

© Коллектив авторов, 2017  
УДК 616.69-008.6

Дробленков А.В.<sup>1</sup>, Прошина Л.Г.<sup>2</sup>, Юхлина Ю.Н.<sup>1</sup>, Байрамов А.А.<sup>1</sup>, Шабанов П.Д.<sup>1</sup>, Никитина И.Л.<sup>1</sup>

## **Тестостерон-зависимые изменения нейронов аркуатного ядра гипоталамуса и их обратимость при моделировании мужского гипогонадизма**

<sup>1</sup> ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Россия, 197341, г. Санкт-Петербург, ул. Акkuratова, д. 2

<sup>2</sup> ФГБОУ ВПО «Новгородский государственный университет им. Ярослава Мудрого» Министерства образования и науки РФ, Россия, 173003, г. Великий Новгород, ул. Большая Санкт-Петербургская, д. 41

**Актуальность.** Значение недостаточности тестостерона для структурного гомеостаза нейронов, регулирующих выработку гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ) и синтезирующих данный гормон, мало изучены. **Цель.** Установить реактивные изменения, количество рецепторов к андрогенам (АР) и особенности их распределения в нейронах медиального аркуатного ядра гипоталамуса (МАЯ) при экспериментальном гипогонадизме, а также обратимость этих изменений после восстановительной терапии тестостероном. **Методы.** У самцов крыс Вистар (16 особей) моделировали гипогонадизм путем удаления одной гонады на 2—3 день постнатальной жизни и исследовали гистологические срезы каудальной части МАЯ у молодых животных (4 мес.) при отсутствии и осуществлении заместительной терапии. Контрольную группу составляли интактные самцы аналогичного возраста (8 особей). В середине левосторонней части МАЯ на площади 0,01 мм<sup>2</sup> определяли реактивные изменения клеток и площадь тел малоизмененных нейронов (после окрашивания срезов методом Ниссля), а также число и долю тел нервных клеток, различавшихся по степени экспрессии АР. **Результаты.** Установлено, что нейроны МАЯ содержат большое количество АР, распределенных в различных частях их тела. При гипогонадизме происходит перераспределение АР и снижение степени их экспрессии (количества). Сгущение АР в области оболочки ядра и плазмолеммы, образование конгломератов в ядре и цитоплазме было характерно для нейронов с умеренной экспрессией. В цитоплазме и в области плазматической мембраны рецепторы отсутствовали у клеток со слабой и очень низкой экспрессией. Снижение степени экспрессии АР при гипогонадизме сопряжено с уменьшением площади тела и гибелью части нейронов. **Заключение.** Выявленные дегенеративные тестостерон-зависимые изменения нейронов МАЯ, которые синтезируют ГнРГ или пептиды, влияющие на его выработку, могут обусловить уменьшение высвобождения гонадолиберина, вторичное снижение синтеза андрогенов и реализацию морфофункциональных проявлений его вторичного дефицита. Заместительная терапия частично компенсирует дегенеративные изменения нейронов, восстанавливает интенсивность экспрессии АР, однако не влияет на процесс гибели нервных клеток.

**Ключевые слова:** медиальное аркуатное ядро; гипогонадизм; рецепторы к андрогенам; нейроны; реактивные изменения.

**Для цитирования:** Дробленков А.В., Прошина Л.Г., Юхлина Ю.Н., Байрамов А.А., Никитина И.Л., Шабанов П.Д. Тестостерон-зависимые изменения нейронов аркуатного ядра гипоталамуса и их обратимость при моделировании мужского гипогонадизма. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(4): 21—30. DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8519

**Для корреспонденции:** Никитина Ирина Леоровна, доктор мед. наук, зав. каф. детских болезней ФГБУ «Северо-Западный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, e-mail: nikitina0901@gmail.com

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

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

**Поступила** 31.03.2017

Droblenkov A.V.<sup>1</sup>, Proshina L.G.<sup>2</sup>, Yuhlina Yu.N.<sup>1</sup>, Bairamov A.A.<sup>1</sup>, Shabanov P.D.<sup>1</sup>, Nikitina I.L.<sup>1</sup>

## **Testosterone-dependent changes in neurons of hypothalamic arcuate nucleus and reversibility of these changes by modeled male hypogonadism**

<sup>1</sup> V.A. Almazov North-West Federal Medical Research Center, Akkuratova Str. 2, St. Petersburg 197341, Russia

<sup>2</sup> Yaroslav-Mudryi Novgorod State University, Bolshaya Sankt-Petersburgskaya Str. 41, Velikiy Novgorod 173003, Russia

**Background.** Importance of testosterone deficiency for structural homeostasis of the neurons regulating production of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and synthesizing this hormone is insufficiently understood. **Aim.** To determine reactive changes, quantity of androgens receptors (AR), and features of their distribution in neurons of hypothalamic medial arcuate nucleus (MAN) in experimental hypogonadism and reversibility of these changes by restorative therapy with testosterone. **Methods.** Hypogonadism was modeled in 16 Wistar rats by removing one gonad on postnatal days 2-3, and histological sections of caudal MAN were examined in young, 4-month old animals with and without a replacement therapy. The control group consisted of 8 age-matched intact males. Cell reactive changes, areas of slightly changed neuron bodies (Nissl staining of sections), and the number and proportion of nerve cell bodies differing in the degree of AR expression were determined in the middle left-sided part of MAN, on an area of 0.01 mm<sup>2</sup>. **Results.** MAN neurons contained a large quantity of AR distributed in different parts of the neuron body. In hypogonadism, AR redistributed and their expression (quantity) decreased. Condensation of AR in the region of nucleolus and plasmalemma and formation of conglomerates in the nucleus and cytoplasm were characteristic of neurons with moderate expression. In the regions of cytoplasm and plasma membrane, the receptors were absent in cells with low and very low expression. The reduced AR expression in hypogonadism was associated with a decreased neuron body area and death of a part of neurons. **Conclusions.** The identified degenerative changes in the testosterone-dependent neuronal MAN that synthesize GnRH or peptides affecting the GnRH production may decrease the release of GnRH, cause a secondary decrease in the androgen synthesis, and mediate morphological and functional manifestations of GnRH secondary deficit. The replacement therapy partially compensated for degenerative changes in neurons and restored the intensity of AR expression, however, it did not influence the process of nerve cell death.

**Keywords:** medial arcuate nucleus; hypogonadism; androgen receptors; neurons; reactive changes.

**For citation:** Droblenkov A.V., Proshina L.G., Yuhlina Yu.N., Bairamov A.A., Shabanov P.D., Nikitina I.L. Testosterone-dependent changes in neurons of hypothalamic arcuate nucleus and reversibility of these changes by modeled male hypogonadism. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 21–30. (in Russ). DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8519

**For correspondence:** Nikitina Irina, Dr. Sci., Professor, Chief of Paediatric Department of North-West Federal Medical Research Center named after Almazov; 2, Akkuratov` street, St. Petersburg, 197341, Russia; e-mail: nikitina0901@gmail.com

#### Information about authors:

Никитина И.Л. <http://orcid.org/0000-0003-4013-0785>

Дробленков А.В. <http://orcid.org/0000-0001-5155-1484>

Прошина Л.Г. <http://orcid.org/0000-0002-0791-4353>

Байрамов А.А. <http://orcid.org/0000-0002-0673-8722>

Юхлина Ю.Н. <http://orcid.org/0000-0001-9144-0578>

Шабанов П.Д. <http://orcid.org/0000-0003-1464-1127>

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

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

**Received** 31.03.2017

Изучение закономерностей половой дифференцировки мозга, особенно выраженной в пубертатном периоде [1], ее гормональной регуляции в условиях нормы и патологии является предметом активного исследовательского интереса [2, 3]. В последние годы стало известно, что выработка гипоталамического гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ), определяющего половую дифференцировку мозга в пубертатном периоде, ее задержка или патологические нарушения в течение жизни опосредована двумя механизмами воздействия на ГнРГ-нейроны. Один из них заключается в пре- и постсинаптических эффектах белков семейства кисспептинов, некоторых других протеинов и глутамата, которые синтезируют нейроны преоптического и медиобазального комплексов гипоталамиче-

ских ядер [4, 5]. Кисспептины, как оказалось, усиливают электрическое возбуждение ГнРГ-нейронов, потенцируют влияние ГАМК на G-белки их мембран [6, 7], тем самым увеличивая экспрессию мРНК и секреторную активность этих клеток [8]. Другой механизм связан с влиянием макроглии, клетки которой вырабатывают факторы роста и малые молекулы, необходимые для поддержания электрического потенциала, высокого уровня пластичности и процессов синтеза в ГнРГ-нейронах [9, 10].

Тела ГнРГ-нейронов в небольшом количестве распределены по всему гипоталамусу [11], содержатся они и в комплексе аркуатных ядер [12], тогда как их аксоны образуют густую сеть в области срединного возвышения [13]. Основным типом нейронов среди

объемного и плотного скопления клеток аркуатных ядер являются ассоциативные (по отношению к ГнРГ-нейронам), синтезирующие киспептины и другие регуляторы синтеза ГнРГ. Доля последних от общего количества нейронов аркуатных ядер мозга у грызунов составляет не менее 86% [14], причем ассоциативные нейроны аркуатных ядер образуют синапсы на телах и отростках ГнРГ-нейронов самих аркуатных ядер [12].

Эти оба функциональных типа нервных клеток аркуатных ядер, в конечном счете, ответственные за развитие морфофункциональных половых признаков организма, содержат огромное количество рецепторов к андрогенам (АР) [14]. Уменьшение их числа в условиях дефицита тестостерона обуславливает дегенеративные изменения дендритов, снижение постсинаптического потенциала и площади синаптических контактов у пирамидных нейронов гиппокампа, сочетаемые с ослаблением его мнестических функций [15—17], определяет сокращение количества спариваний самцов крыс [18]. Влияние тестостерона на нейроны головного мозга, реализуемые через связывание АР, является системным, поскольку оно обусловлено способностью андрогенов стимулировать синтез и высвобождение медиаторов [19]. В связи с этими данными можно полагать, что уровень тестостерона в крови и число связанных с ним рецепторов в комплексе аркуатных ядер гипоталамуса определяют дифференцировку этой формации мозга, а также дифференцировку половых признаков организма.

Между тем данные о количестве АР в аркуатном комплексе гипоталамических ядер в печати не отражены. Среди целого ряда публикаций, посвященных выявлению АР в различных формациях мозга, попытка дать их количественную оценку была сделана лишь в единичных работах [20]. Подсчет клеток в них был основан на различии ядра нейронов по выраженной и слабой экспрессии АР. Дефицит данных, позволяющих оценить количество нейронов, отличающихся интенсивностью экспрессии АР, может быть обусловлен необходимостью более детальной классификации клеток по интенсивности окрашивания и характеру распределения данных рецепторов не только в ядре, но и в других компонентах клетки. Основанием к этому являются данные о том, что андрогены подвергаются регулируемой диффузии в цитоплазму, в ходе которой образуется комплекс АР с мембранными и цитоплазматическими протеинами [21, 22]. В цитоплазме происходит липофильная активация АР после объединения с андрогенами [23]. Затем активированный комплекс АР переносится в ядро [24, 21], после чего он вступает в связь с андроген-чувствительными участками ДНК [17].

В материалах всех публикаций, касающихся результатов моделирования снижения степени экспрессии АР в структурах мозга, отсутствуют данные о сочетании измененной экспрессии этих рецепторов с другими реактивными изменениями тел нейронов, а также обратимостью изменений последних. Знание реактивных изменений нейронов аркуатных ядер в комплексе с изменениями числа АР при моделировании гипогонадизма и последующего восстановления концентрации сывороточного тестостерона поможет глубже понять степень участия этого гормона в механизме половой дифференцировки мозга.

*Цель исследования* — установление реактивных изменений количества рецепторов к андрогенам, площади тел нейронов и доли погибших клеток в медиальном аркуатном ядре при экспериментальном гипогонадизме, а также обратимости этих изменений после восстановительной терапии тестостероном.

### Методика

Для моделирования мужского гипогонадизма у 16 новорожденных самцов-крыс Вистар в возрасте 2—3 сут. (масса 6—7 г) под кратковременным эфирным наркозом удаляли одну гонаду согласно общепринятой методике [25]. У животных первой экспериментальной группы (8 крыс), таким образом, было индуцировано устойчивое снижение выработки тестостерона (гипогонадизм), что вызывает торможение постнатальной дифференцировки нейронов головного мозга [26]. Животным другой группы (8 крыс) после аналогичной операции в возрасте 4 мес. (половозрелые особи) ежедневно, курсом 10 сут., внутримышечно вводили раствор тестостерона пропионата из расчета 3—5 мг/кг (гипогонадные самцы с лечением). Контролем служили интактные животные (8 крыс). В возрасте 4 мес. и 10 дней всех крыс декапитировали. Эксперимент был осуществлен в весенне-летний период, когда резко возрастает экспрессия рецепторов к тестостерону у клеток различных тканей [27]. 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).

Объектом исследования служила каудальная часть медиального аркуатного ядра (МАЯ) — подотдел аркуатного ядерного комплекса, три составные части которого обладают наибольшими размерами, численной

плотностью нейронов [28] и, следовательно, большим числом синаптических связей с нейронами, вырабатывающими гонадолиберин. Искомую часть МАЯ на уровне bregma -3,6 мм устанавливали при микроскопии пробных неокрашенных парафиновых фронтальных срезов согласно стереотаксическому атласу [29].

Для выявления рецепторов к андрогенам использовали мышиные антитела, клон F3 (Cloud-Clone Corp., Китай) в концентрации 500 мкг/мл. Вторичные биотинилированные антитела применяли из набора VECTASTAIN ABC, США. После проявления связанных антигенов диаминобензидином ядра клеток

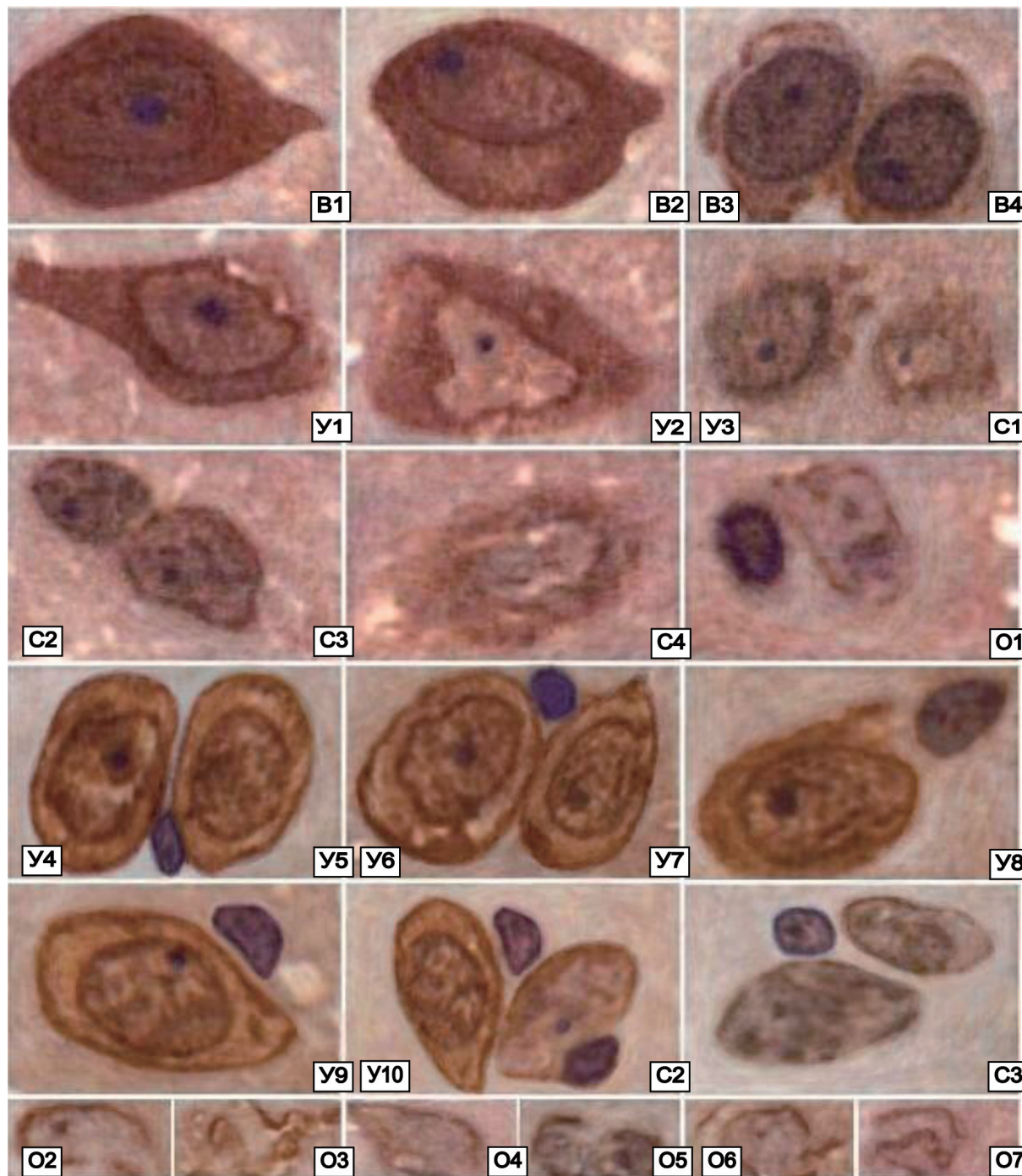


Рис. 1. Классификационные признаки нейронов медиального аркуатного гипоталамического ядра по результатам выявления рецепторов к тестостерону и окрашивания ядер клеток гематоксилином. Ок. x10, об. x100.

докрашивали гематоксилином Карацци. По середине левосторонней части МАЯ в площади  $0,01 \text{ мм}^2$  у каждой особи (общее количество подсчетов = 8) определяли: реактивные изменения клеток и площадь тел малоизмененных нейронов (после окрашивания срезов методом Ниссля), а также число и долю тел нервных клеток, различавшихся по степени экспрессии рецепторов к тестостерону.

Различали следующие параметры степени экспрессии: выраженную, умеренную, слабую и очень низкую. Выраженной (В) считали экспрессию рецепторов, при которой внутренняя часть ядра содержала большое число мелкодисперсных частиц АР, расположенных компактно, причем контуры ядерной оболочки окрашивались интенсивно на всем протяжении (рис. 1). Экспрессию рецепторов расценивали как умеренную (У) при их разреженности в наибольшей части площади ядра и (или) цитоплазмы, что в условиях эксперимента обычно сочеталось с концентрацией АР в области ядерной оболочки и плазмолеммы. Слабой (С) экспрессию АР считали при обнаружении частиц в составе тонкой и прерывистой (у части

клеток) области, ассоциированной с оболочкой ядра, наличии отдельных конгломератов АР во внутренней части ядра, а также при разреженности частиц рецепторов или их отсутствии в цитоплазме. Очень низкой (О) считали экспрессию АР при обнаружении скопленных его частиц в области прерывистых и деформированных контуров оболочки ядра.

Окрашенные срезы МАЯ изучали при помощи микроскопа Leica DME (Германия), фотографировали и осуществляли морфометрическое исследование, используя сканер Pannoramic-250 Flash III (Венгрия) и программу 3DHISTECH (Венгрия). Различия средней величины и ее ошибки считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

МАЯ гипоталамуса у взрослых интактных крыс, в сравнении с остальными ядрами аркуатного комплекса было наиболее обширным; размеры тел нейронов и их высокая компактность расположения, визуально, между ядрами этого комплекса не различались (рис. 2, а). Большинство тел нейронов МАЯ облада-

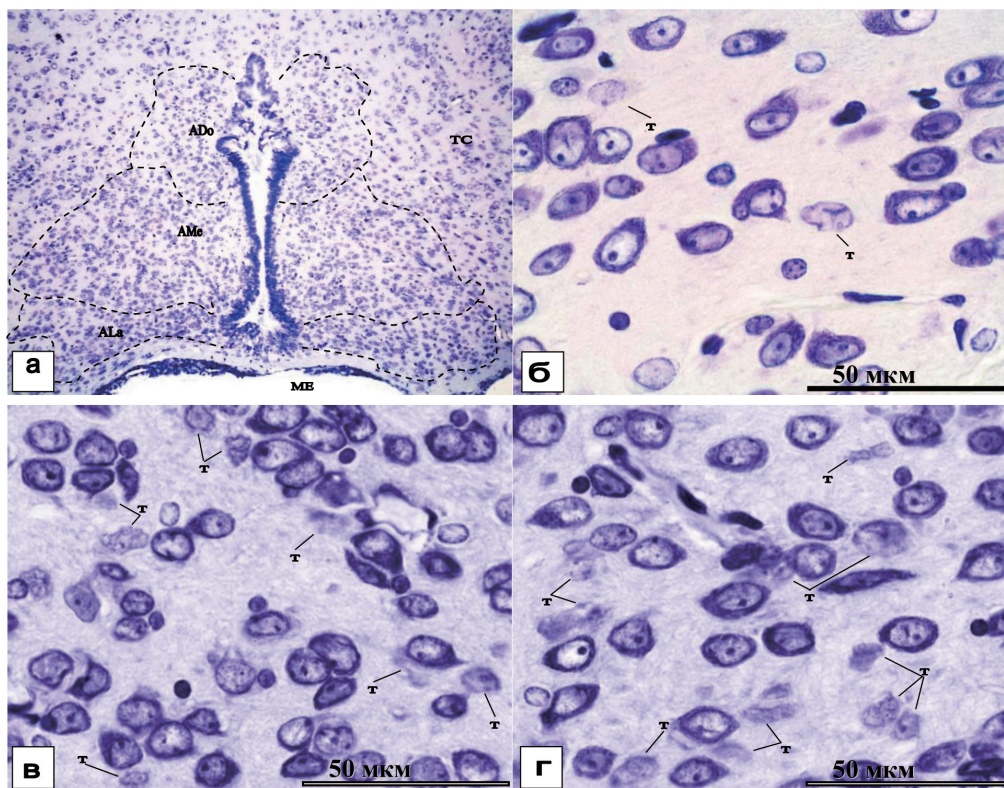


Рис. 2. а – каудальная часть аркуатного ядерного комплекса на уровне bregma -3,6 мм, установленный в результате сопоставления фронтальных срезов промежуточного мозга интактных половозрелых крыс с картами стереотаксического атласа Paxinos G. and Watson C. (1998). Ado – аркуатное дорсальное ядро, Ala – аркуатное латеральное ядро, AMe – аркуатное медиальное ядро, ME – срединное возвышение, TC – область серого бугра, 3v – полость желудочка.

Реактивные изменения нейронов аркуатного медиального ядра у взрослых крыс при моделировании гипогонадизма (в), его терапии тестостероном (г) в сравнении с нормой (б). Т – клетки-«тени». Окраска методом Ниссля, ок.  $\times 10$ , об.  $\times 100$ .

ли отчетливыми, ровными, слегка выпуклыми контурами клеточной поверхности, ровной и выпуклой поверхностью оболочки ядра, на некоторых небольших участках содержащей неглубокие инвагинации. Хроматофильная субстанция представляла собой скопления разного количества мелких глыбок, занимавших наибольшую часть цитоплазмы. Данные нейроны были идентифицированы как неизмененные (рис. 2, б). Среди нейронов определялись единичные клетки-«тени», представленные сморщенными контурами оболочки ядра или ее фрагментами. Долевое соотношение малоизмененных нейронов и клеток-«теней» в МАЯ интактных крыс представлено в табл. 1.

АР экспрессировали тела всех нейронов МАЯ; ядрышко в телах нейронов, ядрышко, хроматин и ядерная оболочка глиальных клеток, визуальнo, АР не содержали и окрашивались гематоксилином. Уровень экспрессии АР у большинства нейронов был выраженным (В1 — В3, рис. 1).

Внутренняя часть ядра этих клеток содержала большое число мелкодисперсных частиц АР, расположенных компактно, причем контуры ядерной оболочки окрашивались интенсивно на всем протяжении. По плотности распределения АР в частях тел нейронов среди клеток этого типа были выявлены различия. У части клеток контур плазмолеммы окрашивался интенсивно на всем протяжении, метка была рав-

номерно распределена в цитоплазме и ядре (В1). У других клеток этого фенотипа контур плазмолеммы также окрашивался интенсивно на всем протяжении, однако в ядре и цитоплазме определялись участки разреженности метки (В2). У следующей данной разновидности клеток отчетливый контур плазмолеммы выявлялся в части поверхности нейрона (В3), определялось сгущение АР в области оболочки ядра, которая выглядела утолщенной, тогда как в цитоплазме рецепторы образовывали единичные небольшие конгломераты (В4).

В МАЯ интактных крыс присутствовали также многочисленные клетки, содержащие в ядре или цитоплазме наряду с участками компактных скоплений частиц АР участки их выраженной разреженности, причем область их экспрессии, ассоциированная с оболочкой ядра была, визуальнo, широкой. Уровень экспрессии АР у данных клеток был расценен как умеренный. Разреженность частиц АР у некоторых клеток этого типа определялась во внутренней части ядра и участке цитоплазмы (У1), в большей части площади ядра и в небольших участках цитоплазмы (У2), а также в участке ядра и в большей части площади цитоплазмы в сочетании с участком отсутствия выраженной экспрессии АР в области оболочки ядра (У3).

Единичные нейроны отличались слабой (С1—С4) и очень низкой экспрессией АР (О1). Рецепторы

Количество и долевое соотношение субпопуляций нейронов МАЯ на площади 0,01 мм<sup>2</sup>, ( $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ )

Таблица 1

Воздействие	Количество и доля нейронов (количество исследованных площадей, m = 8)		Суммарное количество нейронов
	малоизменённых	теневидных	
Нет (контроль)	30,3 ± 1,8 96,0 ± 0,8%	1,3 ± 0,3 4,0 ± 0,8%	100%
Гипогонадизм	32,8 ± 0,7 86,6 ± 1,1%*	5,1 ± 0,5 13,4 ± 1,1%*	100%
Терапия тестостероном	30,0 ± 1,3 82,3 ± 3,8%*	6,0 ± 1,1 17,7 ± 3,8%*	100%

Примечание. \* — различия с параметрами клеток в контроле значимы (p<0,05).

Количественные и долевые различия субпопуляций нейронов МАЯ, отличающихся степенью экспрессии рецепторов к тестостерону на площади 0,01 мм<sup>2</sup>, ( $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ )

Таблица 2

Воздействие	Степень экспрессии (количество исследованных площадей, m = 8)				Суммарное количество нейронов
	Выражена	Умеренно выражена	Слабо выражена	Очень низкая	
Нет (контроль)	20,0 ± 1,1 62,4 ± 3,3%	9,5 ± 1,4 29,6 ± 4,4%	1,8 ± 0,5 5,3 ± 1,6%	0,9 ± 0,3 2,7 ± 1,6%	100%
Гипогонадизм	0 0%*	9,0 ± 1,3 28,2 ± 3,4%	14,4 ± 1,2 45,8 ± 4,1%*	8,3 ± 1,1 26,0 ± 3,3%*	100%
Терапия тестостероном	2,5 ± 0,8 8,5 ± 3,1%**	16,1 ± 2,0 53,3 ± 5,2%**	7,9 ± 0,9 26,4 ± 2,8%**	3,5 ± 0,8 11,8 ± 2,3%**	100%

Примечание. \* — различия с параметрами клеток в контроле значимы (p<0,05); \*\* — различия с параметрами клеток при гипогонадизме значимы (p<0,05).

у клеток этого типа выявлялись в составе тонкой и прерывистой (у части клеток) области, ассоциированной с оболочкой ядра. В области плазмолеммы АР обычно отсутствовали. Немногочисленные частицы АР и их мелкие конгломераты располагались во внутренней части ядра, тогда как в цитоплазме они отсутствовали (С2, С3). При другом варианте слабой экспрессии основной областью расположения немногочисленных частиц АР и их мелких агрегатов была цитоплазма; рецепторы во внутренней части ядра были единичными или отсутствовали (С1, С4). Очень низкая экспрессия АР определялась в составе фрагментов оболочки ядра клеток-«теней». Количественные и долевые соотношения нейронов, различающихся по степени экспрессии АР, представлены в табл. 2.

В результате моделирования устойчивого снижения выработки тестостерона в неонатальном периоде среди нейронов МАЯ взрослых крыс были выявлены значительные патологические нарушения (рис. 2в). Нейроны, измененные в наименьшей степени (малоизмененные) содержали цитоплазму, визуальнo, меньшего размера (более узкую), чем у интактных крыс. Глыбки хроматофильной субстанции в ней располагались компактно и равномерно, исключая основание главных отростков. Светлое ядро неизменной формы содержало крупное ядрышко, у многих клеток определявшееся вблизи внутренней поверхности кариолеммы. Число тeneвидных нейронов было статистически значимо увеличено. Доля клеток-«теней» возросла в 3,4 раза (табл. 1); соответственно, удельное количество малоизмененных нейронов в МАЯ гипогонадной группы животных существенно сократилось. Площадь тел малоизмененных нейронов уменьшилась в 1,7 раза ( $p < 0,05$ ; рис. 3). Количество клеток сателлитов визуальнo увеличилось: подавляющее большинство тел клеток макроглии (олигодендроцитов и астроцитов) прилежали к поверхности тел нервных клеток.

Признаки выраженной экспрессии АР в структурах нейронов МАЯ гипогонадных крыс отсутствовали. Степень экспрессии у большинства тел малоизмененных нейронов по критериям, приведенным в разделе «методика», соответствовала умеренной. АР у нейронов данного фенотипа концентрировались в области оболочки ядра и цитоплазмы, которые выглядели утолщенными на всем протяжении (У4 — У7 и У9 — У10; рис. 1). Во внутренней части ядра и цитоплазмы АР образовывали конгломераты, различающиеся в разных клетках по количеству и размерам. Значительная часть площади цитоплазмы (наибольшая у части клеток) рецепторов не содержала (У6 — У7 и У9 — У10). У отдельных клеток данного фенотипа частицы и конгломераты АР были распределены в части цитоплазмы; сгущение рецепторов

вблизи плазмолеммы не было выражено (У8). Изменение распределения АР между частями тела нейронов при гипогонадизме не сопровождалось значительным сокращением доли клеток с умеренной степенью экспрессии (табл. 2).

Число и, соответственно, доля нейронов со слабо выраженным уровнем экспрессии АР при гипогонадизме возросла в 8,6 раза ( $p < 0,05$ ). Цитоплазматическая локализация рецепторов у клеток данного фенотипа, в отличие от контроля, была не характерна (С2 — С3). Также значительно возросла и доля нейронов, очень слабо экспрессировавших АР, которые образовывали прерывистые и тонкие скопления в области оболочки ядра. Поскольку многие нейроны этого фенотипа являлись клетками-«теньями», их кариолемма была деформированной, фрагментированной, прерывистой, формировала двойные контуры (О2 — О7).

В результате терапии гипогонадного состояния тестостероном большинство нейронов МАЯ выглядели более крупными, чем в основной экспериментальной группе и содержали многочисленные глыбки хроматофильной субстанции в хорошо выраженной цитоплазме. Частичное восстановление площади тел малоизмененных нейронов у животных этой группы в сравнении с площадью нейронов у гипогонадных крыс (рис. 3), визуальнo было обусловлено увеличением площади цитоплазмы. Среди нейронов определялись также клетки-«тени» (рис. 2, г). Их доля у животных этой группы значительно не различалась с данным параметром у гипогонадных крыс без лечения и многократно превышала удельное количество тeneвидных нейронов у здоровых животных (табл. 1). Число клеток-сателлитов в МАЯ у крыс с терапией гипогонадизма, визуальнo, также оставалось высоким.

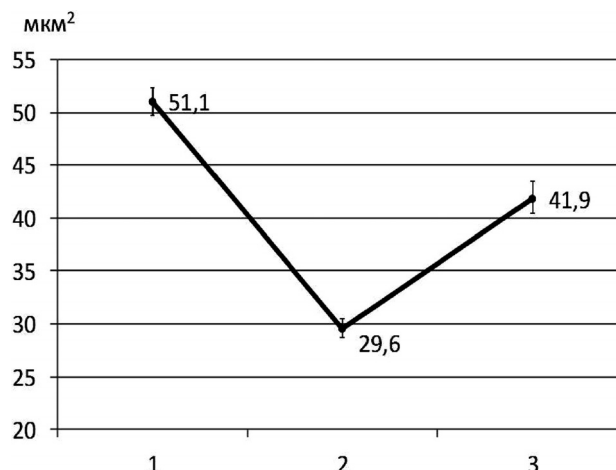


Рис. 3. Изменения площади тел нейронов при гипогонадизме (2) и заместительной терапии (3) в сравнении с параметрами у интактных крыс (1). Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки. Различия между параметрами клеток значимы ( $p < 0,05$ ).

АР в телах некоторых нейронов у крыс гипогонадной группы с лечением были сконцентрированы в большей части площади ядра и цито плазмы, образовывали тонкую непрерывную полосу сгущения в области оболочки ядра. Уровень экспрессии АР нейронов данного фенотипа был выраженным (В2, В3). Большинство нервных клеток характеризовалось умеренной экспрессией АР. В их теле рецепторы имели вид частиц и мелких конгломератов, которые были распределены в небольшой части площади ядра и цитоплазмы (У2, У8). В области оболочки ядра клетки данного фенотипа также формировали тонкую непрерывную полосу сгущения, тогда как концентрация АР в области плазмолеммы не была выражена. У небольшой части нейронов со слабой и очень низкой степенью экспрессии АР в цитоплазме не обнаруживались. Они образовывали небольшие конгломераты во внутренней части ядра, были сконцентрированы в области прерывистой тонкой линии контура кардиолеммы (С2, С3) или в области прерывистых и деформированных контуров оболочки ядра.

Доли нейронов с выраженной и умеренной экспрессией АР в группе гипогонадных крыс с лечением были статистически значимо выше, чем в экспериментальной группе без заместительной терапии, тогда как доля клеток со слабой и очень низкой степенью экспрессии — значимо ниже (табл. 2).

Подводя общие итоги проведенного исследования, считаем важным подчеркнуть следующее. Наличие в медиальном аркуатном ядре интактных крыс, наряду с неизменными нейронами, определенного числа измененных клеток может свидетельствовать о незавершенности процесса программированной гибели нейронов у молодых взрослых крыс. Эти данные согласуются с результатами исследований различных отделов мезокортиколимбической дофаминергической системы и неокортекса здоровых людей и крыс разного возраста [30].

Не вызывает сомнений, что такие выраженные дегенеративные изменения нейронов МАЯ, как уменьшение площади их тел (главным образом, за счет цитоплазмы) в сочетании с гибелью части клеток, происходят вследствие устойчивого дефицита тестостерона. Ключевым фактором в механизме атрофических изменений МАЯ является выявленное снижение экспрессии (сокращение числа) АР нервными клетками данного ядра. В этом убеждают данные, свидетельствующие о грубых морфофункциональных нарушениях нейронов, обусловленных снижением числа их АР, такие, как ослабление синтеза ДНК и рибосомальной РНК [31], электрических потенциалов — пресинаптических [32] и постсинаптических, редукция площади синаптических контактов [15—17]. Выявленные в нашем исследовании дегенеративные изменения

нейронов МАЯ у гипогонадных крыс, которые являются нейросекреторными клетками, вырабатывающими ГнРГ или пептиды, влияющие на его выработку [4, 5, 12, 14], могут обусловить уменьшение выработки и высвобождения гонадолиберина, вторичное снижение синтеза андрогенов и реализацию морфофункциональных проявлений его вторичного дефицита. К последним у растущего организма следует отнести задержку дифференцировки половых признаков, обуславливаемых данным гормоном и системные нарушения, вызванные атрофическими изменениями клеток разной локализации.

В ходе исследования получены новые данные о частичной обратимости как интенсивности экспрессии АР нейронами МАЯ гипоталамуса (которые раньше в данной модели гипогонадизма исследованы не были), так и размеров тел нервных клеток. Данные литературы о причинно-следственной связи между числом АР, концентрацией плазменного тестостерона и уровнем синтеза нуклеиновых кислот [31], а также сведения о восстановлении электрической активности и морфофункциональных признаков синаптической передачи в гиппокампе, полученные при осуществлении заместительной терапии гипогонадизма андрогенами [16, 17, 19], позволяют объяснить и косвенно подтвердить данные о частичной обратимости морфологических нарушений нейронов МАЯ. Вместе с тем, все перечисленные выше аргументы позволяют обосновать гипотезу частичной обратимости тестостерон-зависимых нарушений, таких как дифференцировка половых признаков и системные нарушения, что требует детального подтверждения в ходе дальнейших исследований.

Особым предметом научного интереса, который раскрывается в настоящем исследовании, являются новые данные о локализации и плотности расположения АР в телах нервных клеток, а также о перераспределении рецепторов в модели недостаточности андрогенов. Безусловно, АР, классифицируемые как рецепторы ядерного типа, в конечном счете, локализуясь в интерфазном ядре, связываясь с определенными локусами хромосом, изменяют работу генома [17]. Поэтому в тех редких работах, которые посвящены изучению изменений плотности расположения АР в качестве критерия был использован уровень их экспрессии во внутренней части ядра [20]. Авторами были использованы кроличьи поликлональные антитела к аминокислотам 1-21 АР крыс. Между тем в авторской иллюстрации была хорошо различима и цитоплазматическая локализация АР. Отсутствие в данных этих авторов выраженных локальных сгущений АР и их концентрации в области оболочки ядра и плазмолеммы можно объяснить моделированием более щадящего снижения концентрации андрогена



в их эксперименте — возрастного. Другой вероятной причиной установления участков клеток с нетипичной экспрессией АР является использование в настоящем исследовании моноклональных антител (клон F3, Cloud-Clone Corp., Китай), связывающих как его комплекс с мембранным и цитоплазматическими протеинами, так и его фрагменты, подвергшиеся липофильной деградации в цитоплазме [21, 22]. Поскольку данные об изменениях комплекса АР с цитоплазматическими и мембранными протеинами в условиях дефицита андрогенов в литературе отсутствуют, обоснование выявленной перегруппировки рецепторов между частями нейрона представляется сложным.

### Выводы

Нейроны каудальной части МАЯ гипоталамуса содержат огромное количество АР, которые распределены в разных частях их тела: они образуют скопления в ядре, цитоплазме и оболочках клетки. При гипогонадизме происходит как перераспределение АР, так и снижение уровня их экспрессии (количества). АР концентрируются в области оболочки ядра и плазмолеммы нейронов, образуют конгломераты в ядре и цитоплазме; многие клетки утрачивают локализацию рецепторов в цитоплазме и плазмолемме. Снижение степени экспрессии АР при гипогонадизме сопряжено с дегенеративными изменениями и гибелью части нервных клеток. Заместительная терапия тестостероном частично компенсирует дегенеративные изменения нейронов и восстанавливает интенсивность экспрессии АР.

### References

- Sumiyoshi A., Nonaka H., Kawashima R. Sexual differentiation of the adolescent rat brain: A longitudinal voxel-based morphometry study. *Neurosci. Lett.* 2017; 642: 168-73. Doi: 10.1016/j.neulet.2016.12.023.
- Nikitina I.L., Bairamov A.A. Formirovanie pola i reproduktivnoy sistemy cheloveka: proshloe, nastoyashee, budushee. *Lechenie i profilaktika.* 2014; (2): 76-85. (in Russian)
- Hoduleva Yu.N., Asaulenko Z.P., Bairamov A.A., Nikitina I.L., Drobenkov A.V. Degenerativnye izmeneniya neuronov medialnogo arkuatnogo gipotalamicheskogo yadra v modeli muzhskogo gipogonadizma. *Pediatrics.* 2015; 6(3): 62-8. (in Russian)
- Ojeda S.R., Terasawa E. Neuroendocrine regulation of puberty. *Hormones, Brain and Behavior.* 2002; 4: 589-659.
- Ojeda S.R., Dubay C., Lomniczi A. et al. Gene Networks and the Neuroendocrine Regulation of Puberty. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010; 324(1): 3-11. Doi: 10.1016/j.mce.2009.12.003.
- Messenger S., Chatzidakis E.E., Ma D. et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005; 102(5): 1761-1766. Doi: .
- Ronnekleiv O.K., Kelly M.J. Kisspeptin Excitation of GnRH Neurons. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013; 784: 113-31. Doi: 10.1007/978-1-4614-6199-9\_6.
- Novaira H.J., Ng Y., Wolfe A., Radovick S. Kisspeptin increases GnRH mRNA expression and secretion in GnRH secreting neuronal cell lines. *Molec. Cel. Endocrinol.* 2009; 311: 126-34. Doi: 10.1016/j.mce.2009.06.011.
- Ojeda S.R., Prevot V., Heger S. et al. Glia-to-neuron signaling and the neuroendocrine control of female puberty. *Ann. Med.* 2003; 35(4): 244-55. PMID: 12846266.
- Wilkins A., Majed H., Layfield R. et al. Oligodendrocytes promote neuronal survival and axonal length by distinct intracellular mechanisms: a novel role for oligodendrocyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* 2003; 23(12): 4967-74. PMID: 12832519.
- Conn P.M., Hsueh A.J.W., Crowley W.F.J. Gonadotropin-releasing hormone: Molecular and cell biology, physiology, and clinical applications. *Fed. Proc.* 1984; 43: 2351-61. PMID: 6327393.
- Kallo I., Vida B., Deli L. et al. Co-Localisation of Kisspeptin with Galanin or Neurokinin B in Afferents to Mouse GnRH Neurons. *J. Neuroendocrinol.* 2011; 24: 464-76. Doi: 10.1111/j.1365-2826.2011.02262.x.
- Wray S. Gonadotropin-Releasing Hormone: GnRH-1 System. *Encyclopedia of Neuroscience.* 2009; 4: 967-73.
- Lehman M.N., Merkley C.M., Coolen L.M., Goodman R.L. Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals. *Brain Res.* 2010; 1364: 90-102. Doi: 10.1016/j.brainres.2010.09.020.
- Leranth C., Petnehazy O., MacLusky N.J. Gonadal hormones affect spine synaptic density in the CA1 hippocampal subfield of male rats. *J. Neurosci.* 2003; 23(5): 1588-92. PMID: 12629162.
- Moghadami S., Jahanshahi M., Sepehri H., Amini H. Gonadectomy reduces the density of androgen receptor-immunoreactive neurons in male rat's hippocampus: testosterone replacement compensates it. *Behav. Brain Funct.* 2015; 12(1): 5. Published online 2016, Jan., 28. Doi: 10.1186/s12993-016-0089-9.
- Smith M.D., Jones L.S., Wilson M.A. Sex differences in hippocampal slice excitability: role of testosterone. *Neurosci.* 2002; 109(3): 517-30. PMID: 11823063.
- Wu D., Gore A.C. Changes in Androgen Receptor, Estrogen Receptor alpha, and Sexual Behavior with Aging and Testosterone in Male Rats. *Horm. Behav.* 2010; 58(2): 306-16. Doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.03.001.
- Mitsushima D., Takase K., Funabashi T., Kimura F. Gonadal steroids maintain 24 h acetylcholine release in the hippocampus: organizational and activational effects in behaving rats. *J. Neurosci.* 2009; 29(12): 3808-15. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.5301-08.2009.
- Wu D., Lin G., Gore A.C. Age-related Changes in Hypothalamic Androgen Receptor and Estrogen Receptor  $\alpha$  in Male Rats. *J. Comp. Neurol.* 2009; 512(5): 688-701. Doi: 10.1002/cne.21925.
- Griffith K., Morton M.S., Nicholson R.I. Androgens, androgen receptors, antiandrogens and the treatment of prostate cancer. *Eur. Urology.* 1997; 32(Suppl. 3): 24-40. PMID: 9267783.
- Roy A.K., Tyagi R.K., Song C.S. et al. Androgen receptor: structural domains and function; dynamics after ligand-receptor interaction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001; 949: 44-57. PMID: 11795379.
- Mora G.R., Tindall D.J. Activation of androgen receptor // Prostate Cancer. Biology, Genetics, and the New

Therapeutics (Eds.: L.W.K. Chung et al.). Totowa (N.J.): Humana Press; 2001: 219-39.

24. Farnsworth W.E. Roles of estrogen and SHBG in prostate physiology. *The Prostate*. 1996; 28: 17-23. Doi: 10.1002/(SICI)1097-0045(199601)28:1.

25. Kirshenblat Ya.D. *Praktikum po endokrinologii*. Moscow; Vysshaya shkola, 1969. (in Russian)

26. Gorski R.A. Hypothalamic imprinting by gonadal steroid hormones. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2002; 511: 57-70. PMID: 12575756.

27. Kerver H.N., Wade J. Relationships among Sex, Season and Testosterone in the Expression of Androgen Receptor mRNA and Protein in the Green Anole Forebrain. *Brain Behav. Evol.* 2014; 84(4): 303-14. Doi: 10.1159/000368388.

28. Tetel M.J., Ungar T.C., Hassan B., Bittman E.L. Photoperiodic regulation of androgen receptor and steroid receptor coactivator-1 in Siberian hamster brain. *Brain Res.* 2004; 131(1-2): 79-87. Doi: 10.1016/j.molbrainres.2004.08.009.

29. Paxinos G., Watson C. *The rat brain atlas in stereotaxic coordinates*. Fourth Edition. — Elsevier Acad. Press, 1998. Copyright, CD-Rom design by Halasz P. — Fig. 32.

30. Drobленков A.V. *Pathological changes of neurons, mesocortical-limbic dopaminergic system in healthy humans and rats. [Morphology. Patologicheskiye izmeneniya neyronov mezokortiko-limbicheskoy dofaminergicheskoy sistemy u zdorovykh lyudey i krys. Morfologiya]*. 2010; 149(3): 11-7. (in Russian)

31. Keil K.P., Abler L.L., Laporta J., Altmann H.M., Yang B., Jarrard D.F., Hernandez L.L., Vezina C.M. Androgen receptor DNA methylation regulates the timing and androgen sensitivity of mouse prostate ductal development. *Dev. Biol.* 2014; 396(2): 237-245. Doi: 10.1016/j.ydbio.2014.10.006.

32. Asuthkar S., Demirkhanyan L., Sun X., Elustondo P.A., Krishnan V. et al. The TRPM8 Protein Is a Testosterone Receptor. *J. Biol. Chem.* 2015; 290(5): 2670-2688. Doi: 10.1074/jbc.M114.610873.

### Сведения об авторах:

*Дробленков Андрей Всеволодович*, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», проф. каф. морфологии человека ГБОУ ВПО «Новгородского университета им. Ярослава Мудрого» Министерства образования и науки РФ, e-mail: droblenkov\_a@mail.ru

*Прошина Лидия Григорьевна*, доктор мед. наук, зав. каф. морфологии человека ГБОУ ВПО «Новгородского университета им. Ярослава Мудрого» Министерства образования и науки РФ, e-mail: lidija.proshina@rambler.ru

*Юхлина Юлия Николаевна* мл. науч. сотр. НИЛ детской эндокринологии, врач, ассистент кафедры детских болезней ФГБУ «Северо-Западный медицинский исследовательский центр им. В.А.Алмазова» Минздрава РФ, e-mail: dom-j@mail.ru

*Байрамов Алекбер Азизович* доктор мед. наук, доктор мед. наук, врач ФГБУ «Северо-Западный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, e-mail: alekber@mail.ru

*Шабанов Петр Дмитриевич*, доктор мед. наук, проф., зав. отделом нейрофармакологии им. С.В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», вед. науч. сотр. НИЛ детской эндокринологии ФГБУ «Северо-Западный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, e-mail: shabanov@mail.rcm.ru