© Коллектив авторов, 2016
УДК 616.69-008.6

Никитина И.Л., Ходулева Ю.Н., Масель А.С., Байрамов А.А., Шабанов П.Д.

# Система KISS-KISS1R: периферический сигналинг в андрогензависимых тканях в модели мужского гипогонадизма

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

Система кисспептина, включающая в себя ген KISS-1, кисспептины и G-протеин связывающий рецептор 54 (GPR54), в последние годы рассматривается как ключевое звено активации гонадотропной оси. Эффекты кисспептинов на гонады и периферические ткани мало изучены. **Цель.** Изучить влияние экспериментального гипогонадизма самцов крыс на кисспептиновый сигналинг в андрогензависимых периферических тканях и крови. **Методы.** Экспериментальная модель создана на самцах крыс линии Wistar (31 крыса). Созданы группы контроля — препубертатные крысы 2 мес. и пубертатные крысы 4 мес. Экспериментальная группа — крысы после односторонней гонадэктомии (ОГЭ) в неонатальном периоде и после ОГЭ в неонатальном периоде, получавшие терапию тестостерона пропионатом (5 мг/кг/сут. 10 сут.). Измерялась плотность GPR54 в яичках и мышцах, сывороточное содержание кисспептина и тестостерона. Статистические методы — непараметрический анализ (Me) с использованием W-критерия Вилкоксона. **Результаты.** Плотность GPR54 в гонадах группы ОГЭ ниже, чем в контрольной группе пубертатных крыс (Me 0,88 нг/мг и 1,13 нг/мг, $p<0,05$) и сходна с группой контроля препубертатных крыс (Me 0,92 нг/мг). Плотность GPR54 в гонадах группы контроля половозрелых особей была значительно выше плотности в мышцах этой же группы (Me 0,784 нг/мг и 0,114 нг/мг соответственно, $p<0,01$). В группе ОГЭ уровень тестостерона существенно ниже (Me 15,39 нг/мг) контрольной группы пубертатных крыс (Me 20,02 нг/мг, $p<0,01$). Концентрация кисспептинов в обеих группах не имела значительных различий (0,27 нг/мг и 0,26 нг/мг, $p>0,05$). Лечение тестостероном особей с ОГЭ увеличило уровень тестостерона (от 15,39 нг/мг до 26,26 нг/мг, $p<0,01$), не влияя на плотность GPR54 в гонадах (Me 0,79 нг/мг). **Заключение.** Гипогонадизм ведет к снижению плотности GPR54 в периферических андрогензависимых тканях. Уровень кисспептинов плазмы крови физиологически низок и, вероятно, не может быть использован как маркер активности кисспептиновой системы. Лечение тестостероном значимо не изменяет плотность кисспептиновых рецепторов, что требует поиска новых терапевтических возможностей.

**Ключевые слова:** репродуктивная система; гипогонадизм; кисспептины; KISS1R; тестостерон.

**Для цитирования:** Никитина И.Л., Ходулева Ю.Н., Масель А.С., Байрамов А.А., Шабанов П.Д. Система KISS-KISS1R: периферический сигналинг в андрогензависимых тканях в модели мужского гипогонадизма. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 60(4): 24—33.*

**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** 25.05.16

Nikitina I.L., Khoduleva Yu.N., Masel A.S., Bairamov A.A., Shabanov P.D.

# System of KISS-KISS1R: focus on peripheral signaling in androgen-dependnt tissues in the experimentally induced model hypogonadotropic hypogonadism

«North-West Federal Medical Research Center named after Almazov»; 2, ul. Akkuratova, St. Petersburg, 197341, Russia

Kisspeptins, ligands of G protein-coupled receptor 54 (GPR54) encoded by the KiSS-1 gene, have recently emerged as key gatekeepers of the gonadotropic axis. Unlike its role at the hypothalamus on GnRH secretion, the effects of kisspeptins on gonadal and other peripheral tissues need to be clarified. **The purpose**. To investigate the impact of experimentally induced hypogonadism in male rats on kisspeptins signaling in androgen-dependent tissues and blood. **Methods.** Wistar male rats (total number 31) were used. Rats were divided into four groups. Group 1 (control, prepubertal rats aged 2 months, n = 7). Group 2 (control, pubertal rats aged 4 months, n = 6). Group 3 (unilaterally gonadectomized (ULG) in neonatal period). Group 4 (ULG testosterone-treated with testosterone (T) propionate 5 mg/kg/d during 10 days). In all the four groups density of GPR54 in testes and muscle and serum kisspeptin levels and T levels were estimated. The data was expressed as median values (Me) that were compared by Wilkokson criterion. **Results.** Density of GPR54 in gonads in group 3 was lower than in group 2 (Me 0,88 ng/mg vs 1,13 ng/mg, $p<0,05$) and similar to group 1(Me 0,92 ng/mg). Unlike above, density of

GPR54 in muscle in all groups 1,2,3 was not any differences (Me 0,1; 0,12; 0,13 ng/mg, p>0,05).Generally, density of GPR54 in group 2 in gonads was significantly higher than in the same group in muscle (Me 0,784 ng/mg vs 0.114 ng/mg, p<0,01). In the group 3 a significant decrease in serum levels of T (Me 15,39 ng/mg) in comparison with group 2 (Me 20,02 ng/mg, p<0,01) was invented. However, serum levels of kisspeptins in both groups had not any differences (0,27 ng/mg and 0,26 ng/mg, p>0,05). Treatment with testosterone propionate of the rats of group 4 lead to increase of serum level of T (from 15,39 ng/mg to 26,26 ng/mg, p<0,01), but didn`t modify the density of GPR54 in gonads (Me 0,79 ng/mg). **Conclusions.** Hypogonadism lead to decrease of kisspeptins signaling in peripheral androgen-dependent tissues. Serum level of kisspeptins is physiologically low and, probably, it can not be used as a marker of activity of kisspeptins system. Efficacy of treatment with testosterone is not enough that is required a novel therapeutic resources.

**Keywords:** reproductive system; kisspeptin; KISS1R; hypogonadism; testosterone.

**For citation:** Nikitina I.L., Khoduleva Yu. N., Masel A., Bairamov A.A., Shabanov P.D. System of KISS-KISS1R: Focus on Peripheral Signaling in Androgen-dependent Tissues in the Experimentally Induced Model Hypogonadotropic Hypogonadism. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental`naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2016; 60 (4): 24—33. (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.

**Funding.** The study had no sponsorship.

**Received** 25.05.16

## Введение

Функциональная активность репродуктивной системы играет важную роль в анатомической и психологической дифференцировке пола, старте и прогрессировании полового развития, возможности деторождения. Изучение закономерностей полового развития подростков, механизмов физиологической и патологической задержки реактивации гонадной оси, остается предметом активного исследовательского интереса [1, 2]. Понимание механизмов межнейронального сигналинга способно расширить представления о физиологии и патологии полового развития, понять причины различий в сроках старта пубертата, и, возможно, предложить новые способы коррекции отдельных вариантов патологии [3, 4, 5]. При этом совокупность процессов, предшествующих увеличению импульсной секреции гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ) нейронами гипоталамуса, инициации и закономерностей полового развития и вариабельности чувствительности центральных отделов гонадостата подростков до настоящего времени изучены недостаточно и являются предметом активного исследовательского интереса [6, 7].

Результаты многочисленных исследований показали, что запуск полового развития является мультифакторным процессом. Среди изучаемых в последние годы факторов особое значение принадлежит системе кисспептина и некоторым другим мессенджерам центральной нервной системы (ЦНС) [1, 5]. К числу важных научных открытий последних лет относится установление роли лиганд-рецепторной системы кисспептина в регуляции гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси [8, 9]. Данная система кисспептина включает ген KISS1, локализованный на 1q32, продукты его транскрипционной активности — кисспептины, реализующие свои эффекты через G-протеиновый парный рецептор GPR54 (KISS1R). Впервые идентифицированные в 1996 году группой исследователей-онкологов университета Пенсильвании, кисспептины до 2003 года рассматривались, как супрессоры опухолевого роста при разных типах рака; наиболее важный из группы кисспептинов известен, как метастин [10]. В 2003 г. в эксперименте были установлены новые свойства кисспептина и его рецептора, как регулятора активации/реактивации гонадной оси и сексуальной дифференцировки головного мозга [11]. Согласно результатам большинства исследований, кисспептины реализуют свои эффекты во взаимодействии с другими центральными и периферическими биологически активными субстанциями (нейропептидами, гормонами) [12—14]. Так, было показано, что нейрокинин-В коэкспрессируется с кисспептином и динорфином [15—17]. Данное «трио» в настоящее время рассматривается как наиболее значимый участник реализации сигналинга, направленного на процессы активации/реактивации гонадной оси. Получены данные, что мутации с потерей функции в генах, кодирующих нейрокинин В (TAC3) и его рецептор (TAC3R) приводили к пубертатным нарушениям [16]. Согласно мнению большинства исследователей, предполагается, что кисспептин стимулирует секрецию ГнРГ прямым влиянием на ГнРГ-содержащие нейроны, большинство из которых экспрессируют рецептор Kiss1R. Представляются интересными данные о различной анатомической локализации нейронов,

экспрессирующих KISS1 mRNA (нейроны перивентрикулярных (AVPV) ядер гипоталамуса участвуют в положительной обратной связи регуляции ГнРГ/гонадотропины половыми стероидами, а KISS1-нейроны аркуатных (ARC) ядер показали негативную обратную связь) [18].

В других исследованиях было показано, что кисспептины могут выполнять роль трансмиттеров в передаче сигналов от половых стероидов, а также осуществлять посреднические функции между лептином и ГнРГ-секретирующими центрами гипоталамуса [19—21].

Представляют интерес исследования, уточняющие роль периферических систем в осуществлении кисспептинового сигналинга, направленного на поддержание функциональной активности гонадной оси [8]. Так, лютеинизирующий гормон (ЛГ) и фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), оказывая воздействие на половые железы, приводят к увеличению гонадных гормонов, и последующему развитию физиологических и поведенческих изменений в период половой зрелости. Половые стероиды оказывают центральное активирующее и организующее геномное воздействие на гипоталамические секс-диморфные центры. Продукты экспрессии генов в этих гипоталамических центрах инициируют поведение по мужскому или женскому типу [7, 8]. Многие исследования показали очень высокую степень колокализации KISS1- и KND-нейронов с рецепторами стероидных гонадных гормонов [1, 16].

Тем не менее, следует подчеркнуть, что уточнение большинства механизмов, опосредуемых кисспептинами во влиянии на различные регуляторные процессы репродуктивной системы продолжает оставаться предметом активного исследовательского поиска [22]. Это представляется тем более важным в связи с увеличением количества фактических данных о перспективе применения агонистов и антагонистов кисспептинов для совершентсвования технологий лечения разнообразных расстройств полового развития и репродукции [23—26].

*Цель исследования* — изучение некоторых нейроэндокринных механизмов регуляторного сигналинга с участием системы KISS-KISS1R в периферических андрогензависимых тканях в экспериментальной модели мужского гипогонадизма.

## Методика

Экспериментальный материал: в исследование были включены новорожденные самцы крыс линии Wistar в возрасте 2—3 сут., массой 6—7 г (52 особи).

В настоящем исследовании у самцов крыс линии Wistar создавали модель экспериментально индуцированного гипогонадотропного гипогонадизма двумя способами:

1. Хирургическая модель — хирургическое удаление одной гонады у новорожденных крысят в возрасте 5 сут. постнатальной жизни (по стандартам экспериментальных физиологических исследований) [27, 28];

2. Комбинированная модель (хирургическая + медикаментозная) — введение Трипторелина-депо 0,29 мг/100 г в возрасте 4 мес. части крыс из группы хирургической модели с целью десентизации гонадотрофов [29].

Были сформированы следующие группы животных:

- 1-я группа — хирургическая модель 2 мес. (n = 7);
- 2-я группа — хирургическая модель 4 мес. (n = 8);
- 3-я группа — комбинированная модель 4 мес. (n = 8);
- 4-я группа — хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном (n = 8);
- 5-я группа — контроль 1 мес. (интактные) (n = 8);
- 6-я группа — контроль 2 мес. (интактные) (n = 7);
- 7-я группа — контроль 4 мес. (интактные) (n = 6).

Экстраполирование на соответствующие стадии полового развития у человека было следующим. Крысы 1 мес. жизни — допубертатный период у человека; крысы 2-месячного возраста — препубертатный период у человека; крысы 4-месячного возраста — период завершившегося полового созревания у человека. Была выделена группа (8 крыс) модели гипогонадизма с лечением тестостероном (в 4 мес. вводился тестостерон пропионат, 5 мг/кг/сут., курс лечения 10 сут.) [30]. Производили забор материала на разных сроках полового развития (гонады, мышечная ткань, кровь).

*Критерии исключения*: любые отклонения от стандартов линии Вистар — по массе, возрасту и видимым признакам.

Определение концентрации рецепторов кисспептина KISS1-R в периферических стероидзависимых тканях (гонадах и мышцах) самцов крыс проводилось по следующей методике. На первом этапе осуществлялось получение супернатанта из гомогенизированных тканей. Образцы тканей были гомогенизированы на криогенной мельнице CryoMill-2L (Retsch, Германия) при температуре жидкого азота. Предварительно охлажденные пробы тканей (гонады — 1,5 мин охлаждение, мышцы — 2 мин охлаждение) подверг-

ли вибрационной гомогенизации с частотой 25 Гц (гонады — 3 мин дробление, мышцы — 4 мин дробление). Для выделения G-протеинсвязанного рецептора GPR54 из мембраны клеток, полученный гомогенат суспендировали в изотоническом фосфатном буфере, содержащем 0,5% Тритона 100, далее гомогенаты проб подвергали вибрационному воздействию в аппарате Vortex V-1 plus BioSan в течение 2—3 с и оставляли на 30 мин в холодильнике. Для получения супернатанта гомогенаты центрифугировали в центрифуге Microfuge 22R Centrifuge (Beckman Coulter, Германия) при температуре +4 градуса, на 12000 оборотов в течение 15 мин.

Концентрации рецепторов кисспептина KISS1-R в полученных супернатантах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием Elisa kit набора (MBS 2021161 Test Enzyme-linked Immunosorbent Asay Kit For Kisspeptin Receptor (Kiss1R), China) и сравнивали с приготовленными стандартами (с концентрацией 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 (USA). Полученные значения концентраций рецепторов GPR54 в тканях гонад и мышц пересчитывали с учетом концентрации белка в этих препаратах (количество рецепторов на мг белка) нг/мг. Для этого в полученных супернатантах проб определяли концентрацию белка по методу Варбурга при помощи вертикального оптического абсорбциометра-монохроматора BioTek Synergy 2. Концентрация белка определялась по сравнению с BSA (2,0 мг/мл) для каждого препарата. Концентрации кисспептина в плазме крови крыс определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием Elisa Kit набора (CSB-E1343rTestEnzyme-linkedImmunosorbentAsayKitForthe 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-linkedImmunosorbentAsayKitForthe 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 соблюдались 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).

Математическая обработка полученных данных (сравнение выборок) производилась методами непараметрического анализа с использованием W-критерия Вилкоксона. При значении W-критерия более 1,96 считали, что есть различия между выборками с уровнем значимости $p<0,05$. Корреляционный анализ проводили посредством вычисления коэффициента корреляции r по Пирсону.

## Результаты и обсуждение

Анализ изменений уровня тестостерона в крови показал следующее (табл. 1).

Исследование подтвердило значительные различия в уровне тестостерона у интактных крыс разного возраста. Так, у крыс в возрасте 1 и 2 мес. уровень тестостерона был значительно ниже (медиана (Me) соответственно 5,99 нг/мл и 14,29 нг/мл), чем у крыс в возрасте 4 мес. (Me 20,02 нг/мл, W-критерий 21,68, $p<0,01$), что подтвердило пубертатные изменения половых стероидов в данных возрастных группах крыс. При оценке модели хирургического гипогонадизма получены данные о сопоставимости уровня тестостерона в модели с данными у препубертатных крыс 2 мес. (Me соответственно 15.39 нг/мл и 14,29 нг/мл, W-критерий 0,69, $p>0,05$), при этом уровень тестостерона в хирургической модели крыс 4 мес. был значимо ниже, чем у интактных половозрелых самцов соответствующего возраста (Me 15,39 нг/мл против 20,02 нг/мл, W-критерий 2,86, $p<0,01$). Полученные данные подтвердили корректность созданной модели хирургического гипогонадизма. При оценке комбинированной модели гипогонадизма также было подтверждено статистически значимое снижение уровня тестостерона, однако уровень последнего был настолько низким, что существенно отличался даже от уровня тестостерона в хирургической модели (соответственно Me 9,51 нг/мл и 15,39, W-критерий 3,24, $p<0,01$). Это позволило сделать заключение о дифференцированном по степени тяжести моделировании гипогонадизма с наиболее тяжелым дефицитом тестостерона в комбинированной модели.

*Таблица 1*

**Концентрация тестостерона в плазме крови самцов крыс (нг/мл)**

| Группы | Концентрация тестостерона в плазме (нг/мл) | | | | | | | | Медиана | W-критерий* | p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Контроль 1 мес. (n = 8) | 11,2 | 10,85 | 3,14 | 2,55 | 0 | 0,37 | 8,43 | 11,42 | 5,99 | ** 21,68<br>*** 2,86<br>**** 18,98<br>***** 0,69<br>****** 3,09<br>******* 3,24<br>******** 2,84<br>********* 3,12 | <0,01<br><0,01<br><0,01<br>>0,05<br><0,01<br><0,01<br><0,01<br><0,01 |
| Контроль 2 мес. (n = 8) | 14,02 | 12,56 | 8,22 | 12,7 | 16,17 | 17,73 | 16,91 | 16 | 14,29 | | |
| Хирургическая модель 2 мес. (n = 7) | 10,17 | 11,92 | 16,03 | 18,25 | 13,88 | 8,94 | 15,03 | | 13,46 | | |
| Контроль 4 мес. (n = 6) | 17,94 | 20,19 | 17,96 | 20,7 | 21,05 | 22,27 | | | 20,02 | | |
| Хирургическая модель 4 мес. (n = 7) | 15,61 | 14,21 | 13,96 | 14,22 | 14,6 | 17,96 | 17,19 | | 15,39 | | |
| Комбинированная модель 4 мес. (n = 8) | 11,3 | 10,78 | 11,21 | 10,14 | 5,95 | 5,96 | 7,77 | 12,89 | 9,51 | | |
| Хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном (n = 8) | 21,19 | 26,43 | 26,33 | 25,84 | 26,35 | 26,25 | 26,25 | 26,44 | 26,26 | | |

Примечание. * — W-критерий — критерий Уилкоксона; ** — сравнение "контроль 4 мес. — контроль 1 мес."; *** — сравнение "контроль 4 мес. — хирургическая модель 4 мес."; **** — сравнение "хирургическая модель 4 мес. — контроль 1 мес."; ***** — сравнение "хирургическая модель 4 мес. — контроль 2 мес."; ****** — сравнение "комбинированная модель 4 мес. -контроль 4 мес."; ******* — сравнение "комбинированная модель 4 мес. — хирургическая модель 4 мес"; ******** — сравнение "контроль 4 мес. — хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном"; ********* — сравнение "хирургическая модель 4 мес. — хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном"

*Таблица 2*

**Концентрация кисспептина в плазме крови самцов крыс (нг/мл)**

| Группы | Концентрация кисспептина в плазме (нг/мл) | | | | | | | | Медиана | W-критерий* | p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Контроль 1 мес. (n = 6) | 0,42 | 0,26 | 0,45 | 0,22 | 0,29 | 0,37 | | | 0,33 | ** 0,96<br>*** 0,14<br>**** 0,43<br>***** 1,29<br>****** 0,89<br>******* 1,29 | >0,05<br>>0,05<br>>0,05<br>>0,05<br>>0,05<br>>0,05 |
| Контроль 2 мес. (n = 7) | 0,29 | 0,41 | 0,32 | 0,42 | 0,37 | 0,06 | 0,14 | | 0,29 | | |
| Хирургическая модель 2 мес. (n = 5) | 0,32 | 0,24 | 0,18 | 0,25 | 0,25 | | | | 0,25 | | |
| Контроль 4 мес. (n = 6) | 0,37 | 0,23 | 0,18 | 0,14 | 0,22 | 0,46 | | | 0,26 | | |
| Хирургическая модель 4 мес. (n = 7) | 0,37 | 0,13 | 0,16 | 0,43 | 0,36 | 0,21 | 0,2 | | 0,27 | | |
| Комбинированная модель 4 мес. (n = 8) | 0,23 | 0,19 | 0,43 | 0,31 | 0,46 | 0,39 | 0,39 | 0,74 | 0,39 | | |
| Хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном (n = 5) | 0,23 | 0,31 | 0,3 | 0,34 | 1,16 | | | | 0,47 | | |

Примечание. * — W-критерий — критерий Уилкоксона; ** — сравнение "контроль 4 мес. — контроль 1 мес.";*** — сравнение "контроль 4 мес. — контроль 2 мес."; **** — сравнение "контроль 4 мес. — хирургическая модель 4 мес."; ***** — сравнение "комбинированная модель 4 мес. — контроль 4 мес."; ****** — сравнение "хирургическая модель 4 мес. — хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном"; ******* — сравнение "контроль 4 мес. — хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном"

Впоследствии изучалось отдельно влияние степени тяжести гипогонадизма на состояние кисспептиновой системы. Лечение препаратами тестостерона привело к значительному возрастанию уровня этого гормона в плазме крови гипогонадных самцов (Me до лечения 15,39 нг/мл, Me после лечения 26,26 нг/мл, W-критерий 3,12, $\rho<0,01$), при этом интересен факт, что уровень тестостерона плазмы гипогонадных самцов после лечения стал значительно выше, чем у интактных половозрелых самцов того же возраста (Me 26,26 нг/мл против Me 20,02 нг/мл в контроле, W-критерий 2,84, $\rho<0,01$). Таким образом, терапия тестостероном не только повысила уровень этого гормона в плазме крови гипогонадных самцов крыс, но и сделала его существенно выше физиологического уровня у половозрелых самцов крыс группы контроля.

Что касается динамики белка кисспептина в плазме крови, то его уровень как в группе контроля у допубертатных крыс и половозрелых крыс, так и в группах крыс с обеими (хирургической и комбинированной) моделями гипогонадизма статистически не различался (табл. 2). Терапия тестостероном не приводила к изменению уровня кисспептина у гипогонадотропных крыс, который оставался сопоставимым с уровнем у интактных (нормогонадотропных) половозрелых крыс 4 мес. (Me у гипогонадотропных крыс 4 мес. 0,27 нг/мл, Me у нормогонадных крыс 4 мес. 0,26 нг/мл, W-критерий 0,43, $\rho>0,05$).

В литературе приводятся данные о значимой роли системы кисспептина в активации/инактивации функциональной активности гонадной оси. Так, есть сведения, что у GPR54-нокаут мышей не наступала пульсаторная выработка ЛГ и ФСГ и не развивалась половая зрелость. С другой стороны, исследования Navarro VM et al. (2004) показали, что гонадэктомия увеличивала выработку Kiss1 mRNA в аркуатном ядре гипоталамуса крыс, в то время как назначение стероидной терапии повышенный уровень Kiss1 mRNA снижался [13]. Представлялось интересным изучить ассоциации изменений кисспептина и тестостерона в плазме крови как гипогонадных, так и интактных самцов крыс разного возраста и половой зрелости. Корреляционный анализ медианы кисспептина и тестостерона в группах интактных крыс в возрасте 1, 2 и 4 мес. показал сильную обратную зависимость ($r = 0,99$, $\rho<0,01$), свидетельствующую о снижении плазменного уровня кисспептина при возрастании уровня тестостерона. Подобные обратные взаимосвязи данных показателей установлены в группах модели гипогонадизма (хирургическая модель, 2 и 4 мес., комбинированная модель, 4 мес): $r = 0,86$, $\rho<0,05$. Сделано заключение, что, независимо от количественного содержания тестостерона и кисспептина в плазме крови, направления их изменений носят противоположный характер по отношению друг к другу. Полученные данные были сопоставимы с данными литературы.

На следующем этапе исследования проводилось изучение количества и плотности кисспептиновых рецепторов KISS1R в стероидзависимых периферических тканях (мышцы, гонады). Сравнение плотности кисспептиновых рецепторов в гонадах (табл. 3) в группах контроля — интактных крыс допубертатного, 1 мес., и пубертатного, 4 мес., возраста показало значимое повышение их по достижении пубертата (Me 0,92 нг/мг против 1,13 нг/мг соответственно, W-критерий 2,6, $\rho<0,01$), что подтверждало представление об увеличении количества кисспептиновых рецепторов в возрасте пубертата в физиологических условиях. В модели гипогонадизма плотность KISS1R значительно снижалась по сравнению с нормогонадными самцами того же возраста (Me соответственно 0,88 нг/мг и 1,13 нг/мг, W-критерий 2,04, $\rho<0,05$), при этом различий между гипогонадными половозрелыми крысами в 4 мес. и допубертатными интактными в 1 мес. по количеству рецепторов кисспептина не было выявлено (Me 0,88 нг/мг против 0,92 нг/мг, W-критерий 0,52, $\rho>0,05$). Терапия тестостероном не приводила к повышению количества кисспептиновых рецепторов в гонадах гипогонадных крыс, они оставались статистически значимо ниже, чем в контроле того же возраста (Me соответственно 0,79 нг/мг и 1,13 нг/мг, W-критерий 2,68, $\rho<0,01$). Сравнение в группах гипогонадизма до и после лечения тестостероном показало, что количество кисспептиновых рецепторов не претерпевало существенных различий у гипогонадных и пролеченных тестостероном крыс одного возраста (Me соответственно 0,88 нг/мг и 0,79 нг/мг, W-критерий 0,69, $\rho>0,05$). Сделано заключение, что при индуцированном гипогонадизме количество рецепторов KISS1R в гонадах сокращалось до допубертатного уровня и не повышалось даже на фоне терапии тестостероном.

В то же время при оценке плотности рецепторов к кисспептину в мышечной ткани результаты были иными (табл. 4). Следует отметить, что, несмотря на несомненную принадлежность мышечной ткани к числу стероидзависимых, сравнение плотности Kiss1R рецепторов в гонадах и мышцах показало значительно более низкую представленность данной группы рецепторов в последней. Так, медианы плотности KISS1R в группах интактных самцов крыс допубертатного возраста (1 мес.) составили соответственно в гонадах 0,784 нг/мг, в мышцах 0,114 нг/мг белка, что свидетельствовало о статистически более высокой плотности рецепторов в гонадах (W-критерий 2,88, $\rho<0,01$). Подобные результаты были по-

лучены у половозрелых интактных крыс — Me KISS1R в гонадах 1,17 нг/мг, в мышцах — 0,11 нг/мг белка (W-критерий 2,61, $\rho<0,01$). Таким образом, в физиологических условиях плотность кисспептиновых рецепторов в гонадах самцов крыс значительно выше, чем в мышцах, независимо от возраста и стадии полового развития.

Вероятно, данный факт способен объяснить несущественные различия плотности KISS1R в мышечной ткани как допубертатных и половозрелых интактных крыс, так и гипогонадных самцов крыс в модели хирургического гипогонадизма, причем различия отсутствовали как внутри интактных групп контроля, так и между контрольной и исследуемой группой опыта. Различий в количестве рецепторов в мышцах хирургической модели гипогонадизма и допубертатными ($\rho>0,05$), пубертатными нормогонадными крысами (Me 0,1 нг/мг против 0,12 нг/мг, W-критерий 0,18, $\rho>0,05$) не было обнаружено.

Лечение тестостероном не увеличивало количество KISS1R в мышцах крыс — сравнение группы гипогонадных крыс 4 мес. и группы с лечением тестостероном

*Таблица 3*

**Концентрация рецепторов кисспептина в гонадах крыс, нг/мг белка**

| Группы | Концентрация рецепторов к кисспептинам (нг/мг белка) | | | | | | | | Медиана | W-критерий* | p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Контроль 1 мес. (n = 6) | 0,73 | 0,84 | 0,53 | 0,7 | 0,89 | 1,89 | | | 0,92 | ** 2,05<br>*** 2,68<br>**** 1,83<br>***** 0,69<br>******0,52 | <0,05<br><0,01<br>>0,05<br>>0,05<br>>0,05 |
| Контроль 4 мес. (n = 5) | 1,24 | 1,17 | 0,92 | 1,23 | 1,15 | | | | 1,13 | | |
| Хирургическая модель 4 мес. (n = 8) | 0,85 | 0,81 | 0,8 | 0,7 | 0,81 | 0,86 | 1,3 | 0,94 | 0,88 | | |
| Комбинированная модель 4 мес. (n = 7) | 0,89 | 1,23 | 0,94 | 0,83 | 0,72 | 0,76 | 0,89 | | 0,86 | | |
| Хирургическая модель 4 мес. лечением тестостероном (n = 7) | 0,71 | 0,62 | 0,73 | 0,98 | 0,9 | 0,87 | 0,76 | | 0,79 | | |

Примечание. * — W-критерий — критерий Уилкоксона; ** — сравнение "контроль 4 мес. — хирургическая модель 4 мес."; *** — сравнение "контроль 4 мес. — хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном"; **** — сравнение "контроль 4 мес. — контроль 1 мес."; ***** — сравнение "хирургическая модель 4 мес. — хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном"; ****** — сравнение "хирургическая модель 4 мес. — контроль 1 мес."

*Таблица 4*

**Концентрация рецепторов кисспептина в мышцах крыс, нг/мг белка**

| Группы | Концентрация рецепторов к кисспептинам (нг/мг белка) | | | | | | | | Медиана | W-критерий* | p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Контроль 1 мес. (n = 6) | 0,19 | 0,16 | 0,1 | 0,07 | 0,1 | 0,12 | | | 0,12 | ** 1,28<br>*** 0,29<br>**** 0<br>***** 2,84<br>****** 0,18<br>******* 0,18 | >0,05<br>>0,05<br>>0,05<br><0,01<br>>0,05<br>>0,05 |
| Контроль 4 мес. (n = 5) | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,1 | 0,12 | | | | 0,11 | | |
| Хирургическая модель 4 мес. (n = 6) | 0,04 | 0,19 | 0,08 | 0,11 | 0,09 | 0,1 | | | 0,1 | | |
| Комбинированная модель 4 мес. (n = 7) | 0,04 | 0,02 | 0,06 | 0,06 | 0,07 | 0,09 | 0,07 | | 0,06 | | |
| Хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном (n = 8) | 0,08 | 0,19 | 0,12 | 0,08 | 0,13 | 0,07 | 0,11 | 0,06 | 0,11 | | |

Примечание. * — W-критерий — критерий Уилкоксона; ** — сравнение "контроль 4 мес. — хирургическая модель 4 мес."; *** — сравнение "контроль 4 мес. — хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном"; **** — сравнение "хирургическая модель 4 мес. — хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном"; ***** — сравнение "контроль 4 мес. — комбинированная модель 4 мес."; ****** — сравнение "хирургическая модель 4 мес. — комбинированная модель 4 мес."; ****** — сравнение "хирургическая модель 4 мес. — контроль 1 мес."; ******* — сравнение "контроль 4 мес. — контроль 1 мес."

не показало значимых различий (Me соответственно 0,1 нг/мг и 0,11 нг/мг, W-критерий 0,29, $\rho>0,05$).

Только в модели комбинированной хирургической и химической кастрации значимо уменьшалось количество кисспептиновых рецепторов в мышцах по сравнению как с нормогонадными половозрелыми крысами (Me 0,06 нг/мг и 0,11 нг/мг соответственно, W-критерий 2,84, $\rho<0,01$), так и по сравнению с хирургической моделью гипогонадизма в возрасте 4 мес. (Me 0,06 нг/мг и 0,1 нг/мг, W-критерий 2,14, $\rho<0,05$). Учитывая, что ранее было показано, что степень снижения тестостерона в комбинированной модели значительно более выражена, свидетельствуя о более глубоком угнетении гонадной оси и большей тяжести гипогонадизма, можно высказать предположение о том, что в физиологически менее насыщенной кисспептиновыми рецепторами мышечной ткани изменение периферического кисспептинового статуса носит «тяжесть-зависимый» характер. Иными словами, снижение плотности KISS1R в мышцах ассоциировано с тяжелой степенью дефицита андрогенов.

Таким образом, на данном этапе исследования были получены сведения о кисспептиновом сигналинге в периферических стероидзависимых тканях при физиологическом развитии пубертата и в условиях патологии — при мужском гипогонадотропном гипогонадизме.

Подводя общие итоги проведенной исследования, считаем важным подчеркнуть следующее. Основной идеей проведенного исследования явилось изучение роли кисспептинового сигналинга, играющего важную роль в физиологической регуляции гонадной оси, в части его влияния на периферические стероидзависимые ткани. Для расширения понимания механизмов патологии и поиска новых терапевтических возможностей при нарушениях полового развития детей и подростков в данной работе исследования проводились на экспериментальной модели мужского гипогонадотропного гипогонадизма.

Обсуждая полученные результаты, следует отметить, что при физиологическом половом развитии у самцов крыс контрольной группы были установлены значительные различия в представленности кисспептиновых рецепторов в разных стероидзависимых тканях. Так, в гонадах плотность KISS1R значительно выше по сравнению с мышечной тканью, причем в последней, наряду с очень низкой представленностью, плотность Kiss1R не меняется в зависимости от возраста и стадии полового развития, являясь сопоставимой у самцов в препубертате и завершивших пубертат. В отличие от этого, в гонадах плотность KISS1R статистически значимо возрастает за период от препубертата к моменту завершения полового созревания. Так как было показано, что при этом значительно возрастает уровень тестостерона плазмы крови, можно сделать заключение об однонаправленных изменениях (возрастании) тестостерона и плотности рецепторов к кисспептину на тканевом уровне. Что касается концентрации собственно белка кисспептина в другой биологической среде — плазме крови, то уровень его как у интактных крыс контрольной группы разных возрастов и стадий полового развития, так и в группах модели гипогонадотропного гипогонадизма, оставался крайне низким, не имея различий в зависимости от содержания тестостерона. Корреляционный анализ содержания кисспептина и тестостерона как в контрольной, так и в опытной группе показал наличие сильной обратной связи, свидетельствуя о тенденции к снижению уровня кисспептина плазмы при возрастании уровня тестостерона. Было сделано заключение, что, в отличие от изменений на тканевом уровне, где плотность кисспептиновых рецепторов изменяется однонаправленно с уровнем тестостерона, в крови данные ассоциации носят разнонаправленный характер. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными, свидетельствовавшими, что при старте стероидной терапии снижается KISS1 mRNA [13].

Анализируя результаты в группе самцов крыс с индуцированным гипогонадотропным гипогонадизмом, было установлено, что уровень тестостерона был статистически значимо снижен как в модели хирургического, так и в модели комбинированного (хирургического + медикаментозного) гипогонадизма по сравнению с контрольной группой половозрелых самцов соответствующего возраста. Однако были отмечены статистически значимые различия также внутри групп экспериментального гипогонадизма, свидетельствовшие о более низких значениях тестостерона в комбинированной модели. Данный факт позволил говорить о дифференцированном по степени тяжести гипогонадизме с более тяжелым вариантом в комбинированной модели. Гипогонадотропный гипогонадизм обеих моделей был ассоциирован со снижением плотности кисспептиновых рецепторов в гонадах, в которых последняя снижалась до плотности у самцов допубертатного возраста. Что касается плотности KISS1R в мышцах, то лишь в модели комбинированного, то есть наиболее тяжелого, гипогонадизма было установлено статистически значимое их снижение; хирургическая же модель, равно как и разный уровень полового развития у интактных крыс контрольной группы, не приводили к более или менее существенным изменениям представленности кисспептиновых рецепторов в этой ткани.

Что касается результатов терапии тестостероном гипогонадных самцов крыс (проводилось введение его по «острой» схеме введения), то было констати-

рование его значительное повышение в плазме крови, статистически значимое по сравнению с уровнем до введения. Более того, уровень тестостерона крови после его введения оказался статистически значимо выше такового у интактных половозрелых самцов крыс группы контроля. Однако, несмотря на восстановление высоких пубертатных значений тестостерона в крови, изменений плотности KISS1R в стероидзависимых тканях (гонады и мышцы) не произошло, что позволило сделать заключение, о неэффективности терапии тестостероном в плане восстановления кисспептиновых рецепторов, по крайней мере в примененной дозе и схеме введения. Для уточнения возможностей заместительной терапии требуется продолжение исследований в данном направлении.

Транслируя полученные в эксперименте результаты на клиническую практику, представляется логичным сформулировать следующие заключения, носящие гипотетический характер. Несмотря на тот факт, что участие системы KISS-KISS1R является несомненно значимым в осуществлении регуляторных механизмов гонадной оси на уровне периферических стероидзависимых тканей, роль определения уровня белка кисспептина в плазме крови в качестве диагностического маркера гипогонадизма, представляется малоинформативной. При этом понимание отсутствия количественных изменений тканевых кисспептиновых рецепторов при гипогонадизме в ответ на стандартную заместительную терапию тестостероном обосновывает показания к поиску новых терапевтических возможностей, включая заместительную терапию аналогами кисспептинов.

## Выводы

1. При физиологическом варианте полового развития установлена различная плотность кисспептиновых рецепторов в стероидзависимых тканях: наиболее высокая в ткани гонад и существенно более низкая с мышечной ткани. Концентрация белка кисспептина в крови самцов крыс является стабильно низкой, независимо от уровня андрогенизации, не отражая, таким образом, степени полового развития как при нормальном, так и при патологическом его течении.

2. Уровень тестостерона в физиологических условиях оказывает разнонаправленное влияние на систему кисспептина в различных биологических средах: в крови при повышении тестостерона отмечается снижение белка кисспептина, в то время как в андрогензависимых тканях (гонады) повышение уровня тестостерона сопровождается увеличением плотности кисспептиновых рецепторов.

3. Гипогонадизм, не оказывая существенного влияния на концентрацию кисспептина в крови, приводит к снижению плотности рецепторов кисспептина в периферических стероидзависимых тканях (гонадах и скелетных мышцах), достигающей допубертатного уровня, причем на уровне мышечной ткани данный эффект носит дозозависимый характер и реализуется только при тяжелой степени дефицита андрогенов.

4. Терапия гипогонадизма тестостероном, восстанавливая его уровень в крови, не приводит к значимому изменению плотности кисспептиновых рецепторов в гонадах и мышцах, по крайней мере в использованных дозе и схеме введения. Для уточнения терапевтических возможностей терапии тестостероном требуются дальнейшие исследования.

5. Транслируя результаты экспериментального исследования на клиническую практику, следует отметить, что, несмотря на очевидные изменения кисспептинового сигналинга при гипогонадотропном гипогонадизме на уровне стероидзависимых тканей, определение уровня кисспептина в плазме крови в качестве диагностического маркера представляется малоинформативным ввиду несущественных различий в физиологических условиях на разных стадиях полового развития. Что касается эффективности используемой в настоящее время для терапии гипогонадизма заместительной терапии половыми стероидами, то отсутствие влияния высокой концентрации тестостерона в крови на количество и плотность кисспептиновых рецепторов в стероидзависимых тканях предиктирует целесообразность поиска новых терапевтических возможностей, к которым может относиться, в том числе, применение аналогов кисспептина.

## References

1. Sapronov N.S. *GnRH. Gonadoliberin. [Gonadoliberiny].* S.-Petersburg: Art-ekspress; 2012. (in Russian)

2. Sorensen K., Mouritsen A., Aksglaede L., Hagen C.P., Mogensen S.S., Juul A. Recent secular trends in pubertal timing: implications for evalution and diagnosis of precocious puberty. *Horm. Res. Paediatr.* 2012; 77(3):137-145. Doi: 10.1159/000336325.

3. Nikitina I.L. The timing of puberty: well-known and new. *Arterial'naya gipertenziya.* 2013; 19(3): 227-236. (in Russian)

4. Krsmanovic L.Z., Hu L., Leung P.K., Feng H., Catt K.J. Pulsatile GnRH secretion: roles of G protein-coupled receptors, second messengers and ion channels. *Moll. Cell. Endocrinol.* 2010; 314(2): 158-63. Doi: 10.1016/j.mce.2009.05.015.

5. Parent A.S., Teilmann G., Juul A., Skakkebaek N.E., Toppari J., Bourguignon J.P. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr. Rev.* 2003; 24(5): 668-93.

6. Ojeda S.R., Lomniczi A., Sandau U., Matagne V. New concepts on the control of the onset of puberty. *Endocr. Dev.* 2010; 17: 44-51. Doi: 10.1159/000262527.

7. Tena-Sempere M. Kisspeptin signaling in the brain: recent developments and future challenges. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010; 314(2): 164 -169. Doi: 10.1016/j.mce.2009.05.004.

8. Javed Z., Qamar U., Sathyapalan T. The role of kisspeptin signalling in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis — current perspective. *Endokrynol. Pol.* 2015; 66(6): 534-47. Doi: 10.5603/EP.2015.0066.

9. Yang L., Dhillo W. Kisspeptin as a therapeutic target in reproduction. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2016; 20(5): 567-75. doi: 10.1517/14728222.2016.1124858.

10. Lee J.H., Miele M.E., Hicks D.J., Phillips K.K., Trent J.M., Weissman B.E. et al. KISS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-supressor gene. *J. Natl. Cancer Inst.* 1996; 88(23): 1731-7.

11. de Roux N., Genin E., Carel J.C., Matsuda F., Chaussain J.L., Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KISS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100(19): 10972-6.

12. Nikitina I.L., Bayramov A.A., Khoduleva Yu.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)

13. Navarro V.M., Castellano J.M., Fernandez- Fernandez R., Barreiro M.L., Roa J., Sanchez-Criado J.E. et al. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology.* 2004; 145(10): 4565-74.

14. Nimri R., Lebenthal Y., Lazar L., Chevrier L., Phillip M., Bar M. et al. A novel loss-of-function mutation in GPR54/KISS1R leads to hypogonadotropic hypogonadism in a highly consanguineous family. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011; 96(3): 536-45. Doi: 10.1210/jc.2010-1676.

15. Goodman R.L., Lehman M.N., Smith J.T., Coolen L.M., de Oliveira C.V., Jafarzadehshirazi M.R. et al. Kisspeptin nucleus in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology.* 2007; 148(12): 5752-60.

16. Topaloglu A.K., Reimann F., Guclu M., Yalin A.S., Kotan L.D., Porter K.M. et al. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat. Genet.* 2009; 41(3): 354-8. Doi: 10.1038/ng.306.

17. Young J., George T., Tello J. A., Francou B., Bouligand J., Guiochon-Mantel A. et al. Kisspeptin restores pulsatile LH secretion in patients with neurokinin B signaling deficiencies: physiological, pathophysiological and therapeutic implications. *Neuroendocrinology.* 2013; 97(2): 193-202. Doi: 10.1159/000336376.

18. Leon S., Barroso A., Vazguez M.J., Garcia-Galiano D., Manfredi-Lozano M., Ruiz-Pino F. et al. Direct Actions of Kisspeptins on GnRH Neurons Permit Attainment of Fertility but are Insufficient to Fully Preserve Gonadotropic Axis Activity. *Sci. Rep.* 2016; 6: 19206. Doi: 10.1038/srep19206.

19. Brown R.E., Imran S.A., Ur E., Wilkinson M. KiSS-1 mRNA in adipose tissue is regulated by sex hormones and food intake. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2008; 281(1-2): 64-72.

20. Tng E.L. Kisspeptin signalling and its roles in humans. *Singapore Med. J.* 2015; 56(12): 649-56. Doi: 10.11622/smedj.2015183.

21. Celik O., Celik N., Aydin S., Aygun B.K., Haberal E.T., Kulodlu T. et al. Ghrelin action on GnRH neurons and pituitary gonadotropes might be mediated by GnIH-GPR147 system. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 2016; 25(2): 121-8. Dcoi: 10.1515/hmbci-2015-0050.

22. Pinilla L., Aguilar E., Dieguez C., Millar R.P., Tena-Sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* 2012; 92(3): 1235-316. doi:10.1152/physrev.00037.2010.

23. Guerriero K.A., Keen K.L., Millar R.P., Terasawa E. Developmental changes in GnRH release in response to kisspeptin agonist and antagonist in female rhesus monkeys (Macaca mulatta): implication for the mechanism of puberty. *Endocrinology.* 2012; 153(2): 825-36. Doi: 10.1210/en.2011-1565.

24. Roseweir A.K., Kauffman A.S., Smith J.T., Guerriero K.A., Morgan K., Pielecka-Fortuna J. et al. Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J. Neurosci.* 2009; 29(12): 3920-9. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.5740-08.2009.

25. George J.T., Veldhuis J.D., Roseweir A.K., Newton C.L., Faccenda E., Millar R.P. et al. Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011; 96(8): 1228-36. Doi: 10.1210/jc.2011-0089.

26. Newton C.L., Anderson R.C., Millar R.P. Therapeutic Neuroendocrine Agonist and Antagonist Analogs of Hypothalamic Neuropeptides as Modulators of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis. *Endocr. Dev.* 2016; 30: 106-129. Doi: 10.1159/000439337.

27. Kirshenblat Ya.D. *Manual of endocrinology. [Praktikum po endokrinologii].* Moscow: Vysshaya shkola; 1969. (in Russian)

28. Gorski R.A. Hypothalamic imprinting by gonadal steroid hormones. *Advances in experimental medicine and biology.* 2002; 511: 57-70.

29. Filippi S., Luconi M., Granchi S., Vignozzi L., Bettuzzi S, Tozzi P. et al. Estrogens, But Not Androgens, Regulate Expression and Functional Activity of Oxytocin Receptor in Rabbit Epididymis. *Endocrinology.* 2002; 143(11): 4271-80.

30. Bairamov A.A., Poletaeva A.O., Proshin S.N., Efremov O.M., Sapronov N.S. Sexual Function in Adult Male Rats after Prenatal Modulation of the Cholinergic System. *Neuroscience and Behavioral Physiology.* 2009; 39(5): 463-70.

**Сведения об авторах:**

*Ходулева Юлия Николаевна*, мл. науч. сотр. НИЛ детской эндокринологии, ассистент каф. детских болезней, врач, e-mail: dom-j@mail.ru

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

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

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