

О.Г. Резніков, Н.Д. Носенко, П.В. Сініцин

Кальційзалежні механізми порушень стресової та норадренергічної реактивності гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальної системи у неонатально андрогенізованих самиць щурів

Изучено влияние блокатора кальциевых каналов L-типа верапамила, вводимого самкам крыс в первые сутки после рождения, на стрессорную и норадренергическую реактивность гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГГАС) у половозрелых животных с ановуляцией, вызванной неонатальной андрогенизацией. У животных с постоянным эструсом гормональная реакция коры надпочечных желез на одностороннюю иммобилизацию или введение норадреналина в третий желудочек мозга отсутствовала. Совместное с тестостероном введение верапамила полностью восстанавливало адренкортикальные реакции до пределов нормы. Верапамил не оказывал влияния на изученные показатели у нормальных самок крыс. Анализ полученных результатов позволяет предположить участие кальциевой сигнализации в патогенезе нарушенной функции ГГАС у самок крыс, обусловленных воздействием андрогенов в неонатальном периоде.

ВСТУП

Порушення гормонального балансу в перинатальному періоді індивідуального розвитку організму спричиняє суттєвий модифікуючий вплив на становлення нейроендокринних механізмів регуляції поведінки, репродуктивних процесів і реактивності гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальної системи (ГГАС) [5]. Ці зміни відбуваються на підґрунті механізмів гормоннейромедіаторного імпринтингу, тобто програмування головного мозку, і пов'язані з порушенням епігенетичного контролю експресії клітинного геному.

Найбільш досліджено віддалені наслідки порушень статевої диференціації мозку, що зумовлені дисбалансом андрогенів у ранньому онтогенезі. При цьому більшість даних літератури стосується змін репродуктивної системи. У самиць головним проявом цих розладів є розвиток ановуляторного синдрому, який характеризується дефемі-

нізацією та/або маскулінізацією статевої поведінки, порушенням статевого дозрівання, неплідністю та атрофією яєчників. Дослідження механізмів, які зумовлюють тривалі функціональні розлади репродуктивної системи у неонатально андрогенізованих самиць щурів, засвідчило, що вони супроводжуються змінами експресії мРНК люліберину та вмісту цього нейрогормону в гіпоталамусі, а також зменшенням вмісту цитоплазматичних рецепторів естрогенів [17]. Показано, що відсутність циклічної секреції гонадотропних гормонів у неонатально андрогенізованих самиць щурів певною мірою пов'язана з порушенням катехоламінергічного контролю нейроендокринних функцій [3]. Враховуючи участь катехоламінергічної системи мозку в регуляції ГГАС, логічно припустити, що паралельно з розладами нейроендокринного контролю репродуктивних функцій, порушується формування реакції ендокринної системи на стресові чинники.

© О.Г. Резніков, Н.Д. Носенко, П.В. Сініцин

Феномен раннього гормонального програмування адаптаційних механізмів, зокрема реактивності ГГАС, дискутується вже досить давно. Існує припущення, що статеві відмінності функцій ГГАС, що закладаються перед або відразу після народження, можуть бути наслідком залежної від статевих гормонів організації мозку [15]. У щурів засвідчено деякий збіг у часі між організуючим впливом статевих гормонів на мозок і дозріванням ГГАС [13]. Показано, що введення новонародженим самицям щурів естрогенів, які опосередковують патогенний вплив андрогенів на мозок у критичний період його статевої диференціації, призводить не тільки до дефемінізації та/або маскулінізації репродуктивної системи, але й може спричинити порушення нейроендокринного контролю функцій ГГАС [12].

Натомість клітинні та молекулярні механізми зазначених функціональних порушень залишаються майже невідомими. Одним із таких механізмів може бути регуляція процесів нейрогенезу (міграція, проліферація, апоптоз) іонами кальцію. Показано, що внутрішньоклітинний кальцій залучений до регуляції розвитку та міграції нейронів у новонароджених тварин [11]. Поодинокі публікації свідчать про можливу участь іонів кальцію в гормонозалежних порушеннях нейрогенезу [14]. Зокрема показано, що андрогени здатні змінювати вміст кальційзв'язувальних білків у гіпоталамусі протягом перинатального розвитку [20]. Отже, враховуючи ключову роль кальцієвої сигналізації в процесах нейрогенезу, можна припустити її участь у програмуванні андрогензалежної нейроендокринної патології.

Метою нашої роботи було провести за допомогою верапамілу, блокатора кальцієвих каналів L-типу, фармакологічний аналіз участі іонів кальцію в патогенезі порушень стресової та норадренергічної реактивності ГГАС у дорослих самиць щурів, зумовлених дисбалансом андрогенів у перші доби після народження.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на традиційній моделі неонатально андрогенізованих самиць щурів ($n = 36$), яку відтворювали за допомогою введення тестостерону пропіонату (ТП, 5%-й розчин у кісточковій олії) в дозі 250 мкг одноразово під шкіру на третю добу після народження (день народження вважали за першу добу життя). Верапаміл в ізотонічному розчині NaCl вводили в дозі 0,5 мг/кг новонародженим самицям щурів ($n = 18$) в об'ємі 0,04 мл під шкіру протягом п'яти діб (з 3-ї по 7-му добу життя) окремо або сумісно з ТП. Контрольні тварини ($n=18$) одержували розчинники препаратів. При досягненні статевозрілого віку (6–8 міс) у самиць щурів визначали стадії естрального циклу за мікроскопічною картиною вагінальних мазків протягом двох тижнів перед декапітацією. Залежно від стадії естрального циклу тварин розподіляли на групи для подальших досліджень: 1) контрольні самиці в стадії еструсу; 2) самиці, що отримували верапаміл, в стадії еструсу; 3) неонатально андрогенізовані самиці з постійним еструсом; 4) неонатально андрогенізовані самиці, що отримували верапаміл, з постійним еструсом. Всі експерименти проводили з урахуванням вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986).

Реакцію кори надниркових залоз на гострий стрес (одногодинна іммобілізація) досліджували у самиць віком 6 міс. Знеживлення тварин проводили відразу після закінчення іммобілізації швидкою декапітацією під слабким ефірним наркозом. Кров, що відтікала з судин шиї, збирали у гепаринізовані пробірки для визначення вмісту кортикостерону.

Норадренергічну реактивність ГГАС вивчали у самиць віком 8 міс. Для цього за вісім діб до експерименту самицям, що

перебували під хлоралгідратним наркозом, під стереотаксичним контролем у 3-й шлуночок мозку було імплантовано сталеву спрямовуючу канюлю з мандреном [6]. За 24 год до експерименту у праву зовнішню яремну вену під слабким ефірним наркозом було встановлено силастиковий катетер [10]. За 1 год до експерименту катетер було подовжено поліетиленовою трубкою, заповненою розчином гепарину (50 МО/мл 0,9%-го розчину NaCl). Мандрен заміняли внутрішньою канюлею, що була попередньо заповнена розчином норадреналіну бітартрату ("Koch Light Labs", Англія). Введення норадреналіну в третій шлуночок мозку (10 мкг у 2 мкл 0,9%-го апірогенного розчину NaCl) проводили протягом 1 хв. Зразки крові для визначення вмісту кортикостерону відбирали із катетера до та через 30, 60 і 90 хв після введення норадреналіну з наступним заміщенням крові еквівалентним об'ємом розчину гепарину. Вміст кортикостерону в плазмі крові визначали за флюориметричним мікрометодом [2].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою методів прямої та непрямої різниці з використанням критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У контрольних самиць щурів у стадії еструсу одногодинний іммобілізаційний стрес супроводжувався значним підвищенням вмісту кортикостерону в плазмі крові в середньому в 2,2 раза ($P < 0,05$). Аналогічна гормональна реакція спостерігалася за умов окремого застосування верапамілу у новонароджених тварин (рисунок).

У неонатально андрогенізованих самиць щурів з постійним еструсом гормональна реакція кори надниркових залоз на гострий стрес не виявлялася. Введення верапамілу разом з ТП у неонатальному періоді призводило до нормалізації стресової реакції ГГАС у дорослих тварин. Дослідні

тварини реагували на іммобілізаційний стрес збільшенням вмісту кортикостерону в плазмі крові в 1,9 раза ($P < 0,05$), тобто подібно до контрольних самиць. У тварин усіх дослідних груп базальний вміст кортикостерону в плазмі крові залишався незмінним порівняно з контролем.

Слід відмітити, що у неонатально андрогенізованих самиць з постійним еструсом відносна маса надниркових залоз була зменшена в порівнянні з відповідним показником у контрольних тварин, що перебували в стадії еструсу (введення ТП: $26,2 \text{ мг/100 г} \pm 0,7 \text{ мг/100 г}$; контроль: $28,8 \text{ мг/100 г} \pm 0,9 \text{ мг/100 г}$, $P < 0,05$). У тварин, які отримували верапаміл сумісно з ТП, відносна маса надниркових залоз достовірно не змінювалася ($26,9 \text{ мг/100 г} \pm 1,6 \text{ мг/100 г}$, $P > 0,5$), а за умов окремого введення верапамілу – збільшувалась ($32,4 \text{ мг/100 г} \pm 1,2 \text{ мг/100 г}$, $P < 0,05$) порівняно з контролем.

При дослідженні норадренергічної реактивності ГГАС показано, що у контрольних самиць у відповідь на введення норадреналіну в 3-й шлуночок мозку на 30-й хвилині достовірно (в 1,6 раза, $P < 0,05$) підвищувався вміст кортикостерону в плазмі крові, який поступово, починаючи з 60-ї хвилини, наближався до вихідного ($P > 0,05$). Майже така сама реакція кори надниркових залоз на центральну норадренергічну стимуляцію, проте, дещо подовжена у часі (повернення вмісту гормону до базального відбувалося на 90-й хвилині), спостерігалась і за умов окремого застосування верапамілу (таблиця).

У неонатально андрогенізованих самиць внутрішньошлуночкова інфузія норадреналіну не спричинила збільшення вмісту кортикостерону в плазмі крові. Введення верапамілу андрогенізованим самицям в неонатальному періоді зберігало у них в цілому нормальний тип адренкортикальної реакції: приріст (D) вмісту кортикостерону в плазмі крові на 30-й хвилині у

Вміст кортикостерону (нмоль/л) у плазмі крові самиць щурів після інфузії норадреналіну в третій шлуночок мозку ($M \pm m$; $n=5$)

Група тварин	Вихідний рівень	Після інфузії через		
		30 хв	60 хв	90 хв
Контроль	774,5 ± 131,5	1212,6 ± 63,2*	1021,1 ± 56,3	956,5 ± 62,1
Тварини, що отримували тестостерону пропіонат	862,1 ± 71,1	965,8 ± 62,4	935,0 ± 70,0	894,1 ± 100,0
Тварини, що отримували верапаміл	698,4 ± 97,8	1216,5 ± 77,3*	1095,6 ± 87,2*	797,4 ± 65,1
Тварини, що отримували тестостерону пропіонат і верапаміл	616,5 ± 73,4	1088,0 ± 95,3*	985,9 ± 81,5**	728,7 ± 111,5

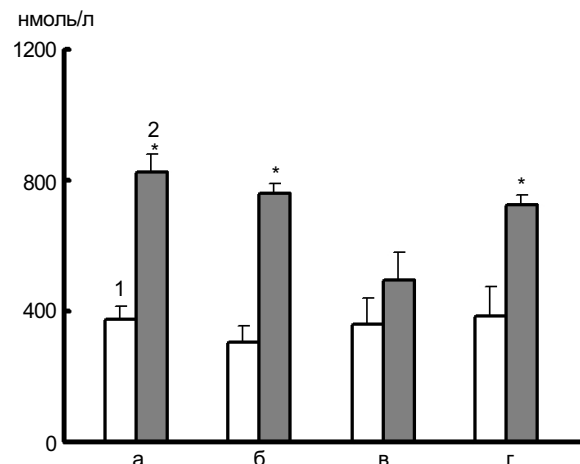
* $P < 0,05$ і ** $P < 0,01$ вірогідно відносно вихідного рівня.

відповідь на норадренергічну стимуляцію гіпоталамуса, тобто максимальна амплітуда адренкортикальної реакції ГГАС, не відрізнявся від такого у контрольних самиць (контроль: $D438,1$ нмоль/л ± $140,3$ нмоль/л; ТП та верапаміл: $D391,5$ нмоль/л ± $99,5$ нмоль/л, $P > 0,05$).

Отже, результати досліджень свідчать про порушення стресової та норадренергічної реактивності ГГАС у дорослих самиць щурів під впливом екзогенного андрогену в неонатальному періоді. Це узгоджується з даними інших авторів, які показали зниження секреції кортикостероїдів у відповідь на різні види стресу у неонатально андрогенізованих самиць щурів [17]. Послаблення адренкортикальної реакції на гострий стрес автори пов'язують зі зменшенням експресії мРНК аргінін-вазопресину та кортиколіберину, а також значним підвищенням вмісту мРНК глюкокортикоїдних рецепторів у паравентрикулярних ядрах гіпоталамуса. На тлі цих спостережень цілком імовірно припустити, що порушення адренкортикальної реакції на стресову або церебральну норадренергічну стимуляцію у андрогенізованих самиць, котрі спостерігалися в наших дослідках, можуть бути результатом прямої дії андрогенів на нервові центри регуляції функції ГГАС, які залучено до гіпоталамічної регуляції за механізмом негативних зворотних зв'язків.

На підставі отриманих нами результатів можна також з великою ймовірністю припустити, що поряд із розладами механізму негативного зворотного зв'язку між окремими ланками ГГАС, суттєву роль у порушеннях стресової реактивності у неонатально андрогенізованих самиць відіграє послаблення чутливості гіпоталамуса до стимулювальної дії норадреналіну.

З іншого боку, аналізуючи можливі механізми зміни реактивності ГГАС у неонатально андрогенізованих самиць щурів, слід враховувати вплив інших гормональних чинників, зокрема естрогенів, які



Зміни вмісту кортикостерону в плазмі крові самиць щурів після односторонньої іммобілізації: а – контроль; б – верапаміл; в – тестостерону пропіонат; г – тестостерону пропіонат і верапаміл; 1 – вихідний рівень, 2 – після іммобілізації. * $P < 0,05$ відносно вихідного рівня, $n = 5-6$ тварин у кожній групі

залучені до регуляції функціональної активності ГГАС. Як відомо, в нормі у самиць щурів стресова реакція ГГАС значно вища, ніж у самців [1, 4, 15, 16], що пояснюється стимулювальним впливом естрогенів на секрецію АКТГ і кортикостерону [7, 19]. Підвищення секреторної активності кори надниркових залоз може бути наслідком як прямої дії естрогенів на секрецію кортикотропін-релізінг-гормону в паравентрикулярних ядрах гіпоталамуса, так і внаслідок посилення до нього чутливості аденогіпофіза [18]. У андрогенізованих самиць вміст циркулюючих естрогенів завдяки гальмуванню фолікулогенезу в яєчниках знижується, а, отже, послаблюється їх активуючий вплив на стресову активність ГГАС [17]. Слід зазначити, що введення естрадіолу неонатально андрогенізованим гонадектомованим самицям призводить до нормалізації експресії мРНК аргінін-вазопресину та кортиколіберину, що є додатковим аргументом на користь активуючої ролі естрогенів у механізмі функціонування ГГАС [16]. Натомість цей ефект естрогенів має вторинний характер відносно програмувального впливу андрогенів у неонатальному періоді на формування реактивності ГГАС у дорослих тварин.

Введення новонародженим самицям щурів верапамілу, блокатора клітинних кальцієвих каналів, разом з тестостероном повністю відновлює у дорослих самиць чутливість ГГАС до гострого стресу або внутрішньошлунковочкової стимуляції норадреналіном до показників, які властиві нормальним тваринам. Це свідчить про можливе залучення кальційзалежних механізмів до реалізації раннього програмувального впливу андрогенів на формування стресової та норадренергічної реактивності ГГАС у самиць щурів статевозрілого віку. Останнє припущення ґрунтується на здатності верапамілу проникати крізь гематоенцефалічний бар'єр і блокувати кальцієві канали у нейронах головного мозку [8, 9].

Отже, цілком імовірно, що протекторний ефект верапамілу відносно змін реактивності ГГАС під впливом неонатальної андрогенізації здійснюється завдяки корекції порушень нейронального кальцієвого гомеостазу, зумовлених тестостероном, у тих ділянках головного мозку, які причетні до регуляції функції ГГАС.

Ґрунтуючись на результатах досліджень, можна дійти висновку про ймовірну важливу роль кальцієвої сигналізації у перинатальному програмуванні залежних від андрогенів порушень реактивності ГГАС у дорослих самиць щурів та про здатність верапамілу здійснювати протекторний ефект щодо цих порушень.

A.G. Reznikov, N.D. Nosenko, P.V. Sinitsyn

CALCIUM-DEPENDENT MECHANISMS OF THE DISORDERS OF STRESS AND NORADRENERGIC RESPONSES OF HYPOTHALAMO-PITUITARY-ADRENAL SYSTEM IN NEONATALLY ANDROGENIZED FEMALE RATS

The effects of neonatal administration of verapamil, a calcium L-type channel blocker, on the stress and noradrenergic responses of hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis in adult female rats with anovulatory syndrome induced by neonatal androgenization have been studied. There was no adrenocortical response to an acute stress nor noradrenaline infusion in the 3rd brain ventricle in females with persistent estrus. Verapamil pretreatment completely restored the adrenocortical responses to normal level. No changes were found in studied parameters following treatment with verapamil alone. These results demonstrate possible involvement of calcium signalling in pathogenesis of the disorders of HPA function in adult female rats, induced by neonatal androgenization.

V.P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism AMS of Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Анищенко Т.Г., Игошева Н.Б. Половые различия в стресс-реактивности у бодрствующих и анестезированных крыс при хирургическом стрессе // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1992. – **113**, № 1. – С.26–28.
2. Балашов Ю.Г. Флюориметрический микрометод определения кортикостерона: сравнение с другими методами // Физиол. журн. СССР. – 1990. – **76**, № 2. – С. 280–283.

3. Носенко Н.Д., Резников А.Г. Половая дифференциация головного мозга как проявление его пластичности // *Нейрофизиология*. - 2001. - **33**, № 2. - С. 141–150.
4. Резніков О.Г., Носенко Н.Д. Перинатальна стресова модифікація реактивності гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової системи // *Фізіол. журн.* - 2000. - **46**, № 2. - С. 146–158.
5. Резников А.Г., Пишак В.П., Носенко Н.Д. та ін. Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология. - Черновцы: Медакадемія, 2004. - 320 с.
6. Antunes-Rodrigues J., McCann S.M. Chemical stimulation of water, sodium chloride and food intake by injection of cholinergic and adrenergic drugs into the third brain ventricle // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* - 1970. - **133**. - P. 1464–1470.
7. Burgess L.H., Handa R.J. Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats // *Endocrinology*. - 1992. - **131**. - P. 1261–1269.
8. Canchola-Martinez E., Vergara-Onofre M., Rodriguez-Medina M.A., Mercado-Sanchez G. Inhibitors of calcium-calmodulin system and hypothalamic sex differentiation in rats. Biochemical parameters // *Ginecol. Obstet. Mex.* - 1997. - **65**. - P. 508–514.
9. Elsinga P.H., Hendrikse N.H., Vaalburg W., van Waarde A. PET Studies on P-glycoprotein function in blood-brain barrier: how it affects uptake and binding of drugs within the CNS // *Curr. Pharm. Des.* - 2004. - **10**, № 13. - P. 1493–1503.
10. Harms P., Ojeda S. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein // *J. Appl. Physiol.* - 1974. - **36**. - P. 391–392.
11. Mattson M. P. Calcium as sculptor and destroyer of neural circuitry // *Exp. Gerontol.* - 1992. - **27**. - P. 29–49.
12. McCormick C.M., Furey B.F., Child M. et al. Neonatal sex hormones have “organizational” effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of male rats // *Brain Res. Dev. Brain Res.* - 1998. - **105**, № 2. - P. 295–307.
13. McEwen B., Coirini H., Westlund-Danielsson A. et al. Steroid hormones as mediators of neural plasticity // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* - 1991. - **39**. - P. 223–232.
14. Pappas I. S., Parnavelas J. G. Generation and differentiation of cortical calretinin-expressing neurons in vitro // *Soc. Neurosci. Abstr.* - 1996. - **22**. - P. 988.
15. Patchev V.K., Hayashi S., Orikasa C., Almeida F.X. Implications of estrogen-dependent brain organization for gender differences in hypothalamo-pituitary-adrenal regulation // *FASEB J.* - 1995. - **9**. - P.419–423.
16. Seale J.V., Wood S.A., Atkinson H.C. et al. Gonadectomy reverses the sexually diergic patterns of circadian and stress-induced hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity in male and female rats // *J. Neuroendocrinol.* - 2004. - **16**. - P.516–524.
17. Seale J.V., Wood S.A., Atkinson H.C. et al. Postnatal masculinization alters the HPA axis phenotype in the adult female rat // *J. Physiol.* - 2005. - **563** (Pt.1) - P. 265–274.
18. Vamvakopoulos N.C., Chrousos G.P. Evidence of direct estrogenic regulation of human corticotropin-releasing hormone gene expression: potential implications for the sexual dimorphism of the stress response and immune/inflammatory reaction // *J. Clin. Invest.* - 1993. - **92**. - P. 1896–1902.
19. Viau V., Meaney J. Basal and stress hypothalamic-adrenal activity in cycling and ovariectomised-steroid treated rats // *Endocrinology*. - 1991. - **129**. - P.2503–2511.
20. Watson M. A., Taylor H., Lephart E. D. Androgen-dependent modulation of calbindin-D28k in hypothalamic tissue during prenatal development // *Neurosci. Res.* - 1998. - **32**. - P. 97–101.

*Ин-т ендокринології та обміну речовин
ім. А.П. Комісаренка АМН України, Київ
E-mail: decie@mail.kar.net*

*Матеріал надійшов до
редакції 12.06.2008*