

*Дробленков А. В.^{1,2}, Прошина Л. Г.², Монид М. В.¹,
Бобков П. С.¹, Кайдалова Ю. Л.¹*

ПАРАМЕТРЫ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ К АНДРОГЕНАМ КАК МАРКЕР МОРФО- ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ НЕЙРОНОВ АРКУАТНОГО ЯДРА ГИПОТАЛАМУСА

¹*Отдел нейрофармакологии им. С.В. Аничкова (заведующий – проф. П. Д. Шабанов)
Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург,
e-mail: droblenkov_a@mail.ru*

²*Кафедра морфологии человека (заведующая – проф. Л. Г. Прошина)
Института медицинского образования НовГУ им. Ярослава Мудрого*

Выработка гипоталамического гонадотропного рилизинг-гормона (ГнРГ), определяющего половую дифференцировку, ее задержку или патологические нарушения, опосредована двумя механизмами. Один заключается в пре- и постсинаптических эффектах белков семейства кисспептинов, других протеинов и ГАМК, которые синтезируют нейроны преоптического и медиобазального комплексов гипоталамических ядер [1, 2]. Кисспептины усиливают электрическое возбуждение ГнРГ-нейронов, потенцируют влияние ГАМК на G-белки мембран их синапсов [3, 4], тем самым увеличивая экспрессию мРНК и секреторную активность клеток [5]. Другой механизм связан с влиянием клеток макроглии, вырабатывающих факторы роста и малые молекулы, необходимые для поддержания электрического потенциала, пластичности и синтеза ГнРГ-нейронов [6,7].

Тела ГнРГ-нейронов в небольшом количестве распределены по всему гипоталамусу [8], содержатся они и в комплексе аркуатных ядер [9], тогда как их аксоны образуют густую сеть в области срединного возвышения [10]. Основным типом нейронов аркуатных ядер являются ассоциативные (по отношению к ГнРГ-нейронам), синтезирующие кисспептины и другие регуляторы синтеза ГнРГ. Доля последних от общего числа нейронов аркуатных ядер мозга у грызунов составляет не менее 86 % [11], причем они образуют синапсы на телах и отростках ГнРГ-нейронов самих аркуатных ядер [9].

Эти оба типа нейронов аркуатных ядер, в конечном счете ответственные за развитие морфо- функциональных половых признаков организма, содержат рецепторы к андрогенам (АР) [11]. 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 [12, 13, 14], определяет сокращение количества спариваний самцов крыс [15]. Влияние тестостерона на нейроны головного мозга, реализуемое через связывание АР, является системным, поскольку оно обусловлено способностью андрогенов стимулировать синтез и высвобождение медиаторов [16]. В связи с этими данными можно полагать, что уровень тестостерона в крови и число связанных АР в комплексе аркуатных ядер определяют дифференцировку не только данной формации мозга, но и различных клеток организма.

Данные о количестве и особенностях распределении АР у нейронов в печати не отражены. В исследованиях моделируемой экспрессии АР в клетках мозга [15] отсутствуют данные об реактивных изменениях последних.

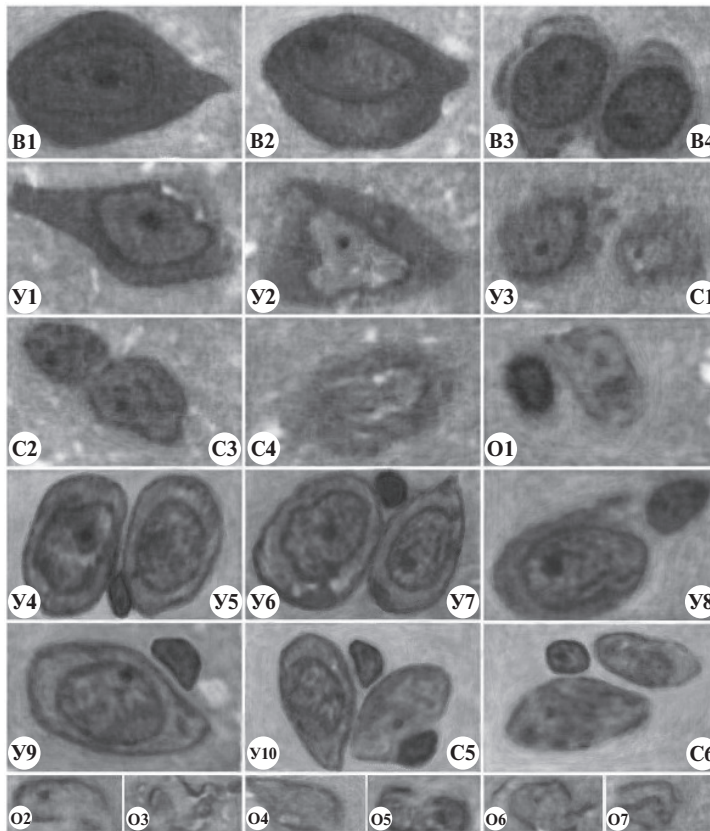


Рис. 1. Классификационные признаки нейронов медиального аркуатного гипоталамического ядра по результатам выявления рецепторов к тестостерону и окрашивания ядер клеток гематоксилином. Ок. $\times 10$, об. $\times 100$

Цель данного исследования – установление числа и локализации рецепторов к андрогенам у нейронов медиального аркуатного ядра гипоталамуса, площади их тел и доли погибших клеток при экспериментальном гипогонадизме, а также обратимости этих изменений после заместительной терапии.

Материал и методы. У 16 новорожденных самцов крыс Вистар в возрасте 2–3 дней (масса 6–7 г) под эфирным наркозом удаляли одну гонаду, индуцируя устойчивое снижение выработки тестостерона (гипогонадизм), тормозящее постнатальную дифференцировку нейронов ЦНС [17]. Части этих животных (8 крыс) в возрасте 4 месяцев ежедневно в течение 10 дней внутримышечно вводили раствор тестостерона пропионата из расчета 3–5 мг/кг (взрослые гипогонадные самцы с лечением). Контролем служили интактные животные (8 крыс). В возрасте 4 месяцев и 10 дней всех крыс умерщвляли.

Объектом гистологического исследования была каудальная часть медиального аркуатного ядра (МАЯ) – наиболее крупной части аркуатного ядерного комплекса, обладающего большим числом синаптических связей с ГнРГ-нейронами (рис. 1). Искомую часть МАЯ изучали на уровне bregma – 3,6 мм (рис. 2).

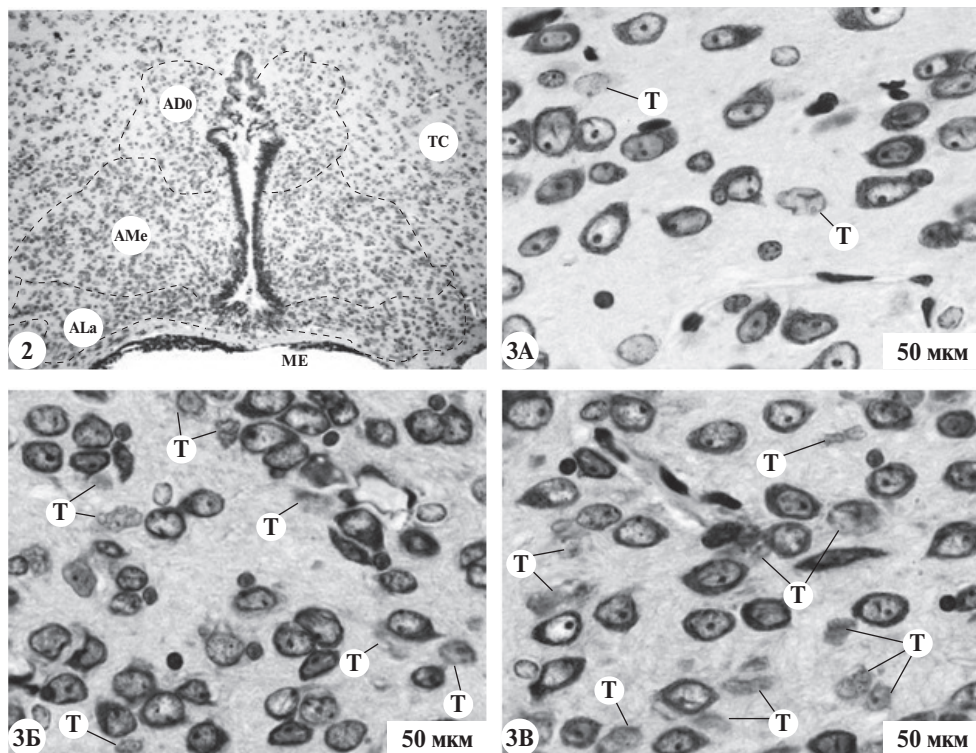


Рис. 2. Каудальная часть аркуатного ядерного комплекса на уровне bregma $-3,6$ мм. Ado – аркуатное дорсальное ядро, Ala – аркуатное латеральное ядро, АМе – аркуатное медиальное ядро, МЕ – срединное возвышение, ТС – область серого бугра, 3v – полость желудочка. Окраска методом Ниссля. Ок. $\times 10$, об. $\times 10$

Рис. 3. Реактивные изменения нейронов аркуатного медиального ядра у взрослых крыс при моделировании гипогонадизма (Б), его терапии тестостероном (В) в сравнении с нормой (А). Т – клетки-«тени». Окраска методом Ниссля. Ок. $\times 10$, об. $\times 100$

Для выявления рецепторов к андрогенам использовали мышинные антитела, клон F3 (Cloud-Clone Corp., Китай) в концентрации $500 \mu\text{g/ml}$. Вторичные биотинилированные антитела применяли из набора VECTASTAIN ABC, США. После проявления связанных антигенов диаминобензидином ядра клеток докрашивали гематоксилином Карацци. В площади $0,01 \text{ мм}^2$ левосторонней части МАЯ у каждой особи определяли: реактивные изменения клеток, площадь тел малоизмененных нейронов (после окрашивания срезов по Ниссля), число и долю тел нейронов, различавшихся по степени экспрессии рецепторов к АР.

Различали параметры степени экспрессии. Выраженной (В) считали экспрессию рецепторов, при которой внутренняя часть ядра и кариотека содержали многочисленные мелкодисперсные частицы АР (см. рис. 1). Экспрессию АР расценивали как умеренную (У) при их разреженности в значительной части площади ядра и (или) цитоплазмы, что в условиях эксперимента часто сочеталось с концентрацией АР в области плазмолеммы. Слабой (С) экспрессию АР считали при обнаружении тонкого и прерывистого скопления частиц в составе оболочки ядра, наличии отдельных конгломератов АР во внутренней части ядра, раз-

реженности частиц рецепторов или их отсутствию в цитоплазме. Очень низкой (О) считали экспрессию АР при обнаружении скоплений его частиц в области прерывистых и деформированных контуров оболочки ядра.

Срезы МАЯ изучали при помощи микроскопа Leica DME (Германия), сканера Раногамис-250 Flash III (Венгрия) и программы 3DHISTECH (Венгрия). Различия средней и ее ошибки считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Большинство тел нейронов МАЯ гипоталамуса у взрослых интактных крыс содержало большое количество мелких глыбок вещества Ниссля в умеренно развитой цитоплазме, хроматин, конденсированный на периферии ядра, и крупное ядрышко (рис. 3А). Определялись также единичные клетки-«тени» (табл. 1), представленные сморщенными контурами оболочки ядра или ее фрагментами.

Таблица 1

КОЛИЧЕСТВО И ДОЛЯ СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙРОНОВ МАЯ
НА ПЛОЩАДИ 0,01 ММ² ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)

Воздействие	Количество и доля нейронов (количество исследованных площадей – 8)		Суммарное количество нейронов
	малоизмененных	тенивидных	
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 %

* различия с параметрами клеток в контроле значимы ($p < 0,05$)

АР экспрессировали тела всех нейронов МАЯ; ядрышко нейронов и клетки нейроглии АР не содержали. Уровень экспрессии у большинства нейронов был выраженным (В1–В4), у некоторых клеток – выраженным умеренно (У1–У3), у единичных – выраженным слабо (С1–С4) или очень низким в составе фрагментов оболочки ядра клеток-«теней» (О1; см. рис. 1; табл. 2).

Таблица 2

КОЛИЧЕСТВО И ДОЛЯ СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙРОНОВ МАЯ, ОТЛИЧАЮЩИХСЯ СТЕПЕНЬЮ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ К ТЕСТОСТЕРОНУ
НА ПЛОЩАДИ 0,01 ММ² ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)

Воздействие	Степень экспрессии (количество исследованных площадей – 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 %

Воздействие	Степень экспрессии (количество исследованных площадей – 8)				Суммарное количество нейронов
	выражена	умеренно выражена	слабо выражена	очень низкая	
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 %

* различия с параметрами клеток в контроле значимы ($p < 0,05$);

** различия с параметрами клеток при гипогонадизме значимы ($p < 0,05$).

В результате снижения выработки тестостерона в неонатальном периоде среди нейронов МАЯ взрослых крыс были выявлены значительные патологические нарушения (рис. 3Б). Нейроны, измененные в наименьшей степени (малоизмененные), содержали цитоплазму, визуально меньшего размера, чем у интактных крыс. Доля клеток-«теней» возросла в 3,4 раза (см. табл. 1). Площадь тел малоизмененных нейронов уменьшилась в 1,7 раза ($p < 0,05$; рис. 4).

Степень экспрессии у большинства тел малоизмененных нейронов соответствовала умеренной. АР у нейронов данного фенотипа концентрировались в области оболочки ядра и плазмолеммы, которые выглядели утолщенными на всем протяжении (У4–У7 и У9–У10; см. рис. 1). Во внутренней части ядра и цитоплазме АР образовывали конгломераты, различающиеся в разных клетках по количеству и размерам. Значительная часть площади цитоплазмы рецепторов не содержала (У6–У7 и У9–У10). У отдельных клеток АР в части плазмолеммы отсутствовали (У8). Нейроны с низкой степенью экспрессии АР (С5–С6) были наиболее многочисленными (см. табл. 2). Значительно возросла доля нейронов-«теней», содержащих очень малое число АР (О2–О7).

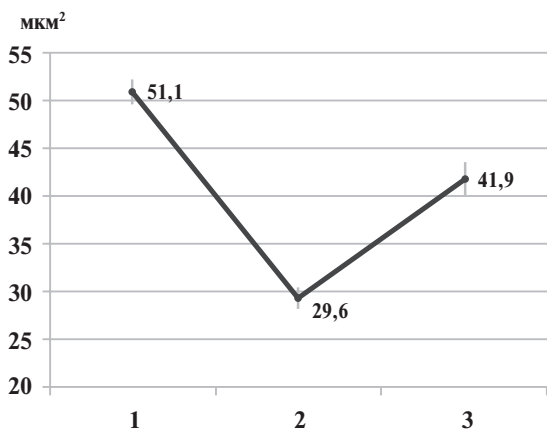


Рис. 4. Изменения площади тел нейронов при гипогонадизме (2) и заместительной терапии (3) в сравнении с параметрами у интактных крыс (1). Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки. Различия между параметрами клеток значимы ($p < 0,05$)

Ключевым фактором в механизме дегенеративных изменений нейронов МАЯ является выявленное снижение ими экспрессии (сокращение числа) АР, происходящее вследствие устойчивого дефицита тестостерона. Об этом свидетельствуют данные тестостерон-зависимого снижения скорости синтеза ДНК и рибосомальной РНК [18], электрических потенциалов [19] и ряда структурных нарушений клеток мозга, сочетающихся с ослаблением либидо.

Особым предметом научного интереса являются новые данные нетипичной для рецепторов ядерного

типа цитоплазматической и плазмолеммальной локализации АР. Обычно их экспрессию у крыс исследуют во внутренней части ядра нейронов после использования кроличьих поликлональных антител к аминокислотам 1–21 [20]. Между тем в авторской иллюстрации была различима и цитоплазматическая локализация АР. Вероятной причиной нетипичной экспрессии АР является использование нами антител, связывающих не только комплекс АР с мембранными и цитоплазматическими протеинами, но и фрагменты этого комплекса, подвергшиеся липофильной деградации в цитоплазме [21].

В результате заместительной терапии гипогонадных крыс происходило частичное восстановление площади тел малоизмененных нейронов ($p < 0,05$; см. рис. 4), которое визуально было обусловлено увеличением размеров цитоплазмы (см. рис. 3В). Доля клеток-«теней» у животных этой группы значительно не различалась с данным параметром у гипогонадных крыс без лечения (см. табл. 1).

Частицы АР в телах некоторых нейронов МАЯ были сконцентрированы в наибольшей части площади ядра и цитоплазмы, образовывали сгущение в оболочке ядра.

У большинства нейронов кариотекальная локализация АР сочеталась с экспрессией небольшого числа частиц и мелких конгломератов рецепторов в ядре и цитоплазме. У малой части нейронов АР в цитоплазме не обнаруживались. Доля умеренно экспрессирующих нейронов в группе гипогонадных крыс с лечением стала значительно больше, чем в опыте без заместительной терапии ($p < 0,05$), появились отдельные нейроны с выраженной экспрессией, доля же клеток со слабой и очень низкой экспрессией снизилась (см. табл. 2).

Заключение. Ядро, цитоплазма и их оболочки в телах нейронов каудальной части МАЯ гипоталамуса содержат множество АР. При гипогонадизме происходит как перераспределение АР, так и снижение их количества. АР концентрируются в оболочке ядра и плазмолемме некоторых нейронов, образуют конгломераты в ядре и цитоплазме; многие клетки утрачивают локализацию АР в перикарионе. Снижение числа АР сопряжено с дегенерацией и гибелью части нейронов. Заместительная терапия частично компенсирует изменения нейронов и восстанавливает интенсивность экспрессии АР.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ojeda S. R., Terasawa E.* Neuroendocrine regulation of puberty // *Hormones, Brain and Behavior*. 2002. Vol. 4. P. 589–659.
2. *Ojeda S. R., Dubay C., Lomniczi A. et al.* Gene networks and the neuroendocrine regulation of puberty // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010. Vol. 324(1). P. 3–11.
3. *Messenger S., Chatzidaki 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. Vol. 102(5). P. 1761–1766.
4. *Ronnekleiv O. K., Kelly M. J.* Kisspeptin excitation of GnRH neurons // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013. Vol. 784. P. 113–131.
5. *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. Vol. 311. P. 126–134.

6. *Ojeda S. R., Prevot V., Heger S. et al.* Glia-to-neuron signaling and the neuroendocrine control of female puberty // *Ann. Med.* 2003. Vol. 35(4). P. 244–255.
7. *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. Vol. 23 (12). P. 4967–4974.
8. *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. Vol. 43. P. 2351–2361.
9. *Kallo I., Vida B., Deli L. et al.* Co-localisation of kisspeptin with galanin or neurokinin B in afferents to mouse GnRH neurones // *J. Neuroendocrinol.* 2011. Vol. 24. P.464–476.
10. *Wray S.* Gonadotropin-releasing hormone: GnRH-1 system // *Encyclopedia of Neuroscience.* 2009. Vol. 4. P. 967–973.
11. *Lehman M. N., Merkley C. M., Coolen L. M., Goodman R. L.* Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals // *Brain Res.* 2010. Vol. 1364. P. 90–102.
12. *Leranth C., Petnehazy O., MacLusky N. J.* Gonadal hormones affect spine synaptic density in the CA1 hippocampal subfield of male rats // *J. Neurosci.* 2003. Vol. 23 (5). P. 1588–1592.
13. *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. Vol. 12 (1).
14. *Smith M. D., Jones L. S., Wilson M. A.* Sex differences in hippocampal slice excitability: role of testosterone // *Neurosci.* 2002. Vol. 109 (3). P. 517–530.
15. *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. Vol. 58(2). P. 306–316.
16. *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. Vol. 29. P. 3808–3815.
17. *Gorski R. A.* Hypothalamic imprinting by gonadal steroid hormones // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2002. Vol. 511. P. 57–70.
18. *Keil K. P., Ablner L. L., Laporta J. et al.* Androgen receptor DNA methylation regulates the timing and androgen sensitivity of mouse prostate ductal development // *Dev. Biol.* 2014. Vol. 396. P. 237–245.
19. *Asuthkar S., Demirkhanyan L., Sun X. et al.* The TRPM8 protein is a testosterone receptor // *J. Biol. Chem.* 2015. Vol. 290. P. 2670–2688.
20. *Wu D., Lin G., Gore A. C.* Age-related changes in hypothalamic androgen receptor and estrogen receptor α in male rats // *J. Comp. Neurol.* 2009. Vol. 512. P. 688–701.
21. *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. Vol. 949. P. 44–57.