (FSH) and insulin-like growth factor I (IGF-I). *Reprod. Fertil. Dev.* 2019.
<https://doi.org/10.1071/RD18425>
57. *Botkjær J.A., Pors S.E., Petersen T.S., Kristensen S.G., Jeppesen J.V., Oxvig C., Andersen C.Y.* Transcription profile of the insulin-like growth factor signaling pathway during human ovarian follicular development. *J. Assist. Reprod. Genet.* 36(5): 889–903. 2019.
<https://doi.org/10.1007/s10815-019-01432-x>
58. *Spitschak M., Hoeflich A.* Potential Functions of IGFBP-2 for Ovarian Folliculogenesis and Steroidogenesis. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 9: 119. 2018.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00119>
59. *Ivell R., Heng K., Anand-Ivell R.* Insulin-Like Factor 3 and the HPG Axis in the Male. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 5: 6. 2014.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00006>

60. *Ivell R., AgoulNIK A.I., Anand-Ivell R.* Relaxin-like peptides in male reproduction – a human perspective. *Br. J. Pharmacol.* 174(10): 990–1001. 2017.
<https://doi.org/10.1111/bph.13689>
61. *Coskun G., Sencar L., Tuli A., Saker D., Alparslan M.M., Polat S.* Effects of Osteocalcin on Synthesis of Testosterone and INSL3 during Adult Leydig Cell Differentiation. *Int. J. Endocrinol.* 2019: 1041760. 2019.
<https://doi.org/10.1155/2019/1041760>
62. *Shpakova E.A., Derkach K.V., Shpakov A.O.* Biological activity of lipophilic derivatives of peptide 562–572 of rat luteinizing hormone receptor. *Dokl. Biochem. Biophys.* 452(1): 248–250. 2013.
<https://doi.org/10.1134/S1607672913050116>
63. *Derkach K.V., Shpakova E.A., Shpakov A.O.* Palmitoylated peptide 562–572 of luteinizing hormone receptor increases testosterone level in male rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 158(2): 209–212. 2014.
<https://doi.org/10.1007/s10517-014-2724-5>
64. *van Straten N.C., Schoonus-Gerritsma G.G., van Someren R.G., Draaijer J., Adang A.E., Timmers C.M., Hanssen R.G., van Boeckel C.A.* The first orally active low molecular weight agonists for the LH receptor: Thienopyr(im)idines with therapeutic potential for ovulation induction. *Chem. Biol. Chem.* 3(10): 1023–1026. 2002.
[https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20021004\)3:10<1023::AID-CBIC1023>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20021004)3:10<1023::AID-CBIC1023>3.0.CO;2-9)
65. *van de Lagemaat R., Timmers C.M., Kelder J., van Koppen C., Mosselman S., Hanssen R.G.* Induction of ovulation by a potent, orally active, low molecular weight agonist (Org 43553) of the luteinizing hormone receptor. *Hum. Reprod.* 24(3): 640–648. 2009.
<https://doi.org/10.1093/humrep/den412>
66. *van de Lagemaat R., Raafs B.C., van Koppen C., Timmers C.M., Mulders S.M., Hanssen R.G.* Prevention of the onset of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) in the rat after ovulation induction with a low molecular weight agonist of the LH receptor compared with hCG and rec-LH. *Endocrinology.* 152(11): 4350–4357. 2011.
<https://doi.org/10.1210/en.2011-1077>
67. *Gerrits M., Mannaerts B., Kramer H., Addo S., Hanssen R.* First evidence of ovulation induced by oral LH agonists in healthy female volunteers of reproductive age. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98(4): 1558–1566. 2013.
<https://doi.org/10.1210/jc.2012-3404>
68. *Derkach K.V., Dar'in D.V., Lobanov P.S., Shpakov A.O.* Intratesticular, intraperitoneal, and oral administration of thienopyrimidine derivatives increases the testosterone level in male rats. *Dokl. Biol. Sci.* 459(1): 326–329. 2014.
<https://doi.org/10.1134/S0012496614060040>
69. *Shpakov A.O., Dar'in D.V., Derkach K.V., Lobanov P.S.* The stimulating influence of thienopyrimidine compounds on the adenylyl cyclase systems in the rat testes. *Dokl. Biochem. Biophys.* 456: 104–107. 2014.
<https://doi.org/10.1134/S1607672914030065>
70. *Derkach K.V., Dar'in D.V., Bakhtyukov A.A., Lobanov P.S., Shpakov A.O.* *In vitro* and *in vivo* studies of functional activity of new low molecular weight agonists of the luteinizing hormone receptor. *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser A: Membran. Cell Biology.* 10(4): 294–300. 2016.
<https://doi.org/10.1134/S1990747816030132>
71. *Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V., Shpakov A.O.* Thienopyrimidine derivatives specifically activate testicular steroidogenesis but do not affect thyroid functions. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 55(1): 30–39. 2019.
<https://doi.org/10.1134/S0022093019010046>
72. *Деркач К.В., Дарьин Д.В., Шпаков А.О.* Низкомолекулярные лиганды рецептора лютеинизирующего гормона с активностью антагонистов. *Биол. мембраны.* 37(3): 1–10. 2020. [*Derkach K.V., Dar'in D.V., Shpakov A.O.* The low-molecular-weight ligands of the luteinizing hormone receptor with antagonistic activity. *Biol. Membr.* 37(3): 1–10. 2020. doi: 10.31857/S0233475520030032]
<https://doi.org/10.31857/S0233475520030032>
73. *Бахтюков А.А., Соколова Т.В., Дарьин Д.В., Деркач К.В., Шпаков А.О.* Сравнительное изучение стимулирующего эффекта низкомолекулярного агониста рецептора лютеинизирующего гормона и хорионического гонадотропина на стероидогенез в клетках Лейдига крысы. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 103(10): 1181–1192. 2017. [*Bakhtyukov A.A., Sokolova T.V., Dar'in D.V., Derkach K.V., Shpakov A.O.* Comparative study of the stimulating effect of a low molecular weight luteinizing hormone receptor agonist and chorionic gonadotropin on steroidogenesis in the rat Leydig cells. *Ros. Fiziol. Zh. im. I.M. Sechenova.* 103(10): 1181–1192. 2017. (In Russ)].
74. *Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V., Shpakov A.O.* Conservation of steroidogenic effect of the low-molecular-weight agonist of luteinizing hormone receptor in the course of its long-term administration to male rats. *Dokl. Biochem. Biophys.* 484(1): 78–81. 2019. doi: 101216
<https://doi.org/10.1134/S1607672919>

75. *Newton C.L., Whay A.M., McArdle C.A., Zhang M., van Koppen C.J., van de Lagemaat R., Segaloff D.L., Millar R.P.* Rescue of expression and signaling of human luteinizing hormone G protein-coupled receptor mutants with an allosterically binding small-molecule agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108(17): 7172–7176. 2011.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1015723108>
76. *Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V., Sharova T.S., Shpakov A.O.* Decrease in the basal and luteinizing hormone receptor agonist-stimulated testosterone production in aging male rats. *Adv. Gerontol.* 9(2): 179–185. 2019.
<https://doi.org/10.1134/S2079057019020036>
77. *Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V., Stepochkina A.M., Shpakov A.O.* A low molecular weight agonist of the luteinizing hormone receptor stimulates adenylyl cyclase in the testicular membranes and steroidogenesis in the testes of rats with type 1 diabetes. *Biochemistry. (Moscow). Suppl Ser A: Membr Cell Biol.* 13(4): 301–309. 2019.
<https://doi.org/10.1134/S1990747819040032>
78. *Heidelbaugh J.J.* Endocrinology Update: Hirsutism. *FP Essent.* 451: 17–24. 2016.
79. *Mizushima T., Miyamoto H.* The Role of Androgen Receptor Signaling in Ovarian Cancer. *Cells.* 8(2): pii: E176. 2019.
<https://doi.org/10.3390/cells8020176>
80. *El Tayer N., Reddy A., Buckler D.* Applied Research Systems ARS Holding N.A., assignee FSH Mimetics for the Treatment of Infertility. United States patent US 6,235,755. 2001.
81. *Yanofsky S.D., Shen E.S., Holden F., Whitehorn E., Aguilar B., Tate E., Holmes C.P., Scheuerman R., MacLean D., Wu M.M., Frail D.E., López F.J., Winneker R., Arey B.J., Barrett R.W.* Allosteric activation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor by selective, nonpeptide agonists. *J. Biol. Chem.* 281(19): 13226–13233. 2006.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M600601200>
82. *Arey B.J.* Allosteric modulators of glycoprotein hormone receptors: discovery and therapeutic potential. *Endocrine.* 34: 1–10. 2008.
<https://doi.org/10.1007/s12020-008-9098-2>
83. *van Straten N.C., Timmers C.M.* Non-Peptide ligands for the gonadotropin receptors. *Annu. Rep. Med. Chem.* 44: 171–188. 2009.
[https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(09\)04408-X](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(09)04408-X)
84. *Nataraja S.G., Yu H.N., Palmer S.S.* Discovery and development of small molecule allosteric modulators of glycoprotein hormone receptors. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 6:142. 2015.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00142>
85. *Zoenen M., Urizar E., Swillens S., Vassart G., Costagliola S.* Evidence for activity-regulated hormone-binding cooperativity across glycoprotein hormone receptor homomers. *Nat. Commun.* 3: 1007. 2012.
<https://doi.org/10.1038/ncomms1991>
86. *Sriraman V., Denis D., de Matos D., Yu H., Palmer S., Nataraja S.* Investigation of a thiazolidinone derivative as an allosteric modulator of follicle stimulating hormone receptor: evidence for its ability to support follicular development and ovulation. *Biochem. Pharmacol.* 89(2): 266–275. 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.02.023>
87. *van Koppen C.J., Verbost P.M., van de Lagemaat R., Karstens W.J., Loozen H.J., van Achterberg T.A., van Amstel M.G., Brands J.H., van Doornmalen E.J., Wat J., Mulder S.J., Raafs B.C., Verkaik S., Hanssen R.G., Timmers C.M.* Signaling of an allosteric, nanomolar potent, low molecular weight agonist for the follicle-stimulating hormone receptor. *Biochem. Pharmacol.* 85(8): 1162–1170. 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.001>
88. *Timmers C.M., Karstens W.F., Grima Poveda P.M. Inventors; N.V. Organon.* Assignee 4-Phenyl-5-Oxo-1,4,5,6,7,8-Hexahydroquinoline Derivatives as Medicaments for the Treatment of Infertility. United States patent US WO2006/117370. 2006.
89. *Fares F.* The role of O-linked and N-linked oligosaccharides on the structure-function of glycoprotein hormones: development of agonists and antagonists. *Biochim. Biophys. Acta.* 1760: 560–567. 2006.
90. *Persani L.* Hypothalamic thyrotropin-releasing hormone and thyrotropin biological activity. *Thyroid.* 8: 941–946. 1998.
91. *Tala H., Robbins R., Fagin J.A., Larson S.M., Tuttle R.M.* Five-year survival is similar in thyroid cancer patients with distant metastases prepared for radioactive iodine therapy with either thyroid hormone withdrawal or recombinant human TSH. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96(7): 2105–2111. 2011.
<https://doi.org/10.1210/jc.2011-0305>
92. *Rani D., Kaisar S., Awasare S., Kamaldeep, Abhyankar A., Basu S.* Examining recombinant human TSH primed ¹³¹I therapy protocol in patients with metastatic differentiated thyroid carcinoma: comparison with the traditional thyroid hormone withdrawal protocol. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 41(9): 1767–1780. 2014.
<https://doi.org/10.1007/s00259-014-2737-3>

93. *Schaarschmidt J., Huth S., Meier R., Paschke R., Jaeschke H.* Influence of the hinge region and its adjacent domains on binding and signaling patterns of the thyrotropin and follitropin receptor. *PLoS One*. 9(10): e111570. 2014.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111570>
94. *Brüser A., Schulz A., Rothmund S., Ricken A., Calebiro D., Kleinau G., Schöneberg T.* The activation mechanism of glycoprotein hormone receptors with implications in the cause and therapy of endocrine diseases. *J. Biol. Chem.* 291: 508–520. 2016.
95. *Krieger C.C., Perry J.D., Morgan S.J., Kahaly G.J., Gershengorn M.C.* TSH/IGF-1 Receptor Cross-Talk Rapidly Activates Extracellular Signal-Regulated Kinases in Multiple Cell Types. *Endocrinology*. 158(10): 3676–3683. 2017.
<https://doi.org/10.1210/en.2017-00528>
96. *Paik J.S., Kim S.E., Kim J.H., Lee J.Y., Yang S.W., Lee S.B.* Insulin-like growth factor-1 enhances the expression of functional TSH receptor in orbital fibroblasts from thyroid-associated ophthalmopathy. *Immunobiology*. 25: 151902. 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.151902>
97. *Derkach K.V., Bogush I.V., Berstein L.M., Shpakov A.O.* The influence of intranasal insulin on hypothalamic-pituitary-thyroid axis in normal and diabetic rats. *Horm. Metab. Res.* 47(12): 916–924. 2015.
<https://doi.org/10.1055/s-0035-1547236>
98. *Smith T.J., Janssen J.A.M.J.L.* Insulin-like Growth Factor-I Receptor and Thyroid-Associated Ophthalmopathy. *Endocr. Rev.* 40(1): 236–267. 2019.
<https://doi.org/10.1210/er.2018-00066>
99. *Nakabayashi K., Matsumi H., Bhalla A., Bae J., Mosselman S., Hsu S.Y., Hsueh A.J.* Thyrostimulin, a heterodimer of two new human glycoprotein hormone subunits, activates the thyroid-stimulating hormone receptor. *J. Clin. Invest.* 109: 1445–1452. 2002.
100. *Wondisford F.E.* The thyroid axis just got more complicated. *J. Clin. Invest.* 109: 1401–1402. 2002.
101. *Baquedano M.S., Ciaccio M., Dujovne N., Herzovich V., Longueira Y., Warman D.M., Rivarola M.A., Belgorosky A.* Two novel mutations of the TSH-beta subunit gene underlying congenital central hypothyroidism undetectable in neonatal TSH screening. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95: E98–E103. 2010.
102. *McLachlan S.M., Rapoport B.* Thyrotropin-blocking autoantibodies and thyroid-stimulating autoantibodies: potential mechanisms involved in the pendulum swinging from hypothyroidism to hyperthyroidism or vice versa. *Thyroid*. 23(1): 14–24. 2013.
<https://doi.org/10.1089/thy.2012.0374>
103. *Bahn R.S.* Autoimmunity and Graves' disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* 91:577–579. 2012.
104. *Sato S., Noh J.Y., Sato S., Suzuki M., Yasuda S., Matsumoto M., Kunii Y., Mukasa K., Sugino K., Ito K., Nagataki S., Taniyama M.* Comparison of efficacy and adverse effects between methimazole 15 mg+inorganic iodine 38 mg/day and methimazole 30 mg/day as initial therapy for Graves' disease patients with moderate to severe hyperthyroidism. *Thyroid*. 25: 43–50. 2015.
105. *Moore S., Jaeschke H., Kleinau G., Neumann S., Costanzi S., Jiang J.K., Childress J., Raaka B.M., Colson A., Paschke R., Krause G., Thomas C.J., Gershengorn M.C.* Evaluation of small-molecule modulators of the luteinizing hormone/choriogonadotropin and thyroid stimulating hormone receptors: structure-activity relationships and selective binding patterns. *J. Med. Chem.* 49: 3888–3896. 2006.
106. *Heitman L.H., Ijzerman A.P.* G protein-coupled receptors of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: a case for GnRH, LH, FSH, and GPR54 receptor ligands. *Med. Res. Rev.* 28: 975–1011. 2008.
107. *Neumann S., Gershengorn M.C.* Small molecule TSHR agonists and antagonists. *Ann. Endocrinol. (Paris)*. 72: 74–76. 2011.
108. *Lane J.R., Ijzerman A.P.* Allosteric approaches to GPCR drug discovery. *Drug Discov. Today Technol.* 10: 219–221. 2013.
109. *Neumann S., Nir E.A., Eliseeva E., Huang W., Marugan J., Xiao J., Dulcey A.E., Gershengorn M.C.* A Selective TSH receptor antagonist inhibits stimulation of thyroid function in female mice. *Endocrinology*. 155: 310–314. 2014.
110. *Neumann S., Padia U., Cullen M.J., Eliseeva E., Nir E.A., Place R.F., Morgan S.J., Gershengorn M.C.* An enantiomer of an oral small-molecule TSH receptor agonist exhibits improved pharmacologic properties. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 7: 105. 2016.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00105>
111. *Шпаков А.О.* Новые достижения в разработке и изучении механизмов действия низкомолекулярных агонистов рецепторов тиреотропного и лютеинизирующего гормонов. *Цитология*. 57(3): 167–176. 2015. [*Shpakov A.O.* New advances in the development and study of the mechanisms of action of low molecular weight agonists of thyrotropic and luteinizing hormone receptors. *Tsitologiya*. 57(3): 167–176. 2015.(In Russ)].

112. Neumann S., Huang W., Titus S., Krause G., Kleinau G., Alberobello A.T., Zheng W., Southall N.T., Inglese J., Austin C.P., Celi F.S., Gavrilova O., Thomas C.J., Raaka B.M., Gershengorn M.C. Small molecule agonists for the thyrotropin receptor stimulate thyroid function in human thyrocytes and mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106: 12471–12476. 2009.
113. Allen M.D., Neumann S., Gershengorn M.C. Small-molecule thyrotropin receptor agonist activates naturally occurring thyrotropin-insensitive mutants and reveals their distinct cyclic adenosine monophosphate signal persistence. *Thyroid*. 21: 907–912. 2011.
114. Meyer Zu Horste M., Pateronis K., Walz M.K., Alesina P., Mann K., Schott M., Esser J., Eckstein A.K. The effect of early thyroidectomy on the course of active Graves' Orbitopathy (GO): A retrospective case study. *Horm. Metab. Res.* 48: 433–439. 2016.
115. Bahn R.S., Burch H.S., Cooper D.S., Garber J.R., Greenlee C.M., Klein I.L., Laurberg P., McDougall I.R., Rivkees S.A., Ross D., Sosa J.A., Stan M.N. The Role of Propylthiouracil in the Management of Graves' Disease in Adults: report of a meeting jointly sponsored by the American Thyroid Association and the Food and Drug Administration. *Thyroid*. 19: 673–674. 2009.
116. Neumann S., Place R.F., Krieger C.C., Gershengorn M.C. Future Prospects for the Treatment of Graves' Hyperthyroidism and Eye Disease. *Horm. Metab. Res.* 47: 789–796. 2015.
117. Hegedüs L., Smith T.J., Douglas R.S., Nielsen C.H. Targeted biological therapies for Graves' disease and thyroid-associated ophthalmopathy. Focus on B-cell depletion with Rituximab. *Clin. Endocrinol. (Oxford)*. 74: 1–8. 2011.
118. Kahaly G.J., Shimony O., Gellman Y.N., Lytton S.D., Eshkar-Sebban L., Rosenblum N., Refaeli E., Kassem S., Ilany J., Naor D. Regulatory T-cells in Graves' orbitopathy: Baseline findings and immunomodulation by anti-lymphocyte globulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96: 422–429. 2011.
119. Chen H., Shan S.J.C., Mester T., Wei Y.-H., Douglas R.S. TSH-Mediated TNF α Production in Human Fibrocytes Is Inhibited by Teprotumumab, an IGF-1R Antagonist. *PLoS One*. 10:e0130322. 2015.
120. Smith T.J., Kahaly G.J., Ezra D.G., Fleming J.C., Dailey R.A., Tang R.A., Harris G.J., Antonelli A., Salvi M., Goldberg R.A., Gigantelli J.W., Couch S.M., Shriver E.M., Hayek B.R., Hink E.M., Woodward R.M., Gabriel K., Magni G., Douglas R.S. Teprotumumab for Thyroid-Associated Ophthalmopathy. *N. Engl. J. Med.* 376: 1748–1761. 2017.
121. Gershengorn M.C., Neumann S. Update in TSH receptor agonists and antagonists. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97: 4287–4292. 2012.
122. Neumann S., Kleinau G., Costanzi S., Moore S., Jiang J.K., Raaka B.M., Thomas C.J., Krause G., Gershengorn M.C. A low-molecular-weight antagonist for the human thyrotropin receptor with therapeutic potential for hyperthyroidism. *Endocrinology*. 149: 5945–5950. 2008.
123. Neumann S., Eliseeva E., McCoy J.G., Napolitano G., Giuliani C., Monaco F., Huang W., Gershengorn M.C. A new small-molecule antagonist inhibits Graves' disease antibody activation of the TSH receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96: 548–554. 2011.
124. Turcu A.F., Kumar S., Neumann S., Coenen M., Iyer S., Chiriboga P., Gershengorn M.C., Bahn R.S. A small molecule antagonist inhibits thyrotropin receptor antibody-induced orbital fibroblast functions involved in the pathogenesis of Graves ophthalmopathy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98: 2153–2159. 2013.
125. Marcinkowski P., Hoyer I., Specker E., Furkert J., Rutz C., Neuenschwander M., Sobottka S., Sun H., Nazare M., Berchner-Pfannschmidt U., von Kries J.P., Eckstein A., Schülein R., Krause G. A New Highly Thyrotropin Receptor-Selective Small-Molecule Antagonist with Potential for the Treatment of Graves' Orbitopathy. *Thyroid*. 29(1): 111–123. 2019. <https://doi.org/10.1089/thy.2018.0349>
126. Marcinkowski P., Kreuchwig A., Mendieta S., Hoyer I., Witte F., Furkert J., Rutz C., Lentz D., Krause G., Schülein R. Thyrotropin Receptor: Allosteric Modulators Illuminate Intramolecular Signaling Mechanisms at the Interface of Ecto- and Transmembrane Domain. *Mol. Pharmacol.* 96(4): 452–462. 2019. <https://doi.org/10.1124/mol.119.116947>
127. Shpakova E.A., Shpakov A.O., Chistyakova O.V., Moyseyuk I.V., Derkach K.V. Biological activity *in vitro* and *in vivo* of peptides corresponding to the third intracellular loop of thyrotropin receptor. *Dokl. Biochem. Biophys.* 433 :64–67. 2012. <https://doi.org/10.1134/S1607672912020020>
128. Деркач К.В., Шпакова Е.А., Бондарева В.М., Шпаков А.О. Исследование дозо-зависимости стимулирующего влияния пептида, производного рецептора тиреотропного гормона, на продукцию тиреоидных гормонов у крыс. *Трансляционная медицина*. 1(30): 15–21. 2015. [Derkach K.V., Shpakova E.A., Bondareva V.M., Shpakov A.O. A study of the dose dependence of the stimulating effect of a peptide, a derivative of the thyroid stimulating hormone receptor, on the production of thyroid hormones in rats. *Translational Medicine*. 1(30): 15–21. 2015. (In Russ)].
129. Derkach K.V., Shpakova E.A., Titov A.M., Shpakov A.O. Intranasal and intramuscular administration of lysine-palmitoylated peptide 612–627 of thyroid-stimulating hormone receptor increases the level of thyroid hormones in rats. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 21: 249–260. 2015.

The Endogenous and Synthetic Regulators of the Effector Components of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal and -Thyroid Axes

A. O. Shpakov*

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg, Russia

*e-mail: alex_shpakov@list.ru

The activity of the peripheral components of the hypothalamic-pituitary-gonadal and -thyroid axes is regulated by the pituitary hormones, such as the gonadotropins and thyroid-stimulating hormone (TSH), which are secreted by specialized cells of the adenohypophysis. Luteinizing hormone (LH) and its homolog, chorionic gonadotropin (CG), realize their steroidogenic effects by binding to the LH/CG receptors located on the surface of the Leydig cells in the testes and the theca and granulosa cells of the mature follicle in the ovaries. Follicle-stimulating hormone (FSH) binds to the FSH receptors located on the surface of the Sertoli cells in the testes and the granulosa cells of primordial and maturing follicles in the ovaries, controlling the folliculogenesis, spermatogenesis and steroidogenesis. The TSH through the activation of TSH receptor stimulates the synthesis of thyroid hormones by thyrocytes in the thyroid gland. The gonadotropins (LH, CG, and FSH) and TSH bind with a high affinity to the extracellular domain of G-protein-coupled receptors specific to them, and activate several signaling cascades which are realized through the different types of G-proteins and β -arrestins. The recombinant and isolated from natural sources gonadotropins used to treat the reproductive dysfunctions and in the assisted reproductive technologies have several disadvantages, as a result of which the peptidic and low-molecular-weight regulators of the LH/CG and FSH receptors, which interact with the allosteric sites located in their transmembrane or intracellular domain are being developed. The use of adipokines, insulin family peptides, the antidiabetic drug metformin, which not only regulate and modulate the response of gonads to gonadotropins, but also themselves affect steroidogenesis and gamete maturation, opens up great prospects in the regulation of reproductive functions and in the control of fertility. In the case of TSH receptors, the most acute problem is the decrease in their increased activity in the autoimmune and oncological thyroid diseases and in endocrine ophthalmopathy. The most promising in this regard are the currently developed low-molecular-weight inversion agonists and neutral antagonists that interact with the allosteric site located in the transmembrane domain of TSH receptor. This review is devoted to modern advances in the development and study of the endogenous and synthetic regulators and modulators of the gonadotropin and TSH receptors, as well as their influence on the peripheral components of the hypothalamic-pituitary-gonad and -thyroid axes.

Keywords: gonadotropin, thyroid-stimulating hormone, G-protein-coupled receptor, allosteric regulator, leptin, low-molecular-weight agonist, thyroid gland

ЦИТИРОВАТЬ:

Шпаков А.О. Эндогенные и синтетические регуляторы периферических звеньев гипоталамо-гипофизарно-гонадной и -тиреоидной осей. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(6): 696–719.

DOI: 10.31857/S0869813920060126

TO CITE THIS ARTICLE:

Shpakov A.O. The Endogenous and Synthetic Regulators of the Effector Components of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal and -Thyroid Axes. Russian Journal of Physiology. 106(6): 696–719.

DOI: 10.31857/S0869813920060126

ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ СТЕРОИДОГЕННОГО ФАКТОРА 1 (SF-1) В НЕЙРОНАХ ВЕНТРОМЕДИАЛЬНОГО ЯДРА ГИПОТАЛАМУСА КРЫСЫ ПРИ СТАРЕНИИ

© 2020 г. К. Ю. Моисеев¹, А. А. Спиричев¹, П. А. Вишнякова¹,
А. Д. Ноздрачев², П. М. Маслоков^{1, *}

¹Ярославский государственный медицинский университет, Ярославль, Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: mpm@ysmu.ru

Поступила в редакцию 15.02.2020 г.

После доработки 06.03.2020 г.

Принята к публикации 03.04.2020 г.

Экспрессия стероидогенного фактора 1 в нейронах вентромедиального ядра гипоталамуса крысы исследовалась при помощи иммуногистохимического метода и вестерн-блоттинга у молодых (2–3 мес.) и старых (2–2.5 г.) крыс самцов и самок. Стероидогенный фактор 1 содержится в подавляющем большинстве нейронов вентромедиального ядра гипоталамуса молодых и старых крыс в дорсомедиальной части ядра. У старых крыс доля иммунореактивных нейронов к стероидогенному фактору 1 в дорсомедиальной части ядра достоверно снижалась с 88 до 68% у самцов и с 82 до 66% у самок. В каждой из возрастных групп не было отмечено достоверных половых различий по числу иммунопозитивных нейронов. Экспрессия стероидогенного фактора 1 достоверно уменьшалась у старых самцов и самок крыс и по данным вестерн-блоттинга. Таким образом, старение связано с изменением нейрхимического состава вентромедиального ядра гипоталамуса, участвующего в регуляции энергетического обмена и полового поведения.

Ключевые слова: гипоталамус, вентромедиальное ядро, стероидогенный фактор 1, старение

DOI: 10.31857/S0869813920060060

Гипоталамус — филогенетически старый отдел промежуточного мозга, который играет важную роль в поддержании постоянства внутренней среды и обеспечении интеграции функций автономной, эндокринной, соматической систем. Есть предположение об участии гипоталамуса в механизмах старения [1, 2], при этом важная роль отводится средней группе ядер, включая вентромедиальное ядро (ВМЯ) гипоталамуса [2, 3].

ВМЯ известно своим участием в регуляции сексуального и пищевого поведения, хотя оно также регулирует кровяное давление и болевые пути [3–6]. Повреждения в ВМЯ изменяют пищевое поведение и связаны с гиперфагией и развитием ожирения [7]. Внутренние часы ВМЯ играют роль в контроле периферических циркадных ритмов [8].

Считается, что вентролатеральная часть ВМЯ (влВМЯ) в основном отвечает за половое поведение у самок крыс и связана с присутствием нейронов, которые экспрессируют рецепторы эстрогена [9, 10], в то время как дорсомедиальная часть ВМЯ (дмВМЯ) больше связана с регуляцией аппетита [11]. ВМЯ содержит гетеро-

генные нейрональные популяции, отличающиеся по функциональной идентичности, а также по биохимической идентичности. Разные субпопуляции нейронов в ВМЯ экспрессируют разные нейропептиды, пептидные рецепторы и факторы транскрипции и имеют разные внутренние свойства. ВМЯ также содержит нейроны, которые отвечают на изменения содержания внеклеточной глюкозы [12].

Стероидогенный фактор 1 (SF-1) представляет собой ядерный рецептор, экспрессирующийся в надпочечниках, гонадах, переднем гипофизе и ВМЯ гипоталамуса [13]. SF-1 имеет жизненно важное значение не только для развития ВМЯ, но и для его физиологических функций [14]. У мышей нокаут SF-1 вызывал ожирение и аномальное развитие ВМЯ [15], а у людей мутации SF-1 приводили к ожирению и диабету 2 типа [16].

Целью исследования явилось изучение экспрессии SF1 в ВМЯ гипоталамуса молодых и старых крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на 40 белых крысах самках ($n = 20$) и самцах ($n = 20$) линии Вистар в возрасте 2–3 мес. (молодые, $n = 20$) и 2–2.5 г. (старые, $n = 20$) с соблюдением “Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных” (приказ № 775 от 12.08.1977 г. МЗ СССР) в соответствии с принципами Базельской декларации. После введения летальной дозы уретана (3 г/кг, внутривентриально), животных перфузировали транскардиально раствором стандартного фосфатно-солевого буфера (PBS; 0.01 М, pH 7.4) (БиолоТ, Россия).

С целью проведения иммуногистохимических исследований, животных ($n = 20$) затем перфузировали 4%-ным раствором параформальдегида (Sigma, США) на PBS. После перфузии головной мозг извлекали и иссекали участок гипоталамуса, содержащий ВМЯ, согласно координатам атласа мозга крыс [17]. Серии коронарных срезов гипоталамуса толщиной 14 мкм изготавливали на криостате Shandon E (Thermo Scientific, Великобритания). Выявление SF1 проводили с использованием меченых антител: первичные моноклональные мышинные антитела против SF-1, разведение 1 : 150 (Invitrogen, кат. номер 434200, США); вторичные ослиные антитела (Jackson ImmunoResearch Laboratories, США) против мышиногеноглобулина G, конъюгированные с флуоресцеин-изотиоцианатом – FITC, флуоресцирующим в зеленой области спектра, разведение 1 : 100. Окраску клеток всей популяции нейронов проводили красителем, флуоресцирующим в красной области спектра, NeuroTrace Red Fluorescent Nissl Stains (Molecular Probes, США) – разведение 1 : 200. После этого срезы отмывали в PBS и заключали в среду для иммунофлуоресценции VectaShield (Vector Laboratories, США). Для исключения неспецифической реакции, часть срезов инкубировали без первичных и/или вторичных антител.

Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе Olympus BX43 (Токио, Япония) с соответствующим набором светофильтров и охлаждаемой цифровой CCD камерой Tucsen TCC 6.1ICE с программным обеспечением ISCapture 3.6 (Китай). Долю SF1-иммунореактивных (ИР) нейронов определяли как их отношение к общему количеству нейронов, выявленных NeuroTrace Fluorescent Nissl Stains, которое принимали за 100%. Анализу подлежали нейроны, срез которых прошел через ядро с видимым ядрышком и с флуоресценцией, превышающей фоновое свечение. Процент ИР нейронов определяли с помощью программы Image J (NIH, США).

Вестерн-блоттинг проводился на 20 крысах, по 5 в каждой группе (самцы, самки, молодые, старые). На вибротоме делались срезы гипоталамуса толщиной 300 мкм. Под стереомикроскопом на срезах вырезались ВМЯ, которые затем гомогенизировали с буфером для лизиса. Каждый лизат ткани разводили в образце буфера (Bio-

Rad Laboratories Inc., США) и денатурировали при 95°C в течение 5 мин. Эквивалентное количество образцов были загружены и разделены с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и затем перенесены на мембраны ПВДФ передачи (AppliChem, Германия). Мембраны блокировали блокирующим раствором, содержащим 3%-ное обезжиренное сухое молоко (AppliChem, Германия) в TBS-T (0.1% Tween 20, 0.2 мМ Трис, 137 мМ NaCl), в течение 30 мин при комнатной температуре. После промывки TBS-T, мембраны инкубировали с первичными моноклональными мышинными антителами против SF-1, разведение 1 : 500 (Invitrogen, кат. номер 434200, США) и поликлональными кроличьими антителами против GAPDH (глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа), разведение 1 : 2500 (Abcam, Великобритания), при 4°C в течение ночи. После промывки TBS-T мембраны инкубировали с вторичными антителами (козы HRP-конъюгированные анти-кроличьи и анти-мышинные IgG, (Abcam, Великобритания)) в соотношении 1 : 3000. Иммуноблоты были обнаружены хемилюминесценцией (ECL Prime детектирующий реагент вестерн-блоттинга, BioRad) с гель-документирующей системой Syngene G : BOX Chemi XR5E (Syngene, Великобритания). Хемилюминесцентные сигналы были определены количественно при помощи программного обеспечения Gene Tools Gel Analysis (Syngene, Великобритания), и их оптическая плотность выражалась относительно GAPDH. Маркеры молекулярной массы белков были включены в каждый вестерн-блот-анализ.

Математическая обработка данных и построение графиков выполнено с использованием программы Sigma Plot (Systat Software, США). Все величины представлены как средняя арифметическая \pm ошибка среднего ($M \pm m$). Две независимые группы сравнивались с помощью U-критерия Манна–Уитни, три и более с помощью рангового анализа вариаций по Краскелу–Уоллису с последующим парным сравнением групп тестом Манна–Уитни с применением поправки Данна при оценке значения p . За уровень статистической значимости был взят $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты иммуногистохимических исследований показали, что SF-1 содержится в подавляющем большинстве нейронов ВМЯ гипоталамуса молодых и старых крыс самцов и самок в дорсомедиальной части ядра (рис. 1). В влВМЯ обнаруживались лишь отдельные SF-1-ИР нейроны. Одиночные SF1-ИР нейроны располагались и в области между ВМЯ и дугообразным ядром, а также в области дугообразного ядра.

У старых крыс процент SF-1-ИР нейронов дмВМЯ достоверно снижался с 88 ± 2.5 до 68 ± 5.5 у самцов и с 82 ± 2.5 до 66 ± 2.7 у самок ($p < 0.05$, рис. 2, 3). В каждой из возрастных групп не было отмечено достоверных половых различий по числу SF-1-ИР нейронов ($p > 0.05$).

Экспрессия SF-1 в ВМЯ определялась методом вестерн-блоттинга, при этом у всех животных в обоих ядрах выявлялись полосы, соответствующие молекулярной массе белка 55 кДа. Экспрессия белка достоверно уменьшалась у старых самцов крыс с 0.59 ± 0.03 до 0.48 ± 0.01 и у самок с 0.57 ± 0.02 до 0.48 ± 0.01 ($p < 0.05$, рис. 4) относительно GAPDH. Не было выявлено половых различий по степени экспрессией вышеназванного белка в каждой из возрастных групп ($p > 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами результаты о селективной экспрессии SF-1 в дмВМЯ и центральной части ВМЯ крыс согласуются с данными литературы, полученными на мышях. В гипоталамусе мышей-самцов SF-1 выявлялся в нейронах на всем протяжении ВМЯ в эмбриональном периоде, но к моменту рождения SF-1 не опреде-

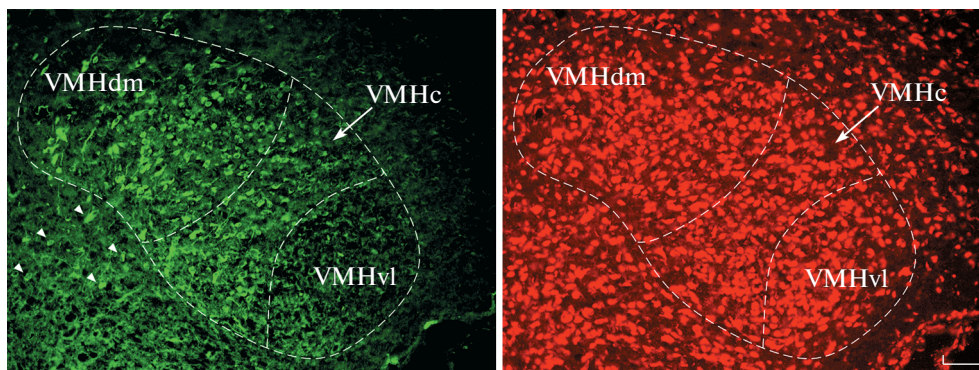


Рис. 1. Флуоресцентное обзорное микрофото нейронов ВМЯ (красный цвет, окраска NeuroTrace Red Fluorescent Nissl Stains) самки старой крысы, иммунореактивных к SF-1 (зеленый цвет). Головки стрелок указывают на отдельные нейроны, расположенные за пределами ВМЯ. VMHdm – дорсомедиальная, VMHc – центральная, VMHvl – вентролатеральная область ВМЯ в соответствии с атласом мозга крысы [17]. Масштаб – 300 мкм.

Fig. 1. Fluorescence observational microphoto of neurons located in the ventromedial hypothalamic (VMH) nucleus (red color, NeuroTrace Red Fluorescent Nissl Stains stain) immunoreactive to SF-1 (green color) of female old rat. The arrowheads point to individual neurons located outside of the VMH. VMHdm is the dorsomedial, VMHc is the central, VMHvl is the ventrolateral region of the VMH in accordance with the atlas of the rat brain [17]. The scale is 300 μ m.

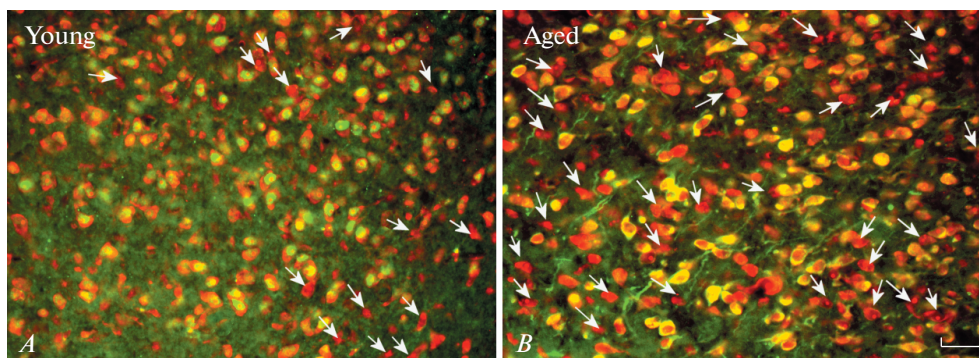


Рис. 2. Микрофотографии нейронов, содержащих SF-1 в дмВМЯ (A, Young) молодых, (B, Aged) старых крыс самок. Двойное мечение. SF-1-негативные нейроны указаны стрелками. Флуоресценция FITC (зеленый, SF-1), NeuroTrace Red Fluorescent Nissl Stains (красный). Масштаб – 50 мкм.

Fig. 2. Microphotographs of neurons containing SF-1 in the VMHdm of (A) young, (B) aged female rats. Double labeling. SF-1-negative neurons are indicated by arrows. Fluorescence FITC (green, SF-1), NeuroTrace Red Fluorescent Nissl Stains (red). The scale is 50 μ m.

лялся в вЛВМЯ [18]. Впервые нами были продемонстрированы и SF-1-ИР нейроны, расположенные за пределами ВМЯ, в частности, одиночные нейроны в области дугообразного ядра. Тем не менее, близость этих нейронов к ВМЯ все же говорит в пользу их общего происхождения и выполняемых функций совместно с основной популяцией дмВМЯ.

Нами не было выявлено половых различий по числу и характеру распределения SF-1-ИР нейронов в ВМЯ. вЛВМЯ и дмВМЯ структурно и функционально различ-

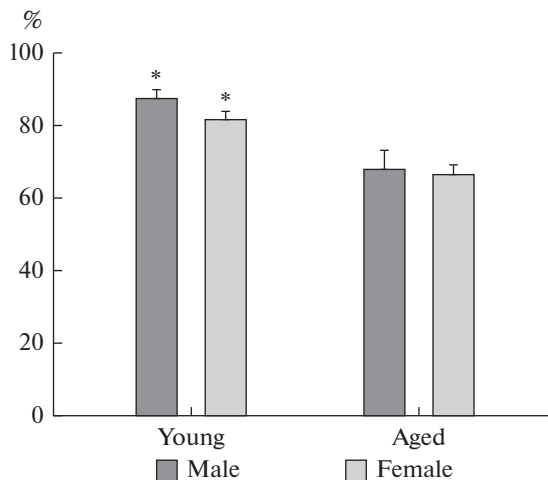


Рис. 3. Процент SF-1-ИР нейронов в дмВМЯ молодых (Young) и старых (Aged) крыс самцов (male) и самок (female). * $p < 0.05$; различия достоверны по сравнению со старыми животными.

Fig. 3. Percentage of SF-1-IR neurons in the VMHdm of young and aged male and female rats. * $p < 0.05$; differences are significant compared to old animals.

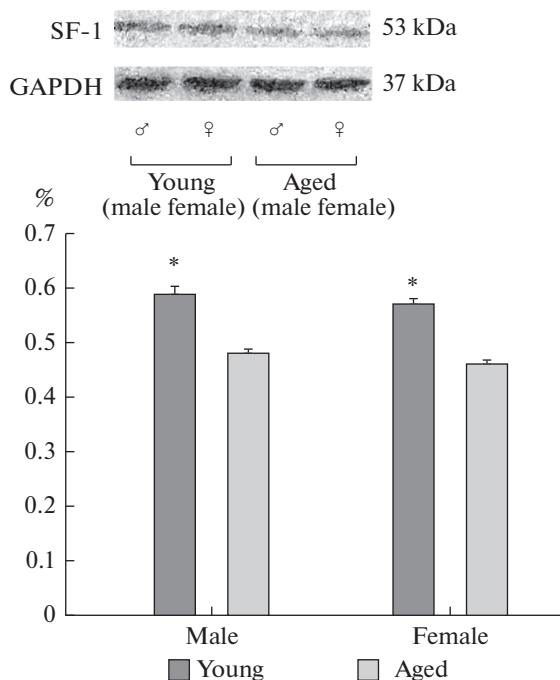


Рис. 4. Экспрессия SF-1 и GAPDH в дмВМЯ молодых (Young), старых (Aged) крыс самцов (male) и самок (female). Данные представлены как отношение к уровню экспрессии GAPDH. Над гистограммой представлены соответствующие иммуноблоты. * $p < 0.05$; различия достоверны по сравнению со старыми животными.

Fig. 4. Expression of SF-1 and GAPDH in the VMHdm of young and aged male and female rats. Data are presented as ratio to GAPDH expression level. The corresponding immunoblots are above the histogram. * $p < 0.05$; differences are significant compared to old animals.

ны. Данные литературы свидетельствуют, что половая специфичность у грызунов характерна для влВМЯ. Нейроны влВМЯ и дмВМЯ экспрессируют сравнительно высокие уровни стероидных рецепторов у самок [19], тогда как рецепторы к лептину и кортикотропин-релизинг-гормону 2 типа (CRFR2) выявляются преимущественно в дмВМЯ [20, 21]. Таким образом, SF-1-содержащие нейроны дмВМЯ играют важную роль в регуляции обмена веществ.

Установленное нами возрастное снижение экспрессии SF-1 в ВМЯ согласуется с ранее полученными нами результатами об изменении нейрохимических особенностей нейронов ВМЯ крысы при старении, в частности процентного содержания нейронов, содержащих синтазу оксида азота, а также кальций-связывающие белки кальбиндин и кальретинин [22]. В геронтологии согласно элевационной теории старения ключевое значение придается возрастному повышению порога чувствительности гипоталамуса к гомеостатическим сигналам [23]. Старение у млекопитающих, в том числе у грызунов и человека, сопровождается увеличением массы тела и количества жировой ткани. ВМЯ гипоталамуса, ответственное за регуляцию обмена веществ и энергии в организме, а также участвующее в контроле периферических циркадных ритмов, предположительно играет важную роль и в процессах старения [24].

Таким образом, полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что старение связано с изменением нейрохимического состава вентромедиального ядра гипоталамуса, участвующего в регуляции энергетического обмена и полового поведения. Молекулярные механизмы, приводящие к снижению экспрессии SF-1 в гипоталамусе, требуют дальнейшего исследования.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-15-00039).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhang Y., Kim M.S., Jia B., Yan J., Zuniga-Hertz J.P., Han C., Cai D. Hypothalamic stem cells control ageing speed partly through exosomal miRNAs. *Nature*. 548 (7665): 52–57. 2017.
2. Kim K., Choe H.K. Role of hypothalamus in aging and its underlying cellular mechanisms. *Mech. Ageing Dev.* 177: 74–79. 2019.
3. Mobbs C.V., Moreno C.L., Poplawski M. Metabolic mystery: aging, obesity, diabetes, and the ventromedial hypothalamus. *Trends Endocrinol. Metab.* 24(10): 488–494. 2013.
4. Watts A.G., Donovan C.M. Sweet talk in the brain: glucosensing, neural networks, and hypoglycemic counterregulation. *Front. Neuroendocrinol.* 31: 32–43. 2010.
5. Briski K.P., Mandal S.K., Bheemanapally K., Ibrahim M.M.H. Effects of acute versus recurrent insulin-induced hypoglycemia on ventromedial hypothalamic nucleus metabolic-sensory neuron AMPK activity: Impact of α_1 -adrenergic receptor signaling. *Brain Res. Bull.* 157: 41–50. 2020.
6. Kammel L.G., Correa S.M. Selective sexual differentiation of neurone populations may contribute to sex-specific outputs of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* 32(1): e12801. 2020.
7. King B.M. The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol. Behav.* 87: 221–244. 2006.
8. Orozco-Solis R., Aguilar-Arnal L., Murakami M., Peruquetti R., Ramadori G., Coppari R., Sassone-Corsi P. The Circadian Clock in the Ventromedial Hypothalamus Controls Cyclic Energy Expenditure. *Cell Metab.* 23(3): 467–478. 2016.
9. Simerly R.B., Chang C., Muramatsu M., Swanson L.W. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 294: 76–95. 1990.
10. Krause W.C., Ingraham H.A. Origins and Functions of the Ventrolateral VMH: A Complex Neuronal Cluster Orchestrating Sex Differences in Metabolism and Behavior. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1043: 199–213. 2017.

11. *Dhillon H., Zigman J.M., Ye C., Lee C.E., McGovern R.A., Tang V., Kenny C.D., Christiansen L.M., White R.D., Edelman E.A., Coppari R., Balthasar N., Cowley M.A., Chua S. Jr, Elmquist J.K., Lowell B.B.* Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron*. 49(2): 191–203. 2006.
12. *Routh V.H., Hao L., Santiago A.M., Sheng Z., Zhou C.* Hypothalamic glucose sensing: making ends meet. *Hypothalamic glucose sensing: making ends meet. Front. Syst. Neurosci.* 8: 236. 2014.
13. *Parker K.L., Schimmer B.P.* Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr. Rev.* 18: 361–377. 1997.
14. *Ikeda Y., Luo X., Abbud R., Nilson J.H., Parker K.L.* The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol. Endocrinol.* 9: 478–486. 1995.
15. *Majdic G., Young M., Gomez-Sanchez E., Anderson P., Szczepaniak L.S., Dobbins R.L., McGarry J.D., Parker K.L.* Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology* 143: 607–614. 2002.
16. *Liu W., Liu M., Fan W., Nawata H., Yanase T.* The Gly146Ala variation in human SF-1 gene: its association with insulin resistance and type 2 diabetes in Chinese. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 73: 322–328. 2006.
17. *Paxinos G., Watson C.* The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 5th Edition. Elsevier. Acad. Press. 2005.
18. *Cheung C.C., Kurrasch D.M., Liang J.K., Ingraham H.A.* Genetic labeling of steroidogenic factor-1 (SF-1) neurons in mice reveals ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH) circuitry beginning at neurogenesis and development of a separate non-SF-1 neuronal cluster in the ventrolateral VMH. *J. Comp. Neurol.* 521(6): 1268–1288. 2013.
19. *Wagner C.K., Morrell J.I.* Levels of estrogen receptor immunoreactivity are altered in behaviorally-relevant brain regions in female rats during pregnancy. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 42(2): 328–36. 1996.
20. *Chao H., Digruccio M., Chen P., Li C.* Type 2 corticotropin-releasing factor receptor in the ventromedial nucleus of hypothalamus is critical in regulating feeding and lipid metabolism in white adipose tissue. *Endocrinology.* 153: 166–176. 2012.
21. *Schwartz M.W., Seeley R.J., Campfield L.A., Burn P., Baskin D.G.* Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J. Clin. Invest.* 98: 1101–1106. 1996.
22. *Порсева В.В., Корзина М.Б., Спиричев А.А., Вишнякова П.А., Арлева Д.А., Ноздрачев А.Д., Маслюков П.М.* Изменения иммуногистохимических характеристик нейронов некоторых ядер гипоталамуса при старении. *Морфология.* 156 (5): 39–43. 2019. [*Porseva V.V., Korzina M.B., Spirichev A.A., Vishnyakova P.A., Aryaeva D.A., Nozdrachev A.D., Masliukov P.M.* Changes of the immunohistochemical characteristics of neurons of the middle group of the hypothalamic nuclei during aging. *Morfologiya.* 156 (5): 39–43. 2019. (In Russ)].
23. *Dilman V.M., Revskoy S.Y., Golubev A.G.* Neuroendocrine-ontogenetic mechanism of aging: toward an integrated theory of aging. *Int. Rev. Neurobiol.* 28: 89–156. 1986.
24. *Escrivá F., Gavete M.L., Fermín Y., Pérez C., Gallardo N., Alvarez C., Andrés A., Ros M., Carrascosa J.M.* Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity. *J. Endocrinol.* 194(1): 131–141. 2007.

Changes in the Expression of the Steroidogenic Factor 1 (SF-1) in Neurons of the Ventromedial Nucleus of the Rat Hypothalamus with Aging

**K. Yu. Moiseev^a, A. A. Spirichev^a, P. A. Vishnyakova^a,
A. D. Nozdrachev^b, and P. M. Masliukov^{a, *}**

^a*Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia*

^b*St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

*e-mail: mpm@ysmu.ru

The expression of steroidogenic factor 1 in neurons of the ventromedial nucleus of the rat hypothalamus was studied using the immunohistochemical method and Western blotting in young (2–3 months old and 2–2.5 year old) male and female rats. Steroidogenic factor 1 is found in the vast majority of neurons in the dorsomedial part of the nucleus in the hypothalamus of young and old rats. In old rats, the percentage of steroidogenic factor 1-immunoreactive neurons in the dorsomedial part of the ventromedial nucleus significantly decreased from 88 to 68% in males and from 82 to 66% in females. In each of the age groups, there were no significant sex differences in the

number of immunopositive neurons. Steroidogenic factor 1 expression was significantly reduced in old male and female rats also according to Western blotting. Thus, the aging is associated with a change in the neurochemical composition of the ventromedial nucleus of the hypothalamus, which is involved in the regulation of energy metabolism and sexual behavior.

Keywords: hypothalamus, ventromedial nucleus, steroidogenic factor 1, aging

ЦИТИРОВАТЬ:

Моисеев К.Ю., Спиричев А.А., Вишнякова П.А., Ноздрачев А.Д., Маслюков П.М. Изменения экспрессии стероидогенного фактора 1 (SF-1) в нейронах вентромедиального ядра гипоталамуса крысы при старении. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(6): 720–727.

DOI: 10.31857/S0869813920060060

TO CITE THIS ARTICLE:

Moiseev K.Yu., Spirichev A.A., Vishnyakova P.A., Nozdrachev A.D., Masliukov P.M. Changes in the Expression of the Steroidogenic Factor 1 (SF-1) in Neurons of the Ventromedial Nucleus of the Rat Hypothalamus with Aging. Russian Journal of Physiology. 106(6): 720–727.

DOI: 10.31857/S0869813920060060

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МОНОАМИНОВ НА ОРЕКСИНЕРГИЧЕСКИЕ НЕЙРОНЫ ГИПОТАЛАМУСА ЭМБРИОНОВ КРЫСЫ

© 2020 г. И. Ю. Морина¹, Е. В. Михайлова¹, И. В. Романова¹, *

¹*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия*

*E-mail: irinaromanova@mail.ru

Поступила в редакцию 15.02.2020 г.

После доработки 06.03.2020 г.

Принята к публикации 03.04.2020 г.

Орексинергические нейроны гипоталамуса вовлечены в контроль различных функций организма, прежде всего энергетического баланса, пищевого поведения, бодрствования и пробуждения. Прямое влияние дофамина и серотонина мозга на орексинергические нейроны гипоталамуса осуществляется через различные подтипы соответствующих рецепторов, экспрессия которых ранее показана в телах орексинергических нейронов. Для выяснения возможности становления этих взаимосвязей в эмбриональном периоде развития было проведено исследование 18-дневных эмбрионов крысы. С помощью Вестерн-блоттинга в развивающемся гипоталамусе показана экспрессия белков рецепторов дофамина D1 и серотонина 2C. Двойное флуоресцентное иммуномечение и конфокальная микроскопия подтверждают экспрессию рецепторов дофамина D1 и серотонина 2C в телах развивающихся орексин-иммунопозитивных клеток у эмбрионов крысы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что развитие морфофункциональных взаимодействий моноаминергических систем с орексинергической происходит в эмбриональный период развития организма.

Ключевые слова: орексины, гипоталамус, дофамин, серотонин, рецепторы дофамина D1, рецепторы серотонина 2C, рецепторы орексина, эмбриогенез, E18

DOI: 10.31857/S0869813920060072

Нейроны перифорникальной/латеральной области гипоталамуса, вырабатывающие орексин-А (гипокретин-1) и орексин-В (гипокретин-2), вовлечены в регуляцию пищевого поведения, энергетического баланса, бодрствования и пробуждения [1–4] и других функций. Действие орексинов осуществляется через два типа G-протеин-связанных рецепторов: OX1R и OX2R, которые экспрессируются в различных отделах мозга [5, 6].

В регуляции пищевого поведения и циркадных ритмов также участвуют серотонин и дофамин мозга. Известно, что структуры гипоталамуса получают обильную дофамин- и серотонинергическую иннервацию [7]. Источником дофамина в гипоталамусе являются как нейроны самого гипоталамуса (перивентрикулярного и аркуатного ядер), так и проекции из других отделов мозга [7–9]. В области латерального гипоталамуса рядом с форниксом проходит мощный пучок отростков nigro-стриатного тракта, которые являются аксонами дофаминергических нейронов среднего мозга. Основным источником серотонинергической иннервации гипоталамуса является дорзальное и медиальное ядра шва [7]. Тирозингидрок-

силаза и триптофангидроксилаза-2 — скорость лимитирующие ферменты биосинтеза дофамина и серотонина, являются общепризнанными маркерами дофаминергических и серотонинергических нейронов.

Проекции орексинергических нейронов OX1R и OX2R выявлены в областях мозга, где локализованы тела дофаминергических и серотонинергических нейронов [2, 5, 10–13]. В свою очередь рецепторы дофамина D1- и D2-подтипов [14], а также рецепторы серотонина 1A и 3A подтипов [15, 16], 2C- и 1B-подтипов [17, 18] экспрессируются в самих орексинергических нейронах. Эти данные подтверждают существование тесных морфофункциональных взаимосвязей между орексинергическими нейронами гипоталамуса с дофамин- и серотонинергическими системами и возможность прямого влияния дофамина и серотонина на функциональную активность орексинергических нейронов.

У крысы в гипоталамусе орексин-иммунопозитивные структуры выявляются на 10–12 день эмбриогенеза (E10–E12), а к E19 их проекции обнаружены уже за пределами гипоталамуса [19–22]. В период E12–E13 в мозге наблюдается развитие дофамин- и серотонинергических нейронов, проекции которых в гипоталамусе выявляются в период E16–E18 [7, 23]. Однако возможность формирования морфофункциональных взаимосвязей моноаминергических систем с орексинергическими нейронами уже в ходе эмбрионального развития организма не показано.

Цель настоящего исследования состояла в том, чтобы с помощью иммуногистохимических и биохимических методов показать возможность становления взаимосвязи орексин-иммунопозитивных нейронов гипоталамуса с дофамин- и серотонинергическими системами уже в эмбриональном периоде развития крысы. Исследования проведены на 18-дневных эмбрионах крысы (E18). Этот период развития, как показано выше, соответствует появлению в гипоталамусе проекций дофамин- и серотонинергических нейронов среднего мозга на фоне развития орексин-иммунопозитивных нейронов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Все процедуры проводили в соответствии с правилами, разработанными Комитетом по биоэтике ИЭФБ РАН (15.02.2018 г.), правилами и требованиями, изложенными в документах “European Communities Council Directive 1986” (86/609/ЕЕС) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. На проведение экспериментов получено разрешение Комитета по биоэтике ИЭФБ РАН (Протокол 10/2 2018 от 15 октября 2018 г.).

В экспериментах были использованы 18-дневные эмбрионы (E18) крысы. Для эксперимента самок крысы Вистар ($n = 5$) отбирали по внешним признакам (чистые шерстяной покров и видимые слизистые), отсаживали в отдельные клетки и при помощи мазков из влагалища следили за эстральным циклом [24, 25]. В фазу проэструса подсаживали самцов, первым днем беременности считали день обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке. Самок содержали в стандартных условиях вивария при 12-часовом световом режиме (12 ч свет/12 ч ночь, световой день начинался в 9.00, температура $23 \pm 2^\circ\text{C}$), без ограничения доступа к воде и пище. На 18-й день беременности самок декапитировали.

Для Вестерн-блоттинга из замороженной головы эмбрионов ($n = 6$) извлекали ткань развивающегося гипоталамуса, гомогенизировали в пятикратном растворе лизирующего буфера (0.02 М TRIS (hydroxymethylaminomethane), 0.15 М NaCl, 0.001 М EDTA, 1% Triton X-100, рН 7.5), в который добавляли коктейль ингибиторов протеаз (Sigma, США) и ингибиторов фосфатаз (PhosStop; RocheDiagnostic, Канада) согласно инструкции производителя. Протокол приготовления проб,

гель-электрофореза и иммуноблоттинга был ранее подробно описан [26]. Для реакции были использованы первичные поликлональные антитела кролика: к D1 рецептору дофамина (Abcam, Великобритания; 1 : 1000), к 2C-подтипу рецептора серотонина (Elabscience Biotechnology Ltd., США; 1 : 500), к триптофангидроксилазе-2 (ТПГ2; Millipore, США; 1 : 2000). Анализ контрольного белка не проводили, так как нас интересовал не количественный результат, а сам факт экспрессии исследуемых белков в гипоталамусе. Также были использованы вторичные антитела козы против IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США), 1 : 5000–10000. Визуализацию сигнала проводили с помощью хемилюминисцентной системы Novex ECL (Invitrogen, Life Technologies, США), рентгеновской пленки (GE Healthcare, Amersham Biosciences AB, Великобритания), которую проявляли стандартным фотонабором (Реактив-фото, Россия).

Для оценки в гипоталамусе экспрессии генов, кодирующих орексиновые рецепторы OX1R и OX2R, использовали ПЦР в реальном времени ($n = 6$). Протокол реакции и реактивы ранее были подробно описаны [27]. Для реакции использовали праймеры, синтезированные фирмой Evrogen (Москва, Россия):

TGCGGCCAACCCCTATCATCTA (For.) и ACCGGCTCTGCAAGGACAA (Rev.) – для *Ox1r* (NM_013064.1), ACTGTCTACGCCTGGTTCAC (For.) и CTCTGTACTTGTGCGTCCCC (Rev.) – для *Ox2r* (NM_013074.1). В качестве референсного гена использовали *Gapdh* (NM_017008.4), кодирующего glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase: GTGTTCCSTACCCCAATGTATCC (For.) и GATGTCATCATACTTGGCAGGTTT (Rev.). Амплификационный сигнал был детектирован прибором 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies ABI). Анализ относительного уровня мРНК проводили с помощью метода $\Delta\text{-}\Delta\text{ Ct}$.

Для морфологических исследований мозг эмбрионов с черепом ($n = 8$) после промывки в холодном натрий-фосфатном буфере (PBS, pH 7.4) фиксировали в течение 5–6 ч (4°C) погружением в холодный раствор 4%-ного *para*-формальдегида, который растворяли в 0.02 М PBS. Далее промывали в холодном PBS и после криопротекции в 30%-ном растворе сахарозы, разведенной в 0.02 М PBS, замораживали с помощью среды Tissue-Tek (Sakura, Япония) в сухом льду. С помощью криостата (Leica Biosystems, Германия) из области головы с мозгом изготавливали чередующуюся серию фронтальных срезов (10 или 25 мкм), каждый 6-й срез монтировали на стекле Superfrost/plus, высушивали при комнатной температуре и хранили при –20°C. Для идентификации отделов мозга эмбрионов использованы схемы, описанные ранее [28].

Протокол одиночного иммуномечения с помощью биотин-стрептавидинового метода ранее подробно описан [29]. Для реакций были использованы первичные антитела мыши к орексину-A (R&Dsystems, США; 1 : 1000) или кролика к орексину-B (Sigma, США; 1 : 1000), или кролика к триптофангидроксилазе-2 (Millipore, США; 1 : 500); соответствующие вторичные антитела козы, конъюгированные с биотином (Vector Labs., Великобритания): против IgG кролика (1 : 400) или против IgG мыши (1 : 500), комплекса стрептавидина с пероксидазой хрена (Sigma, США). Визуализацию реакции проводили с помощью 0.05%-ного раствора 3,3'-диаминобензидина. Реакцию останавливали дистиллированной водой. После тщательной промывки и стандартной гистологической обработки срезы заключали под покровное стекло и высушивали.

Для двойного флуоресцентного иммуномечения был использован протокол, который ранее нами был подробно описан [30]. Перед блокировкой неспецифического связывания срезы 40 мин инкубировали в растворе 100 мМ глицина на PBS. Для исследования использовали смесь первичных антител мыши к орексину-A (R&Dsystems, США; 1 : 1000) с антителами кролика к тирозингидроксилазе (ТГ; Abcam, Великобритания; 1 : 500), или к D1-рецептору дофамина (Abcam, Велико-

британия; 1 : 200), или к 2С-подтипу рецептора серотонина (Elabscience Biotechnology Ltd., США; 1 : 200), или к ТПГ-2 (Millipore, США; 1 : 500). Также была использована смесь вторичных антител, конъюгированных с различными флуоресцентными метками: антитела цыпленка против IgG кролика с Alexa-488 и антитела осла к IgG мыши с Alexa-568 (Invitrogen, США) в разведении 1 : 1000. После промывки в PBS срезы инкубировали в течение 2 мин с ядерным красителем DAPI (Sigma, США; 1 : 2000), промывали, заключали под покровное стекло с помощью среды Mowiol (Sigma, США) и хранили при 4°C до ее полимеризации. Специфичность иммуногистохимической реакции проверяли с помощью негативного контроля (реакции без первичных или вторичных антител).

Изображения структур на препаратах мозга с одиночным иммуномечением получали с помощью микроскопа Carl Zeiss Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) со встроенной телевизионной камерой и программы Axio-Vision 4.8.

Анализ флуоресцентного изображения проводили с помощью микроскопа DM16000 и лазерной сканирующей конфокальной установки TCS SP5-II (Leica Microsystems, Германия). Последовательное сканирование проводили с помощью иммерсионного объектива $\times 63$, лазеров с длиной волны возбуждения 488 и 568 нм. Флуоресценцию с DAPI анализировали с помощью микроскопа Carl Zeiss Axio Imager A1 с флуоресцентной установкой (HB-100), это было необходимо для того, чтобы оценить локализацию рецепторов в нейронах.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В мозге эмбрионов крысы структуры, иммунопозитивные к орексину-А и орексину-В, выявлены в зонах развивающихся обонятельных луковиц, орбито-фронтальной коры больших полушарий, гипоталамуса, гиппокампа. В гипоталамусе орексин-иммунопозитивные клетки и отростки выявлены в области дна и стенки 3-го желудочка, в латеральной от 3-го желудочка области (рис. 1А), соответствующей зоне латерального гипоталамуса (ЛГ) в развивающемся мозге [28]. Интересно отметить тот факт, что интенсивность реакции в нейронах развивающегося гипоталамуса была меньше, чем в орексин-иммунопозитивных клетках, которые выявляются в развивающемся гиппокампе. На препаратах, исследованных с помощью светового или конфокального микроскопа в области развивающегося ЛГ выявляются орексин-иммунопозитивные клетки диаметром 9–10 мкм с узким ореолом иммунопозитивного вещества, которое распределено по периферии перикариона; отчетливо выявляются отходящие от тела клетки отростки (рис. 1В, 2А, В).

Результаты ПЦР в реальном времени демонстрируют стабильную детекцию продукта мРНК OX2R в развивающемся гипоталамусе, в отличие от OX1R, продукт которых либо определялся на очень низком уровне, либо вообще не детектировался.

Результаты Вестерн-блоттинга подтверждают экспрессию белка D1-рецепторов дофамина в развивающемся гипоталамусе эмбрионов крысы (рис. 3А). Результаты двойного флуоресцентного иммуномечения демонстрируют локализацию ТГ-иммунопозитивных отростков вокруг тел орексин-иммунопозитивных клеток (рис. 2), а также иммуноэкспрессию D1-рецепторов дофамина непосредственно в телах орексин-иммунопозитивных клеток развивающегося гипоталамуса (рис. 4).

С помощью Вестерн-блоттинга мы подтвердили присутствие в гипоталамусе эмбрионов крысы белка ТПГ-2 (рис. 3В). Однако с помощью иммуногистохимических реакций в области, где выявлены тела орексин-иммунопозитивных клеток, нам не удалось отчетливо выявить иммунопозитивные к ТПГ-2 отростки несмотря на то, что реакции повторяли на срезах толщиной 25 мкм.

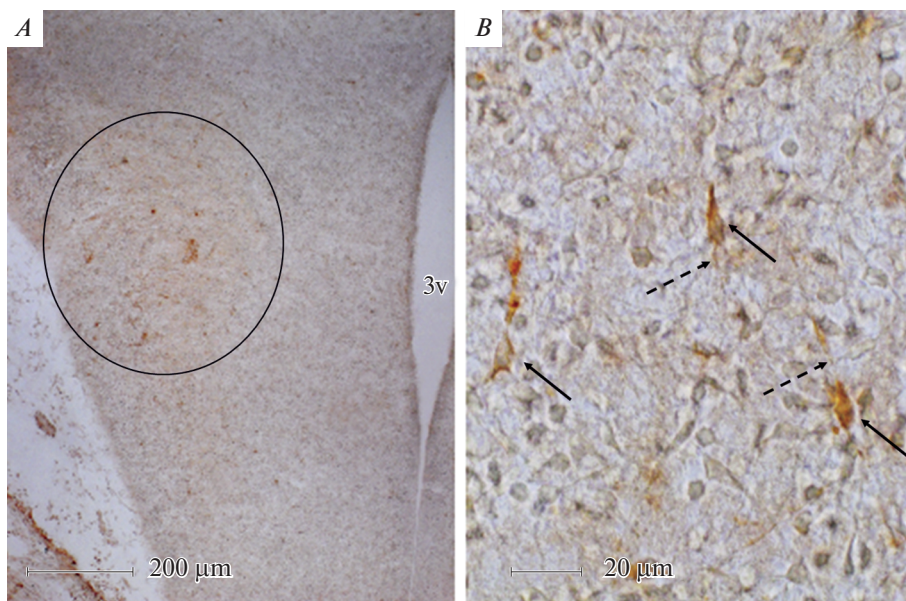


Рис. 1. Микрофотографии, демонстрирующие иммунопозитивные к орексину-А структуры на фронтальном срезе развивающегося (E18) мозга эмбриона крысы: при малом (A) и большом (B) увеличении. Круг (A) – область локализации иммунопозитивных клеток, которые представлены с помощью иммерсионного объектива $\times 100$ (B). Обозначения: 3v – третий желудочек мозга, сплошные стрелки – тела иммунопозитивных клеток, пунктирные стрелки – их отростки; масштаб 200 мкм (A) и 20 мкм (B).

Fig. 1. Microphotographs showing orexin-A immunopositive structures on the frontal section of the developing (E18) brain of the rat embryo: at small (A) and large (B) magnification. Circle (A) is the area of localization of immunopositive cells, which are represented using an immersion objective $\times 100$ (B). Designations: 3v – the third brain ventricle, solid arrows – the bodies of immunopositive cells, discontinuous arrows – their processes; scale of 200 μm (A) and 20 μm (B).

С помощью Вестерн-блоттинга в развивающемся гипоталамусе 18-дневных эмбрионов крысы было показано наличие белка 2С-подтипа рецепторов серотонина, однако положительный результат был получен только при загрузке в гель большого количества белка (рис. 3С). Анализ двойного флуоресцентного иммуномечения демонстрирует иммуноэкспрессию 2С подтипа рецепторов серотонина непосредственно в телах орексин-иммунопозитивных нейронов в развивающемся гипоталамусе (рис. 5).

Таким образом, полученные нами данные демонстрируют присутствие в развивающемся гипоталамусе крысы ферментов биосинтеза дофамина и серотонина, а также и их рецепторов Д1 и 2С, что свидетельствует о возможности влияния дофаминовой и серотониновой систем на орексинергические нейроны уже в эмбриональном периоде развития крысы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В мозге эмбрионов крысы мРНК препро-орексина – предшественника орексина-А и -В выявляется с 12-го дня развития [20]. При этом орексин-иммунопозитивные клетки в мозге также выявляются с 12-го дня эмбриогенеза, а к 19-му дню распределение тел нейронов и их проекций соответствует таковым у взрослых

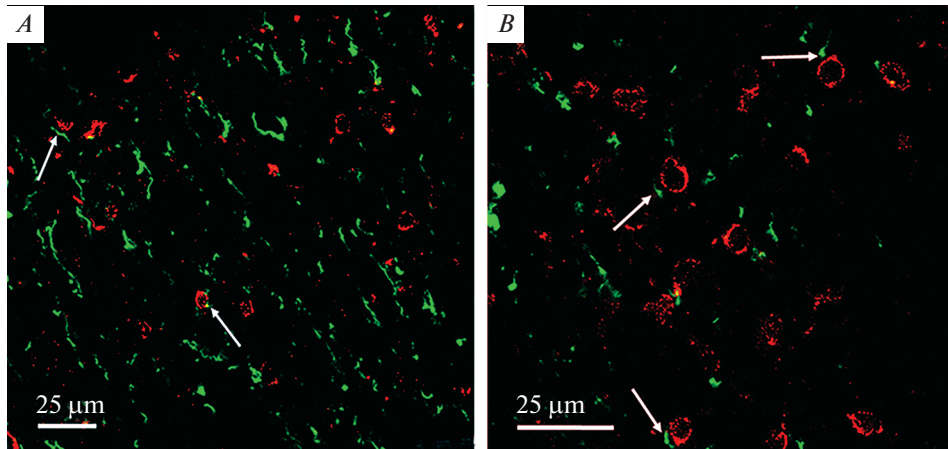


Рис. 2. Двойная иммуногистохимическая реакция к тирозингидроксилазе (зеленый) и орексину-А (красный) в развивающейся зоне латерального гипоталамуса 18-дневного эмбриона крысы, конфокальный микроскоп. Стрелки указывают на тирозингидроксилаза-иммунопозитивные отростки, локализованные вблизи тел орексин-иммунопозитивных клеток при малом (А) и большем (В) увеличении, масштаб 25 мкм.

Fig. 2. Double immunohistochemical reaction to tyrosine hydroxylase (green) and orexin-A (red) in the developing zone of the lateral hypothalamus of the 18-day-old rat embryo, confocal microscope. Arrows indicate tyrosine hydroxylase-immunopositive processes located near the bodies of orexin-immunopositive cells with a small (A) and a larger (B) magnification, scale bars 25 μ m.

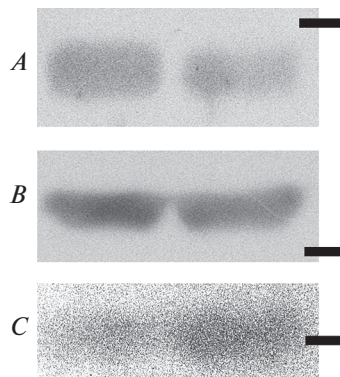


Рис. 3. Результаты Вестерн-блоттинга демонстрируют экспрессию белка D1-рецептора дофамина (А), триптофангидроксилазы-2 (В) и серотонинового рецептора 2С-подтипа (С) в гипоталамусе 18-ти дневных эмбрионов крысы. Полоса справа – уровень локализации белкового маркера 52 кД.

Fig. 3. The results of Western-blotting demonstrate the expression of dopamine receptor protein D1 (A), tryptophan hydroxylase-2 (B) and serotonin subtype 2C receptor (C) in the hypothalamus of 18-day-old rat embryos. The bar on the right – the level of localization of the protein marker 52 kD.

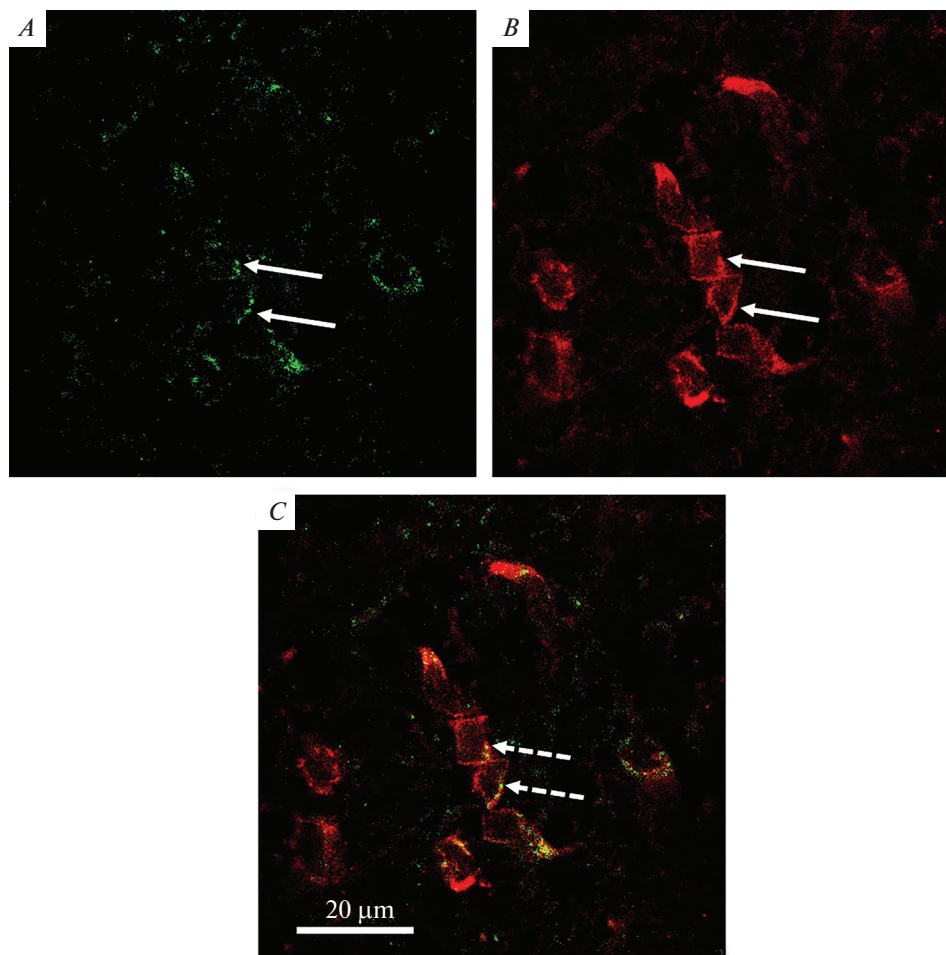


Рис. 4. Флуоресцентное иммуномечение D1-рецепторов дофамина (A, *зеленый*), орексина-A (B, *красный*) и их наложение (C) в развивающейся зоне латерального гипоталамуса 18-дневного эмбриона крысы, конфокальный микроскоп. Сплошные стрелки – D1- и орексин-иммунопозитивные структуры (A, B), прерывистые стрелки – D1-рецепторы, локализованные в телах орексин-иммунопозитивных нейронов, масштаб 20 мкм.

Fig. 4. Fluorescence immunolabeling of dopamine D- receptors (A, *green*), orexin-A (B, *red*) and their merge (C) in the d-eveloping zone of the lateral hypothalamus of the 18-day-old rat embryo, confocal microscope. Solid arrows – D1- and orexin-immunopositive structures (A, B), discontinuous arrows – D1 receptors localized in the bodies of orexin-immunopositive neurons, scale bars 20 μm .

организмов [19–22]. Наши результаты подтверждают полученные ранее данные [20] о присутствии орексин-иммунопозитивных клеток в развивающемся гипоталамусе на стадии E18, которые, судя по их морфологии (небольшой размер, малое количество иммунопозитивного материала, небольшое количество иммунопозитивного материала в отростках), еще не являются зрелыми, интенсивно функционирующими нейронами. Однако экспрессия генов орексиновых рецепторов в эмбриональном периоде свидетельствует о возможности функциональной активности орексинов,

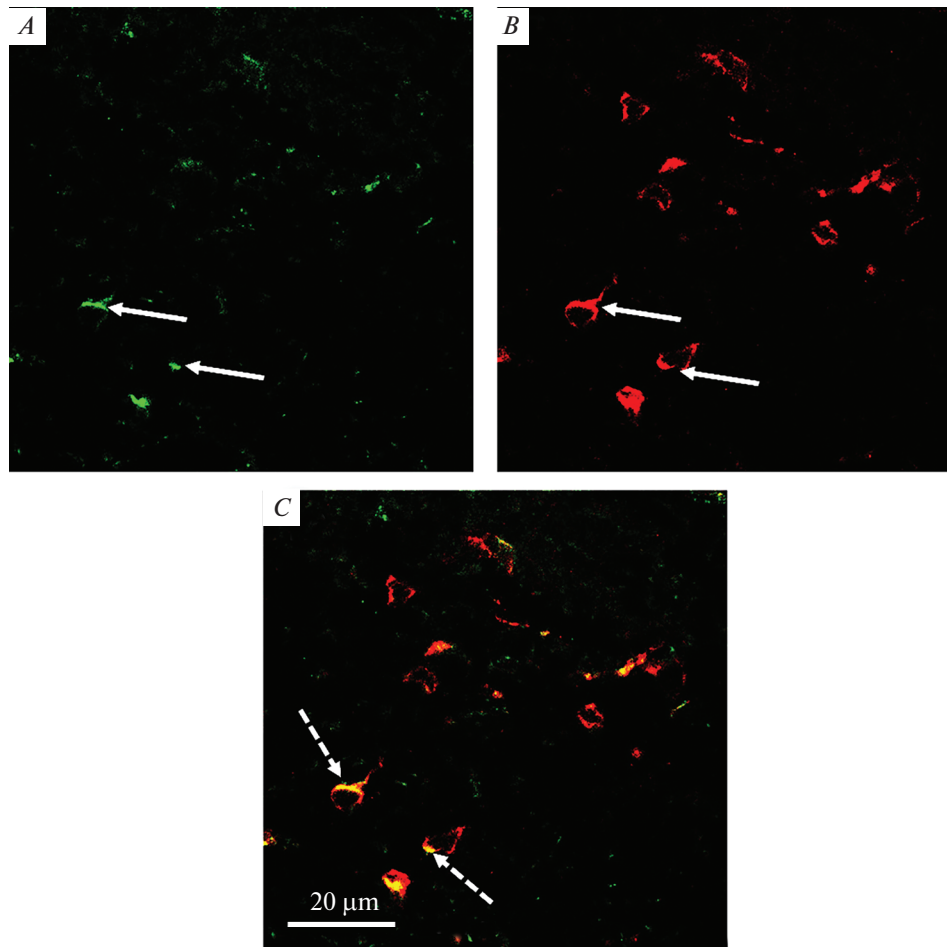


Рис. 5. Флуоресцентное иммуномечение 2С-подтипа рецептора серотонина (*A*, *зеленый*) и орексина-А (*B*, *красный*) и их совмещение (*C*) в области развивающегося латерального гипоталамуса 18-дневного эмбриона крысы, конфокальный микроскоп. Сплошные стрелки – 2С- и орексин-иммунопозитивные структуры (*A*, *B*), прерывистые стрелки – локализация 2С-рецепторов в телах орексин-иммунопозитивных нейронов, масштаб 20 мкм.

Fig. 5. Fluorescence immunolabeling of the 2C-subtype of the serotonin receptor (*A*, *green*) and orexin-A (*B*, *red*) and their merge (*C*) in the region of the developing lateral hypothalamus of the 18-day-old rat embryo, confocal microscope. Solid arrows – 2C and orexin-immunopositive structures (*A*, *B*), intermittent arrows – localization of 2C receptors in the bodies of orexin-immunopositive neurons, scale bars 20 μm .

по-видимому, через OX2R, который не является специфичным для орексина-А или -В: максимальное количество мРНК OX2R в эмбриогенезе выявлено в развивающихся гипоталамусе и коре больших полушарий на 18-й день эмбриогенеза, а стабильный уровень мРНК OX1R выявляется в гипоталамусе и мозжечке после рождения (P0–1) [19], что также подтверждается и полученными нами результатами.

В ходе эмбрионального развития крысы дифференцировка дофаминергических нейронов в гипоталамусе происходит в период E12–E16 [7], а в среднем мозге –

начиная с E13 [31]. Полученные нами данные демонстрируют наличие большого числа ТГ-иммунопозитивных отростков в гипоталамусе эмбрионов E18, а также их локализацию вокруг развивающихся орексин-иммунопозитивных нейронов. Экспрессия же белка активирующих D1-рецепторов дофамина в гипоталамусе и непосредственно в орексин-иммунопозитивных клетках свидетельствует о возможности прямого влияния дофамина на орексинергические клетки гипоталамуса уже в эмбриональном периоде развития организма.

Экспрессия генов дофаминовых рецепторов (D1 и D2) в развивающемся мозге крысы ранее показана с помощью ПЦР в реальном времени и гибридизации *in situ* уже у 14-дневных в медиальной префронтальной коре и в стриатуме [32]. В более раннем исследовании с помощью гибридизации *in situ*, проведенной с помощью автордиографии, мРНК D1- и D2-рецепторов выявлена в гипоталамусе 18-дневных эмбрионов, ее уровень возрастал к 21-му дню и в раннем постнатальном периоде [33]. Полученные ранее данные демонстрируют в гипоталамусе 20-дневных эмбрионов крысы достаточно высокий уровень белка D1-рецепторов дофамина [26].

Серотонинергическая иннервация гипоталамуса обеспечивается отростками нейронов ядер шва, которые у мыши и крысы начинают дифференцироваться с E12 [7] и к E16–18 отдельные отростки выявляются в гипоталамусе [23]. Полученные нами данные подтверждают присутствие белка ТПП-2 в гипоталамусе эмбрионов E18, однако выявить отростки с этим ферментом в области локализации орексин-иммунопозитивных клеток нам не удалось, по-видимому, в связи с тем, что отростки очень тонкие и их количество в гипоталамусе еще очень мало. Наши данные подтверждают присутствие в ткани гипоталамуса очень малого количества белка активирующих рецепторов серотонина 2C подтипа и иммуноэкспрессию этого белка непосредственно в орексин-иммунопозитивных клетках, что свидетельствует о возможности прямого влияния серотонина на орексин-иммунопозитивные клетки уже в эмбриональном периоде развития.

В мозге эмбрионов крысы с помощью ОТ-ПЦР экспрессия генов различных подтипов рецепторов серотонина выявляется довольно рано, в частности, 2A – в период E11, 2B – с E9 [34]. Экспрессия гена рецептора серотонина 2C-подтипа, функциональное значение которых связывают прежде всего с регуляцией энергетического баланса [35], выявляется в период E9–E13, но к E17 уровень ее мРНК значительно снижался [34].

Важно отметить, что в эмбриональном мозге дофамин и серотонин функционируют как гормоны и могут осуществлять свое действие не только после развития иннервации, а непосредственно через ликвор желудочков мозга, а также через кровь, поступающую от периферических тканей в условиях отсутствия гемато-энцефалического барьера [36], воздействуя на соответствующие рецепторы, что свидетельствует о полифункциональных свойствах этих моноаминов в развивающемся мозге.

Полученные нами данные впервые демонстрируют, что становление морфофункциональных взаимодействий дофамин- и серотонинергических систем мозга с орексинергическими нейронами гипоталамуса происходит уже в ходе пренатального развития в период, когда гипоталамус является особенно чувствительным к различного рода воздействиям [37]. Экспрессия в гипоталамусе эмбрионов и непосредственно в орексинергических нейронах D1- и 2C-подтипов рецепторов свидетельствует о возможности активирующего влияния дофамина и серотонина на них, что может оказывать существенное влияние на развитие орексинергических нейронов гипоталамуса при различного рода воздействиях, в частности, при пренатальном стрессе [29].

Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено на средства государственного бюджета по теме госзадания № АААА-А18-118012290427-7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sakurai T., Amemiya A., Ishii M., Matsuzaki I., Chemelli R.M., Tanaka H., Williams S.C., Richardson J.A., Kozlowski G.P., Wilson S., Arch J.R., Buckingham R.E., Haynes A.C., Carr S.A., Annan R.S., McNulty D.E., Liu W.S., Terrett J.A., Elshourbagy N.A., Bergsma D.J., Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. 92(4): 573–585. 1998.
2. de Lecea L., Kilduff T. S., Peyron C., Gao X.-B., Foye P.E., Danielson P.E., Fukuhara C., Battenberg E.L.F., Gautvik V., Bartlett F.S., Frankel W.N., Van Den Pol A.N., Bloom F.E., Gautvik K.M., Sutcliffe J.G. The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95(1): 322–327. 1998.
3. Lin L., Faraco J., Li R., Kadotani H., Rogers W., Lin X., Qiu X., de Jong P. J., Nishino S., Mignot E.S. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell*. 98(3): 365–376. 1999.
4. Chemelli R.M., Willie J.T., Sinton C.M., Elmquist J.K., Scammell T., Lee C., Richardson J.A., Williams S.C., Xiong Y., Kisanuki Y., Fitch T.E., Nakazato M., Hammer R.E., Saper C.B., Yanagisawa M. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*. 98(4): 437–451. 1999.
5. Ohno K., Sakurai T. Orexin neuronal circuitry: Role in the regulation of sleep and wakefulness. *Front. Neuroendocrinol.* 29(1): 70–87. 2008.
6. Kukkonen J.P., Leonard C.S. Orexin/hypocretin receptor signalling cascades. *British J. Pharmacol.* 171: 314–331. 2014.
7. Угрюмов М.В. Механизмы нейроэндокринной регуляции. М. Наука. 82–122. 1999. [Ugrumov M.V. Mechanisms of neuroendocrine regulation M. Nauka. 82–122. 1999. (In Russ)].
8. Björklund A., Lindvall O. Dopamine-containing systems in the CNS. *Handbook of chemical neuroanatomy: Classical neurotransmitters in the CNS*. Amsterdam. Elsevier. Pt. 1. 2: 55–122. 1984.
9. Moore K.E., Lookingland K.J. Dopaminergic neuronal systems in the hypothalamus. In: *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. 2000. www.acnp.org.
10. Steinbusch H.W.M., Nieuwenhuys R. Localization of serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and pituitary of the rat with special reference to the innervations of the hypothalamus. Serotonin: Current aspects of neurochemistry and function. 7–35. 1981.
11. Peyron C., Faraco J., Rogers W., Ripley B., Overeem S., Charnay Y., Nevsimalova S., Aldrich M., Reynolds D., Albin R., Li R., Hungs M., Pedrazzoli M., Padigaru M., Kucherlapati M., Fan J., Maki R., Lammers G.J., Bouras C., Kucherlapati R., Nishino S., Mignot E. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nature Med.* 6(9): 991–997. 2000.
12. Marcus J.N., Aschkenasi C.J., Lee C.E., Chemelli R.M., Saper C.B., Yanagisawa M., Elmquist J.K. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 435(1): 6–25. 2001.
13. Sakurai T. Roles of orexin/hypocretin in regulation of sleep/wakefulness and energy homeostasis. *Sleep Med. Rev.* 9: 231–241. 2005.
14. Morina I. Yu., Mikhriina A.L., Romanova I.V. An Immunohistochemical study of the pathways of the influence of dopamine on orexinergic neurons in the perifornical area of the hypothalamus. *Neurosci. Behav. Physiol.* 49 (9): 1100–1111. 2019.
15. Li Y., Gao X.-B., Sakurai T., van den Pol A.N. Hypocretin/orexin excites hypocretin neurons via a local glutamate neuron – a potential mechanism for orchestrating the hypothalamic arousal system neuron. *Neuron*. 36(6): 1169–1181. 2002.
16. Muraki Y., Yamanaka A., Tsujino N., Kilduff T.S., Goto K., Sakurai T. Serotonergic Regulation of the Orexin/Hypocretin Neurons through the 5-HT1A Receptor. *Neuroscience*. 24 (32): 7159–7166. 2004.
17. Jalewa J., Joshi A., McGinnity T.M., Prasad G., Wong-Lin K., Hölscher C. Neural circuit interactions between the dorsal raphe nucleus and the lateral hypothalamus: an experimental and computational study. *PLoS One*. 9(2): e88003. 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088003>
18. Романова И.В., Морина И.Ю., Шпаков А.О. Локализация 5-НТ2С- и 5-НТ1В-серотониновых рецепторов в орексинергических нейронах перифорникальной области гипоталамуса грызунов. *Журн. эвол. биохим. физиол.* 56 (2): 63–69. 2020. [Romanova I.V., Morina I.Yu., Shpakov A.O. Lokalizaciya 5-HT2C- i 5-HT1B-serotoninovykh receptorov v oreksinergicheskikh neuronakh perifornikal'noy oblasti gipotalamusa gryzunov. *Zhurn. evol. biokhim. fiziol.* 56 (2): 63–69. 2020.]

- sinergicheskikh nejonah perifornikal'noj oblasti gipotalamusa gryzunov. Zhurn. Evol. Biohim. Fiziol. 56 (2): 63–69. 2020. (In Russ)].
19. *van den Pol A.N., Patrylo P.R., Ghosh P.K., Gao X.-B.* Lateral hypothalamus: Early developmental expression and response to hypocretin (orexin). *Compar. Neurol.* 433(3): 349–363. 2001.
 20. *Steininger T.L., Kilduff T.S., Behan M., Benca R.M., Landry C.F.* Comparison of hypocretin/orexin and melanin-concentrating hormone neurons and axonal projections in the embryonic and postnatal rat brain. *J. Chem. Neuroana.* 27(3): 165–181. 2004.
 21. *Amiot C., Brischoux F., Colard C., La Roche A., Fellmann D., Risold P.Y.* Hypocretin/orexin-containing neurons are produced in one sharp peak in the developing ventral diencephalon. *J. Neurosci.* 22(2): 531–534. 2005.
 22. *Ogawa Y., Kanda T., Vogt K., Yanagisawa M.* Anatomical and electrophysiological development of the hypothalamic orexin neurons from embryos to neonates. *Comp. Neurol.* 525: 3809–3820. 2017.
 23. *Deneris E., Gaspar P.* Serotonin neuron development: shaping molecular and structural identities. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 7(1): <https://doi.org/10.1002/wdev.301>. 2018
 24. *Mandl A.M.* The phases of the estrous cycle in the adult white rat. *J. Exp. Biol.* 28: 576–584. 1951.
 25. *Marcondes F. K., Bianchi F.J., Tanno A.P.* Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biology.* 62(4A): 609–614. 2002.
 26. *Romanova I.V., Mikhrina A.L., Chernysheva M.P.* Analysis of development of morphofunctional interconnections between CART- and AGRPergic neurons with dopaminergic structures in ontogenesis of mammals. *Evol. Biochem. Physiol.* 50(5): 448–455. 2014.
 27. *Морина И.Ю., Михайлова Е.В., Романова И.В., Деркач К.В., Шпаков А.О.* Орексин-А и его рецепторы в гипоталамусе мышей с диета-индуцированным и меланокортиновым ожирением. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 105 (4): 481–491. 2019. [*Morina I. Yu., Mikhailova E.V., Romanova I.V., Derkach K.V., Shpakov A.O.* Orexin-A and their receptors in the hypothalamus of mice with the diet-induced and melanocortin obesity. *Russ. J. Physiol.* 105 (4): 481–491. 2019. (In Russ)].
 28. *Coggeshall R.E. A.* Study of diencephalic development in the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 122(2): 241–299. 1964.
 29. *Морина И.Ю., Станкова Е.П., Романова И.В.* Влияние пренатального стресса на формирование орексинергической системы гипоталамуса крысы. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 105(5): 591–607. 2019. [*Morina I. Yu., Stankova E.P., Romanova I.V.* The influence of prenatal stress on the development of rat hypothalamic orexinergic system. *Russ. J. Physiol.* 105(5): 591–607. 2019. (In Russ)].
 30. *Romanova I.V., Derkach K.V., Mikhrina A.L., Sukhov I.B., Mikhailova E.V., Shpakov A.O.* The leptin, dopamine and serotonin receptors in hypothalamic POMC-neurons in normal and obese rodents. *Neurochem. Res.* 43(4): 821–837. 2018.
 31. *Brischoux F., Griffond B., Fellmann D., Risold P.Y.* Early and transient ontogenetic expression of the cocaine- and amphetamine- regulated transcript peptide in the rat mesencephalon: correlation with tyrosine hydroxylase expression. *Neurobiology.* 52(3): 221–229. 2002.
 32. *Sullivan S.E., Konradi C.* Expression and function of dopamine receptors in the developing medial frontal cortex and striatum of the rat. *Neuroscience.* 199: 501–514. 2011.
 33. *Schambra G.E., Duncan G.R., Breese M.G., Fornaretto M.G., Caron R.T., Fremeau Jr.* Ontogeny of D1a and D2 dopamine receptor subtypes in rat brain using in situ hybridization and receptor binding. *Neuroscience.* 62(1): 65–85. 1994.
 34. *Wu C., Dias P., Kumar S., Lauder J.M., Singh S.* Differential expression of serotonin 5-HT2 receptors during rat embryogenesis. *Dev. Neurosci.* 21(1): 22–28. 1999.
 35. *Martin-Gronert M.S., Stocker C.J., Wargent E.T., Cripps R.L., Garfield A.S., Jovanovic Z., D'Agostino G., Yeo G.S., Cawthorne M.A., Arch J.R., Heisler L.K., Ozanne S.E.* 5-HT2A and 5-HT2C receptors as hypothalamic targets of developmental programming in male rats. *Disease Models & Mechanisms.* 9(4): 401–412. 2016.
 36. *Ugrumov M.V.* Endocrine functions of brain in adult and developing mammals. *Russ. J. Development. Biol.* 40 (1): 14–22. 2009. <https://doi.org/10.1134/S1062360409010020>
 37. *Отеллин В. А., Хожай Л.И., Ордян Н.Э.* Пренатальные стрессорные воздействия и развивающийся головной мозг. Адаптивные механизмы, непосредственные и отсроченные эффекты. СПб. Изд-во Десятка. 2007. [*Otellin V. A., Hozhaj L.I., Ordyan N.E.* Prenatal stress and the developing brain. Adaptive mechanisms, immediate and delayed effects. SPb. Izdatel'stvo Desyatka. 2007. (In Russ)].

Investigation of Monoamines Influence on Orexinergic Hypothalamic Neurons of Rat Embryos

I. Yu. Morina^a, E. V. Mikhailova^a, and I. V. Romanova^{a,*}

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

**e-mail: irinaromanova@mail.ru*

Hypothalamic orexinergic neurons are involved in control of various body functions, especially energy balance, feeding behavior, wakefulness and awakening. The direct dopamine and brain serotonin effect on hypothalamic orexinergic neurons is carried out through various subtypes of the corresponding receptors, the expression of which was previously shown in the orexinergic neurons bodies. To clarify the possibility of these relationships existence in the embryonic developmental period, a study of the 18-day-old rat embryos (E18) hypothalamus was made. Expression of dopamine D1 and serotonin 2C receptor proteins was shown in hypothalamus with Western blotting. Double fluorescence immunolabeling and confocal microscopy confirm the expression of dopamine D1 and serotonin 2C receptors in developing orexin-immunopositive cell bodies in rat embryos. Obtained results suggest that the development of monoaminergic systems morphofunctional interactions with orexinergic occurs in the embryonic period of body development.

Keywords: orexins, hypothalamus, dopamine, serotonin, dopamine D1 receptors, serotonin 2C receptors, orexin receptors, embryogenesis, E18

ЦИТИРОВАТЬ:

Морина И.Ю., Михайлова Е.В., Романова И.В. Исследование влияния моноаминов на орексинергические нейроны гипоталамуса эмбрионов крысы. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 106(6): 728—739.

DOI: 10.31857/S0869813920060072

TO CITE THIS ARTICLE:

Morina I.Yu., Mikhailova E.V., Romanova I.V. Investigation of Monoamines Influence on Orexinergic Hypothalamic Neurons of Rat Embryos. *Russian Journal of Physiology.* 106(6): 728—739.

DOI: 10.31857/S0869813920060072

**ЗАВИСИМОЕ ОТ ПОЛА ДЕЙСТВИЕ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕССА
НА АКТИВНОСТЬ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-АДРЕНКОРТИКАЛЬНОЙ
СИСТЕМЫ КРЫС: РОЛЬ КОРТИКОСТЕРОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ МОЗГА**

© 2020 г. Н. Э. Ордян¹, *, С. Г. Пивина¹, К. А. Баранова¹, В. В. Ракицкая¹,
В. К. Акулова¹, Г. И. Холова¹

¹*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: neo@infran.ru*

Поступила в редакцию 11.02.2020 г.

После доработки 15.03.2020 г.

Принята к публикации 03.04.2020 г.

Пренатальный стресс рассматривается в качестве фактора риска развития в последующей жизни таких заболеваний, как психические, сердечно-сосудистые и метаболические расстройства. Дисрегуляция активности гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГГАС) служит одним из механизмов возникновения этих расстройств. Регуляция ГГАС осуществляется посредством двух типов рецепторов – минералокортикоидных (МР) и глюкокортикоидных рецепторов (ГР) кортико-лимбических структур мозга. Связь между пренатальным стрессом, полом и активностью ГГАС, а также роль центральных МР и ГР в этом взаимодействии исследованы недостаточно. Нами изучено влияние пренатального стресса на активность ГГАС взрослых самцов и самок крыс и экспрессию ГР и МР в гиппокампе и медиальной префронтальной коре (мПФК). Пренатальный стресс моделировали, подвергая беременных самок крыс линии Вистар одночасовой иммобилизации с 15-го по 19-й день беременности. У взрослых потомков изучена базальная активность ГГАС и стрессорный уровень кортикостерона в ответ на 30-минутную иммобилизацию. Экспрессию ГР и МР оценивали методом вестерн-блот и дополнительно в гиппокампе иммуногистохимическим методом. У пренатально стрессированных самцов выявлено пролонгирование стрессорного ответа, а у самок – повышение базальной и стрессорной реактивности и усиление чувствительности ГГАС к сигналам обратной связи. У самцов изменения активности ГГАС сопровождалось снижением содержания ГР и МР в гиппокампе и мПФК при неизменном соотношении ГР : МР. У пренатально стрессированных самок наблюдалось усиление экспрессии белка ГР и снижение количества белка МР в гиппокампе и увеличение соотношения ГР : МР в обеих областях мозга. В гиппокампе самцов и самок наибольшие изменения содержания ГР и МР выявлено в СА3 поле и зубчатой извилине. Полученные данные указывают на вклад изменения экспрессии белков ГР и МР гиппокампа и мПФК в зависимость от пола модификацию активности ГГАС в результате пренатального стресса.

Ключевые слова: пренатальный стресс, гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальная система, гиппокамп, медиальная префронтальная кора, глюкокортикоидные рецепторы, минералокортикоидные рецепторы, пол

DOI: 10.31857/S0869813920060096

Гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальная система (ГГАС) является ключевой гормональной системой, определяющей способность организма реагировать

на повреждающие (стрессорные) события и адаптироваться к ним. Нарушение активности данной гормональной оси служит одной из причин возникновения различных заболеваний, включая нарушения функционирования сердечно-сосудистой системы, ментальные и когнитивные дисфункции [1].

В регуляции как базальной, так и стрессорной активности ГГАС участвуют различные области головного мозга и, главным образом, гиппокамп, медиальная префронтальная кора (мПФК) и миндаля [2, 3]. Первые две мозговые структуры оказывают тормозное воздействие на активность ГГАС, а миндаля – возбуждающее. Гиппокампу и мПФК уделяется наибольшее внимание исследователей в связи с тем, что нарушение торможения ГГАС после стрессорной активации и, соответственно, чрезмерное влияние длительно повышенного уровня глюкокортикоидных гормонов на мозг и организм в целом способствует развитию “болезней адаптации” [4]. Влияние гиппокампа и мПФК на активность ГГАС реализуется через два типа кортикостероидных рецепторов – глюко- (ГР) и минералокортикоидные рецепторы (МР). Поскольку МР имеют более высокое сродство к глюкокортикоидному гормону, их эффекты в основном реализуются при базальных концентрациях гормона в крови, тогда как ГР вовлекаются в регуляцию активности ГГАС в условиях повышения уровня глюкокортикоидов в крови, например, при стрессе и циркадном максимуме активности ГГАС [4]. Тем не менее, исследования последних лет указывают на то, что такое представление о роли ГР и МР в регуляции активности ГГАС является сильно упрощенным. Решающее значение здесь имеет соотношение числа ГР и МР, что было наглядно продемонстрировано для гиппокампа [5, 6]. В отношении мПФК и роли соотношения ГР и МР в регуляции активности ГГАС этой области коры известно меньше.

Не меньший интерес вызывает и проблема гендерных различий реагирования ГГАС на стрессорные воздействия. Многочисленными исследованиями было показано, что женщины/самки более стресс-реактивны, чем мужчины/самцы, и эти различия определяются более высоким уровнем эстрогенов у особей женского пола [7, 8]. Однако о межполовых различиях экспрессии ГР и МР в мозге известно недостаточно.

Активность ГГАС подвергается фенотипической модификации воздействием различных стрессоров в пре- и постнатальном онтогенезе. В результате воздействия на беременную женщину повышенного уровня глюкокортикоидов вследствие стрессирования, депрессии, тревоги или введения экзогенных гормонов наблюдается изменение базальной и стрессорной активности ГГАС у новорожденных и детей ювенильного возраста [9, 10]. Наиболее многочисленны экспериментальные данные о влиянии пренатального стресса на активность ГГАС во взрослой жизни у лабораторных животных [см. обзоры 11, 12]. Определенное внимание уделяется и межполовым различиям в действии пренатального стресса у лабораторных грызунов. Показано преимущественное влияние пренатального стресса на активность ГГАС самцов, которое заключалось в более длительном повышении уровня кортикостерона при стрессе [13, 14].

Влияние пренатального стресса на активность ГГАС взрослых животных преимущественно связывают с изменением экспрессии кортикостероидных рецепторов в гиппокампе [13, 15, 16]. Несмотря на важную роль мПФК в регуляции активности ГГАС, о влиянии пренатального стресса на экспрессию ГР и МР в этой области коры известно меньше, а анализ межполовых различий действия пренатального стресса на кортикостероидные рецепторы мПФК взрослых животных не проводился.

В связи с этим в данном исследовании изучены последствия стрессирования беременных крыс в последнюю треть беременности на особенности активности ГГАС и экспрессию кортикостероидных рецепторов в гиппокампе и мПФК половозрелых самцов и самок. Активность ГГАС нами изучена в динамике гормональ-

ного стрессорного ответа, что позволяет судить о максимальной выраженности стрессорной активации системы и эффективности ее торможения по механизму отрицательной обратной связи. Анализ экспрессии ГР и МР в гиппокампе и мПФК проведен методом вестерн-блот, а в гиппокампе дополнительно иммуноцитохимическим методом, что позволило оценить количество белка соответствующих рецепторов и их распределение внутри мозговой структуры.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на половозрелых самках крыс линии Вистар массой 200–220 г из ЦКП “Биоколлекция” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, а также на их потомках: самцах массой 230–240 г и самках массой 200–220 г в возрасте 2.5 мес. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и корму (гранулированный комбикорм). Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями Комиссии по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Моделирование пренатального стресса осуществляли следующим образом. Беременных первородящих самок ($n = 9$) с 15-го по 19-й день подвергали ежедневному иммобилизационному стрессу в течение 1 ч в узких пластиковых пеналах размером $20 \times 7 \times 6$ см в условиях повышенной освещенности, которую создавали лампой 60 Вт, расположенной на высоте 40 см. Контрольных беременных самок ($n = 9$) оставляли интактными. Наступление беременности определяли по наличию сперматозоидов в окрашенных азур-эозином вагинальных мазках самок, находящихся в стадии проэструс–эструс. Беременных самок крыс перед родами рассаживали в индивидуальные клетки и далее ежедневно проводили наблюдение с целью определения даты родов. День обнаружения новорожденных крысят считали 0 днем жизни. На следующий день число крысят в пометах выравнивали до 8 животных (4 самца и 4 самки). Пометы, где обнаружено резкое преобладание животных одного пола, из исследования исключали. Полученное от самок потомство содержали совместно с матерью до 30-дневного возраста и далее по 6 особей в клетке.

Потомков обоего пола стрессированных самок (пренатально стрессированные крысы) и контрольных самок делили на три группы. Животных первой группы подвергали иммобилизационному стрессу в течение 30 мин в узких пластиковых пеналах с целью анализа характера стрессорной активности ГГАС. Пробы крови забирали из хвостовой вены до начала иммобилизации (базальная активность) и далее через 30, 60 и 180 мин после начала стрессирования. Пробы крови центрифугировали (1000 g, 20 мин, 4°C) и далее плазму хранили при температуре -20°C до момента определения содержания в ней кортикостерона. Уровень кортикостерона в плазме крови определяли методом ИФА, используя стандартные наборы производства ХЕМА, Россия. Все манипуляции с самками осуществляли в стадию диэструс, которую контролировали по характеру окрашенных вагинальных мазков. Каждая подгруппа пренатально стрессированных и контрольных самцов и самок в данном эксперименте состояла из 10 животных.

Животных второй группы декапитировали, на льду выделяли гиппокамп и мПФК, которые сразу гомогенизировали для последующего анализа экспрессии белка ГР и МР методом вестерн-блот. Ткани мозга гомогенизировали с использованием лизисного буфера, содержащего ингибиторы протеиназ. Подготовленные гомогенаты центрифугировали 1 ч при 4°C при 32000 g. Общую концентрацию белка в пробах определяли по методу Бредфорда. Индивидуальные пробы, содержащие одинаковое количество белка (15 мкг – гиппокамп и 20 мкг – мПФК) смешивали с буфером Лэмли, после чего белок денатурировали путем нагрева до 95°C в

течение 5 мин. От каждого животного независимо брали три фракции из экстрагированного белка. Подготовленные пробы наносили на 7.5%-ный полиакриламидный гель и разгоняли при помощи электрофореза на оборудовании Bio-Rad Laboratories, США. Разделенные в геле белки электрофоретически переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham, Великобритания) с использованием буфера, который содержал 25 мМ Трис, 192 мМ глицина и 20% метанола (рН 8.3). Полученные мембраны инкубировали 1 ч при 37°C в блокирующем растворе 5%-ного молока, приготовленного на основе ТБСТ буфера (50 мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl, 0.05% Tween 20, рН 8.0). По окончании процедуры мембраны перекладывали в 1%-ный раствор молока на основе ТБСТ буфера, который содержал поликлональные антитела к ГР или МР и моноклональные антитела к β -актину (Santa Cruz Biotechnology, Inc., США) в разведении 1 : 500, и инкубировали в течение ночи при 4°C. По окончании инкубации мембраны трижды промывали в ТБСТ буфере и затем повторно инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в 1%-ном растворе молока на основе ТБСТ буфера с добавлением вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, в разведении 1 : 2500. Визуализацию белков производили при помощи детектирующих реагентов (ECL detection kit, Sigma-Aldrich Laboratories) согласно инструкции производителя. Оптическую плотность полос для белка ГР, МР и β -актина измеряли в компьютерной программе Image ProPlus (Media Cybernetics Inc., США). Каждая подгруппа пренатально стрессированных и контрольных самцов и самок в данном эксперименте состояла из 4 животных.

Животных третьей группы декапитировали, мозг быстро извлекали из черепной коробки и помещали в 4%-ный раствор параформальдегида в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.3) на 1 ч, а затем на 48 ч при 4°C. Далее материал после стандартной обработки (промывка, обезвоживание, проведение через порции ксилола) заливали в парафин. Изготавливали серии срезов мозга во фронтальной плоскости толщиной 6 мкм. С помощью метода немеченых антител (авидин-биотинового) и иммунопероксидазной реакции проводили выявление иммунореактивного вещества. После стандартных процедур депарафинизации, регидратации и демаскировки антигена (кипячение срезов в 0.01 М цитратном буфере, рН 6.0 под давлением в течение 1 мин), срезы в течение ночи при 4°C инкубировали с первичными поликлональными антителами к ГР или МР (Santa Cruz Biotechnology Inc., США; 1 : 100). Далее на срезы наносили универсальную систему авидин-биотинового комплекса (ABC, Vector Laboratories, Inc, США) и оставляли инкубироваться 30 мин при комнатной температуре. После инкубации с ABC-комплексом стекла промывали в фосфатном буфере 3 раза по 5 мин. Для визуализации реакции связывания антитела с антигеном использовали диаминобензидиновый кит (DAB Substrate kit, Vector Laboratories, Inc, США). Количественную оценку иммунореактивности производили с использованием системы анализа изображения, включающей световой микроскоп Olympus CX31 (Япония), цветную цифровую камеру VideoZavr Standard VZ-C31Sr и программное обеспечение Видеозавр Мультиметр 2.3 (АТМ-практика, Санкт-Петербург). Оценивали среднюю оптическую плотность окраски в иммунопозитивных нейронах гиппокампа. Подсчет производился на 4–5 срезах от каждого животного, анализировали количество клеток на одинаковой площади среза для каждой исследуемой области гиппокампа (поля CA1, CA3 и зубчатая извилина). На основании оценки оптической плотности иммунопозитивные клетки разделяли на 3 класса: слабо- (0.05–0.1 ед. оптической плотности), средне- (0.1–0.25 ед. оптической плотности) и сильноиммунореактивные (0.25–0.5 ед. оптической плотности) клетки. Каждая подгруппа пренатально стрессированных и контрольных самцов и самок в данном эксперименте состояла из 4 животных.

Результаты вестерн-блот и иммуноцитохимического анализа обрабатывали с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Анализ динамики

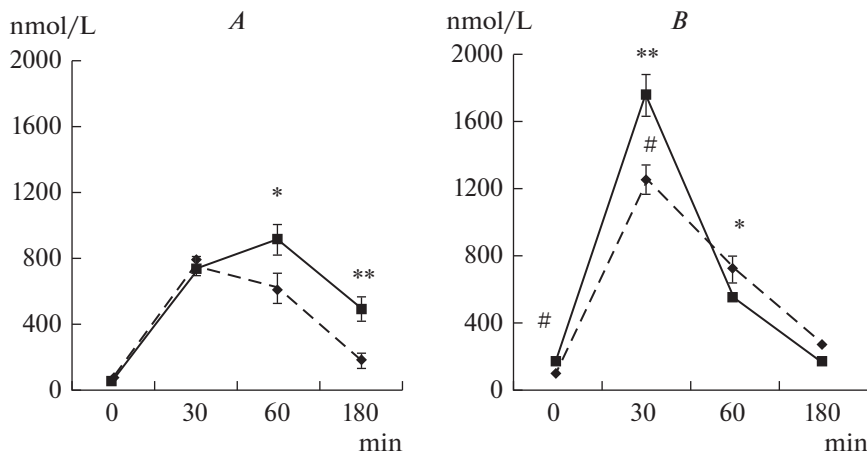


Рис. 1. Эффекты пренатального стресса на уровень кортикостерона (nmol/L) в плазме крови в ответ на 30-минутный иммобилизационный стресс у взрослых самцов (A) и самок (B) крыс. $n = 10$ в группе для каждого пола. Сплошная линия – пренатально стрессированные крысы; прерывистая линия – контрольные крысы. 0 min – базальный уровень кортикостерона; 30 min – иммобилизация; 60 min – уровень кортикостерона спустя 1 ч; 180 min – спустя 3 ч. * Достоверные отличия от контрольных крыс ($p < 0.05$), ** – $p < 0.001$. # Достоверные различия между контрольными самцами и самками ($p < 0.05$).

Fig. 1. Effects of prenatal stress on plasma corticosterone (nmol/L) response to an acute 30 min restraint stress in adult male (A) and female (B) rats. $n = 10$ per group for each sex. Solid line – prenatally stressed rats; broken line – control rats. 0 min – basal level of corticosterone; 30 min – restraint; 60 min – level of corticosterone 1 hr later, and 180 min – 3 hr later. * Significant difference from the control rats ($p < 0.05$), ** – $p < 0.001$. # Significant difference between control male and female rats ($p < 0.05$).

стрессорной реактивности ГГАС проводили и помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA, пакета программ STATISTICA 8.0) с последующими парными post-hoc сравнениями (тест Тьюкки) значений уровня кортикостерона в каждой временной точке у отдельных групп животных. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$. Данные представлены в виде $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Двухфакторный дисперсионный анализ показал достоверное влияние пола животных на динамику стрессорного выброса кортикостерона ($F_{(3,79)} = 40.3$, $p < 0.0001$). Кривая стрессорной гормональной реактивности ГГАС самок отличалась от самцов не только более высоким максимальным значением стрессорного уровня кортикостерона, но и более быстрым торможением системы после стрессорной активации. У самцов через 60 мин после начала 30-минутной иммобилизации уровень кортикостерона сохранялся повышенным (рис. 1A), тогда как у самок он существенно снижался по сравнению с 30-мин временным интервалом (рис. 1B). Самки отличались от самцов более высоким значением базального уровня кортикостерона.

Обнаружено также статистически значимое влияние фактора пренатального стресса на характер стрессорного ответа самцов ($F_{(3,79)} = 9.3$, $p < 0.001$) и самок ($F_{(3,79)} = 5.2$, $p < 0.04$). Сравнение значений уровня кортикостерона в крови в каждой временной точке у самцов показало, что у пренатально стрессированных жи-

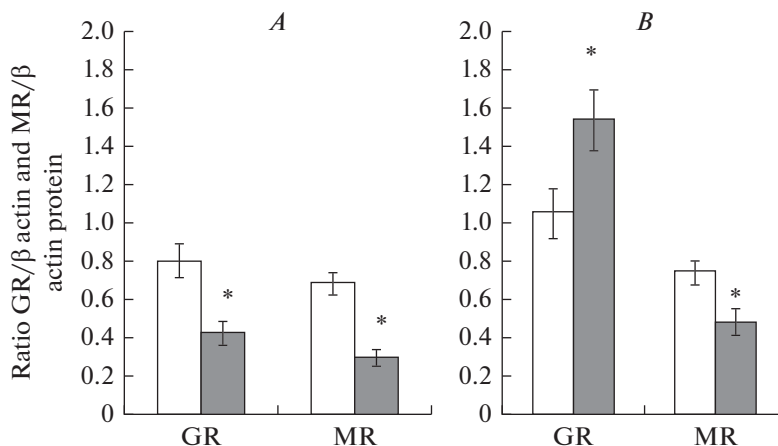


Рис. 2. Экспрессия белка глюкокортикоидных рецепторов (GR) и белка минералокортикоидных рецепторов (MR) в гиппокампе, выявленная методом вестерн-блот у взрослых самцов (A) и самок (B) крыс. $n = 4$ в группе для каждого пола. Пустые столбики – контрольные крысы; темные столбики – пренатально стрессированные крысы. * Достоверные отличия от контрольных крыс ($p < 0.05$). # Достоверные различия между контрольными самцами и самками ($p < 0.05$).

Fig. 2. Glucocorticoid receptor (GR) and mineralocorticoid receptor (MR) protein expression in hippocampus detected by western blot in adult male (A) and female (B) rats. $n = 4$ per group for each sex. Open bars – control rats; black bars – prenatally stressed rats. * Significant difference from the control rats ($p < 0.05$). # Significant difference between control male and female rats ($p < 0.05$).

вотных повышен уровень КС через 60 мин после начала стрессирования по сравнению с контрольными самцами (рис. 1A). Более высокий уровень кортикостерона у пренатально стрессированных самцов наблюдали и через 180 мин от начала стрессирования, тогда как у контрольных животных содержание гормона в крови в этой временной точке снижалось до базального уровня. Эти данные свидетельствуют о снижении чувствительности ГГАС пренатально стрессированных самцов к сигналам отрицательной обратной связи. У пренатально стрессированных самок помимо повышенной стрессорной реактивности ГГАС (более высокий уровень кортикостерона в 30-минутной точке) обнаружено и усиленное торможение системы после стрессорной активации, о чем свидетельствовал сниженный уровень кортикостерона уже через 60 мин от начала стрессирования (рис. 1B). Кроме того, у пренатально стрессированных самок обнаружено статистически значимое повышение базального уровня кортикостерона по сравнению с контрольными самками (183 ± 22.3 и 109 ± 19.1 , $p < 0.05$ соответственно).

Анализ количества белка GR и MR методом вестерн-блот показал снижение количества обоих типов кортикостероидных рецепторов в гиппокампе пренатально стрессированных самцов (рис. 2A), повышение количества белка GR и снижение количества белка MR у пренатально стрессированных самок (рис. 2B). В мПФК пренатально стрессированных самцов (рис. 3A) уровень иммуореактивных белков для MR и GR также был снижен по сравнению с контрольными самцами. При этом у пренатально стрессированных самок количество белка GR было статистически значимо повышено (рис. 3B). Образцы блотов для каждой группы животных и каждой исследованной структуры мозга представлены на рис. 4.

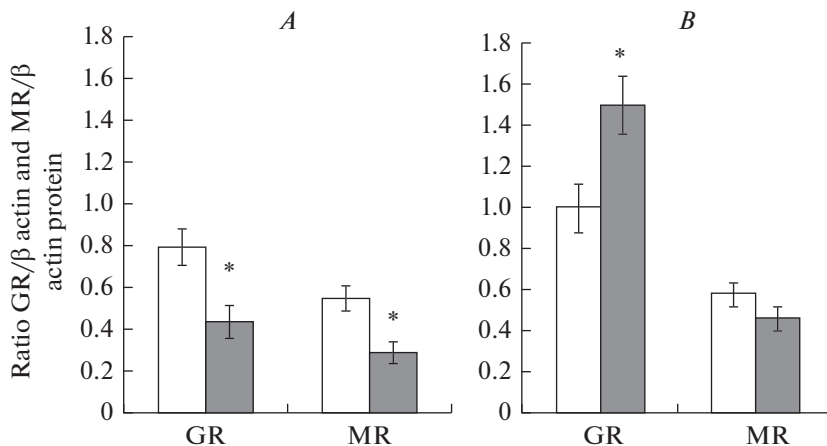


Рис. 3. Экспрессия белка глюкокортикоидных рецепторов (GR) и белка минералокортикоидных (MR) рецепторов в медиальной префронтальной коре, выявленная методом вестерн блот у взрослых самцов (A) и самок (B) крыс. $n = 4$ в группе для каждого пола. Пустые столбики – контрольные крысы; темные столбики – пренатально стрессированные крысы. * Достоверные отличия от контрольных крыс ($p < 0.05$). # Достоверные различия между контрольными самцами и самками ($p < 0.05$).

Fig. 3. Glucocorticoid receptor (GR) and mineralocorticoid receptor (MR) protein expression in medial prefrontal cortex detected by western blot in adult male (A) and female (B) rats. $n = 4$ per group for each sex. Open bars – control rats; black bars – prenatally stressed rats. * Significant difference from the control rats ($p < 0.05$).

Кроме того, проведен анализ изменения соотношения MR и GR в гиппокампе и мПФК контрольных и пренатально стрессированных животных. В гиппокампе самцов мы не выявили различий в этом показателе. Соотношение GR : MR у пренатально стрессированных самцов составил 1.4 ± 0.15 , а у контрольных самцов – 1.25 ± 0.14 . В мПФК соотношение двух типов кортикостероидных рецепторов также не различалось у пренатально стрессированных (1.4 ± 0.14) и контрольных (1.5 ± 0.2) самцов. У контрольных самок соотношение GR : MR в гиппокампе (1.4 ± 0.13) и мПФК (1.7 ± 0.2) было таким же, как и у контрольных самцов. Пренатальный стресс у самок значимо увеличил соотношение GR : MR как в гиппокампе (3.2 ± 0.35 , $p < 0.05$), так и в мПФК (3.3 ± 0.4 , $p < 0.05$).

Иммуногистохимический анализ распределения белков GR и MR в областях гиппокампа показал снижение содержания GR в полях CA1 и CA3, а также в зубчатой извилине пренатально стрессированных самцов по сравнению с контрольными самцами (табл. 1). Кроме того, в поле CA3 и в зубчатой извилине этих самцов статистически значимо снижалось количество клеток, экспрессирующих GR. Обнаружено также снижение содержания MR в поле CA3 и зубчатой извилине пренатально стрессированных самцов. У пренатально стрессированных самок, напротив, количество GR повышалась в поле CA3 и зубчатой извилине не только за счет увеличения числа клеток, экспрессирующих GR, но и за счет роста числа сильно- и среднеиммунопозитивных для GR клеток (табл. 2). Кроме того в поле CA3 и зубчатой извилине пренатально стрессированных самок было снижено число среднеиммунопозитивных клеток для MR. Следует отметить, что пренатальный стресс наименьшее влияние оказал на экспрессию GR и MR в поле CA1 как у самок, так и у самцов. Образцы срезов с выявлением иммунопозитивных для GR клеток поля CA3 гиппокампа и зубчатой извилины самцов и самок крыс представлены на рис. 5.

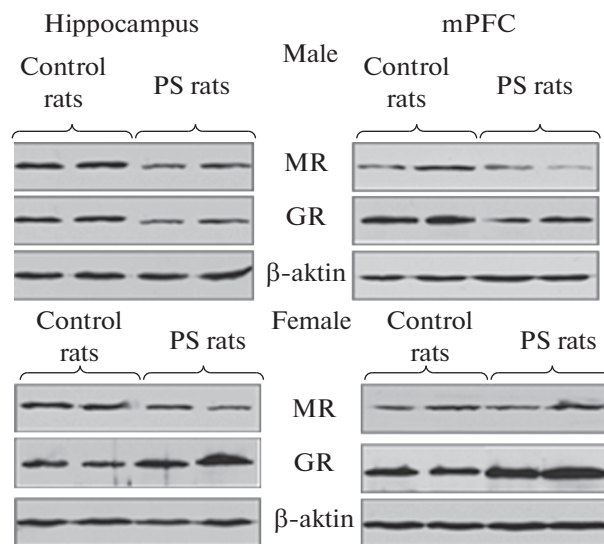


Рис. 4. Образцы вестерн-блотов для глюкокортикоидных рецепторов (GR), минералокортикоидных (MR) рецепторов и β -актина контрольных и пренатально стрессированных самцов и самок крыс гиппокампа и медиальной префронтальной коры (mPFC).

Fig. 4. Representative images of glucocorticoid receptor (GR), mineralocorticoid receptor (MR) and β -actin western-blot in control and prenatal stressed male and female samples of hippocampus and medial prefrontal cortex (mPFC).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные исследования показали зависимое от пола животных влияние пренатального стресса на характер гормонального стрессорного ответа ГГАС. Если у самцов эффекты пренатального стресса касались преимущественно чувствительности ГГАС к сигналу отрицательной обратной связи, которая была ослаблена у этих животных, то у самок напротив, торможение ГГАС после стрессорной активации было ускорено, что сопровождалось значительным ростом стрессорной реактивности этой гормональной оси.

Разнонаправленные эффекты пренатального стресса у самцов и самок обнаружены также в отношении экспрессии белка ГР в гиппокампе и мПФК. У пренатально стрессированных самцов наблюдали снижение уровня иммунореактивного белка для ГР в полях гиппокампа и зубчатой извилине на фоне снижения общего числа клеток, экспрессирующих ГР. Этот эффект пренатального стресса был более выражен в поле СА3 и зубчатой извилине. В этих же областях гиппокампа пренатально стрессированных самцов наблюдается и снижение экспрессии белка MR. Сходные данные были получены в исследованиях других авторов, которые показали, что у самцов, родившихся от стрессированных в последнюю треть беременности матерей, нарушена регуляция ГГАС по механизму отрицательной обратной связи и снижено количество мРНК ГР и MR в поле СА3 гиппокампа [15]. Эти авторы не обнаружили статистически значимого снижения мРНК ГР и MR в зубчатой извилине, что, вероятно, связано с различиями в количестве мРНК и белка соответствующих рецепторов. Тем не менее, зубчатой извилине, наряду с СА3 полем гиппокампа, принадлежит ведущая роль в торможении ГГАС после стрессорной активации [17, 18]. Более того, в исследованиях, выполненных на мышах, имею-

Таблица 1. Количество иммунопозитивных клеток к глюко- (GR) и минералокортикоидным (MR) рецепторам в гиппокампе самцов крыс после пренатального стресса (ПС)

Table 1. The quantity of GR- and MR-immunoreactive cells in the hippocampus of prenatally stressed (PS) male rats

Лиганд Ligand	Локализация Localization		Контрольные крысы, $n = 4$ Control rats, $n = 4$	ПС крысы, $n = 4$ PS rats, $n = 4$
GR	CA1	Всего Total	81.8 ± 9.7	71.75 ± 8.1
		1 тип 1 type	1.5 ± 0.6	0 ± 0
		2 тип 2 type	15.8 ± 4.2	$0.25 \pm 0.2^*$
		3 тип 3 type	64.5 ± 5.5	71.5 ± 8.0
	CA3	Всего Total	178.5 ± 18.5	$117.2 \pm 21.1^*$
		1 тип 1 type	10.25 ± 2.8	9.0 ± 3.1
		2 тип 2 type	48.5 ± 8.1	$17.0 \pm 5.3^*$
		3 тип 3 type	119.7 ± 12.5	91.2 ± 18.5
	Dentate gyrus	Всего Total	223.8 ± 25.3	$152.8 \pm 14.8^*$
1 тип 1 type		5.6 ± 1.55	0 ± 0	
2 тип 2 type		25.8 ± 4.22	$5.4 \pm 3.2^*$	
3 тип 3 type		194.4 ± 10.4	$147.4 \pm 7.8^*$	
MR	CA1	Всего Total	91.4 ± 10.21	84.2 ± 10.14
		1 тип 1 type	1.0 ± 0.47	0.3 ± 0.2
		2 тип 2 type	8.25 ± 2.7	9.6 ± 1.2
		3 тип 3 type	82.1 ± 9.4	74.3 ± 12.13
	CA3	Всего Total	176 ± 21.1	$118 \pm 18.9^*$
		1 тип 1 type	8 ± 2.4	10 ± 3.2
		2 тип 2 type	51 ± 14.3	$15 \pm 8.6^*$
		3 тип 3 type	117 ± 15.2	93 ± 16.7
	Dentate gyrus	Всего Total	231.1 ± 23.4	$154.0 \pm 20.1^*$
1 тип 1 type		3.1 ± 0.5	1.7 ± 0.33	
2 тип 2 type		21.8 ± 7.4	9.4 ± 4.4	
3 тип 3 type		216.3 ± 22.4	$132.9 \pm 20.6^*$	

* Достоверные ($p < 0.05$) отличия от контрольных крыс.

* Significant difference from the control rats ($p < 0.05$).

Таблица 2. Количество иммунопозитивных клеток к глюко- (GR) и минералокортикоидным (MR) рецепторам в гиппокампе пренатально стрессированных (ПС) самок крыс
Table 2. The quantity of GR- and MR-immunoreactive cells in the hippocampus of prenatally stressed (PS) female rats

Лиганд Ligand	Локализация Localization		Контрольные крысы, <i>n</i> = 4 Control rats, <i>n</i> = 4	ПС крысы, <i>n</i> = 4 PS rats, <i>n</i> = 4
GR	CA1	Всего Total	75.4 ± 5.4	88.4 ± 7.2
		1 тип 1 type	0 ± 0	0.5 ± 0.06
		2 тип 2 type	6.9 ± 2.0	12.5 ± 4.8
		3 тип 3 type	68.4 ± 5.9	75.4 ± 10.9
	CA3	Всего Total	103.5 ± 12.2	140.5 ± 8.9*
		1 тип 1 type	7.5 ± 2.1	14.8 ± 2.8*
		2 тип 2 type	14.7 ± 2.3	22.7 ± 4.2*
		3 тип 3 type	81.25 ± 8.6	106.5 ± 8.8
	Dentate gyrus	Всего Total	232.8 ± 10.7	304.6 ± 17.8*
1 тип 1 type		2.5 ± 0.5	10.5 ± 2.2*	
2 тип 2 type		12.8 ± 0.5	68.0 ± 12.1*	
3 тип 3 type		217.0 ± 10.2	210.1 ± 19.9	
MR	CA1	Всего Total	67.1 ± 7.2	56.5 ± 6.1
		1 тип 1 type	0 ± 0	0 ± 0
		2 тип 2 type	5.57 ± 0.8	6.1 ± 0.8
		3 тип 3 type	61.6 ± 5.3	50.4 ± 7.5
	CA3	Всего Total	116.5 ± 7.3	120.6 ± 8.1
		1 тип 1 type	5.7 ± 3.8	8.1 ± 2.6
		2 тип 2 type	30.2 ± 7.5	15.6 ± 3.6*
		3 тип 3 type	87.2 ± 12.1	96.9 ± 7.9
	Dentate gyrus	Всего Total	239.6 ± 10.5	199.6 ± 9.9
1 тип 1 type		19.9 ± 3.8	0 ± 0	
2 тип 2 type		24.9 ± 6.6	15.7 ± 4.6*	
3 тип 3 type		194.8 ± 8.3	183.9 ± 8.9	

* Достоверные (*p* < 0.05) отличия от контрольных крыс.

* Significant difference from the control rats (*p* < 0.05).

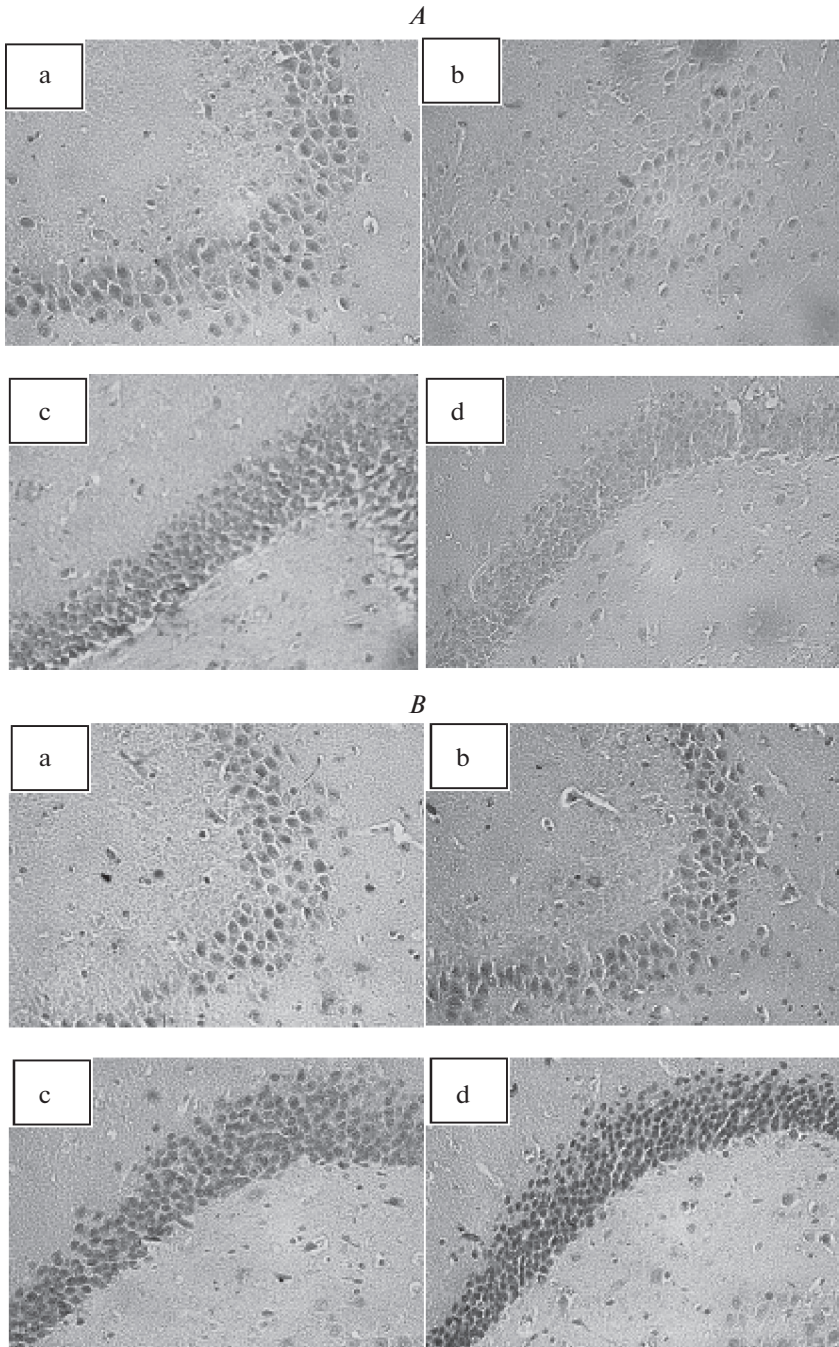


Рис. 5. Экспрессия белка глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе пренатально стрессированных и контрольных животных, выявленная иммуногистохимическим методом. *A* – самцы; *B* – самки. Контрольные крысы (a – CA3, c – dentate gyrus). Пренатально стрессированные крысы (b – CA3, d – dentate gyrus).

Fig. 5. The protein expression of glucocorticoid receptor in the hippocampus of prenatal stressed and control rats detecting by immunohistochemistry technique. *A* – male; *B* – female. Control rats (a – CA3, c – dentate gyrus). Prenatal stressed rats (b – CA3, d – dentate gyrus).

щих повышенный или нормальный уровень МР и ГР в гиппокампе, показано, что только при сниженном уровне ГР и нормальном, но не повышенном уровне МР наблюдается усиление реактивности ГГАС и пролонгированный гормональный стрессорный ответ на 40-минутную иммобилизацию. Можно полагать, что снижение экспрессии в гиппокампе не только ГР, но и МР также способствует нарушению регуляции ГГАС по механизму отрицательной обратной связи. Подтверждением этому служит тот факт, что введение антидепрессантов не только нормализует функции ГГАС, но и повышает уровень мРНК ГР и МР в гиппокампе [19–21]. Сниженный уровень экспрессии белков ГР и МР у пренатально стрессированных самцов мы также обнаружили в мПФК, что также может обуславливать снижение чувствительности их ГГАС к сигналам отрицательной обратной связи [22]. Неслучайно пренатально стрессированных самцов рассматривают как модель депрессии, поскольку у этих животных воспроизводятся многие гормональные и поведенческие дисфункции, характерные для клинической картины этой психопатологии [23].

Следует отметить, что в настоящее время не только ГР, но и МР гиппокампа и мПФК уделяется значительное внимание в связи с данными о вовлеченности данных рецепторов в патогенез депрессии [24, 25]. Исследование мозга больных депрессией *post-mortem* выявило значительное снижение количества МР рецепторов в гиппокампе (поле СА3) [26, 27]. С дисфункцией МР связывают нарушение базальной активности ГГАС у пациентов с депрессией [28]. В исследованиях, проведенных на трансгенных животных, показано, что недостаточность МР в мозге повышает не только базальный уровень активности ГГАС, но и стрессорный ответ этой гормональной оси на иммобилизацию [29]. Несмотря на снижение экспрессии белка МР рецепторов в гиппокампе пренатально стрессированных самцов, мы не обнаружили повышение базальной активности ГГАС у этих животных. Мы полагаем, что подобное отсутствие изменения базального уровня кортикостерона связано с отсутствием отличий от контрольных животных в соотношении ГР : МР в гиппокампе. В подтверждение такого заключения можно привести данные, полученные при анализе соотношения МР и ГР в гиппокампе у самцов крыс, подвергнутых хроническому непредсказуемому стрессу и последующему введению антидепрессантов. Хронический непредсказуемый стресс, используемый в исследованиях как модель депрессии, повышал базальный уровень кортикостерона у животных и снижал соотношение ГР : МР, а введение антидепрессантов нормализовало не только уровень кортикостерона, но и соотношение кортикостероидных рецепторов [27].

Эффекты пренатального стресса на активность ГГАС у самок существенно отличались от самцов. Помимо повышенной стрессорной реактивности и базального уровня кортикостерона, чувствительность к сигналам отрицательной обратной связи была усилена. Более быстрое торможение стрессорной активности ГГАС пренатально стрессированных самок, вероятнее всего, определяется повышением экспрессии белка ГР в дорзальном гиппокампе и мПФК, ответственных за эффективное торможение активности этой гормональной оси при стрессе. Остается открытым вопрос о повышенной стрессорной реактивности пренатально стрессированных самок по сравнению с контрольными животными. Тот факт, что самки отличаются повышенной стрессорной реактивностью ГГАС хорошо известно. Также было показано, что самки характеризуются повышенной экспрессией ГР и увеличенным соотношением ГР : МР в гиппокампе по сравнению с самцами [30], что обнаружено и в нашем исследовании. При этом межполовых различий в экспрессии белка МР гиппокампа выявлено не было. Следует отметить, что снижение экспрессии белка ГР в гиппокампе, префронтальной коре и амигдале у нокаутных самок мышей не меняло базальный и стресс-индуцированный уровень кортикостерона, тогда как у самцов способствовало пролонгированию гормонального стрессорного

ответа [31]. Эти данные свидетельствуют о том, что в изменении базальной и стрессорной активности ГГАС самок вовлечены механизмы, напрямую не связанные с центральными ГР.

Повышенную стресс-реактивность самок связывают преимущественно с эстрадиолом [32]. Причем эстрадиол, взаимодействуя с двумя подтипами рецепторов α и β , может как снижать, так и увеличивать стресс-индуцированный уровень кортикостерона. Показано, что через активацию α -рецепторов эстрадиол повышает стрессорную реактивность ГГАС, а посредством активации β -рецепторов снижает секрецию кортикостерона в ответ на иммобилизационный стресс [33–35].

В пользу вовлеченности эстрадиол-зависимых механизмов повышения активности ГГАС у пренатально стрессированных самок свидетельствует факт обнаружения сниженной экспрессии β -рецепторов эстрадиола и повышенной экспрессии α -рецепторов в отдельных областях гипоталамуса, включая паравентрикулярное ядро, медиальную амигдалу и BNST в результате пренатального стресса [36]. Изменение экспрессии β -рецепторов эстрадиола в мозге пренатально стрессированных самок авторы этих результатов связывают со снижением уровня 17β -эстрадиола в крови этих животных. Действительно, показано, что эстрадиол, циркулирующий в крови, оказывает стимулирующее влияние на экспрессию β -рецепторов эстрадиола [37.] Следует отметить, что в своих исследованиях мы также обнаружили снижение уровня 17β -эстрадиола в крови пренатально стрессированных самок [38].

Интересно отметить, что сходный профиль активности ГГАС (повышенная реактивность и чувствительность к сигналам отрицательной обратной связи) характерна для больных посттравматическим стрессовым расстройством, что сопровождается повышением уровня ГР [39]. В экспериментах на лабораторных животных также было обнаружено повышение экспрессии ГР в гиппокампе и префронтальной коре при моделировании посттравматического стрессового расстройства [40, 41]. И хотя такое усиление экспрессии ГР в мозге при стрессовым расстройством в основном связывают с нарушением эмоциональной памяти о психотравматизирующих событиях [42], нельзя исключать, что изменение экспрессии центральных ГР при посттравматическом стрессовым расстройством также может являться одним из механизмов повышенной стресс-реактивности.

Таким образом, проведенные исследования показали, что эффекты пренатального стресса на активность ГГАС имеют зависимые от пола животных особенности и проявляются у взрослых самцов в пролонгировании гормонального стрессорного ответа, а у самок в повышенной стрессорной реактивности и усилении чувствительности ГГАС к сигналам отрицательной обратной связи. У пренатально стрессированных самцов изменения активности ГГАС сопровождаются снижением экспрессии белков ГР и МР в гиппокампе и мПФК при неизменном соотношении ГР : МР. В свою очередь у пренатально стрессированных самок наблюдается усиление экспрессии белка ГР и снижение экспрессии белка МР в гиппокампе и увеличение соотношения ГР : МР в исследованных структурах мозга. В гиппокампе как самцов, так и самок наибольшие изменения экспрессии ГР и МР в результате пренатального стресса выявлено в СА3 поле и зубчатой извилине. Полученные данные о половом диморфизме эффектов пренатального стресса на активность ГГАС и количество ГР и МР в областях мозга, ответственных за базальную активность этой гормональной оси и ее своевременное торможение после стрессорной активации, важно для разработки методов коррекции последствий пренатального стресса в последующей жизни.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования выполнены в рамках Государственного задания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН на 2019 г., тема № 0134-2019-0002.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит результатов исследований с участием людей в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *deKloet E.R., Joels M., Holsboer F.* Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6: 463–475. 2005.
2. *McEwen B.S.* The Ever-Changing Brain: Cellular and Molecular Mechanisms. *Dev. Neurobiol.* 72(6): 878–890. 2012.
3. *McEwen B.S., Morrison J.H.* Brain On Stress: Vulnerability and Plasticity of the Prefrontal Cortex Over the Life Course. *Neuron.* 79(1): 16–29. 2013.
4. *deKloet E.R., Derijk R.* Signaling pathways in brain involved in predisposition and pathogenesis of stress-related disease: genetic and kinetic factors affecting the MR/GR balance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1032: 14–34. 2004.
5. *Harris A.P., Holmes M.C., de Kloet E.R., Chapman K.E., Seckl J.R.* Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor balance in control of HPA axis and behavior. *Psychoneuroendocrinology.* 38: 648–658. 2013.
6. *Koning A.C., Buurstedde J.C., van Weert L.T., Meijer O.C.* Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptors in the Brain: A Transcriptional Perspective. *J. Endocr. Soc.* 3(10): 1917–1930. 2019.
7. *Young E.A., Korszun A., Figueiredo H.F., Solomon M.B., Herman J.P.* Sex differences in HPA axis regulation. In: *Rocker J.B., Berkley K.J., Geary N., Hampson E., Herman J.P., Young E.A.* (Eds). *Sex differences in the brain from genes to behavior.* New York. Oxford Univer. Press Inc. 95–105. 2006.
8. *Kudielka B.M., Kirschbaum C.* Sex differences in HPA axis responses to stress: review. *Biol. Psychol.* 69: 113–132. 2005.
9. *Nath A., Murthy G.V.S., Babu G.R., Di Renzo G.C.* Effect of prenatal exposure to maternal cortisol and psychological distress on infant development in Bengaluru, southern India: a prospective cohort study. *BMC Psychiatry.* 17(1): 255. 2017.
10. *Davis E.P., Glynn L.V., Waffarn F., Sandman C.A.* Prenatal maternal stress programs infant stress regulation. *J. Child. Psychol. Psychiatry.* 52(2): 119–129. 2011.
11. *Bale T.L.* Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat. Rev. Neurosci.* 16: 332–344. 2015.
12. *Harris A., Seckl J.* Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Horm. Behav.* 59: 279–289. 2011.
13. *Darnaudéry M., Maccari S.* Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain Res. Rev.* 57: 571–585. 2008.
14. *Baker S., Rees S., Chebli M., LeMarec N., Hutaa V., Bielajewa C.* Effects of gestational stress: 2. Evaluation of male and female adult offspring. *Brain Res.* 1302: 194–204. 2009.
15. *Darnaudéry M., Maccari S.* Epigenetic programming of the stress response of male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain Res. Rev.* 57: 571–585. 2008.
16. *Galeeva A., Pelto-Huikko M., Pivina S., Ordyan N.* Postnatal ontogeny of the glucocorticoid receptor in the hippocampus. *Hormones of the Limbic system. Vitamins and Hormones.* 82: 367–389. 2010.
17. *Radley J.J.* Toward a limbic cortical inhibitory network: implications for hypothalamic-pituitary-adrenal responses following chronic stress. *Front. Behav. Neurosci.* 29; 6: 7. 2012.
18. *Herman J.P.* Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 45(4): 292–298. 2012.
19. *Reul J.M., Stec I., Soder M., Holsboer F.* Chronic treatment of rats with the antidepressant amitriptyline attenuates the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Endocrinology.* 133(1): 312–320. 1993.
20. *Przegalinski E., Budziszewska B.* The effect of long-term treatment with antidepressant drugs on the hippocampal mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in rats. *Neurosci. Lett.* 161(2): 215–218. 1993.
21. *Seckl J.R., Fink G.* Antidepressants increase glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA in the rat hippocampus in vivo. *Neuroendocrinology.* 55: 621–626. 1992.

22. *McKlveen J.M., Myers B., Flak J.N., Bundzikova J., Solomon M.B., Seroogy K.B., Herman J.P.* Role of Prefrontal Cortex Glucocorticoid Receptors in Stress and Emotion. *Biol. Psychiatry.* 74(9): 672–679. 2013.
23. *Maccaria S., Morley-Fletcher S.* Effects of prenatal restraint stress on the hypothalamus–pituitary–adrenal axis and related behavioral and neurobiological alterations. *Psychoneuroendocrinology.* 32(1): 10–15. 2007.
24. *Chen J., Wang Z., Zhang S., Zuo W., Chen N.* Does mineralocorticoid receptor play a vital role in the development of depressive disorder? *Life Sci.* 152: 76–81. 2016.
25. *Hinkelmann K., Hellmann-Regen J., Wingefeld K., Kuehl L.K., Mews M., Fleischer J., Heuser I., Otte C.* Mineralocorticoid receptor function in depressed patients and healthy individuals. *Progr. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.* 71: 183–188. 2016.
26. *Medina A., Seasholtz A.F., Sharma V., Burke S., Bunney W.Jr., Myers R.M., Schatzberg A., Akil H., Watson S.J.* Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor expression in the human hippocampus in major depressive disorder. *J. Psychiatr. Res.* 47(3): 307–314. 2013.
27. *Lopez J.F., Chalmers D.T., Little K.Y., Watson S.J.* Regulation of serotonin1A, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. *Biol. Psychiatry.* 43(8): 547–573. 1998.
28. *Otte C., Wingefeld K., Kuehl L.K., Kaczmarczyk M., Richter S., Quante A., Regen F., Bajbouj M., Zimmermann-Viehoff F., Wiedemann K., Hinkelmann K.* Mineralocorticoid receptor stimulation improves cognitive function and decreases cortisol secretion in depressed patients and healthy individuals. *Neuropsychopharmacology.* 40(2): 386–393. 2015.
29. *Horst J.P.T., Van der M.M.H., Arp M., Berger S., de Kloet E.R., Oitzl M.S.* Stress or no stress: mineralocorticoid receptors in the forebrain regulate behavioral adaptation. *Neurobiol. Learn Mem.* 98(1): 33–40. 2012.
30. *Brydges N.M., Jin R., Seckl J., Holmes M.C., Drake A.J., Holl S.* Juvenile stress enhances anxiety and alters corticosteroid receptor expression in adulthood. *Brain Behav.* 4(1): 4–13. 2013.
31. *Solomon M.B., Furay A.R., Jones K., Packard A.E.B., Packard B.A., Wulsin A.C., Herman J.P.* Deletion of forebrain glucocorticoid receptors impairs neuroendocrine stress responses and induces depression-like behavior in males but not females. *Neuroscience.* 203: 135–143. 2012.
32. *Oyola M.G., Handa R.J.* Hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsiveness. *Stress.* 20(5): 476–494. 2017.
33. *Lund T.D., Hinds L.R., Handa R.J.* The androgen 5 α -dihydrotestosterone and its metabolite 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol inhibits the hypothalamic–pituitary–adrenal response to stress by acting through estrogen receptor β -expressing neurons in the hypothalamus. *J. Neurosci.* 26: 1448–1456. 2006.
34. *Lund T.D., Munson D.J., Haldy M.E., Handa R.J.* Androgen inhibits, while oestrogen enhances, restraint-induced activation of neuropeptide neurons in the paraventricular nucleus of hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* 16: 272–278. 2004.
35. *Weiser M.J., Foradori C.D., Handa R.J.* Estrogen receptor β activation prevents glucocorticoid receptor-dependent effects of the central nucleus of the amygdala on behavior and neuroendocrine function. *Brain Res.* 1336: 78–88. 2010.
36. *He F., Wang Z., Guo G.* Postnatal separation prevents the development of prenatal stress-induced anxiety in association with changes in oestrogen receptor and oxytocin immunoreactivity in female mandarin vole (*Microtus mandarinus*) offspring. *Behav. Neurosci.* 47(1): 95–108. 2018.
37. *Giguere V., Tremblay A., Tremblay G.B.* Estrogen receptor β : re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling. *Steroids.* 63: 335–339. 1998.
38. *Shamolina T.S., Pivina S.G., Ordyan N.E.* Changes in the activity of hypophyseal–adrenocortical and reproductive systems in prenatally stressed female rats during aging. *Neurosci. Behav. Physiol.* 40(9): 1017–1022. 2010.
39. *Yehuda R.* Post-traumatic stress disorder. *N. Engl. J. Med.* 346(2): 108–114. 2002.
40. *Daskalakis N.P., Cohen H., Cai G., Buxbaum J.D., Yehuda R.* Expression profiling associates blood and brain glucocorticoid receptor signaling with trauma-related individual differences in both sexes. *PNAS.* 111(37): 13529–13534. 2014.
41. *George S.A., Rodriguez-Santiago M., Riley J., Rodriguez E., Liberzon I.* The effect of chronic phenytoin administration on single prolonged stress induced extinction retention deficits and glucocorticoid upregulation in the rat medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology.* 232: 47–56. 2015.
42. *Finsterwald C., Alberini C.M.* Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: from adaptive responses to psychopathologies. *Neurobiol. Learn Mem.* 112: 17–29. 2014.

**Sex-Dependent Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis
Stress Reactivity after Prenatal Stress in Rats:
Relevance of the Brain Corticosteroid Receptors Expression**

**N. E. Ordyan^a, *, S. G. Pivina^a, K. A. Baranova^a, V. V. Rakitskaya^a,
V. K. Akulova^a, and G. I. Kholova^a**

^aPavlov Institute of Physiology Russian Academy Science, St.-Petersburg, Russia

**e-mail: neo@infran.ru*

Prenatal stress (PS) is considered a major risk factor for developing some diseases in later life. Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis is one of the mechanisms of the occurrence of such diseases. Mineralocorticoid (MR) and glucocorticoid receptors (GR) of cortico-limbic structures regulate HPA axis activity. The link between PS, sex, and the HPA axis activity, as well as the role of brain MR and GR in this interaction is understudied. We studied the effect of PS on the HPA axis of adult male and female rats, and the expression of GR and MR in the hippocampus and medial prefrontal cortex (mPFC). PS caused by exposing pregnant female Wistar rats to 1-hr immobilization from the 15th to the 19th day of pregnancy. HPA axis activity of adult offspring was assessed by measuring corticosterone levels in basal condition and after 30 min immobilization. We measured the effects of PS on MR and GR levels in the hippocampus and mPFC with western blot and additionally with immunohistochemical method in the hippocampus. PS elevated HPA axis activity under rest condition only in females. HPA axis reactivity after immobilization was prolonged in males, and increased in females. We also observed increased HPA axis sensitivity to feedback signals in females. This effect in males was accompanied by low expression of the MR and GR in the hippocampus and mPFC with a constant ratio of GR: MR. PS increased GR expression and decreased MR expression in the hippocampus, and increased the ratio of GR : MR in both brain areas of females. The greatest changes in the expression of GR and MR were detected in the CA3 field of the hippocampus and in the dentate gyrus of males and females. The data obtained indicate the contribution of changes in the expression of GR and MR of the hippocampus and mPFC, as well as their ratio in the sex-dependent modification of the HPA axis activity due to PS.

Keywords: prenatal stress, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, hippocampus, medial prefrontal cortex, mineralocorticoid receptor, glucocorticoid receptor, sex

ЦИТИРОВАТЬ:

Ордян Н.Э., Пивина С.Г., Баранова К.А., Ракицкая В.В., Акулова В.К., Холова Г.И. Зависимое от пола действие пренатального стресса на активность гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы крыс: роль кортикостероидных рецепторов мозга. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(6): 740–755.

DOI: 10.31857/S0869813920060096

TO CITE THIS ARTICLE:

Ordyan N.E., Pivina S.G., Baranova K.A., Rakitskaya V.V., Akulova V.K., Kholova G.I. Sex-Dependent Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Stress Reactivity After Prenatal Stress in Rats: Relevance of the Brain Corticosteroid Receptors Expression. Russian Journal of Physiology. 106(6): 740–755.

DOI: 10.31857/S0869813920060096

ОСОБЕННОСТИ ОТВЕТОВ ЗАЩИТНЫХ СИСТЕМ МОЗГА ВЗРОСЛЫХ КРЫС НА СТРЕССОРЫ И ЛИПОПОЛИСАХАРИД

© 2020 г. Н. П. Комышева¹, Г. Т. Шишкина¹, *, Т. С. Калинина¹, Н. Н. Дыгало¹

¹*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

**E-mail: gshi@bionet.nsc.ru*

Поступила в редакцию 29.01.2020 г.

После доработки 10.03.2020 г.

Принята к публикации 03.04.2020 г.

Восприимчивость или устойчивость к развитию депрессии определяется действием провоцирующих ее стимулов, включающих стрессоры и воспалительные процессы, а также активностью защитных систем организма, например, нейротрофинов и антиапоптозных белков. Для выяснения влияния стрессорных и провоспалительного воздействий, индуцирующих депрессивно-подобное состояние, на эти защитные механизмы, исследовали уровни мРНК мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и антиапоптозного белка Bcl-xL в отделах мозга взрослых самцов крыс после 14-дневных стрессовых (принудительное плавание или ограничение подвижности) или провоспалительного (введение липополисахарида, LPS) воздействий. Оба стрессора достоверно снижали экспрессию BDNF в среднем мозге; снижение экспрессии нейротрофина в коре было достоверным после плавания, а после ограничения подвижности – на уровне тенденции. После LPS уровень мРНК BDNF достоверно снижался в гиппокампе, но не в среднем мозге – области эффекта стрессоров. Оба стрессора повышали уровень мРНК Bcl-xL в стволовой части мозга, но снижали его в среднем мозге и не изменяли в других отделах. LPS не влиял на экспрессию Bcl-xL в большинстве отделов, но снижал ее в стволе мозга, в котором уровень этого транскрипта негативно коррелировал с индексом надпочечников. В целом стрессорные и провоспалительные воздействия индуцировали уникальные для каждого из них и даже противоположные по направлению (в стволе мозга) изменения экспрессии Bcl-xL. Про-депрессивное действие и LPS, и стрессоров ассоциировалось со снижением экспрессии BDNF, которое локализовалось в специфичных для каждого из этих типов воздействий отделах мозга: для LPS в гиппокампе, а стрессоров – в среднем мозге и префронтальной коре. Выявленные особенности ответов BDNF и Bcl-xL указывают на существенные различия путей индукции психоэмоциональной патологии стрессом и активацией воспаления.

Ключевые слова: стресс, липополисахарид, мозговой нейротрофический фактор, анти-апоптозный белок Bcl-xL, головной мозг, потребление сахарозы, надпочечники

DOI: 10.31857/S0869813920060059

Развитие депрессии связано с вовлечением в этиологию заболевания многофакторных процессов, что создает сложности в выявлении конкретных мишеней для ее эффективной терапии. Среди индукторов депрессии наиболее часто рассматривают стрессовые события [1], а в последнее время в этой связи также интенсивно исследуется роль провоспалительных факторов [2–6]. Несмотря на очевидные различия природы этих воздействий, они имеют некоторые общие пути влияния на

организм. Стрессоры способны провоцировать нейровоспаление [7], а провоспалительные факторы, в свою очередь, могут активировать центральную для ответа на стрессоры гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальную систему [8–10]. Восприимчивость или устойчивость к развитию депрессии определяется не только действием патогенных стимулов, но и активностью защитных систем организма, что, очевидно, обуславливает значительную индивидуальную вариабельность поведенческих и воспалительных последствий стрессовых воздействий, а также наличие чувствительных и устойчивых в этом плане субпопуляций [11].

Возникновение психиатрических расстройств, таких как депрессия, связывают, в том числе, и с уменьшением количества нейрональных клеток в результате ослабления нейрогенеза, прежде всего, в гиппокампе, либо прямой их гибели в разных отделах мозга [12, 13]. Важную роль в обеспечении жизнеспособности клеток играют нейротрофические факторы [14–16] и антиапоптозные белки [17], которые, как было показано, также могут вовлекаться в формирование устойчивости к провоцирующему симптому психопатологии действию непродолжительного стресса [18]. Сравнение ответов этих защитных систем на разные типы воздействий, индуцирующих депрессию, может быть полезным как для выявления общих и специфических механизмов патофизиологии заболевания, так и понимания путей адаптивной реакции. Целью работы явилось исследование экспрессии мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и антиапоптозного белка Bcl-xL в отделах мозга взрослых самцов крыс после хронических стрессовых и провоспалительного воздействий, способных провоцировать у животных депрессивно-подобное состояние. Среди антиапоптозных белков мы выбрали Bcl-xL, который помимо канонической антиапоптозной функции вовлекается в ряд важных противодействующих нейродегенеративным стимулам процессов, включающих регуляцию биоэнергетической функции митохондрий, формирование синапсов, рециркуляцию синаптических пузырьков и рост нейритов [19].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на взрослых самцах крыс линии Вистар, содержащихся в стандартных условиях вивария ИЦиГ СО РАН при температуре 22–24°C, естественном освещении и свободном доступе к воде и корму в соответствии с принципами Базельской декларации, Международными стандартами по работе с лабораторными животными и рекомендациями комиссии по биоэтике ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”. Было проведено 2 отдельных эксперимента в сходных световых и температурных условиях. Все исследования проводили с 10:00 до 14:00.

В первом эксперименте, в котором были использованы 3 группы по 10 крыс в каждой, животных подвергали двум видам стрессового воздействия. В одной группе это было помещение животных в условия принудительного плавания (в стеклянные цилиндры высотой 46 см и диаметром 20 см, наполненных водой 20°C до 30 см) 1 раз в день на 15 мин в течение 14 последовательных дней. Животных другой стрессовой группы в течение такого же двухнедельного периода ежедневно подвергали одночасовому ограничению подвижности в тесных сетчатых цилиндрах. Контролем служили животные, которых не подвергали стрессовым воздействиям, но так же, как и стрессуемых животных, ежедневно брали в руки.

Для моделирования нейровоспаления в экспериментах на грызунах широко используют липополисахарид (LPS) — компонент клеточной мембраны грамотрицательных бактерий. В течение нескольких часов после однократного введения эндотоксина у взрослых крыс наблюдается достоверное увеличение уровней мРНК

провоспалительных цитокинов в гиппокампе и развитие симптомов депрессивно-подобного состояния [20]. Поскольку психиатрические заболевания, как полагают, являются следствием хронических провоспалительных процессов, в работе для длительной индукции нейровоспаления LPS из *Escherichia coli*, серотип 055:B5 (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, США), согласно опубликованному в литературе протоколу [21], вводили крысам в дозе 0.5 мг/кг 1 раз в 2 дня (7 введений) в течение двух недель. Контрольные животные в этом эксперименте получали соответствующие инъекции физиологического раствора. В каждой из групп было по 8 животных.

У животных после воздействий было оценено потребление сахарозы – тест на ангедонию. Для этого животным был предоставлен выбор между обычной питьевой водой и 1%-ным раствором сахарозы. Потребление сахарозы оценивалось в процентах относительно общего потребления жидкости за сутки.

После окончания стрессовых и провоспалительного воздействий, у животных были определены относительные массы надпочечников (мг/100 г веса тела), а также выделены ствол, средний мозг, гиппокамп и префронтальная кора. Средний мозг включал блок ткани от ростральной границы верхнего колликулуса до ростральной границы моста, ствол мозга – мост и ростральную часть продолговатого мозга до примерно –10.5 мм относительно брегмы. Префронтальная кора выделялась в границах координат от +3.20 до +2.70 мм. В выделенных образцах 5–6 животных каждой группы, выбранных случайным образом, определяли уровни мРНК (ПЦР в реальном времени в технологии TagMan с использованием наборов праймеров/зондов Applied Biosystems, США) мозгового нейротрофического фактора (BDNF; Rn02531967_s1) и антиапоптозного белка Bcl-xL (Rn00437783_m1) на амплификаторе ABI VIIA™ 7 (“Applied Biosystems”, США). Референсным геном служил бета-актин (Rn00667869_m1). Суммарную РНК выделяли одноступенчатым гуанидин-изотиоционатным методом. Уровни транскриптов рассчитывали по методу $\Delta\Delta Ct$ [22].

Полученные данные обрабатывали статистически с помощью однофакторного (фактор–стресс) дисперсионного анализа или *t*-критерия Стьюдента (после введения LPS), а также, для оценки возможной взаимосвязи между защитными и адреснокортикальными ответами, коэффициента корреляции Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Примененные нами воздействия являются для животных стрессовыми, на что указывает повышение относительной массы надпочечников (после LPS – на уровне тенденции), а также индуцирующими у животных депрессивно-подобное состояние, подтверждаемое развитием у животных ангедонии (уменьшением по сравнению с соответствующим контролем, принятым за 100%, процента потребления сахарозы) (табл. 1). Фактическое потребление сахарозы контрольными животными: в стрессовом эксперименте – $69.2 \pm 11.0\%$; с введением эндотоксина – $57.1 \pm 11.7\%$.

При очевидном сходстве этих изменений после разных по природе воздействий (стрессоры, эндотоксин) ответы исследованных защитных систем в отделах мозга демонстрировали как похожие черты, так и специфические особенности (рис. 1А, В). Несмотря на более чем 25%-ное снижение уровня мРНК BDNF (рис. 1А) в стволе после обоих стрессовых воздействий, а также введения LPS, изменения в этом отделе не достигали статистической значимости. После стрессовых воздействий экспрессия мРНК BDNF достоверно ($p < 0.05$) снижалась в среднем мозге и не отличалась от контроля в гиппокампе. После LPS, напротив, экспрессия нейротрофина не была изменена в среднем мозге, но значительно ($p < 0.05$) снижена в гиппокампе. В префронтальной коре после всех воздействий наблюдалось снижение экспрессии мРНК BDNF, достоверное ($p < 0.05$) после стресса принудительного пла-

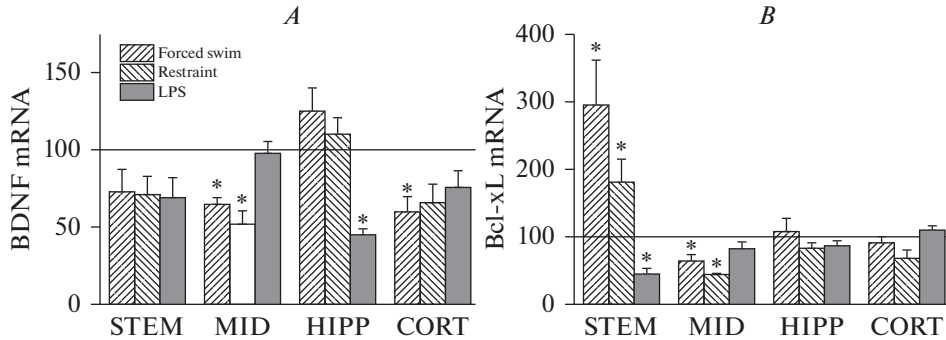


Рис. 1. Уровни мРНК BDNF (A) и Bcl-xL (B) в стволе (STEM), среднем мозге (MID), гиппокампе (HIPP) и коре (CORT) после принудительного плавания (Forced swim), ограничения подвижности (Restraint) или введения липополисахарида (LPS). Данные представлены в процентах к соответствующему контрольному значению, принятому за 100% и показанному на рисунке линией. Звездочками отмечены достоверные различия с соответствующим контролем.

Fig. 1. BDNF (A) and Bcl-xL (B) mRNA levels in the brainstem (STEM), midbrain (MID), hippocampus (HIPP) and cortex (CORT) after forced swimming (Forced swim), mobility restriction (Restraint) or lipopolysaccharide (LPS). The data are presented as a percentage of the corresponding control value, taken as 100% and shown in the figure by a line. Asterisks indicate significant differences with appropriate controls.

вания и на уровне тенденции после стресса ограничения подвижности ($p = 0.07$) и введения LPS ($p = 0.08$).

Уровень мРНК антиапоптозного белка Bcl-xL (рис. 1B) после обоих видов хронических стрессовых воздействий был достоверно ($p < 0.05$) увеличен в стволе мозга, снижен в среднем мозге и не изменен в гиппокампе и фронтальной коре. После воздействия LPS в течение двух недель уровень мРНК Bcl-xL был достоверно ($p < 0.05$) уменьшен в стволе мозга и не изменен в среднем мозге, гиппокампе и префронтальной коре.

С целью оценки возможного вклада активации адренокортикальной функции в изменение экспрессии BDNF и Bcl-xL в отделах мозга были проанализированы корреляции между значениями экспрессии этих параметров и относительной массой надпочечников после примененных воздействий. Единственная достоверная (отрицательная) корреляция была обнаружена между индексом надпочечников и экспрессией Bcl-xL в стволе мозга в эксперименте с двухнедельным введением LPS: $r = -0.66$, $p < 0.05$.

Таблица 1. Изменение массы надпочечников и потребления сахарозы после принудительного плавания, ограничения подвижности или введения липополисахарида (стрелками показано направление изменений, выраженное в процентах по отношению к значениям у соответствующего контроля)

Параметры Parameters	Принудительное плавание Forced swim	Ограничение подвижности Restraint	Липополисахарид LPS
Масса надпочечников, мг/100 г массы тела Adrenals, mg/100 g BW	↑ 33%, $p < 0.01$	↑ 25%, $p < 0.05$	↑ 11%, $p = 0.07$
Потребление сахарозы Sucrose intake	↓ 36%, $p < 0.05$	↓ 43%, $p < 0.05$	↓ 45%, $p < 0.05$

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хронические стрессовые воздействия, такие как принудительное плавание [23, 24] и ограничение подвижности животных [25, 26], а также периферическое введение LPS [21], широко используются для индукции депрессивно-подобного поведения в исследованиях на грызунах. В нашей работе после двухнедельных стрессовых воздействий в соответствии с опубликованными результатами процитированных выше исследований, в которых применяли подобные воздействия в течение 1–3 нед., обнаружено достоверное увеличение массы надпочечников, а также уменьшение потребления сахарозы, являющееся общепринятым показателем развития у животных сопоставимого с клиническим симптомом депрессии ангедонии. Введение LPS в течение двух недель также уменьшало потребление сахарозы и увеличивало массу надпочечников, отмечаемое и другими исследователями [8, 9], что подтверждает активацию эндотоксином аденокортикальной функции, включающей увеличение продукции глюкокортикоидов [27].

Сравнение ответов исследованных защитных систем на стрессовые и провоспалительные воздействия показало после обоих типов воздействий снижение экспрессии BDNF в ряде отделов мозга, эффект, который согласно нейротрофической гипотезе депрессии [12, 28], рассматривается в качестве одной из причин наблюдаемого у животных депрессивно-подобного состояния. Вместе с тем, ответ экспрессии BDNF в отдельных областях зависел от примененного воздействия. Если в коре наблюдалось единообразие ответа, то в среднем мозге уровень BDNF был снижен после стрессовых воздействий и не изменен после LPS, а в гиппокампе, напротив, обнаружено отсутствие отличий от контроля после стрессовых воздействий, но выраженное снижение после LPS. Снижение экспрессии BDNF в коре, достоверное после стресса принудительного плавания и на уровне тенденции после более мягкого стресса ограничения подвижности животных, а также введения LPS, сходное с наблюдениями и других авторов, может указывать на особое значение этого эффекта как фактора риска депрессии и в условиях стресса и воспаления. Хотя подобное заключение, безусловно, требует дополнительных специальных исследований, определенным подтверждением такой возможности может служить достоверная отрицательная корреляция, выявленная между уровнем BDNF во фронтальной коре и таким общепринятым оценочным показателем депрессивно-подобного поведения в тесте принудительного плавания, как продолжительность замирания [29]. Однако достоверное, в отличие от коры, снижение экспрессии BDNF в гиппокампе после LPS может указывать на больший вклад этого изменения в индукцию депрессивно-подобного поведения в условиях воспаления. Например, увеличение продолжительности пассивного поведения в тесте принудительного плавания после центрального введения LPS крысам ассоциировалось со снижением экспрессии BDNF именно в гиппокампе [30].

В рамках нейротрофической гипотезы основные усилия по выяснению роли вызываемых стрессом изменений длительное время были нацелены на BDNF гиппокампа. Однако поскольку направленное снижение экспрессии нейротрофина в гиппокампе не всегда индуцировало симптомы депрессии [31], был сделан вывод, что само по себе снижение экспрессии BDNF в этой структуре не является определяющей причиной психопатологии. Непродолжительный стресс, в том числе и стресс принудительного плавания [18], вызывает, как правило, быстрое снижение экспрессии BDNF в гиппокампе, эффект, который, однако, не наблюдался после двухнедельного воздействия. Отсутствие изменений в экспрессии BDNF в гиппокампе, отмечаемое в работах и других авторов [32], а также наблюдаемое в некоторых случаях даже увеличение экспрессии нейротрофина в этой структуре [33–35] после хронических стрессовых воздействий, индуцирующих депрессивно-подоб-

ное состояние, очевидно, являются элементами защитного ответа против негативных центральных эффектов стресса. Еще одним проявлением механизма защитного ответа на стресс может быть обнаруженное в нашей работе выраженное увеличение экспрессии антиапоптозного белка Bcl-xL в стволе мозга. Хронический стресс, индуцирующий депрессию, может повышать предрасположенность некоторых нейронов к гибели путем апоптоза [36]. Поэтому активация антиапоптозной функции была одновременно предложена двумя независимыми группами исследователей в качестве потенциальной терапевтической стратегии уменьшения апоптотической активности и ослабления симптомов депрессии [37, 38].

Важный вклад в психоэмоциональные эффекты стресса и LPS, помимо сходного после обоих типов воздействий снижения экспрессии BDNF в коре, может вносить уменьшение экспрессии антиапоптозного белка Bcl-xL в областях мозга, где локализованы клеточные тела моноаминергических нейронов. Так, в среднем мозге вместе с Bcl-xL, осуществляющим ряд внутриклеточных аспектов действия BDNF, обнаружено также снижение экспрессии и самого нейротрофина. После введения LPS экспрессия Bcl-xL была значительно снижена в стволе мозга. Одним из последствий этих изменений может быть ослабление локализованной в среднем мозге и стволе активности серотонинергической системы – наиболее тесно связываемой с про- и антидепрессивными эффектами [13]. Например, на ослабление серотонинергической активности после введения LPS в той же дозе и том же режиме, что и в данной работе, указывает уменьшение содержания серотонина в префронтальной коре и гиппокампе, иннервируемых нейронами среднего мозга и ствола [20].

В основе сходных и специфических ответов BDNF и Bcl-xL на стресс и LPS в отделах мозга могут лежать сложные взаимодействия между провоспалительными и аденокортикальными ответами. Оба типа воздействий повышают экспрессию провоспалительных цитокинов в отделах мозга [7, 21], и, как уже обсуждалось, способны активировать гипоталамо-гипофизарно-аденокортикальную систему, на что в нашей работе указывают повышенные массы надпочечников. Вместе с тем, какой механизм или оба ответственные за выявленные изменения экспрессии нейротрофина и антиапоптозного белка в той или иной структуре, остается неясным. Достоверная отрицательная корреляция между массой надпочечников и экспрессией Bcl-xL в стволе мозга в эксперименте с двухнедельным введением LPS указывает на возможный вклад в механизм снижения экспрессии антиапоптозного белка в этой структуре активации аденокортикального комплекса в условиях стимуляции иммунной системы.

В целом экспрессии мРНК BDNF и Bcl-xL в отделах мозга в ответ на стрессоры и LPS демонстрировали как однотипные, так и специфические изменения. Эти ответы могут отражать особенности путей индукции психоэмоциональной патологии стрессом и активацией воспаления, включающих изменения нейрональной пластичности.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания (проекты № 0324-2019-0041-С-01 и № 0259-2019-0003-С-01) и при поддержке РФФИ (проект № 18-015-00082).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Stepanichev M., Dygalo N.N., Grigoryan G., Shishkina G.T., Gulyaeva N.* Rodent models of depression: neurotrophic and neuroinflammatory biomarkers. *Biomed. Res. Int.* 2014; 932757. 2014.
2. *Dantzer R.* Cytokine, sickness behavior, and depression. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 29: 247–264. 2009.

3. Adzic M., Brkic Z., Mitic M., Francija E., Jovicic M.J., Radulovic J., Maric N.P. Therapeutic Strategies for Treatment of Inflammation-related Depression. *Curr. Neuropharmacol.* 16: 176–209. 2018.
4. Leonard B.E. Inflammation and depression: a causal or coincidental link to the pathophysiology? *Acta Neuropsychiatr.* 30: 1–16. 2018.
5. Liu C.H., Zhang G.Z., Li B., Li M., Woelfer M., Walter M., Wang L. Role of inflammation in depression relapse. *J. Neuroinflamm.* 16: 90. 2019.
6. Lasselín J. Is inflammation-associated depression atypical depression? *Brain Behav. Immun.* 2020. [Epub ahead of print].
7. Slavich G.M., Way B.M., Eisenberger N.I., Taylor S.E. Neural sensitivity to social rejection is associated with inflammatory responses to social stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 14817–14822. 2010.
8. Takemura T., Makino S., Takao T., Asaba K., Suemaru S., Hashimoto K. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical responses to single vs. repeated endotoxin lipopolysaccharide administration in the rat. *Brain Res.* 767: 181–191. 1997.
9. Grinevich V., Ma X.M., Herman J.P., Jezova D., Akmayev I., Aguilera G. Effect of repeated lipopolysaccharide administration on tissue cytokine expression and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in rats. *J. Neuroendocrinol.* 13: 711–723. 2001.
10. Elgarf A.S., Aboul-Fotouh S., Abd-Alkhalak H.A., El Tabbal M., Hassan A.N., Kassim S.K., Hammouda G.A., Farrag K.A., Abdel-tawab A.M. Lipopolysaccharide repeated challenge followed by chronic mild stress protocol introduces a combined model of depression in rats: reversibility by imipramine and pentoxifylline. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 126: 152–162. 2014.
11. Finnell J.E., Wood S.K. Putative Inflammatory Sensitive Mechanisms Underlying Risk or Resilience to Social Stress. *Front. Behav. Neurosci.* 12: 240. 2018.
12. Duman R.S., Monteggia L.M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol. Psychiatry.* 59: 1116–1127. 2006.
13. Krishnan V., Nestler E.J. The molecular neurobiology of depression. *Nature.* 455: 894–902. 2008.
14. Sairanen M., Lucas G., Ernfors P., Castrén M., Castrén E. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J. Neurosci.* 25: 1089–1094. 2005.
15. Gulyaeva N.V. Molecular Mechanisms of Neuroplasticity: An Expanding Universe. *Biochemistry (Mosc).* 82: 237–242. 2017.
16. Wurzelmann M., Romeika J., Sun D. Therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and a small molecular mimics of BDNF for traumatic brain injury. *Neural. Regen. Res.* 12: 7–12. 2017.
17. Youle R.J., Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 47–59. 2008.
18. Shishkina G.T., Kalinina T.S., Berezova I.V., Bulygina V.V., Dygalo N.N. Resistance to the development of stress-induced behavioral despair in the forced swim test associated with elevated hippocampal Bcl-xl expression. *Behav. Brain Res.* 213: 218–224. 2010.
19. Jonas E.A., Porter G.A., Alavian K.N. Bcl-xL in neuroprotection and plasticity. *Front. Physiol.* 5: 355. 2014.
20. Fulenwider H.D., Smith B.M., Nichenko A.S., Carpenter J.M., Nennig S.E., Cheng K., Rice K.C., Shank J.R. Cellular and behavioral effects of lipopolysaccharide treatment are dependent upon neurokinin-1 receptor activation. *J. Neuroinflamm.* 15: 60. 2018.
21. Dang R., Zhou X., Tang M., Xu P., Gong X., Liu Y., Jiao H., Jiang P. Fish oil supplementation attenuates neuroinflammation and alleviates depressive-like behavior in rats submitted to repeated lipopolysaccharide. *Eur. J. Nutr.* 57: 893–906. 2018.
22. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)). *Method. Methods.* 25(4): 402–408. 2001.
23. Dal-Zotto S., Martí O., Armario A. Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. *Behav. Brain Res.* 114: 175–181. 2000.
24. Guan X.T., Lin W.J., Tang M.M. Comparison of stress-induced and LPS-induced depressive-like behaviors and the alterations of central proinflammatory cytokines mRNA in rats. *Psych. J.* 4: 113–122. 2015.
25. Chiba S., Numakawa T., Ninomiya M., Richards M.C., Wakabayashi C., Kunugi H. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Prog. Neuropsychopharmacol. Psychiatry.* 39: 112–119. 2012.
26. Ampuero E., Luarte A., Santibañez M., Varas-Godoy M., Toledo J., Diaz-Veliz G., Cavada G., Rubio F.J., Wyncken U. Two Chronic Stress Models Based on Movement Restriction in Rats Respond Selectively to Antidepressant Drugs: Aldolase C As a Potential Biomarker. *Int. J. Neuropharmacol.* 18: pyv038. 2015.

27. *Martinez C.C., Astort F., Di Gruccio J.M., Repetto E.M., Mercau M., Giordanino E., Sanchez R., Pignataro O., Arias P., Cymeryng C.B.* Lipopolysaccharide stimulates adrenal steroidogenesis in rodent cells by a NF κ B-dependent mechanism involving COX-2 activation. *Mol. Cell Endocrinol.* 337: 1–6. 2011.
28. *Duman R.S., Deyama S., Fogaça M.V.* Role of BDNF in the pathophysiology and treatment of depression: Activity-dependent effects distinguish rapid-acting antidepressants. *Eur. J. Neurosci.* 2019. [Epub ahead of print].
29. *Borsoi M., Antonio C.B., Viana A.F., Nardin P., Gonçalves C.A., Rates S.M.* Immobility behavior during the forced swim test correlates with BDNF levels in the frontal cortex, but not with cognitive impairments. *Physiol. Behav.* 140: 79–88. 2015.
30. *Hritcu L., Gorgan L.D.* Intranigral lipopolysaccharide induced anxiety and depression by altered BDNF mRNA expression in rat hippocampus. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 51: 126–132. 2014.
31. *Adachi M., Barrot M., Autry A.E., Theobald D., Monteggia L.M.* Selective loss of brain-derived neurotrophic factor in the dentate gyrus attenuates antidepressant efficacy. *Biol. Psychiatry.* 63: 642–649. 2008.
32. *Allaman I., Papp M., Kraftsik R., Fiumelli H., Magistretti P.J., Martin J.L.* Expression of brain-derived neurotrophic factor is not modulated by chronic mild stress in the rat hippocampus and amygdala. *Pharmacol. Rep.* 60: 1001–1007. 2008.
33. *Naert G., Ixart G., Maurice T., Tapia-Arancibia L., Givalois L.* Brain-derived neurotrophic factor and hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptation processes in a depressive-like state induced by chronic restraint stress. *Mol. Cell. Neurosci.* 46: 55–66. 2011.
34. *Charoenphandhu N., Nuntapornsak A., Wongdee K., Krishnamra N., Charoenphandhu J.* Upregulated mRNA levels of SERT, NET, MAO B , and BDNF in various brain regions of ovariectomized rats exposed to chronic aversive stimuli. *Mol. Cell. Biochem.* 375: 49–58. 2013.
35. *Scotton E., Colombo R., Reis J.C., Possebon G.M.P., Hizo G.H., Valiati F.E., Géa L.P., Bristol G., Salvador M., Silva T.M., Guerra A.E., Lopes T.F., Rosa A.R., Kunz M.* BDNF prevents central oxidative damage in a chronic unpredictable mild stress model: The possible role of PRDX-1 in anhedonic behavior. *Behav. Brain Res.* 378: 112245. 2020.
36. *McKernan D.P., Dinan T.G., Cryan J.F.* “Killing the Blues”: a role for cellular suicide (apoptosis) in depression and the antidepressant response? *Prog. Neurobiol.* 88: 246–263. 2009.
37. *Dygalo N.N., Kalinina T.S., Bulygina V.V., Shishkina G.T.* Increased expression of the anti-apoptotic protein Bcl-xL in the brain is associated with resilience to stress-induced depression-like behavior. *Cell. Mol. Neurobiol.* 32: 767–776. 2012.
38. *Malkesman O., Austin D.R., Tragon T., Henter I.D., Reed J.C., Pellecchia M., Chen G., Manji H.K.* Targeting the BH3-interacting domain death agonist to develop mechanistically unique antidepressants. *Mol. Psychiatry.* 17: 770–780. 2012.

Features of the Responses of Protective Systems in the Brain of Adult Rats to Stressors and Lipopolysaccharide

N. P. Komysheva^a, G. T. Shishkina^a, *, T. S. Kalinina^a, and N. N. Dygalov^a

^a*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

**e-mail: gtshi@bionet.nsc.ru*

Susceptibility or resistance to the development of depression is determined by the action of provoking stimuli, including stressors and inflammatory processes, as well as the activity of the organism's protective systems, for example, neurotrophins and anti-apoptotic proteins. To compare the influence of stressful and pro-inflammatory exposures that induce a depressive-like state on these protective mechanisms, we examined the levels of mRNAs for the brain neurotrophic factor (BDNF) and anti-apoptotic protein Bcl-xL in the brain regions of adult male rats after administration of stressful (forced swimming or limited mobility) or pro-inflammatory (administration of lipopolysaccharide, LPS) factors during 14-days. Both stressors reduced the expression of BDNF in the midbrain and in the cortex: swimming – significantly, limitation of mobility – at the level of the trend. After LPS, BDNF mRNA levels were significantly decreased in the hippocampus, but not in the midbrain, the area of the stress effect. Both stressors increased the level of Bcl-xL mRNA in the brainstem, but reduced it in the midbrain and did not affect it in other structures. LPS did not affect the expression of Bcl-xL in most brain regions, but reduced it in the brainstem, in which the level of this transcript was negatively correlated

with the adrenal gland index. The data suggest that stressful and pro-inflammatory exposures induced changes in Bcl-xL expression that were unique for each of them and even opposite in direction (in the brainstem). The pro-depressive effect of both LPS and stressors was associated with a decrease in BDNF expression, which was localized in brain region specific for each of these types of effects: for LPS in the hippocampus and for stressors in the midbrain and prefrontal cortex. The revealed features of the responses of BDNF and Bcl-xL indicate significant differences in the pathways of inducing psycho-emotional pathology by stress and activation of inflammation.

Keywords: stress, lipopolysaccharide, brain-derived neurotrophic factor, anti-apoptotic protein Bcl-xL, brain, sucrose intake, adrenal gland weight

ЦИТИРОВАТЬ:

Комышева Н.П., Шишкина Г.Т., Калинина Т.С., Дыгало Н.Н. Особенности ответов защитных систем мозга взрослых крыс на стрессоры и липополисахарид. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(6): 756–764.

DOI: 10.31857/S0869813920060059

TO CITE THIS ARTICLE:

Komyшева N.P., Shishkina G.T., Kalinina T.S., Dygalo N.N. Features of the Responses of Protective Systems in the Brain of Adult Rats to Stressors and Lipopolysaccharide. Russian Journal of Physiology. 106(6): 756–764.

DOI: 10.31857/S0869813920060059

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**КОГНИТИВНАЯ ДИСФУНКЦИЯ У ПОТОМСТВА КРЫС
С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ НА РАННИХ И ПОЗДНИХ
ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА И ЕЕ КОРРЕКЦИЯ ПРОИЗВОДНЫМИ ГАМК**

© 2020 г. Е. А. Музыко^{1, *}, Г. А. Ткачева², В. Н. Перфилова¹, К. В. Суворин¹,
А. А. Нестерова¹, И. Н. Тюренков¹

¹*Волгоградский государственный медицинский университет Минздрава России,
Волгоград, Россия*

²*Волгоградский государственный социально-педагогический университет,
Волгоград, Россия*

**e-mail: muzyko.elena@mail.ru*

Поступила в редакцию 02.03.2020 г.
После доработки 10.03.2020 г.
Принята к публикации 03.04.2020 г.

В статье изучены когнитивные нарушения в различные периоды онтогенеза у потомства крыс с экспериментальной преэклампсией, смоделированной путем замены питьевой воды на 1.8%-ный раствор хлорида натрия с 1-го по 21-й день гестации. У потомства самок с осложненной беременностью как на ранних (40 дней и 3 мес.), так и на более поздних (6 и 12 мес.) этапах индивидуального развития наблюдается снижение рабочей памяти в тесте Распознавание нового объекта, ухудшение формирования и сохранения памятного следа в тесте Условный рефлекс пассивного избегания, а также более выраженный амнезирующий эффект скополамина в дозе 1.75 мг/кг при тестировании сохранности памятного следа. Пероральное введение в пубертатном возрасте (с 40-го по 70-й день жизни) потомству самок с экспериментальной преэклампсией производных ГАМК: сукцикарда, салифена, фенибута и препарата сравнения пантогама способствует уменьшению когнитивного дефицита у животных в разные периоды постнатального развития.

Ключевые слова: экспериментальная преэклампсия, потомство, производные ГАМК, когнитивная дисфункция

DOI: 10.31857/S0869813920060084

Преэклампсия — специфичное для беременности заболевание, сопряженное с высокой частотой возникновения осложнений как у матери, так и у ребенка на разных этапах жизни.

Ухудшение маточно-плацентарного кровотока при преэклампсии из-за абнормальной плацентации и эндотелиальной дисфункции ведет к гипоксии, хроническое влияние которой провоцирует образование активных форм кислорода, повреждающих нейроны коры и других структур головного мозга. Следствием этого являются нарушения формирования памяти, познавательных процессов и двигательных навыков у потомства [1–3].

Принятые сокращения: ГАМК — гамма-аминомасляная кислота; АД — артериальное давление; УРПИ — условный рефлекс пассивного избегания; Кд — коэффициент дискриминации; ЦНС — центральная нервная система; АТФ — аденозинтрифосфат.

У детей, рожденных матерями с преэклампсией, повышен риск возникновения гипертонии, инсульта и когнитивных нарушений [4]. В раннем возрасте у них наблюдается дефицит развития речи [5], а также более низкий уровень коэффициента интеллекта [6] и индекса умственного развития по сравнению с детьми, рожденными здоровыми матерями [7].

По достижении подросткового периода и во взрослой жизни сохраняется дефицит словесно-логического мышления и устного счета [8]. У таких детей в зрелом возрасте и в старости повышается риск развития депрессивных состояний и вероятность ранних дементных нарушений [9].

Гипоксические поражения головного мозга могут вызвать снижение активности холинергической системы. Изменение экспрессии и метаболизма ее ключевого фермента ацетилхолинэстеразы приводит к когнитивной дисфункции в раннем возрасте и развитию нейродегенеративных изменений в более поздние периоды онтогенеза [10].

На настоящий момент нет лекарственных средств с доказанной эффективностью для лечения постгипоксических нарушений у детей в ранние и поздние сроки онтогенеза, недостаточно внимания уделяется проблемам и перспективам поиска новых эффективных и безопасных лекарственных препаратов для коррекции отклонений у потомства, рожденного матерями с преэклампсией. В этом аспекте интерес представляют производные гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), обладающие ноотропными, нейро- и эндотелиопротекторными, антигипоксическими и антиоксидантными эффектами [11–13], способностью регулировать пролиферацию и созревание нейрональных клеток [14]. Перечисленные эффекты веществ этой группы дают основание предполагать возможность влияния их на различные патогенетические звенья постгипоксических осложнений у детей. В ранее проведенных исследованиях было показано, что салифен (аддукт γ -амино- β -фенилмасляной и салициловой кислот) устранял нарушения поведения в пре- и пубертатном периодах у крысят, подвергнутых на второй день после рождения гипоксическому воздействию [13]. В этой связи целью нашего исследования явилось изучение влияния курсового введения производных ГАМК: сукцикарда, салифена, фенибута и препарата сравнения пантогама в пубертатном периоде (с 40-го по 70-й день жизни) на когнитивные функции потомства крыс с экспериментальной преэклампсией в ближайшие и отдаленные периоды онтогенеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эксперименты выполнены на потомстве ($n = 442$) в возрасте 40 дней, 3, 6 и 12 мес., рожденном белыми беспородными крысами-самками массой 230–250 г с физиологической беременностью ($n = 13$) и экспериментальной преэклампсией ($n = 65$), которую моделировали заменой питьевой воды на 1.8%-ный раствор хлорида натрия с 1-го по 21-й день гестации [11]. Животные были получены из ФГУП “Питомник лабораторных животных Рапполово” (Ленинградская область) и содержались в условиях вивария ВолГМУ. Содержание и уход за ними осуществляли согласно рекомендациям национального стандарта Российской Федерации ГОСТ Р-33044-2014 “Принципы надлежащей лабораторной практики”, Международных рекомендаций “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях” (The European Convention, 1986). Исследование было выполнено в соответствии с требованиями приказа МЗ РФ № 199н от 01.04.2016 г. “Об утверждении правил лабораторной практики” и директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Протокол экспериментального исследования был одобрен Региональным Исследо-

вательским Этическим Комитетом Волгоградской области: № 2044-2017 от 25 декабря 2017 г.

О развитии экспериментальной преэклампсии у самок судили по увеличению артериального давления (АД) и белка в моче на 20-й день беременности по сравнению с 1-ым днем. Измерение АД проводили у самок в 1-й и 20-й дни гестации с помощью прибора неинвазивного измерения давления CODA™ Non-Invasive Blood Pressure System (“Kent Scientific Corporation”, США). Для сбора суточной мочи крыс-самок помещали в метаболическую клетку (Nalgene, Италия). При определении общего белка в моче использовали набор реагентов КлиниТест-БМ ПГК (Эко-сервис, Россия).

На 39-й день после рождения потомство отсаживали от самок и распределяли таким образом, чтобы крысята от одной самки с экспериментальной преэклампсией оказались в разных группах.

Эксперимент носил двухэтапный характер. На первом этапе животных разделили на две группы: 1 – позитивный контроль – потомство (самцы и самки) от крыс без экспериментальной преэклампсии ($n = 41$); 2 – негативный контроль – потомство (самцы и самки) от крыс с экспериментальной преэклампсией ($n = 40$). Затем на 40-ой день для оценки рабочей памяти проводили тест Распознавание нового объекта.

Выявленные нарушения рабочей памяти у потомства от самок с экспериментальной преэклампсией послужили основой для проведения второго этапа исследования, где были сформированы следующие группы животных: 1-я позитивный контроль – потомство (самцы и самки) от крыс без экспериментальной преэклампсии ($n = 59$), получавшее дистиллированную воду; 2 – негативный контроль – потомство (самцы и самки) от крыс с экспериментальной преэклампсией ($n = 60$), получавшее дистиллированную воду; 3-я, 4-я, 5-я, 6-я опытные – потомство (самцы и самки) от крыс с экспериментальной преэклампсией, получавшее производные ГАМК – сукцикард в дозе 22 мг/кг ($n = 59$), салифен – 7.5 мг/кг ($n = 62$), фенибут – 25 мг/кг ($n = 61$), а также препарат сравнения пантогам 50 мг ($n = 60$) соответственно. Исследуемые производные ГАМК и дистиллированную воду вводили перорально один раз в сутки с 40-го по 70-й день постнатального периода в одно и то же время. Дозы веществ соответствовали $\frac{1}{2}$ от используемых у взрослых крыс, проявляющих максимально выраженную фармакологическую активность в ранее проведенных экспериментах [15, 16]. Пантогам был выбран в качестве препарата сравнения, потому что показаниями к применению его у детей являются детский церебральный паралич, перинатальная энцефалопатия, умственная отсталость различной степени тяжести, нарушения психологического статуса в виде общей задержки психического развития, специфические расстройства речи и двигательных функций или их сочетания, затруднение формирования навыков чтения, письма, счета.

После проведенного “лечения” у потомства в возрасте 3, 6 и 12 мес. оценивали рабочую память в тесте Распознавание нового объекта в следующем варианте: тест проводили в установке Открытое поле, для этого животных предварительно помещали в установку на 3 мин, что способствовало привыканию к ней и снижению стрессорного воздействия на поведение крыс. В качестве объектов использовали два металлических цилиндра белого цвета и один цилиндр синего цвета. Они имели одинаковый размер ($d = 6$ см, $h = 11$ см) и массу (385 г). В первую фазу “Ознакомления” крысы изучали два одинаковых незнакомых объекта (белые цилиндры) в течение 4 мин, при этом регистрировалось время исследования каждого из них. Затем на 3 мин крысу помещали в индивидуальную клетку. Во вторую фазу “Тестовую” объект 2 меняли на другой, одинаковый по форме, но различающийся по цвету (синий). После этого 4 мин регистрировали время исследования знакомого и новых объектов. Перед началом теста для каждой последующей крысы установку

и цилиндры протирали спиртом для уничтожения меток и запаха, оставленных предыдущим животным. Для оценки рабочей памяти и исследовательской активности крыс использовали коэффициент дискриминации (Кд), отражающий разницу между временем исследования двух объектов по отношению к суммарному времени их исследования. Увеличение Кд расценивали как повышение уровня когнитивных процессов. Кд рассчитывали для каждой фазы отдельно по формулам:

$$\text{Кд} = \frac{\text{Время (Объект 2)} - \text{Время (Объект 1)}}{\text{Время (Объект 2)} + \text{Время (Объект 1)}},$$

для фазы "Ознакомления",

$$\text{Кд} = \frac{\text{Время (ОбъектНовый)} - \text{Время (ОбъектЗнакомый)}}{\text{Время (ОбъектНовый)} + \text{Время (ОбъектЗнакомый)}},$$

для "Тестовой" фазы.

Если крыса в "Тестовую" фазу не проявляла интереса ни к одному объекту, то ее относили к животным с отсутствием исследовательской активности.

Затем группы животных разделяли на 2 подгруппы, одной из которых оценивали долговременную память (формирование и сохранение памятного следа) в тесте УРПИ в возрасте 3, 6 и 12 мес., а другой – состояние холинергической системы в аналогичные возрастные периоды.

В УРПИ тестировались животные группы позитивного контроля ($n = 38$), негативного контроля ($n = 41$), опытные: 3-я группа ($n = 36$), 4-я ($n = 37$), 5-я ($n = 38$) и 6-я ($n = 40$).

Установка для обучения УРПИ состояла из двух отсеков, сообщающихся между собой: темного с электрифицированным полом и светлого. Животных по одному помещали в светлую камеру хвостом к входному отверстию в темную камеру. Крысы, в силу норкового рефлекса, имея возможность покинуть менее комфортную светлую камеру, заходили в темный отсек, после чего животное закрывали и в течение 10 с наносили электрошоковое раздражение (10 ударов током, сила тока 0.45 мА). Оценку сформировавшегося памятного следа производили через 24 ч после сеанса обучения, а сохранность его на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сут после обучения. Крысу помещали в установку и в течение 180 с регистрировали латентный период первого захода в темную камеру, который является показателем выработки памятного следа, и количество животных от общего числа каждой исследуемой группы, зашедших в нее, в процентах. В день воспроизведения навыка при заходе животного в темную камеру болевое раздражение не наносили [17].

Холинергическая система играет важную роль в регуляции внимания, временной и эксплицитной памяти, обучении и других когнитивных процессов [18]. Для оценки состояния холинергической системы использовали модель скополаминового амнезии. После обучения УРПИ животным внутрибрюшинно вводили антагонист М-холинорецепторов – скополамин (Across, США) в дозе 1.75 мг/кг за 16 ч перед 1-ым, 3-им, 7-ым, 14-ым и 21-ми днями воспроизведения навыка и на 1-е, 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сут проверяли сохранность рефлекса пассивного избегания. Доза скополамина была выбрана в соответствии с ранее проведенными исследованиями [19]. В эксперименте участвовало потомство группы позитивного ($n = 20$), и негативного контроля ($n = 20$), животные опытных групп: 3-ей ($n = 22$), 4-ой ($n = 22$), 5-ой ($n = 21$) и 6-ой ($n = 20$).

Для регистрации поведения животных применялись видеокамеры, подключенные к персональному компьютеру с программным обеспечением для работы с видеопотоком.

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли в пакете программ STATISTICA v.6.0 (StatSoft Inc., США) по U-критерию Манна–Уитни, F-критерии

рию Фишера для парных сравнений и критерию Крускала–Уоллиса с пост-тестом Даннета для множественных, с предварительной проверкой выборок на нормальность распределения по критерию Шапиро–Уилка. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У крыс, которым моделировали экспериментальную преэклампсию, АД на 20-й день гестации было выше в 1.2 раза ($p < 0.05$) по сравнению с 1-ым днем, а уровень суточного белка – в 2.1 раза ($p < 0.05$), в то время как у здоровых самок АД и уровень белка в моче к 20-му дню беременности существенно не изменились. Это дало основание считать, что у самок, получавших солевой раствор, развивалась экспериментальная преэклампсия.

В тесте Распознавание нового объекта у сорокадневного потомства крыс с экспериментальной преэклампсией показатели рабочей памяти были ниже, чем у животных, рожденных здоровыми самками (табл. 1). В “Тестовой” фазе у крысят от самок с экспериментальной преэклампсией Кд носил отрицательный характер, что говорит о пониженном интересе к новому объекту в знакомой обстановке и когнитивных расстройств в подростковом периоде. В этой связи на втором этапе исследования были сформированы группы потомства крыс с экспериментальной преэклампсией, которым с 40-го по 70-й день жизни вводили производные ГАМК и препарат сравнения пантогам.

В возрасте 3 мес. животные всех групп в фазе “Ознакомления” не отдавали предпочтение какому-либо одному объекту, а в 6 и 12 мес. чуть более часто интересовались Объектом 2, однако достоверных отличий между группами выявлено не было.

В “Тестовой” фазе у крыс, рожденных самками с осложненной беременностью как на ранних (3 мес.), так и на более поздних (6 и 12 мес.) этапах онтогенеза Кд был достоверно ниже, чем у группы позитивного контроля, что свидетельствует об ухудшении у потомства крыс с экспериментальной преэклампсией кратковременной рабочей памяти. Кроме того, в возрасте 3, 6 и 12 мес. процент животных, не проявлявших исследовательской активности и не подходивших ни к одному объекту, в группе негативного контроля был выше по сравнению с потомством, рожденным здоровыми самками. У животных всех возрастов, получавших производные ГАМК и препарат сравнения пантогам, Кд был достоверно выше относительно потомства группы негативного контроля (табл. 1). Это свидетельствует о том, что рабочая память у животных, которым вводили сукцикард, салифен, фенибут и препарат сравнения пантогам, была лучше, чем у крыс группы негативного контроля как на ранних, так и на поздних этапах индивидуального развития.

При проведении теста УРПИ трехмесячные крысята группы негативного контроля быстрее заходили в темную камеру по сравнению с животными, рожденными от самок без экспериментальной преэклампсии на 7-е, 14-е и 21-е сут после обучения, а процент животных, зашедших в нее на 21-е сут был значительно больше, чем у потомства группы позитивного контроля (рис. 1).

Шестимесячные животные группы негативного контроля в большем количестве заходили в темную камеру и имели меньший по сравнению с группой позитивного контроля латентный период захода в нее на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сут воспроизведения навыка (рис. 2). Следует отметить, что в возрасте 6 мес. среди потомства здоровых крыс обучилось всего 4 животных из 36, и обучившиеся не заходили в темную камеру во все дни воспроизведения навыка, в то время как 11 обучившихся (из 38) крыс из группы негативного контроля посетили ее на 3-и сут тестирования сохранности рефлекса. Подобное снижение обучаемости можно объяснить тем, что большее количество крыс группы позитивного контроля помнило о болевом раздраже-

Таблица 1. Влияние производных ГАМК на рабочую память потомства от крыс с экспериментальной преэклампсией в разные периоды онтогенеза в тесте Распознавание нового объекта ($M \pm m$)

Table 1. The effect of GABA derivatives on the working memory of the offspring from rats with experimental preeclampsia in different periods of ontogenesis in the Novel object recognition test ($M \pm m$)

Возраст Age	Группы животных Groups of animals	n	Фаза “Ознакомления” “Familiarization” phase	“Тестовая” фаза “Test” phase	
			Коэффициент дискриминации Discrimination ratio ($M \pm m$)	Коэффициент дискриминации Discrimination ratio ($M \pm m$)	Доля особей с отсутствием исследовательской активности The part of rats with lack of research activity (%)
40 дней 40 days	Потомство от самок с физиологической беременностью – позитивный контроль The offspring from rats with physiological pregnancy – positive control	41	-0.04 ± 0.06	0.36 ± 0.07	0
	Потомство от самок с экспериментальной преэклампсией – негативный контроль The offspring from rats with experimental preeclampsia – negative control	40	-0.03 ± 0.07	$-0.01 \pm 0.08^*$	0
3 месяца 3 months	Потомство от самок с физиологической беременностью, получавшее дистиллированную воду – позитивный контроль The offspring from rats with physiological pregnancy receiving distilled water – positive control	59	0.01 ± 0.06	0.47 ± 0.05	3.39
	Потомство от самок с экспериментальной преэклампсией, получавшее дистиллированную воду – негативный контроль The offspring from rats with experimental preeclampsia receiving distilled water – negative control	60	-0.07 ± 0.06	$-0.04 \pm 0.06^*$	5
	Потомство от самок с экспериментальной преэклампсией, получавшее сукцикард 22 мг/кг The offspring from rats with experimental preeclampsia receiving succicard 22 mg/kg	59	-0.18 ± 0.05	$0.32 \pm 0.05\#$	1.69
	Потомство от самок с экспериментальной преэклампсией, получавшее салифен 7.5 мг/кг The offspring from rats with experimental preeclampsia receiving salifen 7.5 mg/kg	62	0.03 ± 0.05	$0.52 \pm 0.04\#$	1.61
	Потомство от самок с экспериментальной преэклампсией, получавшее фенибут 25 мг/кг The offspring from rats with experimental preeclampsia receiving phenibut 25 mg/kg	61	-0.07 ± 0.05	$0.33 \pm 0.06\#$	1.64
	Потомство от самок с экспериментальной преэклампсией, получавшее пантогам 50 мг The offspring from rats with experimental preeclampsia receiving pantogam 50 mg	60	-0.04 ± 0.05	$0.32 \pm 0.05\#$	5

Таблица 1. Продолжение/ Table 1. Continuation

Возраст Age	Группы животных Groups of animals	n	Фаза “Ознакомления” “Familiarization” phase	“Тестовая” фаза “Test” phase	
			Коэффициент дискриминации Discrimination ratio ($M \pm m$)	Коэффициент дискриминации Discrimination ratio ($M \pm m$)	Доля особей с отсутствием исследовательской активности The part of rats with lack of research activity (%)
6 месяцев 6 months	Потомство от самок с физиологической беременностью, получавшее дистиллированную воду – позитивный контроль The offspring from rats with physiological pregnancy receiving distilled water – positive control	57	0.09 ± 0.06	0.54 ± 0.04	0
	Потомство от самок с экспериментальной преэклампсией, получавшее дистиллированную воду – негативный контроль The offspring from rats with experimental preeclampsia receiving distilled water – negative control	59	0.006 ± 0.05	-0.06 ± 0.05*	3.34
	Потомство от самок с экспериментальной преэклампсией, получавшее сукцикард 22 мг/кг The offspring from rats with experimental preeclampsia receiving succicard 22 mg/kg	56	0.15 ± 0.05	0.41 ± 0.05#	1.79
	Потомство от самок с экспериментальной преэклампсией, получавшее салифен 7.5 мг/кг The offspring from rats with experimental preeclampsia receiving salifen 7,5 mg/kg	55	0.09 ± 0.07	0.43 ± 0.05#	0
	Потомство от самок с экспериментальной преэклампсией, получавшее фенибут 25 мг/кг The offspring from rats with experimental preeclampsia receiving phenibut 25 mg/kg	58	0.07 ± 0.05	0.47 ± 0.05#	0
	Потомство от самок с экспериментальной преэклампсией, получавшее пантогам 50 мг The offspring from rats with experimental preeclampsia receiving pantogam 50 mg	59	0.08 ± 0.05	0.50 ± 0.04#	0
12 месяцев 12 months	Потомство от самок с физиологической беременностью, получавшее дистиллированную воду – позитивный контроль The offspring from rats with physiological pregnancy receiving distilled water – positive control	54	0.14 ± 0.07	0.36 ± 0.07	0
	Потомство от самок с экспериментальной преэклампсией, получавшее дистиллированную воду – негативный контроль The offspring from rats with experimental preeclampsia receiving distilled water – negative control	58	0.12 ± 0.03	0.17 ± 0.06*	6.89

Таблица 1. Окончание / Table 1. Ending

Возраст Age	Группы животных Groups of animals	n	Фаза “Ознакомления” “Familiarization” phase	“Тестовая” фаза “Test” phase	
			Коэффициент дискриминации Discrimination ratio ($M \pm m$)	Коэффициент дискриминации Discrimination ratio ($M \pm m$)	Доля особей с отсутствием исследовательской активности The part of rats with lack of research activity (%)
	Потомство от самок с экспериментальной преэклампсией, получавшее сукцикард 22 мг/кг The offspring from rats with experimental preeclampsia receiving succicard 22 mg/kg	54	0.02 ± 0.07	0.42 ± 0.06#	1.85
	Потомство от самок с экспериментальной преэклампсией, получавшее салифен 7.5 мг/кг The offspring from rats with experimental preeclampsia receiving salifen 7,5 mg/kg	49	0.10 ± 0.07	0.53 ± 0.07#	2.04
	Потомство от самок с экспериментальной преэклампсией, получавшее фенибут 25 мг/кг The offspring from rats with experimental preeclampsia receiving phenibut 25 mg/kg	54	0.11 ± 0.08	0.41 ± 0.07#	1.85
	Потомство от самок с экспериментальной преэклампсией, получавшее пантогам 50 мг The offspring from rats with experimental preeclampsia receiving pantogam 50 mg	54	0.12 ± 0.07	0.52 ± 0.05#	1.85

* $p < 0.05$ по критерию Манна–Уитни по сравнению с группой позитивного контроля; # $p < 0.05$ по критерию Крускала–Уоллиса. с пост-тестом Даннета по сравнению с группой негативного контроля.

* $p < 0.05$ as compared with the positive control group, Mann–Whitney U-test; # $p < 0.05$ as compared with the negative control, Kruskal–Wallis test with Dunn’s multiple comparison (post hoc) test.

нии, нанесенном им в темной камере в возрасте 3 мес., по сравнению с потомством самок с экспериментальной преэклампсией.

В возрасте 12 мес. количество обучившихся животных в группах позитивного и негативного контролей статистически значимо не различалось, и крысы обеих групп начали заходить в темную камеру на 7-е сут воспроизведения навыка. Несмотря на то, что достоверных отличий между группами не было, латентный период захода в темную камеру у потомства самок с экспериментальной преэклампсией был меньше по сравнению с группой позитивного контроля, а процент зашедших – больше (рис. 3).

Полученные результаты говорят о нарушении долговременной памяти у потомства крыс с экспериментальной преэклампсией в пубертатном возрасте и в отдаленные периоды развития.

У животных в возрасте 3 мес., которым в подростковом периоде (с 40-го по 70-й дни жизни) вводили сукцикард, салифен, фенибут и препарат сравнения пантогам, лучше формировался и сохранялся памятный след. Так, процент животных, зашедших в темную камеру среди потомства, получавшего производные ГАМК и

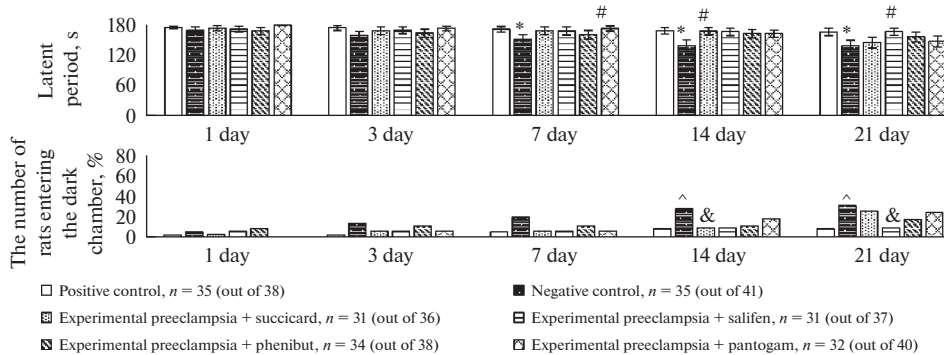


Рис. 1. Влияние производных ГАМК на формирование и сохранность памятного следа у потомства самок с экспериментальной преэклампсией в тесте Условный рефлекс пассивного избегания в возрасте 3 месяцев ($M \pm m$):

* $p < 0.05$ по критерию Манна–Уитни по сравнению с группой позитивного контроля; # $p < 0.05$ по критерию Манна–Уитни по сравнению с группой негативного контроля; ^ $\phi > 2.31$ по критерию Фишера по сравнению с группой позитивного контроля; & $\phi > 2.31$ по критерию Фишера по сравнению с группой негативного контроля; n – количество обучившихся животных.

Fig. 1. The effect of GABA derivatives on the formation and preservation of a memorial trace in the offspring from rats with experimental preeclampsia in the test One-way step-down inhibitory (“passive”) avoidance at the age of 3 months ($M \pm m$):

* $p < 0.05$ as compared with the positive control group, Mann–Whitney U-test; # $p < 0.05$ as compared with the negative control, Mann–Whitney U-test; ^ $\phi > 2.31$ as compared with the positive control, Fisher F-test; & $\phi > 2.31$ as compared with the negative control, Fisher F-test; n – the number of trained animals.

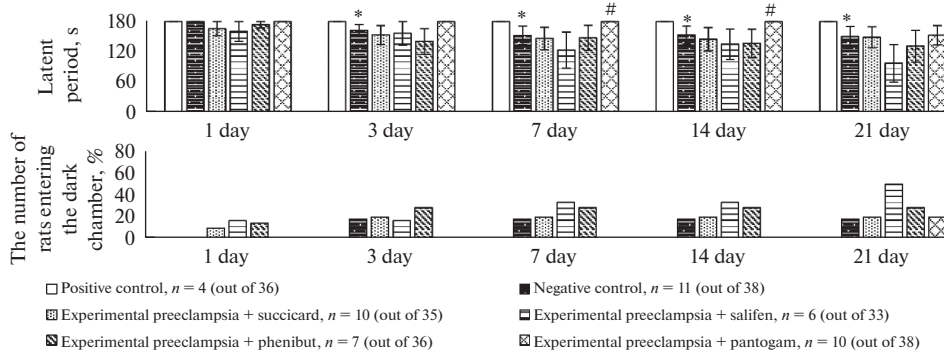


Рис. 2. Влияние производных ГАМК на формирование и сохранность памятного следа у потомства самок с экспериментальной преэклампсией в тесте Условный рефлекс пассивного избегания в возрасте 6 месяцев ($M \pm m$):

* $p < 0.05$ по критерию Манна–Уитни по сравнению с группой позитивного контроля; # $p < 0.05$ по критерию Манна–Уитни по сравнению с группой негативного контроля; ^ $\phi > 2.31$ по критерию Фишера по сравнению с группой позитивного контроля; & $\phi > 2.31$ по критерию Фишера по сравнению с группой негативного контроля; n – количество обучившихся животных.

Fig. 2. The effect of GABA derivatives on the formation and preservation of a memorial trace in the offspring from rats with experimental preeclampsia in the test One-way step-down inhibitory (“passive”) avoidance at the age of 6 months ($M \pm m$):

* $p < 0.05$ as compared with the positive control group, Mann–Whitney U-test; # $p < 0.05$ as compared with the negative control, Mann–Whitney U-test; ^ $\phi > 2.31$ as compared with the positive control, Fisher F-test; & $\phi > 2.31$ as compared with the negative control, Fisher F-test; n – the number of trained animals.

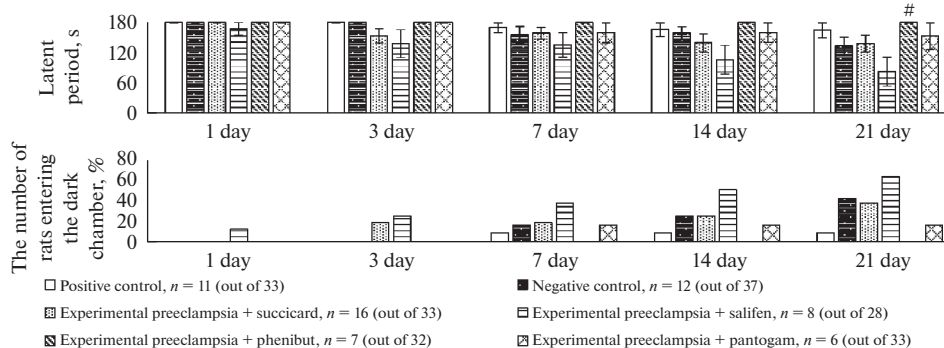


Рис. 3. Влияние производных ГАМК на формирование и сохранность памятного следа у потомства самок с экспериментальной преэклампсией в тесте Условный рефлекс пассивного избегания в возрасте 12 мес. ($M \pm m$):

* $p < 0.05$ по критерию Манна–Уитни по сравнению с группой позитивного контроля; # $p < 0.05$ по критерию Манна–Уитни по сравнению с группой негативного контроля; ^ $\varphi > 2.31$ по критерию Фишера по сравнению с группой позитивного контроля; & $\varphi > 2.31$ по критерию Фишера по сравнению с группой негативного.

Fig. 3. The effect of GABA derivatives on the formation and preservation of a memorial trace in the offspring from rats with experimental preeclampsia in the test One-way step-down inhibitory (“passive”) avoidance at the age of 12 months ($M \pm m$):

* $p < 0.05$ as compared with the positive control group, Mann–Whitney U-test; # $p < 0.05$ as compared with the negative control, Mann–Whitney U-test; ^ $\varphi > 2.31$ as compared with the positive control, Fisher F-test; & $\varphi > 2.31$ as compared with the negative control, Fisher F-test; n – the number of trained animals.

пантогам, было ниже, чем в группе негативного контроля, а латентный период захода в нее – больше (рис. 1).

У шестимесячных крыс латентный период захода в темную камеру и процент зашедших в нее среди животных, которым вводили сукцикард, салифен и фенибут, статистически значимо не отличались от показателей крыс группы негативного контроля, в то время как животные, получавшие пантогам, имели достоверно больший латентный период захода в темную камеру на 7-е и 14-е сут воспроизведения УРПИ по сравнению с потомством самок с экспериментальной преэклампсией, которому вводили дистиллированную воду (рис. 2).

В возрасте 12 мес. показатели потомства, получавшего сукцикард, салифен и пантогам, не имели достоверных отличий от группы крыс, рожденных самками с экспериментальной преэклампсией и получавших дистиллированную воду. Животные, которым вводили фенибут, не заходили в темную камеру во все дни воспроизведения навыка (рис. 3).

Холинергическая система играет значительную роль в формировании когнитивной функции. Ее состояние определяли путем введения М-холиноблокатора скополамина в дозе 1.75 мг/кг за 16 ч перед 1-ым, 3-им, 7-ым, 14-ым и 21-ым днями воспроизведения УРПИ потомству здоровых крыс и самок с экспериментальной преэклампсией, что вызывало у последних больший амнестический эффект в различные периоды постнатального онтогенеза.

В возрасте 3 мес. животные группы негативного контроля заходили в темную камеру через 24 ч после обучения, имели достоверно более низкий по сравнению с группой позитивного контроля латентный период, начиная с 7-го дня тестирования сохранности рефлекса. Кроме того, процент животных от крыс с эксперименталь-

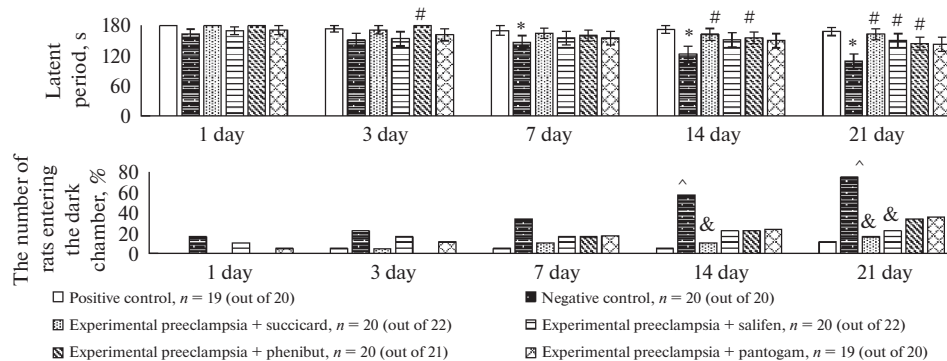


Рис. 4. Влияние производных ГАМК на выраженность амнезии, вызванной введением скополамина, у потомства самок с экспериментальной преэклампсией в тесте Условный рефлекс пассивного избегания в возрасте 3 месяцев ($M \pm m$):

* $p < 0.05$ по критерию Манна–Уитни по сравнению с группой позитивного контроля; # $p < 0.05$ по критерию Манна–Уитни по сравнению с группой негативного контроля; ^ $\varphi > 2.31$ по критерию Фишера по сравнению с группой позитивного контроля; & $\varphi > 2.31$ по критерию Фишера по сравнению с группой негативного контроля; n – количество обучившихся животных.

Fig. 4. The effect of GABA derivatives on the severity of amnesia caused by the administration of scopolamine to the offspring from females with experimental preeclampsia in the test One-way step-down inhibitory (“passive”) avoidance at the age of 3 months ($M \pm m$):

* $p < 0.05$ as compared with the positive control group, Mann–Whitney U-test; # $p < 0.05$ as compared with the negative control, Mann–Whitney U-test; ^ $\varphi > 2.31$ as compared with the positive control, Fisher F-test; & $\varphi > 2.31$ as compared with the negative control, Fisher F-test; n – the number of trained animals.

ной преэклампсией, посетивших темную камеру, был значительно больше, чем среди потомства самок без экспериментальной преэклампсии (рис. 4).

В возрасте 6 и 12 мес. тенденция сохранялась. Шестимесячные крысы из группы негативного контроля посетили темную камеру на 3-и сутки тестирования сохранности УРПИ, тогда как потомство группы позитивного контроля только на 14-е сут. У потомства самок с экспериментальной преэклампсией наблюдались более низкие значения латентного периода, чем в группе позитивного контроля на 3-и, и 7-е сут воспроизведения навыка (рис. 5).

В возрасте 12 мес. потомство здоровых самок не посещало темную камеру на всем протяжении этапа тестирования сохранности рефлекса, а крысы из группы негативного контроля заходили в нее, начиная с 1-го дня (рис. 6).

Большая выраженность амнезии у потомства самок с экспериментальной преэклампсией как на ранних этапах, так и в отдаленные периоды развития по сравнению с крысами, рожденными здоровыми самками, в тесте УРПИ с использованием скополамина может быть связана с недостаточностью холинергической системы, вызванной гипоксией в пренатальном периоде.

В возрасте 3, 6 и 12 мес. потомство, получавшее производные ГАМК, имело больший латентный период захода в темную камеру по сравнению с группой негативного контроля (рис. 4, 5, 6). В возрасте 3 мес. статистически значимые отличия были выявлены на 3-и сут воспроизведения навыка у потомства, которому вводили фенибут, на 14-е сут – у животных, получавших сукцикард и фенибут, на 21-е сут – у крыс, которым вводили сукцикард, салифен и фенибут. В возрасте 6 и 12 мес. производные ГАМК и препарат сравнения пантогам сохраняли антиамнестический эффект.

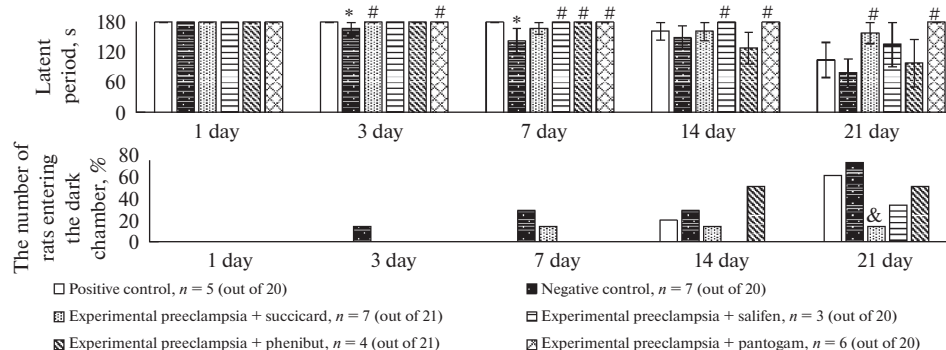


Рис. 5. Влияние производных ГАМК на выраженность амнезии, вызванной введением скополамина, у потомства самок с экспериментальной преэклампсией в тесте Условный рефлекс пассивного избегания в возрасте 6 месяцев ($M \pm m$):

* $p < 0.05$ по критерию Манна–Уитни по сравнению с группой позитивного контроля; # $p < 0.05$ по критерию Манна–Уитни по сравнению с группой негативного контроля; ^ $\varphi > 2.31$ по критерию Фишера по сравнению с группой позитивного контроля; & – $\varphi > 2.31$ по критерию Фишера по сравнению с группой негативного контроля; n – количество обучившихся животных.

Fig. 5. The effect of GABA derivatives on the severity of amnesia caused by the administration of scopolamine to the offspring from females with experimental preeclampsia in the test One-way step-down inhibitory (“passive”) avoidance at the age of 6 months ($M \pm m$):

* $p < 0.05$ as compared with the positive control group, Mann–Whitney U-test; # $p < 0.05$ as compared with the negative control, Mann–Whitney U-test; ^ $\varphi > 2.31$ as compared with the positive control, Fisher F-test; & $\varphi > 2.31$ as compared with the negative control, Fisher F-test; n – the number of trained animals.

Следует отметить, что при формировании скополаминовой амнезии потомство некоторых групп, получавших производные ГАМК, в возрасте 6 и 12 мес. не посещало темную камеру при воспроизведении УРПИ, в то время как животные, которые тестировались в УРПИ без моделирования амнезии, заходили в нее. Подобные результаты могут быть связаны с высокой эффективностью исследуемых веществ в условиях амнезии. Однако это также может объясняться и малой выборкой обучившихся животных, поскольку моделирование амнезии проходило после этапа обучения, а введение скополамина в дозе 1.75 мг/кг вызывало лишь кратковременный амнестический эффект, они могли помнить о болевом раздражении, нанесенном им в темной камере в возрасте 3 мес. Для уточнения данного факта необходимо провести дополнительные исследования.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По данным литературы, гипоксические поражения ЦНС имеют от 20 до 50% детей, матери которых перенесли преэклампсию и эклампсию различной степени тяжести, что проявляется в виде таких патологий, как детский церебральный паралич, гидроцефалия и микроцефалия, задержка развития интеллектуальных и двигательных навыков [20]. Многие экспериментальные исследования свидетельствуют о негативном влиянии экспериментальной преэклампсии на когнитивные функции потомства. При использовании таких моделей, как замена питьевой воды на 1.8%-ный раствор хлорида натрия с 1-го по 21-й день гестации или введение беременным крысам внутрибрюшинно неселективного блокатора NO-синтаз L-NAME в дозе 25 мг/кг с 14–20-й день гестации, двухмесячное потомство имело нарушение пространствен-

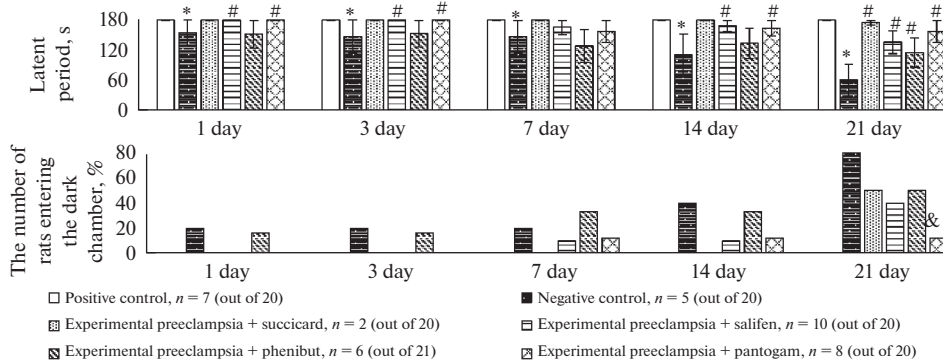


Рис. 6. Влияние производных ГАМК на выраженность амнезии, вызванной введением скополамина, у потомства самок с экспериментальной преэклампсией в тесте Условный рефлекс пассивного избегания в возрасте 12 месяцев ($M \pm m$):

* $p < 0.05$ по критерию Манна–Уитни по сравнению с группой позитивного контроля; # $p < 0.05$ по критерию Манна–Уитни по сравнению с группой негативного контроля; ^ $\varphi > 2.31$ по критерию Фишера по сравнению с группой позитивного контроля; & $\varphi > 2.31$ по критерию Фишера по сравнению с группой негативного контроля; n – количество обучившихся животных.

Fig. 6. The effect of GABA derivatives on the severity of amnesia caused by the administration of scopolamine to the offspring from females with experimental preeclampsia in the test One-way step-down inhibitory (“passive”) avoidance at the age of 12 months ($M \pm m$):

* $p < 0.05$ as compared with the positive control group, Mann–Whitney U-test; # $p < 0.05$ as compared with the negative control, Mann–Whitney U-test; ^ $\varphi > 2.31$ as compared with the positive control, Fisher F-test; & $\varphi > 2.31$ as compared with the negative control, Fisher F-test; n – the number of trained animals.

ной памяти в приподнятом 8-радиальном лучевом лабиринте [21]. При проведении тестов водный лабиринт Морриса и Y-образный лабиринт у потомства в возрасте 2 мес. от самок с экспериментальной преэклампсией, вызванной L-NAME, также наблюдалось нарушение памяти [22, 23].

Результаты проведенных нами экспериментов свидетельствуют, что потомство самок с экспериментальной преэклампсией, которую моделировали заменой питьевой воды на 1.8%-ный раствор хлорида натрия в течение всего периода беременности, на ранних (40 дней и 3 мес.) и поздних (6 и 12 мес.) этапах постнатального развития имеет когнитивные нарушения, проявляющиеся в снижении кратковременной и долговременной памяти. На это указывают значительно более низкий по сравнению с животными группы позитивного контроля Кд в “Тестовой” фазе Распознавания нового объекта, более короткий латентный период захода в темную камеру и больший процент животных, посетивших ее, в тесте УРПИ. Кроме того, у животных группы негативного контроля в разные периоды онтогенеза наблюдался более выраженный амнезирующий эффект после введения скополамина за 16 ч перед 1-ым, 3-им, 7-ым, 14-ым и 21-ым днями тестирования сохранности УРПИ, что может свидетельствовать о снижении активности холинергической системы, отвечающей за регуляцию когнитивных функций.

Подобные последствия экспериментальной преэклампсии, очевидно, связаны с гипоксически-ишемическим поражением ЦНС потомства. В ранее проведенных исследованиях было показано, что у самок с экспериментальной преэклампсией, смоделированной путем замены питьевой воды на 1.8%-ный раствор хлорида натрия с 1-го по 21-й день гестации, развивается эндотелиальная дисфункция, сопро-

вождающаяся вазоконстрикцией, увеличением агрегации тромбоцитов и гиперкоагуляцией, нарушением маточно-плацентарного кровообращения и гипоксией, а также активацией процесса перекисного окисления липидов с одновременным снижением активности ферментов антиоксидантной системы [12, 15]. Все это может привести к нарушению нейрогенеза и дифференциации структур головного мозга плода, а также гибели нейронов различных нейромедиаторных систем, в том числе холинергической, с последующим отставанием в развитии психических и физических функций у потомства в постнатальном периоде [24]. Было показано, что в сенсомоторной коре головного мозга крыс из-за внутриутробной гипоксии к концу первого месяца жизни и до полутора лет повышена активность растворимой и мембраносвязанной форм ацетилхолинэстеразы, что способствует быстрой деградации ацетилхолина, снижению активности холинергической системы головного мозга и развитию когнитивной дисфункции как на ранних, так и на поздних этапах онтогенеза [10, 25]. Кроме того, при значительном снижении активности холинергической системы происходит задержка клеточной дифференцировки коры, что в постнатальном периоде может служить причиной поведенческого и когнитивного дефицита [26]. Поэтому проблема коррекции связанных с отягощенной беременностью постгипоксических состояний у потомства в различные периоды онтогенеза, является актуальной для современной медицины.

У потомства крыс с экспериментальной преэклампсией, получавшего производные ГАМК с 40-го по 70-й день жизни, в возрасте 3, 6 и 12 мес. отмечались более высокие показатели когнитивных функций по сравнению с группой негативного контроля.

В тесте Распознавание нового объекта животные этих групп во все возрастные периоды проявляли выраженный интерес к новому объекту и имели высокий Кд в “Тестовую” фазу.

При оценке долговременной памяти в тесте УРПИ трехмесячные крысы, получавшие сукцикард, салифен и препарат сравнения пантогам, дольше помнили о болевом раздражении, чем животные контрольной группы, рожденные самками с экспериментальной преэклампсией. В возрасте 6 мес. раннее введение сукцикарда, салифена и фенибута не улучшало формирование и сохранение памятного следа, в отличие от препарата сравнения пантогама. В возрасте 12 мес. животные, получавшие фенибут, дольше помнили о болевом воздействии в темной камере, латентный период захода и количество зашедших в нее среди крыс, которым вводили сукцикард, салифен и препарат сравнения пантогам, достоверно не отличались от показателей группы негативного контроля.

При ведении М-холиноблокатора скополамина сукцикард, салифен, фенибут и пантогам ограничивают развитие амнезии в возрасте 3, 6 и 12 мес. Об этом свидетельствуют меньшее по сравнению с группой негативного контроля количество животных, посетивших темную камеру, больший латентный период захода в нее при воспроизведении УРПИ.

Производные ГАМК обладают ноотропным, нейро- и эндотелиопротекторным, антигипоксическим и антиоксидантным эффектами, что было показано в ранее проведенных исследованиях [11, 12, 15]. Производные ГАМК соединения РГПУ-147 и фенибут предотвращают нарушения микрогемодикуляции у стрессированных животных [16]. Известно также, что фенибут повышает функциональную устойчивость мозгового кровотока при значительных изменениях системного артериального давления [27], а дилитиевая соль N'N-бис [2,6-пиридинкарбонил]-ГАМК и литиевая соль N-ацетил-ГАМК предотвращают развитие гиперемии и восстанавливают мозговой кровоток после ишемии [28]. В экспериментальном исследовании, проведенном Ордян и соавт. [13], введение салифена в дозе 15 мг/кг в течение 14 дней после гипоксического воздействия двухдневным крысятам кор-

ректировало поведенческие нарушения у последних. Еще одним из важнейших механизмов действия препаратов данной группы, в частности, циклического производного ГАМК пираретама, является активация синтеза ацетилхолина, дефицит которого приводит к недостаточности холинергической системы и может проявляться в виде нарушений памяти на разных этапах онтогенеза [25, 29]. Применение пантогама, который представляет собой видоизмененную молекулу пантотеновой кислоты, включающую остаток ГАМК, способствует синтезу макроэргических фосфатов и активации тканевого дыхания, снижая энергодефицит нейронов при гипоксии, улучшает утилизацию глюкозы, стимулирует процессы синтеза белка в клетках мозга и стабилизирует функции нейрональных мембран при хронической церебральной ишемии [30, 31]. Вероятно, высокие показатели когнитивной функции в разные периоды постнатального онтогенеза у потомства самок с экспериментальной преэклампсией, получавшего исследуемые соединения, можно объяснить политропным действием производных ГАМК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у потомства, рожденного самками с экспериментальной преэклампсией, наблюдаются когнитивные нарушения как на ранних, так и на более поздних этапах онтогенеза. Поэтому данная проблема является актуальной не только для акушерской и педиатрической практики, но и для специалистов, работающих с болезнями более зрелого возраста. Исследуемые в этой работе производные ГАМК, очевидно, способны нивелировать нарушения когнитивных функций у потомства, рожденного самками с экспериментальной преэклампсией.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит результатов исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств госзадания по теме АААА-А18-118032290148-9.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Curtis D., Sood A., Phillips T., Leinster V., Nishiguchi A., Coyle C., Lacharme-Lora L., Beaumont O., Kemp H., Goodall R., Cornes L., Giugliano M., Barone R., Matsusaki M., Akashi M., Tanaka H., Kano M., McGarvey J., Halemani N., Simon K., Keehan R., Ind W., Masters T., Grant S., Athwal S., Collett G., Tannetta D., Sargent I., Scull-Brown E., Liu X., Aquilina K., Cohen N., Lane J., Thoresen M., Hanley J., Randall A., Case C. Secretions from placenta, after hypoxia/reoxygenation, can damage developing neurones of brain under experimental conditions. *Exp. Neurol.* 261: 386–395. 2014.
2. Miller S., Huppi P., Mallard C. The consequences of fetal growth restriction on brain structure and neurodevelopmental outcome. *J. Physiol.* 594(4): 807–823. 2016.
3. Phillips T., Scott H., Menassa D., Bignell A., Sood A., Morton J., Akagi T., Azuma K., Rogers M., Gilmore C., Inman G., Grant S., Chung Y., Aljunaidy M., Cooke C., Steinkraus B., Pocklington A., Logan A., Collett G., Kemp H., Holmans P., Murphy M., Fulga T., Coney A., Akashi M., Davidge S., Case C. Treating the placenta to prevent adverse effects of gestational hypoxia on fetal brain development. *Scient. Rep.* 7: 1–16. 2017.
4. Dang F., Croy B.A., Stroman P.W., Figueiró-Filho E.A. Impacts of preeclampsia on the brain of the offspring. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 38(8): 416–22. 2016.
5. Whitehouse A.J., Robinson M., Newnham J.P., Pennell C.E. Do hypertensive diseases of pregnancy disrupt neurocognitive development in offspring? *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 26(2): 101–108. 2012.

6. *Many A., Fattal A., Leitner Y., Kupferminc M.J., Harel S., Jaffa A.* Neurodevelopmental and cognitive assessment of children born growth restricted to mothers with and without preeclampsia. *Hypertens. Pregnancy.* 22(1): 25–29. 2003.
7. *Morsing E., Maršál K.* Preeclampsia- an additional risk factor for cognitive impairment at school age after intrauterine growth restriction and very preterm birth. *Early Hum. Dev.* 90(2): 99–101. 2014.
8. *Tuovinen S., Eriksson J.G., Kajantie E., Räikkönen K.* Maternal hypertensive pregnancy disorders and cognitive functioning of the offspring: a systematic review. *J. Am. Soc. Hypertens.* 8(11): 832–847. 2014.
9. *Tuovinen S., Räikkönen K., Kajantie E., Pesonen A.K., Heinonen K., Osmond C., Barker D.J., Eriksson J.G.* Depressive symptoms in adulthood and intrauterine exposure to preeclampsia: the Helsinki Birth Cohort Study. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 117(10): 1236–1242. 2010.
10. *Nalivaeva N.N., Turnerand A.J., Zhuravin I.A.* Role of prenatal hypoxia in brain development, cognitive functions, and neurodegeneration. *Front. Neurosci.* 12: 825. 2018.
11. *Тюренков И.Н., Перфилова В.Н., Михайлова Л.И., Жакупова Г.А., Лебедева С.А.* Сравнительное изучение влияния нейроактивных аминокислот на постнатальное развитие потомства крыс с экспериментальным гестозом. *Вестн. Рос. акад. мед. наук.* 69(9–10): 123–130. 2014. [*Tyurenkov I.N., Perfilova V.N., Mikhailova L.I., Zhakupova G.A., Lebedeva S.A.* Comparative study of the effects of new neuroactive amino acid derivatives on the postnatal development of the rat's offspring with experimental preeclampsia. *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* 69(9–10): 123–130. 2014. (In Russ)].
12. *Тюренков И.Н., Перфилова В.Н., Карамышева В.И., Попова Т.А., Лебедева С.А., Михайлова Л.И., Жакупова Г.А.* Гравидопротекторное действие фенибута при экспериментальной преэклампсии. *Эксп. клин. фармакол.* 77(11): 6–10. 2014. [*Tyurenkov I.N., Perfilova V.N., Karamysheva V.I., Popova T.A., Lebedeva S.A., Mikhailova L.I., Zhakupova G.A.* Gravidaprotective action of phenibut in experimental pre-eclampsia. *Eksp. Klin. Farmakol.* 77(11): 6–10. 2014. (In Russ)].
13. *Ордян Н.Э., Акулова В.К., Пивина С.Г., Отеллин В.А., Тюренков И.Н.* Нарушения вследствие перинатальной гипоксии поведенческой и гормональной стресс-реакций крыс подросткового возраста и их коррекция новым производным ГАМК. *Журн. эвол. биохим. физиол.* 55(1): 59–64. 2019. [*Ordyan N.E., Akulova V.K., Pivina S.G., Orellin V.A., Tyurenkov I.N.* Perinatal hypoxia-induced impairments of behavioral and hormonal stress responses in rats and their correction by a novel GABA derivative. *Zhurn. Evol. Biokhim. Fiziol.* 55(1): 59–64. 2019. (In Russ)].
14. *Represa A., Ben-Ari Y.* Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci.* 28(6): 278–283. 2005.
15. *Тюренков И.Н., Перфилова В.Н., Резникова Л.Б., Смирнова Л.А., Рябуха А.Ф., Сучков Е.А., Кузнецов К.А.* Производные ГАМК цитрокард и салифен уменьшают тяжесть течения экспериментального гестоза. *Бюлл. экп. биол. мед.* 157(1): 49–52. 2014. [*Tyurenkov I.N., Perfilova V.N., Reznikova L.B., Smirnova L.A., Ryabukha A.F., Suchkov E.A., Kuznetsov K.A.* GABA derivatives citrocard and salifen reduce the intensity of experimental gestosis. *Byull. Eksp. Biol. Med.* 2014. 157(1): 49–52. 2014. (In Russ)].
16. *Тюренков И.Н., Лебедева С.А., Перфилова В.Н., Берестовицкая В.М., Васильева О.С.* Изменения функционирования системы микроциркуляции под влиянием нового производного ГАМК — соединения РГПУ-147 при хроническом стрессорном воздействии. *Регионарн. кровообращ. и микроцикул.* 4: 64–67. 2007. [*Tyurenkov I.N., Lebedeva S.A., Perfilova V.N., Berestovitskaya V.M., Vasilyeva O.S.* Changes in the functioning of the microcirculation system under the influence of a new derivative of GABA — the compound RGPU-147 under chronic stress effects. *Region. Blood Circulat. Microcirculat.* 4: 64–67. 2007. (In Russ)].
17. *Миронов А.Н.* Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М. Гриф и К. 2012 [*Mironov A.N.* Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv [Preclinical drug research guide] Moscow. Grif i K. 2012. (In Russ)].
18. *Лобзин С.В., Соколова М.Г., Налькин С.А.* Влияние дисфункции холинергической системы головного мозга на состоянии когнитивных функций (обзор литературы). *Вестник Сев.-Зап. гос. мед. универ. им. И.И. Мечникова.* 9(4): 53–58. 2017. [*Lobzin S.V., Sokolova M.G., Nalkin S.A.* Influence of brain basal cholinergic system dysfunction on the condition of cognitive functions (literature review). *Vestnik Sev.-Zap. Gos. Med. Univ. im. I.I. Mechnikova.* 9(4): 53–58. 2017. (In Russ)].
19. *Тюренков И.Н., Перфилова В.Н., Лашеннова Л.И., Жакупова Г.А., Лебедева С.А.* Изучение психических функций потомства от крыс с экспериментальной преэклампсией в постнатальном онтогенезе. *Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова.* 66(4): 499–510. 2016. [*Tyurenkov I.N., Perfilova V.N., Lashhenova L.I., Zhakupova G.A., Lebedeva S.A.* Study of mental functions offspring of rats with experimental preeclampsia in postnatal ontogenesis. *Zh. Vyssh. Nervn. Deyat. im. I.P. Pavlova.* 66(4): 499–510. 2016. (In Russ)].
20. *Блинов Д.В., Терентьев А.А.* Белковые маркеры гипоксически-ишемического поражения ЦНС в перинатальном периоде. *Нейрохимия.* 10(2): 22–28. 2013. [*Blinov D.V., Ter-*

- ent'ev A.A.* Protein markers of hypoxic-ischemic lesions of the CNS in the perinatal period. *Neirokimiya*. 10(2): 22–28. 2013. (In Russ)].
21. *Перфилова В.Н., Жакупова Г.А., Лашченко Л.И., Лебедева С.А., Тюренков И.Н.* Изучение пространственной памяти у потомства крыс с различными моделями экспериментальной преэклампсии. *Бюлл. эксп. биол. мед.* 161(5): 581–584. 2016. [*Perfilova V.N., Zhakupova G.A., Lashchenova L.I., Tyurenkov I.N., Lebedeva S.A.* Spatial memory in the progeny of rats subjected to different types of experimental preeclampsia. *Byull. Eksp. Biol. Med.* 161(5): 581–584. 2016. (In Russ)].
 22. *Liu X., Zhao W., Liu H., Kang Y., Ye C., Gu W., Hu R., Li X.* Developmental and Functional Brain Impairment in Offspring from Preeclampsia-Like Rats. *Mol. Neurobiol.* 53(2):1009–1019. 2016.
 23. *Cauli O., Herraiz S., Pellicer B., Pellicer A., Felipe V.* Treatment with sildenafil prevents impairment of learning in rats born to pre-eclamptic mothers. *Neuroscience*. 171(2): 506–12. 2010.
 24. *Kay V.R., Rasep M.T., Figueiro-Filho E.A., Croy B.A.* Preeclampsia may influence off-spring neuroanatomy and cognitive function: a role for placental growth factor. *Biol. Reprod.* 0(0): 1–13. 2019.
 25. *Кочкина Е.Г., Плеснева С.А., Журавин И.А., Тернер А.А., Наливаева Н.Н.* Влияние гипоксии на активность холинэстераз в сенсомоторной коре у крыс. *Журн. эвол. биохим. физиол.* 51(2): 107–116. 2015. [*Kochkina E.G., Plesneva S.A., Zhuravin I.A., Nalivaeva N.N., Turner A.J.* Effect of hypoxia on cholinesterase activity in rat sensorimotor cortex. *Zhurn. Evol. Biokh. Fiziol.* 51(2): 107–116. 2015. (In Russ)].
 26. *Beer A., Slotkin T.A., Seidler F.J., Aldridge J.E., Yanai J.* Nicotine therapy in adulthood reverses the synaptic and behavioral deficits elicited by prenatal exposure to phenobarbital. *Neuropsychopharmacology*. 30(1): 156–65. 2005.
 27. *Attwell D., Iadecola C.* The neural basis of functional brain imaging signals. *Trends in neurosciences. Trends Neurosci.* 25 (12): 621–625. 2002.
 28. *Перфилова В.Н., Бородкина Л.Е.* Участие гамма-аминомаслянокислотно-ергической системы в регуляции мозгового кровообращения. *Вестн. Рос. военно-мед. акад.* 1(45): 203–211. 2014. [*Perfilova V.N., Borodkina L.E.* Participation of gamma-amino-butyric-ergic system in the regulation of cerebral blood flow. *Vestnik Ross. Voen. Med. Acad.* 1(45): 203–211. 2014. (In Russ)].
 29. *Востриков В.В.* Место пирacetам в современной практической медицине. *Обзоры по клин. фармакол. и лекарств. терапии.* 15(1): 14–25. 2017. [*Vostrikov V.V.* Place of piracetam in the modern practice of medicine. *Obzori Klin. Farmak. Lekarstv. Terap.* 15(1): 14–25. 2017. (In Russ)].
 30. *Бурчинский С.Г.* ГАМК-ергические средства в фармакотерапии хронической церебральной ишемии. *Междунар. невролог. журн.* 1(71): 101–105. 2015. [*Burchynskiy S.H.* GABA-ergic agents in the pharmacotherapy of chronic cerebral ischemia. *Internat. Neurolog. J.* 1(71): 101–105. 2015. (In Russ)].
 31. *Воронина Г.А.* Пантогам и пантогам актив. Клиническое применение и фундаментальные исследования. М. Триада-Фарм. 2009. [*Voronina G.A.* Pantogam i pantogam aktiv. *Klinicheskoe primenenie i fundamental'nye issledovaniya* [Pantogam and pantogam active. *Clinical application and fundamental research*]. Moscow. Triada-Farm. 2009. (In Russ)].

Cognitive Dysfunction in the Offspring from Rats with Experimental Preeclampsia at the Early and Late Stages of Ontogenesis and Its Correction by GABA Derivatives

E. A. Muzyko^{a,*}, G. A. Tkacheva^b, V. N. Perfilova^a, K. V. Suvorin^a,
A. A. Nesterova^a, and I. N. Tyurenkov^a

^a*Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia*

^b*Volgograd State Socio-Pedagogical University, Volgograd, Russia*

**e-mail: muzyko.elena@mail.ru*

In the article was studied cognitive dysfunction in different stages of ontogenesis in the offspring from rats with experimental preeclampsia modeled by replacing drinking water with a 1.8% solution of sodium chloride from day 1 to 21 of pregnancy. There are working memory deflection in the Novel object recognition test, impairment of formation and preservation of a memorial trace in the test One-way step-down inhibitory (“passive”) avoidance, as well as a significant amnesic effect of scopolamine at dose 1.75 mg/kg in the test One-way step-down inhibitory (“passive”) avoidance in the offspring from females with complicated pregnancies have cognitive impairment both in the early

(40 days and 3 months) and late (6 and 12 months) stages of ontogenesis.. Oral management at puberty (from 40 to 70 days of life) to the offspring from females with experimental preeclampsia of gamma-aminobutyric acid (GABA) derivatives such as succinylcholine, salifen, phenibut, and the comparison drug pantogam, helps to restrict cognitive deficits in animals who was born from rats with complicated pregnancies in different periods of postnatal development.

Keywords: experimental preeclampsia, offspring, GABA derivatives, cognitive dysfunction

ЦИТИРОВАТЬ:

Музыка Е.А., Ткачева Г.А., Перфилова В.Н., Суворин К.В., Нестерова А.А., Тюренков И.Н. Когнитивная дисфункция у потомства крыс с экспериментальной преэклампсией на ранних и поздних этапах онтогенеза и ее коррекция производными ГАМК. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 106(6): 765–782.

DOI: 10.31857/S0869813920060084

TO CITE THIS ARTICLE:

Muzyko E.A., Tkacheva G.A., Perfilova V.N., Suvorin K.V., Nesterova A.A., Tyurenkov I.N. Cognitive Dysfunction in the Offspring From Rats with Experimental Preeclampsia at the Early and Late Stages of Ontogenesis and its Correction by GABA Derivatives. Russian Journal of Physiology. 106(6): 765–782.

DOI: 10.31857/S0869813920060084

**ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ УРОВНЯМИ АДИПОКИНОВ,
ИХ СООТНОШЕНИЕМ В ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ
И РЕЗУЛЬТАТИВНОСТЬЮ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ
У ЖЕНЩИН С НОРМАЛЬНОЙ И ПОВЫШЕННОЙ МАССОЙ ТЕЛА**

© 2020 г. Ю. Р. Рыжов^{1, 2, *}, А. О. Шпаков², Н. Н. Ткаченко¹, М. Р. Махмадалиева¹,
И. Ю. Коган¹, А. М. Гзгзян¹

¹Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродукции им. Д.О. Отта,
Санкт-Петербург, Россия

²Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: julian.ryzhov@gmail.com

Поступила в редакцию 06.03.2020 г.

После доработки 12.04.2020 г.

Принята к публикации 20.04.2020 г.

Вырабатываемые жировой тканью адипокины вовлечены в регуляцию стероидогенеза и фолликулогенеза и влияют на имплантацию эмбриона и рецептивность эндометрия. Вследствие этого уровни адипокинов и их соотношение в фолликулярной жидкости могут быть использованы для оценки эффективности экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Цель исследования состояла в изучении влияния уровней лептина, адипонектина и грелина и их соотношения в фолликулярной жидкости женщин с нормальной и повышенной массой тела на эффективность и исходы ЭКО. Исследовали женщин с нормальной массой тела, которые забеременели (БН, $n = 7$) или не забеременели (нБН, $n = 14$) в результате ЭКО, и с повышенной массой тела (ИМТ >25 кг/м²), забеременевших (БП, $n = 5$) и не забеременевших (нБП, $n = 19$) после проведения ЭКО. В группе БН уровень лептина в фолликулярной жидкости был выше, чем в группе нБН ($p < 0.05$). В группах БП и нБП он не различался, но был выше, чем в группах с нормальной массой тела. В группе БН уровень грелина был ниже чем в группе нБН ($p < 0.05$), в то время как в группах БП и нБП он был сопоставимым. Соотношение лептин/адипонектин в группе БН было выше, чем в группе нБН (7.05 ± 0.84 против 2.97 ± 0.44 , $p < 0.05$), но ниже, чем в группах БП (13.80 ± 2.28) и нБП (11.28 ± 1.03). Соотношение лептин/грелин в группе БН было также выше, чем в группе нБН (18.46 ± 4.20 против 4.07 ± 0.68 , $p < 0.05$), но ниже, чем в группах БП (37.46 ± 21.59) и нБП (25.17 ± 3.97). Прогностическая значимость соотношения лептин/грелин составила 25.13 (CI 1.24–509.15, $p = 0.035$). Уровни адипонектина и соотношение адипонектин/грелин в исследуемых группах не различались. Таким образом, прогностическая значимость изменений уровней лептина и грелина и соотношений лептин/грелин и лептин/адипонектин в фолликулярной жидкости обусловлена массой тела пациенток и их метаболическим статусом. Концентрация лептина и отношение лептин/грелин в фолликулярной жидкости могут рассматриваться как ценные маркеры оценки успешности ЭКО у женщин с нормальной массой тела.

Ключевые слова: лептин, адипонектин, грелин, экстракорпоральное оплодотворение, фолликулярная жидкость, избыточная масса тела

DOI: 10.31857/S0869813920060102

Одним из подходов для повышения рождаемости у женщин со сниженной фертильностью является использование процедуры экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) – *in vitro* фертилизации [1]. Результативность процедуры ЭКО зависит от многих факторов, включая гормональный и метаболический статус организма женщины [2]. Имеются многочисленные свидетельства того, что адипокины, гормоноподобные вещества, вырабатываемые жировой тканью, играют исключительно важную роль в регуляции активности всех компонентов гипоталамо-гипофизарно-гонадной (ГГГ) оси и, тем самым, влияют на процессы фолликулогенеза, оогенеза и стероидогенеза [3–7].

В наибольшей степени изучено влияние на репродуктивные функции у женщин лептина и его функционального антагониста адипонектина. Лептин, синтезируемый адипоцитами белой жировой ткани, поступает из кровотока в мозг, преодолевая гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), где активирует продукцию гипоталамическими нейронами гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ), усиливая, тем самым, выработку гонадотропинов и активируя ГГГ ось [8]. Наряду с этим, лептин, преодолевая гемато-овариальный барьер, непосредственно воздействует на фолликулярные клетки яичников, причем определенный вклад в стимуляцию лептиновых сигнальных путей в яичниках может вносить лептин, синтезируемый в овариальной ткани *in situ* [9]. В условиях гиперлептинемии и развивающейся вследствие этого лептиновой резистентности, характерных для ожирения и метаболического синдрома, начинает выявляться негативное влияние лептина на функции ГГГ оси. Это обусловлено нарушением поступления лептина через ГЭБ в мозг, результатом чего является дефицит лептина в ЦНС и ослабление его стимулирующего влияния на ГнРГ-экспрессирующие гипоталамические нейроны, а также значительное снижение чувствительности к лептину фолликулярных клеток яичников, что ослабляет их ответ на лептин [10]. Действие адипонектина на репродуктивную систему является во многом противоположным таковому лептина. Этот адипокин подавляет активность ГнРГ-экспрессирующих нейронов в гипоталамусе и при высоких концентрациях ингибирует процессы стероидогенеза и фолликулогенеза в яичниках [5]. В меньшей степени изучено влияние на ГГГ ось адипокина грелина, еще одного функционального антагониста лептина [11, 12]. Грелин через гипоталамические механизмы контролирует пищевое поведение и является мощным орексигенным фактором, усиливающим аппетит [13]. Поскольку функции адипокинов и механизмы их действия на ткани-мишени тесно связаны, имеются основания считать, что более информативным для изучения адипокинового статуса является оценка соотношений между концентрациями адипокинов в крови или в других биологических жидкостях, включая фолликулярную жидкость [14].

Имеются сведения, что концентрация адипокинов, в том числе лептина, в фолликулярной жидкости может существенно влиять на протекание фолликулогенеза и определять чувствительность фолликулярных клеток к гонадотропинам. При этом уровни адипокинов в фолликулярной жидкости не всегда коррелируют с их уровнями в крови. Это обусловлено тем, что уровни адипокинов в фолликулярной жидкости зависят от проницаемости для них гемато-овариального барьера, интенсивности биодеградации адипокинов и возможностью их синтеза в фолликулярных клетках *in situ*, как это показано для лептина и адипонектина [9, 15]. Основываясь на этом, мы предположили, что успешность проведения ЭКО может зависеть от уровня и соотношений адипокинов в фолликулярной жидкости. Целью исследования была проверка этого предположения, для чего изучали уровни лептина, адипонектина и грелина и их соотношения в фолликулярной жидкости женщин с нормальной и повышенной массой тела, проходящих лечение бесплодия с помощью ЭКО.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом НИИ акушерства, гинекологии и репродукции им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург (протокол № 77 от 12 мая 2016 г.). В исследовании принимали участие 45 женщин. Критериями включения являлись: (1) возраст 18–45 лет, и (2) грубно-перитонеальный или мужской фактор бесплодия. Критериями исключения являлись: (1) клинические признаки синдрома поликистозных яичников, (2) нарушения углеводного обмена, (3) концентрация антимюллерова гормона в крови ниже 1.0 нг/мл, (4) общие противопоказания к проведению процедуры ЭКО. В зависимости от индекса массы тела (ИМТ) женщины были разделены на 2 группы – с нормальной и повышенной массой тела. ИМТ рассчитывали по формуле $\text{ИМТ} = \text{вес (кг)} / [\text{рост (м)}]^2$. Нормальной массой тела считались значения ИМТ от 18.5 до 24.9 кг/м², в то время как повышенная масса тела определялась при значениях ИМТ > 25 кг/м². В зависимости от наступления беременности в каждой из двух сформированных групп, женщин делили на 2 подгруппы: забеременевшие после проведения ЭКО и те, у кого беременность после ЭКО отсутствовала.

ЭКО проводили с применением протокола с антагонистами ГнРГ. Для стимуляции созревания фолликулов применяли препараты рекомбинантного фолликуло-стимулирующего гормона (ФСГ): Гонал-Ф[®] (Merck Serono S.p.A., Италия), Пурегон[®] (Organon, Нидерланды), Фоллитроп[®] (LG Chem Ltd., Республика Корея), Перговерис[®] (Merck Serono S.A., Швейцария), и человеческий менопаузальный гонадотропин, выделенный из мочи постменопаузальных женщин: Менопур[®] (Ferring GmbH, Германия) и Хумог[®] (Bharat Serums & Vaccines Ltd., Индия). При достижении как минимум двумя фолликулами размера 18 мм осуществляли стимуляцию овуляции с помощью рекомбинантного хорионического гонадотропина человека (ХГЧ): Прегнил[®] (Organon, Нидерланды), Овитрель[®] (Merck Serono S.p.A., Италия). Через 34–36 ч после введения ХГЧ выполняли трансвагинальную пункцию фолликулов с забором яйцеклеток. Фолликулярную жидкость из первого пунктированного фолликула собирали в отдельную емкость для последующего исследования с помощью ИФА. Через 4–5 дней в матку переносили не более двух эмбрионов. Через 14–15 дней после переноса эмбрионов исследовали содержание β-субъединицы ХГЧ в сыворотке крови пациенток. При положительном результате проводили УЗИ для визуализации в полости матки плодного яйца, при обнаружении которого женщину относили к группе забеременевших пациенток в результате проведения ЭКО. Концентрацию лептина в образцах фолликулярной жидкости определяли с помощью набора DRG Leptin ELISA (DRG, США), концентрацию адипонектина – с помощью набора AssayMax Human Adiponectin ELISA (AssayPro, США), уровня грелина – с помощью набора Human Ghrelin ELISA (SCETI, Япония).

Статистическую обработку данных выполняли с помощью программ для статистического анализа SPSS Statistics. Данные во всех исследуемых группах проверяли на нормальность распределения с помощью критерия Колмогорова–Смирнова (во всех случаях $p > 0.05$). Для обнаружения достоверных различий между группами был применен дисперсионный анализ. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Из 45 женщин, принимавших участие в исследовании, после проведения ЭКО клиническая беременность наступала у 12 пациенток (27%). Формировали следующие 4 группы: женщины с нормальной массой тела – забеременевшие (БН, $n = 7$) и с

Таблица 1. Показатели возраста, ИМТ, уровней адипокинов в фолликулярной жидкости и их соотношения у женщин с нормальной и повышенной массой тела, забеременевших в результате процедуры ЭКО или с отсутствием беременности

Table 1. The age, BMI, adipokines levels in the follicular fluid and their ratios in women with the normal and increased body weight who became pregnant as a result of IVF or with no pregnancy

Показатель Indicator	Нормальная масса тела Normal body weight		Повышенная масса тела Increased body weight	
	нБН (<i>n</i> = 14) нPN (<i>n</i> = 14)	БН (<i>n</i> = 7) PN (<i>n</i> = 7)	нБП (<i>n</i> = 19) нPI (<i>n</i> = 19)	БП (<i>n</i> = 5) PI (<i>n</i> = 5)
Возраст, лет Age, years	31.9 ± 0.9	32.1 ± 2.1	34.3 ± 1.2	31.8 ± 1.8
Индекс массы тела, кг/м ² Body mass index, kg/m ²	21.3 ± 0.4	23.0 ± 0.4	29.9 ± 0.9	30.6 ± 1.0
Лептин, нг/мл Leptin, ng/mL	10.48 ± 1.33 ^{a,b}	21.54 ± 3.34 ^{a,c}	32.13 ± 2.73 ^b	39.72 ± 6.29 ^c
Грелин, нг/мл Ghrelin, ng/mL	3.80 ± 0.89 ^{a,b}	1.36 ± 0.2 ^a	1.92 ± 0.38 ^b	2.18 ± 0.54
Адипонектин, мкг/мл Adiponectin, µg/mL	3.70 ± 0.14 ^b	3.17 ± 0.40	2.98 ± 0.10 ^b	2.92 ± 0.23
Лептин/адипонектин Leptin/Adiponectin	2.97 ± 0.44 ^{a,b}	7.05 ± 0.84 ^{a,c}	11.28 ± 1.03 ^b	13.80 ± 2.28 ^c
Лептин/грелин Leptin/Ghrelin	4.07 ± 0.68 ^{a,b}	18.46 ± 4.20 ^a	25.17 ± 3.97 ^b	37.46 ± 21.59
Адипонектин/грелин Adiponectin/Ghrelin	1.69 ± 0.32	2.68 ± 0.54	2.40 ± 0.37	2.19 ± 0.90

Примечание. ^a – различия между группами нБН и БН статистически значимы при $p < 0.05$; ^b – различия между группами нБН и нБП статистически значимы при $p < 0.05$; ^c – различия между группами БН и БП статистически значимы при $p < 0.05$.

^a – the differences between the nPN and PN groups are statistically significant at $p < 0.05$; ^b – the differences between the nPN and nPI groups are statistically significant at $p < 0.05$; ^c – the differences between the PN and PI groups are statistically significant at $p < 0.05$

отсутствием беременности после ЭКО (нБН, $n = 14$), женщины с повышенной массой тела – забеременевшие (БП, $n = 5$) и с отсутствием беременности после ЭКО (нБП, $n = 19$). Все исследуемые группы были однородны по возрасту. В свою очередь, группы БН и нБН и группы БП и нБП были попарно однородны по значениям ИМТ.

Изучение уровня лептина в фолликулярной жидкости у пациенток с нормальной массой тела показало, что в группе БН он был достоверно выше, чем в группе нБН ($p = 0.0015$) (табл. 1). У пациенток с повышенной массой тела, как забеременевших, так и с отсутствием беременности после ЭКО, уровень лептина в фолликулярной жидкости был достоверно выше, чем в группе БН. При этом достоверных различий между группами БП и нБП выявлено не было (табл. 1). Уровни адипонектина в фолликулярной жидкости у исследуемых групп пациенток с разным исходом ЭКО статистически значимо не различались (табл. 1). При изучении уровня грелина отмечали его снижение в группе БН в сравнении с группой нБН. В группах пациенток с повышенной массой тела различий между пациентками с беременностью и ее отсутствием после ЭКО выявлено не было (табл. 1).

Поскольку регуляторные влияния лептина и его функциональных антагонистов, адипонектина и грелина, тесно взаимосвязаны, высокой информативностью характеризуется показатель соотношения их концентраций в биологических жидкостях. Нами показано, что соотношение концентраций лептина к адипонектину в фолликулярной жидкости в значительной степени повышено в обеих группах пациенток с повышенной массой тела – БП и нБП, в то время как в группах пациенток с нормальной массой тела оно выше у забеременевших женщин ($p < 0.001$) (табл. 1). У па-

Таблица 2. Показатели прогностической значимости концентраций лептина и соотношений лептин/грелин и лептин/адипонектин в фолликулярной жидкости
Table 2. The prognostic significance of the leptin concentrations and the ratios of leptin/ghrelin and leptin/adiponectin in the follicular fluid

Показатель Indicator	Значение, при котором наступление беременности становится маловероятным The value at which pregnancy becomes unlikely	Чувствительность, % Sensitivity, %	Специфичность, % Specificity, %
Лептин, нг/мл Leptin, ng/mL	<15	86	86
Лептин/грелин Leptin/Ghrelin	<9	86	100
Лептин/адипонектин Leptin/Adiponectin	<5	86	86

циенток с повышенной массой тела соотношение концентраций лептина к грелину было выше, чем у пациенток с нормальной массой тела. При этом в группе БН оно было выше, чем в группе нБН. У пациенток с повышенной массой тела прослеживалась сходная закономерность, но различия между группами БП и нБП в этом случае не были статистически значимыми (табл. 1). Соотношение адипонектин/грелин между исследуемыми группами достоверно не различалось (табл. 1).

Далее определяли пороговые значения, ниже которых наступление беременности становится маловероятным. В качестве пороговых значений были выбраны значения с наилучшими показателями чувствительности и специфичности, которые рассчитывали по стандартной методике [16]. Чувствительность рассчитывали по формуле $S_n = TP / (TP + FN)$, где S_n – чувствительность, TP – число истинно положительных результатов, FN – число ложноотрицательных результатов. Специфичность рассчитывали по формуле $S_p = TN / (TN + FP)$, где S_p – специфичность, TN – число истинно отрицательных результатов, FP – число ложноположительных результатов. Согласно проведенным расчетам (табл. 2), наиболее чувствительным показателем является соотношение лептин/грелин. Для оценки его прогностической значимости было рассчитано отношение шансов (Odds ratio), которое составило 25.13 (CI 1.24–509.15, $p = 0.035$). Полученное значение свидетельствует о том, что соотношение лептин/грелин в значительной степени определяет эффективность и исход программ ЭКО.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Имеется ряд работ по изучению возможных взаимосвязей между уровнем лептина в фолликулярной жидкости и результативностью процедур ЭКО, но полученные результаты противоречивы [17–19]. Основным источником циркулирующего в крови лептина является жировая ткань, хотя он в небольшой степени экспрессируется и в яичниках [20]. Основной пул лептина, который содержится в фолликулярной жидкости, формируется за счет лептина, который переносится в яичники через гемато-овариальный барьер с помощью рецептор-зависимого эндоцитоза, причем этот барьер более проницаем для адипокинов в сравнении с ГЭБ [21]. Регуляторное влияние лептина на функции яичников и фолликулогенез является разнонаправленным. В концентрациях, близких к физиологическим (3.7–11.1 нг/мл), лептин стимулирует фолликулогенез, усиливает продукцию прогестерона и активирует фермент ароматазу, повышая, тем самым, продукцию эстрадиола [22–26]. В высоких концентрациях, характерных для ожирения и метаболического синдрома, лептин, напро-

тив, снижает базальную и стимулированную инсулиноподобным фактором роста-1 продукцию эстрадиола и прогестерона, подавляет стимулированный гонадотропинами стероидогенез, ингибирует стимулированную ХГЧ овуляцию [27–29].

Полученные нами данные отчетливо демонстрируют разнонаправленные эффекты различных концентраций лептина на функции яичников у женщин репродуктивного возраста. В группах пациенток с нормальной массой тела уровень лептина в фолликулярной жидкости у пациенток с отсутствием беременности после ЭКО был ниже, чем у забеременевших. Это может быть обусловлено тем, что для нормальной регуляции функций яичников концентрация лептина должна поддерживаться на определенном базальном уровне, что обеспечивает полноценную активацию лептиновой сигнальной системы в фолликулярных клетках. Значительное снижение уровня лептина приводит к ослаблению гормональной стимуляции этой системы и, как следствие, к нарушению процессов фолликулогенеза и овуляции, на что указывает снижение эффективности ЭКО у пациенток с нормальной массой тела и сниженным уровнем лептина в фолликулярной жидкости. Исследования с мышами, нокаутными по гену лептина, также демонстрируют сильно выраженные нарушения фолликулогенеза и овуляции, причем попытка их коррекции с помощью гонадотропинов не приводит к нормализации функции яичников [30]. Все вышесказанное свидетельствует о том, что у пациенток с нормальной массой тела и низким уровнем лептина проведение повторных процедур ЭКО без нормализации уровня этого адипокина не представляется целесообразным.

Нами показано, что у пациенток с повышенной массой тела уровень лептина в фолликулярной жидкости выше, чем у пациенток с нормальной массой тела, что согласуется с данными других авторов [31]. При этом различий в содержании лептина в фолликулярной жидкости у забеременевших женщин и пациенток с отсутствием беременности выявлено не было. Это может объясняться тем, что в условиях гиперлептинемии, вызванной увеличением массы жировой ткани, снижается чувствительность фолликулярных клеток к лептину и овариальная лептиновая система не вносит решающего вклада в контроль процессов фолликулогенеза и овуляции. Причинами лептиновой резистентности в яичниках могут быть как снижение экспрессии лептиновых рецепторов и нарушение их транслокации в плазматическую мембрану, так и усиление активности негативных регуляторов лептиновых сигнальных путей, в первую очередь протеинфосфотириозинфосфатазы 1В и ингибитора цитокинового сигналинга SOCS3 [10, 32, 33]. В случае гиперлептинемии оценка уровня лептина в фолликулярной жидкости для прогнозирования исхода процедуры ЭКО теряет свою значимость.

Адипонектин и грелин, функциональные антагонисты лептина, также участвуют в регуляции репродуктивных функций у женщин. Так адипонектин подавляет стероидогенез в яичниках и секрецию ГнРГ гипоталамусом, хотя при этом и увеличивает секрецию гонадотропинов гонадотрофами гипофиза [34]. Регуляторные эффекты адипонектина на яичники в значительной степени зависят от метаболического статуса организма, от концентрации и паттерна изоформ адипонектина, а также от соотношения адипонектиновых рецепторов 1-го и 2-го типов, которые существенно различаются по активности и характеризуются даже некоторым антагонизмом по отношению друг к другу [5]. Нами не было обнаружено существенных изменений в содержании адипонектина в фолликулярной жидкости исследуемых групп женщин, что указывает на отсутствие взаимосвязи между концентрацией этого адипокина в фолликулярной жидкости и исходами ЭКО. При этом было отмечено значительное повышение соотношения концентраций лептина и адипонектина в группе забеременевших после ЭКО женщин с нормальной массой тела по сравнению с пациентками, у кого беременность после ЭКО отсутствовала. Это может указывать на возможность использования такого показателя, как соотношение лептин/адипонектин в качестве маркера для прогнозирования результативности ЭКО.

Для женщин с нормальной массой тела нами показано не только снижение уровня грелина в фолликулярной жидкости забеременевших пациенток в сравнении с теми, у кого беременность отсутствовала, но и значительное повышение соотношения лептин/грелин. Следует отметить, что повышенное содержание грелина является одной из причин развития лептиновой резистентности, в основе чего лежит повышение активности негативных регуляторов лептиновых сигнальных путей, в том числе SOCS3 [35]. Важно отметить, что у женщин с повышенной массой тела отношение лептин/грелин вследствие сильно выраженной гиперлептинемии было повышено, а различия между забеременевшими женщинами и пациентками с отсутствием беременности не были статистически значимыми. Таким образом, у пациенток с нормальной, но не повышенной, массой тела соотношение лептин/грелин, наряду с уровнем лептина, может рассматриваться как важный прогностический показатель для исхода ЭКО. Это иллюстрируют рассчитанные нами пороговые значения для лептина (<15) и соотношения лептин/грелин (<9), ассоциированные с неудачными попытками ЭКО. При этом соотношение лептин/грелин является наиболее чувствительным и специфичным.

Полученные нами результаты указывают на то, что нормализация лептиновых сигнальных путей в яичниках может быть одним из эффективных путей для повышения результативности ЭКО. Усиление лептиновой сигнализации в яичниках в условиях лептиновой резистентности может быть достигнуто путем подавления активности негативных регуляторов сигнальных путей лептина, в первую очередь протеинфосфотирозинфосфатазы 1В. Так ингибитор этого фермента Тролусквемин, повышает чувствительность клеток-мишеней к лептину, снижает аппетит и массу тела при ожирении и метаболическом синдроме, стимулирует зависимые от лептина физиологические процессы [36]. При этом применение фармакологических препаратов лептина и его аналогов, эффективных в условиях острого системного дефицита лептина в организме, при нормолептинемии и гиперлептинемии может привести только к усилению лептиновой резистентности и в еще большей степени усугубить дисфункции репродуктивной системы [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами проведено системное изучение взаимосвязей между исходами ЭКО и уровнями и соотношением наиболее важных для контроля репродуктивных функций адипокинов в фолликулярной жидкости женщин с нормальной и повышенной массой тела. Впервые установлено, что прогностическая значимость изменений уровней лептина, грелина и соотношений лептин/грелин и лептин/адипонектин в фолликулярной жидкости в значительной степени определяется массой тела пациентки и ее гормональным и метаболическим статусом. Установлено, что концентрация лептина в фолликулярной жидкости и соотношение лептин/грелин могут стать новыми маркерами для оценки успешности ЭКО и, в ряде случаев, могут использоваться как критерии для принятия решения о целесообразности использования вспомогательных репродуктивных технологий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана госзаданием АААА-А18-118012290427-7.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом НИИ акушерства, гинекологии и репродукции им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург (протокол № 77 от 12 мая 2016 г.).

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коган И.Ю., Гзгзян А.М., Лесик Е.А. Протоколы стимуляции в циклах ЭКО, 2-е издание. М.: “ГЕОТАР-Медиа”. 2017. 128 с. eLIBRARY ID: 36374989. [Kogan I.Yu., Gzgzian A.M., Lesik E.A. Stimulation Protocols in the IVF Cycles, 2nd Edition. M.: “ГЕОТАР-Медиа”. 2017. 128 pp. eLIBRARY ID: 36374989. (In Russ)].
2. Шпаков А.О. Гонадотропины – от теории к клинической практике. Санкт-Петербург: ПОЛИТЕХ-ПРЕСС. 2018. 347 с. eLIBRARY ID: 3642381. [Shpakov A.O. Gonadotropins – from theory to clinical practice. St. Petersburg: Polytech-Press. 2018. 347 p. eLIBRARY ID: 3642381. (In Russ)].
3. Reverchon M., Ramé C., Bertoldo M., Dupont J. Adipokines and the female reproductive tract. *Int. J. Endocrinol.* 2014; 232454. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/232454>
4. Бахтыюков А.А., Шпаков А.О. Молекулярные механизмы действия лептина на гипоталамо-гипофизарно-гонадную ось. *Цитология.* 60(10): 755–767. 2018. [Bakhtyukov A.A., Shpakov A.O. Molecular mechanisms of the action of leptin on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Tsitologiya.* 60(10): 755–767. 2018. (In Russ)]. <https://doi.org/10.7868/S0041377118100016>
5. Рыжов Ю.Р., Шпаков А.О. Адипонектин, как эндогенный регулятор гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. *Трансляционная медицина.* 5(5): 26–36. 2018. [Ryzhov Yu.R., Shpakov A.O. Adiponectin as an endogenous regulator of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Translational medicine.* 5(5): 26–36. 2018. (In Russ)].
6. Mathew H., Castracane V.D., Mantzoros C. Adipose tissue and reproductive health. *Metabolism.* 86: 18–32. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.11.006>
7. Shpakov A.O., Ryzhov Ju.R., Bakhtyukov A.A., Derkach K.V. The regulation of the male hypothalamic-pituitary-gonadal axis and testosterone production by adipokines (Chapter 2). In: *Advances in Testosterone Action* (Ed. by M. Estrada). Intech Open Access Publisher, Rijeka, Croatia. 25–57. 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76321>
8. Ratra D.V., Elias C.F. Chemical identity of hypothalamic neurons engaged by leptin in reproductive control. *J. Chem. Neuroanat.* 61–62: 233–238. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2014.05.005>
9. Löffler S., Aust G., Köhler U., Spanel-Borowski K. Evidence of leptin expression in normal and polycystic human ovaries. *Mol. Hum. Reprod.* 7(12): 1143–1149. 2001. <https://doi.org/10.1093/molehr/7.12.1143>
10. Liu J., Yang X., Yu S., Zheng R. The leptin resistance. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1090: 145–163. 2018. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1286-1_8
11. Celik O., Celik N., Aydin S., Aygun B.K., Haberal E.T., Kuloglu T., Ulas M., Aktun L.H., Acet M., Celik S. Ghrelin action on GnRH neurons and pituitary gonadotropes might be mediated by GnIH-GPR147 system. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 25(2): 121–128. 2016. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2015-0050>
12. Rak-Mardyta A., Wróbel A., Gregoraszczyk E.L. Ghrelin negatively affects the function of ovarian follicles in mature pigs by direct action on basal and gonadotropin-stimulated steroidogenesis. *Reprod. Sci.* 22(4): 469–475. 2015. <https://doi.org/10.1177/1933719114549854>
13. Al Massadi O., López M., Tschöp M., Diéguez C., Nogueiras R. Current understanding of the hypothalamic ghrelin pathways inducing appetite and adiposity. *Trends Neurosci.* 40(3): 167–180. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.12.003>
14. Frühbeck G., Catalán V., Rodríguez A., Ramírez B., Becerril S., Salvador J., Colina I., Gómez-Ambrós J. Adiponectin-leptin ratio is a functional biomarker of adipose tissue inflammation. *Nutrients.* 11(2). pii: E454. 2019. <https://doi.org/10.3390/nu11020454>
15. Artimani T., Saidijam R., Aflatoonian R., Ashrafi M., Amiri I., Yavangi M., Soleimani Asl S., Shabab N., Karimi J., Mehdizadeh M. Down-regulation of adiponectin system in granulosa cells and low levels of HMW adiponectin in PCOS. *J. Assist. Reprod. Genet.* 33(1): 101–110. 2016. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0620-1>
16. Akobeng A.K. Understanding diagnostic tests 1: sensitivity, specificity and predictive values. *Acta Paediatr.* 96(3): 338–341. 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2006.00180.x>
17. Anifandis G., Koutselini E., Stefanidis I., Liakopoulos V., Leivaditis C., Mantzavinos T., Vamvakopoulos N. Serum and follicular fluid leptin levels are correlated with human embryo quality. *Reproduction.* 130(6): 917–921. 2005. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00705>
18. Takikawa S., Iwase A., Goto M., Harata T., Umezu T., Nakahara T., Kobayashi H., Suzuki K., Manabe S., Kikkawa F. Assessment of the predictive value of follicular fluid insulin, leptin and adiponectin in assisted reproductive cycles. *Gynecol. Endocrinol.* 26(7): 494–499. 2010. <https://doi.org/10.3109/09513591003632050>

19. Akarsu S., Buke B., Göde F., Dirican K.E., Başbuğ A., Ceyhan S.T., Goktolga U., Akın O., Korkmaz C., Kara C., Zeki Isık A. Association of serum and follicular fluid leptin and ghrelin levels with in vitro fertilization success. *Ginekol. Pol.* 88(9): 469–474. 2017.
<https://doi.org/10.5603/gp.a2017.0086>
20. Zendron C., Gonçalves H.F., Cavalcante F.S., Pereira T.R., Evangelista A., Ramos C.F., Oliveira M.A. Increased expression of the leptin receptor in human ovaries affected by endometrioma and detection of high levels of leptin in the ovarian endometriomal fluid. *J. Ovarian. Res.* 7: 2. 2014.
<https://doi.org/10.1186/1757-2215-7-2>
21. Banks W.A., McLay R.N., Kastin A.J., Sarmiento U., Scully S. Passage of leptin across the blood-testis barrier. *Am. J. Physiol.* 276(6): 1099–1104. 1999.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.1999.276.6.e1099>
22. Kitawaki J., Kusuki I., Koshiba H., Tsukamoto K., Honjo H. Leptin directly stimulates aromatase activity in human luteinized granulosa cells. *Mol. Hum. Reprod.* 5(8): 708–713. 1999.
<https://doi.org/10.1093/molehr/5.8.708>
23. Lin Q., Poon S.L., Chen J., Cheng L., HoYuen B., Leung P.C. Leptin interferes with 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling to inhibit steroidogenesis in human granulosa cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7: 115. 2009.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-115>
24. Karamouti M., Kollia P., Kallitsaris A., Vamvakopoulos N., Kollios G., Messinis I.E. Modulating effect of leptin on basal and follicle stimulating hormone stimulated steroidogenesis in cultured human lutein granulosa cells. *J. Endocrinol. Invest.* 32(5): 415–419. 2009.
<https://doi.org/10.1007/BF03346478>
25. Bilbao M.G., Di Yorio M.P., Faletti A.G. Different levels of leptin regulate different target enzymes involved in progesterone synthesis. *Fertil. Steril.* 99(5): 1460–1466. 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.12.014>
26. Di Yorio M.P., Bilbao M.G., Biagini-Majorel A.M., Faletti A.G. Ovarian signalling pathways regulated by leptin during the ovulatory process. *Reproduction.* 146(6): 647–658. 2013.
<https://doi.org/10.1530/REP-13-0257>
27. Karlsson C., Lindell K., Svensson E., Bergh C., Lind P., Billig H., Carlsson L.M., Carlsson B. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82(12): 4144–4148. 1997.
<https://doi.org/10.1210/jcem.82.12.4446>
28. Agarwal S.K., Vogel K., Weitsman S.R., Magoffin D.A. Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84(3): 1072–1076. 1999.
<https://doi.org/10.1210/jcem.84.3.5543>
29. Brannian J.D., Zhao Y., McElroy M. Leptin inhibits gonadotrophin-stimulated granulosa cell progesterone production by antagonizing insulin action. *Hum. Reprod.* 14(6): 1445–1458. 1999.
<https://doi.org/10.1093/humrep/14.6.1445>
30. Olatinwo M.O., Bhat G.K., Stah C.D., Mann D.R. Impact of gonadotropin administration on folliculogenesis in prepubertal *ob/ob* mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 245(1–2): 121–127. 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.11.003>
31. Di Carlo C., Tommaselli G.A., Nappi C. Effects of sex steroid hormones and menopause on serum leptin concentrations. *Gynecol. Endocrinol.* 16(6): 479–491. 2002.
<https://doi.org/10.1080/gye.16.6.479.491>
32. Kaszubska W., Falls H.D., Schaefer V.G., Haasch D., Frost L., Hessler P., Kroeger P.E., White D.W., Jirousek M.R., Trevillyan J.M. Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line. *Mol. Cell. Endocrinol.* 195(1–2): 109–118. 2002.
[https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(02\)00178-8](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(02)00178-8)
33. Bjørbaek C., El-Haschimi K., Frantz J.D., Flier J.S. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J. Biol. Chem.* 274(42): 30059–30065. 1999.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.42.30059>
34. Sominsky L., Hodgson D.M., McLaughlin E.A., Smith R., Wall H.M., Spencer S.J. Linking stress and infertility: a novel role for ghrelin. *Endocr. Rev.* 38(5): 432–467. 2017.
<https://doi.org/10.1210/er.2016-1133>
35. Heldsinger A., Grabauskas G., Wu X., Zhou S., Lu Y., Song I., Owyang C. Ghrelin induces leptin resistance by activation of suppressor of cytokine signaling 3 expression in male rats: implications in satiety regulation endocrinology. *Endocrinology.* 155(10): 3956–3969. 2014.
<https://doi.org/10.1210/en.2013-2095>
36. Lantz K.A., Hart S.G., Planey S.L., Roitman M.F., Ruiz-White I.A., Wolfe H.R., McLane M.P. Inhibition of PTP1B by trodusquemine (MS1-1436) causes fat-specific weight loss in diet-induced obese mice. *Obesity (Silver Spring).* 18(8): 1516–1523. 2010.
<https://doi.org/10.1038/oby.2009.444>

The Interrelation between the Adipokines Levels and Their Ratio in the Follicular Fluid and the Efficiency of *In Vitro* Fertilization in Women with the Normal and Increased Body Weight

**J. R. Ryzhov^{a, b, *}, A. O. Shpakov^b, N. N. Tkachenko^a, M. R. Mahmalieva^a,
I. Yu. Kogan^a, and A. M. Gzgzyan^a**

^a*Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproduction,
St. Petersburg, Russia*

^b*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian Academy of Sciences,
St. Petersburg, Russia*

**e-mail: julian.ryzhov@gmail.com*

Adipokines produced by adipose tissue are involved in the regulation of steroidogenesis and folliculogenesis and affect embryo implantation and endometrial receptivity. As a result, the adipokine levels and their ratio in the follicular fluid can be used to evaluate the effectiveness of the *in vitro* fertilization (IVF). The aim was to study the effect of the leptin, adiponectin and ghrelin levels and their ratios in the follicular fluid of women with the normal and increased body weight on the effectiveness and outcome of IVF. We studied women with normal body weight who became pregnant (PN, $n = 7$) or who did not become pregnant (nPN, $n = 14$) as a result of IVF, and overweight women ($\text{BMI} > 25 \text{ kg/m}^2$), who became pregnant (PO, $n = 5$) and not pregnant (nPO, $n = 19$) after IVF. In the PN group, the level of leptin in the follicular fluid was higher than in the nPN group ($p < 0.05$). In the PO and nPO groups, it did not differ, but was higher than in the groups with normal body weight. In the PN group, the ghrelin level was lower than in the nPN group ($p < 0.05$), while in the PO and nPO groups it was comparable. The leptin/adiponectin ratio in the PN group was higher than in the nPN group (7.05 ± 0.84 versus 2.97 ± 0.44 , $p < 0.05$), but lower than in the PO (13.80 ± 2.28) and nPO (11.28 ± 1.03) groups. The leptin/ghrelin ratio in the PN group was also higher than in the nPN group (18.46 ± 4.20 vs. 4.07 ± 0.68 , $p < 0.05$), but lower than in the PO (37.46 ± 21.59) and nPO (25.17 ± 3.97) groups. The prognostic significance of the leptin/ghrelin ratio was 25.13 (CI 1.24–509.15, $p = 0.035$). The adiponectin levels and the adiponectin/ghrelin ratio in the investigated groups did not differ. Thus, the prognostic significance of the leptin and ghrelin levels and the leptin/ghrelin and leptin/adiponectin ratios in the follicular fluid is due to the patient's body weight and metabolic status. The concentration of leptin and the ratio of leptin/ghrelin in the follicular fluid can be considered as valuable markers for assessing the success of IVF in women with normal body weight.

Keywords: leptin, adiponectin, ghrelin, *in vitro* fertilization, follicular fluid, overweight

ЦИТИРОВАТЬ:

Рыжов Ю.Р., Шпаков А.О., Ткаченко Н.Н., Махмадалиева М.Р., Коган И.Ю., Гзгзьян А.М. Взаимосвязь между уровнями адипокинов, их соотношением в фолликулярной жидкости и результативностью экстракорпорального оплодотворения у женщин с нормальной и повышенной массой тела. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(6): 783–792.

DOI: 10.31857/S0869813920060102

TO CITE THIS ARTICLE:

Ryzhov J.R., Shpakov A.O., Tkachenko N.N., Mahmalieva M.R., Kogan I.Yu., Gzgzyan A.M. The Interrelation between the Adipokines Levels and Their Ratio in the Follicular Fluid and the Efficiency of *In Vitro* Fertilization in Women with the Normal and Increased Body Weight. Russian Journal of Physiology. 106(6): 783–792.

DOI: 10.31857/S0869813920060102