

© Коллектив авторов, 2017  
УДК616-092

Никитина И.Л., Кудряшова Е.К., Масель А.С., Байрамов А.А., Шабанов П.Д.

## **Изменения уровня моноаминовых нейромедиаторов в ЦНС и кисспептина в крови у потомства гиперандрогенизированных самок крыс в эксперименте**

ФГБУ «Северо-Западный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, 197341, Россия, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Аккуратова, д. 2

**Актуальность.** Важную роль в механизмах формирования половой дифференцировки мозга (ПДМ) и полового поведения отводят межнейрональному сигналингу и взаимодействию нейромедиаторных систем мозга. Однако физиология и патология ПДМ остаются наименее изученными и требуют дальнейших исследований, в свете новых открытий нейроэндокринной регуляции гонадной оси системой kiss/kiss1R. **Цель** — изучение профиля моноаминовых медиаторов в ЦНС в ассоциации с уровнем кисспептинов в крови у потомства женского пола гиперандрогенизированных на разных сроках гестации самок крыс. **Методы.** Модель пренатальной гиперандрогенизации создана на самках крыс линии Wistar (50 крыс) путем внутривентрикулярного введения тестостерона беременным самкам на 11-е и 18-е сут. гестации. Изучали потомство этих животных. Экспериментальную группу составили самки крыс 2- и 4-месячного возраста с гиперандрогенизацией их матерей во 2-м и 3-м триместре беременности (по 5 особей). Контролем служили препубертатные самки крыс 2 мес. (5 особей) и пубертатные 4 мес. (5 особей), рожденные в условиях физиологически протекающей беременности. Измеряли уровень сывороточного кисспептина и тестостерона, а также концентрацию норэпинефрина (НЭ) и серотонина в структурах головного мозга. Обработку данных производили методами дисперсионного анализа, непараметрического анализа (Me) с использованием W-критерия Вилкоксона. **Результаты.** В ядрах гипоталамуса выявлено статистически значимое по сравнению с контролем повышение концентрации норэпинефрина (медиана, Me) 3,642 нг/мл и 2,132 нг/мл ( $p < 0,001$ ) во 2-м триместре, а также 3,685 нг/мл и 2,132 нг/мл ( $p < 0,001$ ) в 3-м триместре соответственно. В гиппокампе выявлено статистически значимое повышение уровня НЭ в сравнении с контролем (медиана, Me) 1,517 нг/мл и 0,068 нг/мл ( $p < 0,05$ ) во 2-м триместре; 2,068 нг/мл и 0,068 нг/мл ( $p < 0,05$ ) в 3-м триместре соответственно. В миндалевидном комплексе изменений уровня НЭ в сравнении с контролем выявлено не было. В гипоталамусе отмечалось статистически значимое снижение концентрации серотонина (С) при гиперандрогенизации в 3-м триместре (1,294 нг/мл против 1,637 нг/мл в контроле,  $p < 0,05$ ). В миндалевидном комплексе обнаружено статистически значимое снижение уровня С в группе андрогенизации на поздних сроках гестации (медианы, соответственно, 1,428 нг/мл в контроле и 0,885 нг/мл в группе андрогенизации в 3-м триместре,  $p < 0,05$ ). Значимых различий в уровне тестостерона в крови потомства самок крыс, андрогенизированных в разные сроки гестации, по сравнению с контролем выявлено не было. Уровень кисспептина статистически значимо возрастал в обеих опытных группах (2 и 4 мес.) при гиперандрогенизации на более поздних сроках гестации. Медианы кисспептина двухмесячных крыс, андрогенизированных в 3-м триместре, по сравнению с двухмесячным контролем составили 0,67 нг/мл и 0,17 нг/мл ( $p < 0,05$ ); 4-месячных крыс того же срока андрогенизации по сравнению с четырехмесячным контролем — 0,64 нг/мл и 0,31 нг/мл соответственно ( $p < 0,05$ ). **Заключение.** Избыток тестостерона на ранних сроках гестации оказывает тератогенное действие на потомство. Разнонаправленные изменения нейромедиаторного сигналинга, возникшие на фоне пренатальной гиперандрогенизации на поздних сроках гестации, опосредованно могут приводить к инверсиям половой дифференцировки и полового поведения. Пренатальная гиперандрогенизация ассоциирована с повышением уровня кисспептина крови, что позволяет предположить опосредованное влияние гиперандрогенизации на поздних сроках гестации на активацию кисспептинового сигналинга и ассоциированную с этим активацию гонадной оси. Продолжение изучения ассоциации изменения профиля нейромедиаторов моноаминового ряда и динамики кисспептина способно расширить понимание механизмов половой дифференцировки мозга и транслировать полученные данные в клиническую практику.

**Ключевые слова:** норэпинефрин, серотонин, кисспептины, половая дифференцировка мозга, гиперандрогенизация, самки крыс.

**Для цитирования:** Никитина И.Л., Кудряшова Е.К., Масель А.С., Байрамов А.А., Шабанов П.Д. Изменение уровня моноаминовых нейромедиаторов в ЦНС и кисспептина в крови у потомства гиперандрогенизированных самок крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(1): 4–12.

**Для корреспонденции:** Никитина Ирина Леоровна, e-mail: nikitina0901@gmail.com

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила** 13.10.2016

Nikitina I.L., Kudryashova E.K., Masel A., Bairamov A.A., Shabanov P.D.

## ***Level of monoamine neurotransmitters in the central nervous system and kisspeptin in blood in the offsprings of experimentally induced model hyperandrogenisation in female rats***

«North-West Federal Medical Research Center named after Almazov»;

2, ul. Akkuratova, St. Petersburg, 197341, Russia

**Background.** An important role in the mechanisms of the formation of the sexual differentiation of the brain and sexual behavior assign interneuronal signaling and interaction of neurotransmitter systems in the brain. However, PDM physiology and pathology are the least understood and requires further research, in the aspects of new discoveries neuroendocrine regulation of gonadal axis by kiss / kiss1R system. **The purpose.** To study the profile of monoamine neurotransmitters in the central nervous system, in association with blood levels of kisspeptin in female offspring with prenatal hyperandrogenisation at different stages of gestation in female rats. **Methods.** The experimental model was created in female Wistar rats (total 50 rats). Prenatal hyperandrogenisation model was created by intraperitoneal injection of testosterone to pregnant females at 11 and 18 days of gestation. Next, the resulting offspring was investigated. During the experiment set up control groups — prepubertal female rats aged 2 months (5 individuals) and pubertal female rats aged 4 months (5 individuals), those born in a physiological pregnancy. Experimental group were female rats aged 2 and 4 months with hyperandrogenisation in 2 and 3 trimester (5 individuals). In all groups the serum levels of testosterone, kisspeptin and the concentration of norepinephrine and serotonin in the brain structures were measured. Processing of the data was performed by analysis of variance, non-parametric analysis (Me) by using the Wilkoxson criterion. **Results.** In the hypothalamic nuclei a significant increase of NE concentration was found, compared to a control group (median (Me), respectively 3,642 ng/ml and 2,132 ng/ml,  $p < 0.001$  in the 2nd trimester, 3,685 ng/ml and 2,132 ng/ml,  $p < 0.001$  3 trimester). In the hippocampus a significant increase of NE was revealed in comparison with controls (median (Me) respectively 1,517 ng/ml and 0.068 ng/ml,  $p < 0.05$  in the 2nd trimester; 2,068 ng/ml and 0.068 ng/ml,  $p < 0.05$  in the 3rd trimester). In the amygdala NE-level changes in comparison to a control group was not revealed. In the hypothalamus there was a significant decrease of SER concentration in rats with hyperandrogenisation in 3 trimester (1,294 ng/ml versus 1.637 ng/ml in the controls ( $p < 0.05$ )). In the amygdala SER level decreased in group with androgenisation in 3rd trimester — a median, respectively, 1.428 ng/ml in the control and 0.885 ng/ml in the experimental group,  $p < 0.05$ ). The study did not found significant differences in the level of testosterone in the blood of female rats hyperandrogenised at different stages of gestation, compared with age-matched controls and within groups. Kisspeptin level was significantly increased in both experimental groups (2 months and 4 months) at androgenisation in 3rd trimester. Kisspeptin median in 2-month aged rats androgenised in the 3rd trimester compared with the 2-month control group was 0.67 ng/ml and 0.17 ng/ml ( $p < 0.05$ ); 4-month aged rats with androgenisation in the same period compared to 4-month controlgroup — 0.64 ng/ml and 0.31 ng/ml, respectively ( $p < 0.05$ ). **Conclusions.** An excess of testosterone in early gestation has teratogenic effects in the offspring. Opposite changes in neurotransmitter signaling, arising on a background of prenatal hyperandrogenisation in the later stages of gestation, may indirectly lead to inversions of sexual differentiation and sexual behavior. Prenatal hyperandrogenisation is associated with higher levels of kisspeptin in blood, what suggesting an indirect effect of androgenisation in the later stages of gestation on activation kisspeptin signaling and activation of the gonadal axis. Continuation of the study of the association profile changes of monoamine neurotransmitters and dynamics of kisspeptin able to expand the understanding of the mechanisms of sexual differentiation of the brain and translate the findings into clinical practice.

**Keywords:** norepinephrine; serotonin; kisspeptin; sexual differentiation of the brain; hyperandrogenisation; female rats.

**For citation:** Nikitina I.L., Kudryashova E.K., Masel A., Bairamov A.A., Shabanov P.D. Level of monoamine neurotransmitters in the central nervous system and kisspeptin in blood in the offsprings of experimentally induced model hyperandrogenisation in female rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61 (1): 4–12. (in Russ.).

**For correspondence:** Nikitina I.L. Professor, M.D., Ph.D., Chief of Pediatric Endocrinology Department «North-West Federal Medical Research Center named after Almazov»; 2, ul. Akkuratova, St. Petersburg, 197341, Russia, e-mail: nikitina0901@gmail.com

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

**Received** 13.10.2016

## Введение

Вопросы, связанные с пониманием многоуровневых взаимосвязей между нервной и эндокринной системами, лежащих в основе формирования психического статуса, эмоций, когнитивных функций, особенностей поведения, включая половую самоидентификацию и сексуальную ориентацию, сохраняют актуальность и большой исследовательский интерес. С середины XIX столетия, и особенно во второй половине прошлого века, отмечается активное развитие новой науки — психонейроэндокринологии, изучающей роль нейрогуморальной системы организма в контроле и регулировании интегративной деятельности головного мозга человека [1—4]. В иерархической структуре управления названными процессами гормонам отводится промежуточная позиция между нейромедиаторами и ферментами, которые осуществляют непосредственный межсинаптический сигналинг и регулируют метаболического гомеостаза организма. При этом очевидно, что количественные и качественные нарушения синтеза и секреции гормонов, равно как и нейромедиаторов центральной нервной системы (ЦНС), способны привести к глубоким депривациям в психической и поведенческой сфере [5, 6]. Частным случаем в этой области является нарушение половой дифференцировки мозга. Исторически взгляды на половую самоидентичность и физиологические механизмы, лежащие в ее основе, претерпевали изменения. С середины 70-х годов прошлого века произошла смена концепции половой дифференцировки мозга — на смену ранее пропагандируемому убеждению, что половая самоидентификация и поведение человека полностью определяются внешними факторами (социальной средой, воспитанием в присвоенном поле), что не оправдало себя, так как повзрослевшие пациенты часто не соглашались с ранее установленным полом, пришла современная концепция, согласно которой половая дифференцировка мозга пренатальна и необратима. Среди наиболее важных факторов, определяющих пренатальную дифференцировку мозга во второй половине внутриутробного периода развития плода, имеют значение уровень андрогенов, экспрессия ряда генов, уровень кисспептина и, вероятно, другие факторы, характер влияния которых недостаточно изучен до настоящего времени [7, 8]. В физиологических условиях внутриутробно из половых стероидов именно андрогены (тестостерон) должны активно синтезироваться у плодов мужского пола. При патологическом развитии плода андрогены могут избыточно присутствовать у плодов женского и отсутствовать у плодов мужского пола. Роль тестостерона состоит в оказании дифференцирующего в сторону маскулинности влияния на половую дифференцировку мозга. Получены данные о существовании двух пулов

тестостерона в ЦНС — ароматизированного в эстрогены (эстрадиол, эстрон), которые взаимодействуют с соответствующими лигандами структур головного мозга, и неароматизированного (5-альфа дигидротестостерона), который играет важную роль в формировании сексуальных функций в соответствии с мужским полом. Между эстрогенами и андрогенами в ЦНС существуют сложные, не до конца изученные, взаимоотношения. К числу новых регуляторных систем полового поведения и идентичности относится лиганд-рецепторная система кисспептинов, включающая ген *KISS1*, рецептор *KISS1R* и собственно кисспептины, относящиеся к числу пептидных сигнальных регуляторов большого числа функций, имеющих отношение к поддержанию функциональной активности репродуктивной системы, регуляции взаимодействий между периферическими и центральными отделами гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, а также к процессам половой дифференцировки мозга [9—11]. Взаимодействие и передача информационных сигналов как в гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, так и при межнейрональном сигналинге в пределах ЦНС, опосредовано действием нейромедиаторов, изменяющих концентрации в ответ на действие гормонов и биологически активных пептидов, к которым относятся, в том числе кисспептины. Исследования последних десятилетий дают интересную научную информацию в отношении количественных изменений, топики секретирующих ядер моноаминовых нейромедиаторов в ассоциации с клиническими наблюдениями вариантов полового поведения, сексуальной самоидентификации и ориентации животных мужского и женского пола. Так, существует гипотеза, что в основе гомосексуальной и бисексуальной половой ориентации имеет место сильная норадренергическая и слабая серотонинергическая системы [12]. Другими исследователями [13] показано, что повышение уровня НЭ, секретируемого медиальными ядрами преоптической зоны гипоталамуса, сопровождается повышением сексуальной активности и возбуждения, в то время как высвобождение серотонина (С) латеральными ядрами переднего гипоталамуса, напротив, снижало сексуальное влечение, так как ингибировались дофаминсекретирующие нейроны [13]. Lin T.W. и соавт. (2013) подчеркивали, что наличие тестостерона, инициирующего повышение уровня окиси азота, являлось необходимым условием для реализации дофаминергической секреции в медиальных преоптических ядрах гипоталамуса. При этом они отметили, что взаимные изменения дофаминовой и серотониновой секреции в различных областях головного мозга способствовали как повышению сексуальной активности, так и появлению сексуальной удовлетворенности [14]. Однако, несмотря на достаточно ак-

тивное исследование изменений уровней нейромедиаторов — производных моноаминов, сохраняются открытыми ряд вопросов, касающихся нейрофизиологических основ формирования полового поведения, самоидентификации и сексуальной роли индивидуума. В последние годы интенсивно изучается роль лиганд-рецепторной системы кинспептина в вышеуказанных процессах, а также характер взаимодействий последних с нейромедиаторами ЦНС и половыми гормонами [9, 11]. Вместе с тем, в клинической практике часто возникает необходимость принятия решений, связанных с присвоением пола пациентам, имеющим анатомические нарушения половой дифференцировки. При этом сами пациенты, в силу раннего возраста либо других причин, не всегда способны участвовать в таком решении, и перед клиницистом стоит задача максимально точно прогнозировать характер пренатальной половой дифференцировки мозга в каждом индивидуальном случае. Ошибочное заключение при этом способно тяжело травмировать психику растущего пациента впоследствии, привести к психосоциальной дезадаптации и даже суициду. Поэтому расширение знаний в области психонейроэндокринологии половой дифференцировки мозга, а также поиск и определение биохимических и гуморальных маркеров, способных оказать помощь в предиктивной диагностике психологического пола, имеют несомненную актуальность.

В подавляющем большинстве публикаций, посвященных пренатальной гиперандрогенизации изучался моноаминовый сигналинг у потомства мужского пола, при этом подобные исследования у потомства женского пола немногочисленны. В связи с этим исследование последствий пренатальной гиперандрогенизации в отношении гендер-ассоциированной дифференцировки мозга у самок крыс в свете существующей в настоящее время научной концепции значимого влияния пренатального уровня андрогенов на половую дифференцировку мозга и связанную с ней половую идентификацию, лежащую в основе понятия психологического пола, представляется очень важным и нуждается в дальнейших исследованиях.

*Цель исследования* — изучение профиля моноаминовых медиаторов в ЦНС в ассоциации с уровнем кинспептинов в крови у потомства женского пола гиперандрогенизированных на разных сроках гестации самок крыс.

### Методика

Опыты выполнены на 50 половозрелых самках крыс линии Wistar, выращенных в условиях вивария. Животных содержали при свободном доступе к воде и пище. Все опыты проведены в осенне-зимний период.

Модель гиперандрогенизации создавали путем внутривентрикулярного введения беременным самкам на 11-е сут. гестации (2-й триместр,  $n = 20$ ) и 18-е сут. гестации (3-й триместр,  $n = 19$ ) тестостерона в дозе 30 мг/кг. Беременным самкам интактных крыс (группа контроля,  $n = 20$ ) вводили в эти же сроки стерильный апиrogenный физиологический раствор (0,01 мл/г 0,9% NaCl внутривентрикулярно). От самок с пренатальной андрогенизацией во 2-м триместре получено потомство 37 крысят, из них: мертворожденных 7, самок 20, самцов 10.

От самок с гиперандрогенизацией в 3-м триместре получено потомство 30 крысят, из них: мертворожденных 2, самок 18, самцов 10.

Объектом дальнейшего изучения было потомство женского пола.

Были сформированы следующие группы:

- 1-я группа — двухмесячные самки, ( $n = 5$ ), 2-я — четырехмесячные самки ( $n = 5$ ), рожденные в условиях пренатальной гиперандрогенизации во 2-м триместре.

- 3-я и 4-я группы, соответственно двух- ( $n = 5$ ) и четырехмесячные ( $n = 5$ ) самки, рожденные в условиях пренатальной гиперандрогенизации в 3-м триместре.

- 5-я и 6-я группы — контроль: самки, рожденные в условиях физиологически протекающей беременности в возрасте 2 ( $n = 5$ ) и 4 мес. ( $n = 5$ ).

Критерии исключения: любые отклонения от стандартов линии Wistar по массе, возрасту и видимым признакам. Экстраполирование на соответствующие стадии полового развития у человека: крысы 2-месячного возраста — препубертатный период, 4-месячного — завершившееся половое созревание у человека.

Концентрацию норэпинефрина (НЭ) и серотонина (С) в структурах мозга потомства определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на «Beckman System Gold» с электрохимическим детектором LC-4С. В исследованиях использовали структуры, участвующие в реализации поведенческих половых реакций — гиппокамп, миндалевидный комплекс и гипоталамус. Участки мозга выделяли при  $-20^{\circ}\text{C}$  и сохраняли в жидком азоте. Для хроматографического анализа структуры мозга гомогенизировали в охлажденной 0,1 N хлорной кислоте, и центрифугировали при 14000 г в течение 7 мин при  $4^{\circ}\text{C}$ . Каждая структура мозга сохранялась в отдельной 0,2-мл пробирке, после взвешивания переносилась в 0,5-мл пробирку, где гомогенизировалась в течение 45—60 с на ледяной подложке с помощью микрогомогенизатора с наконечником из стальной проволоки. Далее, гомогенат центрифугировали в этой же пробирке в микроцентрифуге (Beckman, Германия). Слой супернатанта фильтровали через

0,20-мм Millipore фильтр. Часть супернатанта в объеме 20 мкл вводили в систему HPLC-ED. Аналитическое время пробега пробы в хроматографической колонке составляло 18 мин в изократическом режиме при скорости 1.0 мл/мин. Идентификацию и чистоту хроматографических пиков, а также их количественную оценку осуществляли по отношению к пикам, полученным от внешних стандартов. Стандарты для контроля определяемых медиаторов и их метаболитов вводили в систему в начале и в конце работы хроматографа.

Концентрацию кисспептина в плазме крови крыс определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием Elisa Kit набора (CSB-E1343rTestEnzyme-linkedImmunsorbentAsay-KitForthe quantitative determination of rat kisspeptin-1 (KISS1),China) и сравнивали с приготовленными стандартами (с концентрацией 10 нг/мл, 5 нг/мл, 2,5 нг/мл, 1,25 нг/мл, 0,625 нг/мл, 0,312 нг/мл, 0,156 нг/мл, 0 нг/мл) на аппарате вертикального оптического абсорбциометра-монохроматора BioTek Synergy 2. Концентрацию тестостерона в плазме крови крыс определяли методом твердофазного иммуноферментного анализатора Synergy 2 (BioTek USA) с использованием Elisa Kit набора (CSB-E05100rTestEnzyme-linkedImmunsorbentAsayKitForthe quantitative determination of rat testosterone concentrations, China) и сравнивали с приготовленными стандартами (с концентрацией 25,6 нг/мл, 6,4 нг/мл, 2 нг/мл, 0,5 нг/мл, 0,13 нг/мл, 0 нг/мл) на аппарате вертикального оптического абсорбциометра-монохроматора BioTek Synergy 2.

В ходе подготовки и проведения эксперимента были соблюдены принципы гуманного отношения к лабораторным животным в соответствии с «Руководящими методическими материалами по экспериментальному и клиническому изучению новых лекарственных средств» (1984), «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985) и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 2003 г. № 267).

#### *Методы статистического анализа*

Выборка для каждой группы крыс составила не менее 5 животных. Для оценки значимости влияния изучаемых факторов на полученный результат использовали метод однофакторного дисперсионного анализа; для сравнения пар показателей в группах опыта и контроля применяли непараметрический метод рангового сравнения — вычисление парного критерия Вилкоксона (W-критерий). Различия считали существенными при уровне значимости различий  $p < 0,05$ . Статистическую обработку проводили в пакете программ Microsoft Excel 2010®.

## **Результаты и обсуждение**

Представленные в данной публикации результаты являются фрагментом клинико-экспериментального исследования, проводимого с целью углубления понимания нейроэндокринных основ сексуальной дифференцировки мозга в ассоциации с особенностями полового поведения и самоидентификации. Базируясь на современной концепции пренатального завершения и необратимости формирования психологического пола, и значимой роли тестостерона в данном процессе, экспериментальная часть исследования была основана на создании модели гиперандрогенизации беременных самок крыс на разных (ранних и поздних) сроках гестации, и анализе изменений нейромедиаторного и гуморального профиля в центральных и периферических отделах гонадной оси потомства женского пола. Анализ был проведен в сравнительном аспекте с интактными крысами в двух возрастно-физиологических этапах жизни — препубертатном (потомство 2 мес.) и пубертатном (потомство 4 мес.). В работе планировалась оценка как прямого влияния препарата на развивающийся внутриутробно плод, так и опосредованного, так как введение препарата производилось не непосредственно потомству, а беременной самке, т.е. оценивалось влияние тестостерона на различные функции, связанные в пределах гонадной оси, с регуляторными процессами лежащими в основе гендер-специфической дифференцировки головного мозга.

На первом этапе были оценены последствия прямого влияния фармакологических доз тестостерона. В ходе осмотра потомства крыс, андрогенизированных на более ранних сроках гестации, отмечались врожденные пороки развития хвостов и задних лапок (перетяжки, укорочение, фокомелия). Также в этой группе был констатирован более высокий процент мертворождения — 18,9% по сравнению с потомством, полученном от самок с гиперандрогенизацией в 3-м триместре, где аналогичный показатель составил всего 6%. Принимая во внимание, что процессы эмбриогенеза протекают на ранних этапах гестации, и воздействия повреждающих факторов на этих сроках могут приводить к формированию врожденных пороков, часто не совместимых с жизнью, значимое повышение мертворожденности и врожденных аномалий среди потомства андрогенизированных на ранних сроках гестации крыс указывает на тот факт, что тестостерон может оказывать значимое тератогенное действие, если присутствует во время гестации в нефизиологических количествах.

Исследование профиля моноаминовых нейромедиаторов НЭ и С проведено в 3 ассоциированных с половым диморфизмом структурах ЦНС — гипоталамусе, гиппокампе и миндалевидном комплексе. Каждая из названных структур играет определенную роль в иерархи-

ческой системе управления половыми функциями организма, при этом гипоталамус имеет наиболее высокую плотность нейросекреторных ядер, секретирующих гонадотропин-рилизинг гормон (ГнРГ), кинспептины и другие биологически активные нейромедиаторы.

В ядрах гипоталамуса у потомства женского пола при гиперандрогенизации во 2-м и 3-м триместрах было выявлено значимое повышение концентрации НЭ в сравнении с группой контроля (табл. 1). В гиппокампе были получены сходные результаты — в группах пренатальной гиперандрогенизации во 2-м

и 3-м триместрах было выявлено статистически значимое повышение уровня НЭ в сравнении с контролем (табл. 2). В миндалевидном комплексе, вне зависимости от сроков гиперандрогенизации, изменений уровня НЭ в сравнении с группой контроля не выявлено. Сделано общее заключение, что вне зависимости от сроков воздействия фактор пренатальной гиперандрогенизации оказывал значимое влияние на концентрацию НЭ в структурах гиппокампа и гипоталамуса, не влияя на уровень данного нейромедиатора в структурах миндалевидного комплекса.

Таблица 1

Уровень нейромедиаторов в гипоталамусе потомства женского пола гиперандрогенизированных на разных сроках гестации самок крыс

Нейромедиатор	Показатель	Контроль (n = 10)	Потомство андрогенизированных во 2-м триместре крыс (n = 10)	Потомство андрогенизированных в 3-м триместре крыс (n = 10)	p
Норэпинефрин	Медиана (нг/мг сырой ткани)	2,132	3,642	3,685	p* < 0,001 p** < 0,001
	Дисперсия	0,020	0,471	0,383	
Серотонин	Медиана (нг/мг сырой ткани)	1,637	1,432	1,294	p* > 0,05 p** < 0,05
	Дисперсия	0,004	0,236	0,033	

Примечание. p\* — сравнение группы андрогенизированных во 2-м триместре с контролем; p\*\* — сравнение группы андрогенизированных в 3-м триместре с контролем

Таблица 2

Уровень нейромедиаторов в гиппокампе потомства женского пола гиперандрогенизированных на разных сроках гестации самок крыс

Нейромедиатор	Показатель	Контроль (n = 10)	Потомство андрогенизированных во 2-м триместре крыс (n = 10)	Потомство андрогенизированных в 3-м триместре крыс (n = 10)	p
Норэпинефрин	Медиана (нг/мг сырой ткани)	0,068	1,517	2,068	p* < 0,05 p** < 0,05
	Дисперсия	0,001	1,486	0,985	
Серотонин	Медиана (нг/мг сырой ткани)	0,837	0,989	1,121	p* > 0,05 p** > 0,05
	Дисперсия	0,001	0,036	0,043	

Примечание. p\* — сравнение группы андрогенизированных во 2-м триместре с контролем; p\*\* — сравнение группы андрогенизированных в 3-м триместре с контролем

Таблица 3

Уровень нейромедиаторов в миндалевидном комплексе потомства женского пола гиперандрогенизированных на разных сроках гестации самок крыс

Нейромедиатор	Показатель	Контроль (n = 10)	Потомство андрогенизированных во 2-м триместре крыс (n = 10)	Потомство андрогенизированных в 3-м триместре крыс (n = 10)	p
Норэпинефрин	Медиана (нг/мг сырой ткани)	0,674	0,92	0,781	p* > 0,05 p** > 0,05
	Дисперсия	0,005	1,757	1,789	
Серотонин	Медиана (нг/мг сырой ткани)	1,428	1,221	0,885	p* > 0,05 p** < 0,05
	Дисперсия	0,002	0,09	0,111	

Примечание. p\* — сравнение группы андрогенизированных во 2-м триместре с контролем; p\*\* — сравнение группы андрогенизированных в 3-м триместре с контролем

Динамика изменений уровня серотонина была не столь однонаправленной. Так, в гипоталамусе значимое снижение концентрации С отмечалось только в группе потомства самок, андрогенизированных на поздних сроках гестации. Данная тенденция к снижению имела место и в отношении группы андрогенизации во 2-м триместре, однако статистически значимых различий установлено не было (табл. 1). В миндалевидном комплексе изменения были сходными с таковыми в гипоталамусе — снижение уровня С в группе андрогенизации на поздних сроках гестации (табл. 3). В гиппокампе значимых изменений уровня С во всех исследуемых группах установлено не было (табл. 1—3).

Таким образом, основные изменения уровня нейромедиатора С были выявлены у потомства женского пола самок, гиперандрогенизированных на поздних

сроках гестации, и заключались в снижении его концентрации в структурах гипоталамуса и миндалевидного комплекса по сравнению с таковым у интактных крыс сопоставимой по полу и возрасту группы.

Следующим этапом исследования был сравнительный анализ уровня тестостерона и ксипептина в крови потомства женского пола гиперандрогенизированных самок крыс. Статистически значимых различий в уровне тестостерона в крови потомства самок крыс, андрогенизированных в разные сроки гестации, по сравнению с соответствующим контролем, не отмечено (табл. 4).

Сделано заключение, что пренатальная андрогенизация беременных самок крыс (непрямое действие на потомство), не приводила к значимым отклонениям в уровне тестостерона в плазме.

Таблица 4

Концентрация тестостерона в плазме крови самок крыс (нг/мл)

Группы	Концентрация тестостерона в плазме (нг/мл)					Ме	W-критерий	р
Контроль 2 мес. (n = 5)	3,98	5,78	4,34	5,12	4,17	4,34	** 0,31 *** 1,15	**>0,05 ***>0,05
Контроль 4 мес. (n = 5)	3,02	5,13	4,67	5,22	6,47	5,13	**** 0,31 ***** 0,94	****>0,05 *****>0,05
2 триместр 2 мес. (n = 5)	7,42	6,97	4,04	3,9	4,39	4,39		
2 триместр 4 мес. (n = 5)	6,40	6,75	3,01	5,69	4,61	5,69		
3 триместр 2 мес. (n = 5)	7,92	4,59	5,23	4,84	4,63	4,84		
3 триместр 4 мес. (n = 5)	5,04	2,99	1,63	3,97	7,46	3,97		

Примечание. \* W-критерий — критерий Вилкоксона; \*\* — сравнение «контроль 2 мес. — 2 триместр 2 мес.»; \*\*\* — сравнение «контроль 2 мес. — 3 триместр 2 мес.»; \*\*\*\* — сравнение «контроль 4 мес. — 2 триместр 4 мес.»; \*\*\*\*\* — сравнение «контроль 4 мес. — 3 триместр 4 мес.»; \*\*\*\*\* — сравнение «2 триместр 4 мес. — 3 триместр 4 мес.».

Таблица 5

Концентрация ксипептина в плазме самок крыс (нг/мл)

Группы	Концентрация ксипептина в плазме (нг/мл)					Ме	W-критерий	р
Контроль 2 мес. (n = 5)	0,13	0,24	0,17	0,21	0,14	0,17	** 41,2 *** 2,4	**<0,01 ***<0,05
Контроль 4 мес. (n = 5)	0,39	0,29	0,23	0,31	0,41	0,31	**** 1,36 ***** 2,6	****>0,05 *****<0,01
2 триместр 2 мес. (n = 5)	0	0	0,01	0,61	0,47	0,01	***** 0,1	*****>0,05
2 триместр 4 мес. (n = 5)	0,99	0,27	0,35	0,93	0,67	0,67		
3 триместр 2 мес. (n = 5)	0,67	0,82	0,89	0,23	0,39	0,67		
3 триместр 4 мес. (n = 5)	0,64	0,44	0,75	0,86	0,51	0,64		

Примечание. \* W-критерий — критерий Вилкоксона; \*\* — сравнение «контроль 2 мес. — 2-й триместр 2 мес.»; \*\*\* — сравнение «контроль 2 мес. — 3-й триместр 2 мес.»; \*\*\*\* — сравнение «контроль 4 мес. — 2-й триместр 4 мес.»; \*\*\*\*\* — сравнение «контроль 4 мес. — 3-й триместр 4 мес.»; \*\*\*\*\* — сравнение — 2-й триместр 4 мес. — 3-й триместр 4 мес.

Иные результаты были получены в отношении концентраций ксиспептина в плазме. Установлено, что уровень ксиспептина статистически значимо возрос в обеих опытных группах (2- и 4-мес.) при гиперандрогенизации на поздних сроках гестации (табл. 5). В группе потомства крыс, андрогенизированных на ранних сроках гестации (во 2-м триместре), изменения уровня белка ксиспептина было разнонаправленным и незакономерным (табл. 5).

Таким образом, в отличие от результатов, представленных выше в отношении тестостерона, пренатальная андрогенизация беременных самок крыс, (непрямое действие на потомство), приводила к статистически значимому возрастанию, плазменного уровня ксиспептина.

Подводя общий итог проведенного исследования, представляется целесообразным обсудить следующее. Избыток тестостерона на ранних и поздних сроках гестации, способен оказывать прямое и опосредованное, разнонаправленное влияние на развитие потомства женского пола. При андрогенизации на ранних, ассоциированных с эмбриогенезом, сроках пренатального развития плода очевидно тератогенное действие тестостерона, приводящее как к значимому росту внутриутробной гибели плода, так и к увеличению числа видимых врожденных аномалий развития. В структурах ЦНС, имеющих отношение к регуляции полового развития и половой дифференцировке мозга, наиболее выраженные изменения нейромедиаторного сигналинга связаны, напротив, с более поздним периодом гиперандрогенизации. Так, установлено значимое повышение уровня нейромедиатора нораэпинефрина, способного, по мнению ряда исследований, опосредовать влияние андрогенов на половую дифференцировку мозга и быть ассоциированным с маскулинизацией у особей женского пола. Избыток уровня дофамина и его производных, к которым относится НЭ, влечет повышение агрессивности, жестокости, гиперсексуальности в половом поведении, независимо от гендерной принадлежности. Что касается профиля другого исследуемого нейромедиатора, серотонина, то выявленные изменения его уровня также были диагностированы в группах с более поздним периодом андрогенизации. Установленное снижение уровня С у потомства женского пола, несомненно, способно также оказывать детерминирующее влияние на половое поведение и дифференцировку, что подтверждают данные, свидетельствующие об ассоциациях низкого уровня этого нейромедиатора с инверсиями половой ориентации, в частности, гомосексуальности и бисексуальности.

Что касается изучения периферических гуморальных взаимодействий, то следует подчеркнуть, что отсутствие каких-либо изменений уровня тестостерона

в крови самок крыс, андрогенизированных пренатально, свидетельствует об отсутствии прямого влияния тестостерона на изменение гормонального статуса. Тем больший интерес представляют полученные результаты в отношении динамики уровня ксиспептина. Фактор андрогенизации на поздних сроках гестации привел к существенному возрастанию уровня этого пептида в крови потомства, что опосредовано, учитывая предшествующие данные в отношении тестостерона, непрямым воздействием этого фактора на ксиспептиновый сигналинг. Учитывая обсуждаемое в последние годы многообразное участие системы KISS-KISS1R в регуляции функциональной активности гонадной оси и детерминацию полового поведения, можно гипотетически предположить неслучайность и взаимосвязанность однонаправленных событий, касающихся нейромедиаторного сигналинга в ЦНС (повышение дофаминовых производных (НЭ), снижение серотонина) и повышение плазменного уровня ксиспептина у особей женского пола, имевших пренатальную гиперандрогенизацию на поздних сроках гестации. Основываясь на современной концепции половой дифференцировки мозга, предполагающей одним из основных детерминирующих факторов последней дифференцирующее действие тестостерона именно во второй половине гестации, т.е. на более поздних, по отношению к анатомической дифференцировке пола, сроках, следует подчеркнуть, что практически все значимые изменения, в сравнении с контрольной группой потомства интактных крыс, были выявлены именно в группе с андрогенизацией на поздних сроках гестации, что, в связи с этим, может рассматриваться, как обоснование нейрогуморальных основ нарушений формирования психологического пола в соответствии с анатомическим.

Продолжение изучения ассоциации изменения профиля нейромедиаторов моноаминового ряда и динамики ксиспептина способно расширить понимание механизмов половой дифференцировки мозга и транслировать полученные данные в клиническую практику.

## References

1. Sapronov N.S., Fedotova Y.O. *Hormones of hypothalamic-pituitary-thyroid system and brain. [Gormony gipotalamo-gipofizarno-tireoidnoi sistemy i mozg]*. St.Peterburg: Lan'; 2002. (in Russian)
2. Dorner G. *Perinatal hormone levels and brain organization*. In: Stumpf W.E., Grant L.D. *Anatomical Neuroendocrinology*. Basel: Karger; 1975:245-252. doi:10.1159/000398041
3. Dorner G. *Hormones, brain development and fundamental processes of life*. In: Dorner G. *Hormones and Brain Development*. Amsterdam: Elsevier; 1978:13-25.
4. Nikitina I.L. *Pediatric endocrinology. [Detskaya endokrinologiya]*. Rostov-na-Donu: Feniks; 2006. (in Russian)
5. Curzon G. A relationship between brain serotonin and adrenocortical secretion and its possible significance in endo-



genous depression. *Pharmacopsychiatry*. 1969; 2(4):234-244. doi:10.1055/s-0028-1094251

6. Ettigi P.G., Brown G.M. Psychoneuroendocrinology of affective disorder. *Am J Psychiatry*. 1977;134(5):493-501. doi:10.1176/ajp.134.5.493

7. Worrell L.A. *Sexual differentiation of the brain related to gender identity: beyond hormones*. Master Thesis, Faculty of Medicine, Universiteit Utrecht [Internet] 2010. [cited 2016 Nov 1]. Available from: <http://dspace.library.uu.nl/handle/1874/182733>

8. Swaab D.E., Garcia-Falgueras A. Sexual differentiation of the human brain in relation to gender identity and sexual orientation. *Funct Neurol*. 2009; 24(1):17-28.

9. Tena-Sempere M. Roles of kisspeptins in the control of hypothalamic-gonadotropic function: focus on sexual differentiation and puberty onset. *Endocr Dev*. 2010;17:52-62. doi: 10.1159/000262528

10. Nikitina I.L. The timing of puberty: well-known and new. *Arterial'naya gipertenziya*. 2013; 19(3): 227-36. (in Russian)

11. Nikitina I.L., Bayramov A.A., Khoduleva Y.N., Shabanov P.D. Kisspeptins in physiology and pathology of sex development — new diagnostic and therapeutic approaches. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii*. 2014; 12(4): 3-12. (in Russian) doi: 10.17816/RCF1243-12

12. Fitzgerald P.J. A neurotransmitter system theory of sexual orientation. *J Sex Med*. 2008;5(3):746-748. doi:10.1111/j.1743-6109.2007.00693.x

13. Kim S.W., Schenck C.H., Grant J.E., Yoon E, Dosa P.I., Odlaug B.L. et al. Neurobiology of sexual desire. *NeuroQuantology*. 2013; 11(2):332-59. doi:10.14704/nq.2013.11.2.662

14. Lin T.W., Kuo Yu.M. Exercise benefits brain function: the monoamine connection. *Brain Sci*. 2013; 3(1): 39-53. doi:10.3390/brainsci3010039

### Сведения об авторах:

Кудряшова Елена Константиновна аспирант кафедры детских болезней, врач, e-mail: aksi-lena@rambler.ru

Масель Алиса Сергеевна клинический ординатор кафедры детских болезней; врач, e-mail: masel.alisa@gmail.com

Байрамов Алекбер Азизович доктор мед. наук, д.м.н., врач, e-mail: alekber@mail.ru

Шабанов Петр Дмитриевич доктор мед. наук, проф., вед. науч. сотр. НИЛ детской эндокринологии, e-mail: shabanov@mail.rcom.ru