

# ПУТИ ЦИРКАДИАННОГО КОНТРОЛЯ ПРОДУКЦИИ ГОНАДОТРОПИН-РИЛИЗИНГ-ГОРМОНА <sup>1</sup>

© А.В. Разыграев, Г.О. Керкешко, А.В. Арутюнян

НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН

CIRCADIAN CONTROL PATHWAYS OF GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE PRODUCTION

A.V. Razygraev, G.O. Kerkeshko, A.V. Arutjunyan

D.O. Ott Institute of Obstetrics and Gynecology, the North-Western Branch of the Russian Academy of Medical Sciences

The pathways of the signal transduction from the circadian pacemaker (the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus) to gonadotropin-releasing-hormone-producing neurons is currently being thoroughly investigated. The circadian signals are essential for gonadotropin-releasing-hormone preovulatory hyperproduction. The molecular mechanism of the circadian signal generation in the pacemaker, which includes transcription and translation cycles of the internal clock genes and corresponding proteins, is relatively well known. However, it is still unclear whether various neurotransmitter systems are involved in amplification and transduction of the signal to gonadotropin-releasing-hormone-producing hypothalamic cells. The present review covers the mechanism of molecular oscillations and its influence on the neurotransmitter production in the suprachiasmatic nuclei. The data proving that peptidergic, glutamate/GABA-ergic and monoaminergic systems are involved in gonadotropin-releasing-hormone production control are presented. The role of the transduction system elements that integrate the circadian and ovarian signals is specified. The neurohumoral pathway of the circadian signal transduction via melatonin is described.

*Key words: gonadotropin-releasing hormone, circadian oscillator, CLOCK, BMAL1, vasopressin, glutamate, GABA, monoamine, melatonin, reproduction.*

*Zhurnal Akusherstva i Zhenskikh Boleznei, 60.2 (2011): 88-98.*

## Введение

Большинство организмов, включая человека, постоянно находятся в условиях 24-часового суточного цикла с чередованием темного и светлого времени суток. Данное обстоятельство существенным образом отражается на состоянии организма в целом и на функциональной активности отдельных систем органов. В зависимости от фотоцикла находятся, в частности, механизмы центральной регуляции функционирования репродуктивной системы женского организма.

Это не означает, однако, что состояние организма всегда напрямую определяется таким внешним условием как фотоцикл. В большинстве случаев справедливо обратное: действие фотопериода осуществляется через некий физиологический посредник, внутренний ритмоводитель, или циркадианный осциллятор, имеющий собственный ритм активности, период которого близок к 24 ч. Циркадианные осцилляторы обнаружены у самых разных организмов, будь то бактерии, грибы, растения или животные. К настоящему времени установлено, что основа циркадианных осцилляторов представлена механизмом, состоящим из процессов транскрипции определенных генов и трансляции, продукты которой регулируют собственную экспрессию. Осцилляции на уровне генов приводят к возникновению ритмов на клеточном, тканевом и системном уровнях.

Зависимость работы циркадианного ритмоводителя от фотопериода заключается в том, что внутренний таймер способен подстраиваться под фотоцикл и перенастраиваться в зависимости от смещения фазы ритма освещенности. Зависимая от внешних условий работа осциллятора позволяет организму прогнозировать изменения в среде и обеспечивать готовность к меняющимся условиям.

Вполне закономерен вопрос о локализации циркадианного ритмоводителя всего организма

---

<sup>1</sup> Обзор опубликован в Журнале акушерства и женских болезней, 2011. Т. 60, № 2, С. 88-98.

в конкретной анатомической структуре. Поскольку для большинства организмов именно световой режим является фактором, подчиняющим локомоторную активность и другие циклически меняющиеся параметры на уровне целого организма, вполне понятным является тот факт, что у млекопитающих циркадианный осциллятор локализован в ткани нервной системы, а именно в супрахиазматических ядрах (СХЯ) гипоталамуса, тесно связанных со зрительными путями. Однако, помимо нейронов СХЯ, клетки в составе многих других тканей также имеют выраженные молекулярные циклы транскрипции-трансляции тех же генов внутренних часов, характеризующиеся отличиями по отношению к ритмам в СХЯ. Полагают, что, например, в клетках печени определяющим фактором, настраивающим работу их внутренних часов, является, скорее, время приема пищи, нежели световой режим. Тем не менее, одна из наиболее системных, поведенческая цикличность, у млекопитающих находится в тесной зависимости от работы осциллятора в центральной нервной системе (т.е. от СХЯ). То же справедливо в отношении работы репродуктивной системы млекопитающих [29, 37, 52].

Известно, что ключевым регуляторным фактором, обеспечивающим циклическую продукцию ооцитов яичниками, является синтез и секреция в кровь пептидного гонадотропин-рилизинг-гормона ( $\text{Glu}^1\text{-His}^2\text{-Trp}^3\text{-Ser}^4\text{-Tyr}^5\text{-Gly}^6\text{-Leu}^7\text{-Arg}^8\text{-Pro}^9\text{-Gly}^{10}_{\text{амид}}$ , ГРГ), или гонадолиберина, соответствующими нейронами, перикарионы которых располагаются у человека преимущественно роstralной гипоталамической области и в медиальном базальном гипоталамусе. Секреция данного нейрогормона осуществляется в портальную кровеносную систему гипофиза и обеспечивается проекциями гонадолиберинэргических нейронов в срединное возвышение гипоталамуса. Гиперсекреция ГРГ приводит к высвобождению гонадотропинов гипофиза (т.е. лютеинизирующего (ЛГ) и фолликулостимулирующего гормонов), необходимых для осуществления овуляции [32].

Для ГРГ характерен определенный фоновый уровень секреции, носящей импульсный характер. Частота пульсов фоновой секреции *in vivo* у гонадэктомированных обезьян, овец и крыс равна одному пульсу в 40-60 минут, длительность пульса составляет приблизительно 5 минут; для интактных животных характерны более длинные межпульсовые интервалы. Существуют экспериментальные данные, указывающие на то, что у приматов во время преовуляторного пика секреция ГРГ носит характер сплошного излияния нейрогормона в сочетании с присутствием импульсов секреции [24].

Если импульсная фоновая секреция ГРГ осуществляется за счет механизмов, действующих в самих гонадолиберинпродуцирующих клетках, то преовуляторный пик секреции ГРГ осуществляется главным образом благодаря наличию двух внешних по отношению к гонадолиберинэргическим нейронам сигналов. Не последнюю роль в генерации импульсов секреции ГРГ соответствующими нейронами играют гены внутренних часов, функционирующие в этих клетках. Однако, каким образом связана работа циркадианных генов в гонадолиберинэргических нейронах (с приблизительно 24-часовым периодом функционирования) с ритмами импульсной секреции (длительность фазы которых составляет менее часа), к настоящему времени не установлено [24]. Яснее, каким образом в строго определенное время в ходе репродуктивного цикла (а у грызунов, в силу того, что цикл укорочен, еще и в определенное время суток) осуществляется преовуляторный пик секреции. Один из двух (внешних по отношению к нейронам, продуцирующим ГРГ) сигналов имеет гуморальную природу и поступает от яичников с периодичностью, равной продолжительности репродуктивного цикла. Данный сигнал заключается в повышении уровня эстрадиола в крови, секретлируемого растущими фолликулами. Общим для мужского и женского организмов является механизм отрицательной обратной связи, по которому повышение уровня половых стероидов в крови вызывает снижение уровня ГРГ и гонадотропинов. В женском организме, помимо этого, функционируют механизмы положительной обратной связи между уровнем половых стероидов в крови и уровнем синтеза и секреции ГРГ и гонадотропинов [25]. Активация гипоталамо-гипофизарного звена регуляции репродуктивной функции в преовуляторный период осуществляется по механизму

положительной обратной связи в ответ на дальнейшее повышение секреции эстрадиола. Уровень прогестерона в крови, растущий вплоть до наступления овуляции, по механизму отрицательной обратной связи препятствует возникновению новых преовуляторных пиков на последующих стадиях менструального/эстрального цикла.

Другой сигнал, критически необходимый для преовуляторной секреции ГРГ — сигнал нейрональной природы, ежедневно поступающий от циркадианного осциллятора СХЯ. Далее будет представлено описание механизма, представляющего функциональную основу циркадианного осциллятора млекопитающих, в том числе человека. Будут рассмотрены основные известные и предполагаемые пути, по которым осцилляции на уровне генов в нейронах СХЯ передаются гонадолиберинэргическим нейронам, создавая условия, обеспечивающие репродуктивную цикличность в женском организме. Следует отметить, что представленные обобщения могли быть сформированы главным образом благодаря результатам исследований, выполненных на лабораторных животных (преимущественно грызунах) по причине невозможности выполнения подобных исследований на человеке.

### **Организация циркадианного осциллятора**

Главными генами, образующими основу молекулярного осциллятора, являются гены группы *Per* (от англ. *Period*), а именно *mPer1* и *mPer2* («m» означает «mammalian», т.е. *Period*-ген млекопитающих). Транскрипционными факторами по отношению к *mPer1* и *mPer2* являются гетеродимеры, сформированные белками *CLOCK* и *BMAL1*, имеющими в своем составе структурный мотив *helix-loop-helix* (HLH). Гетеродимеры *CLOCK/BMAL1* связываются с нуклеотидной последовательностью *SACGTG* (E-бокс) промоторов генов *mPer1* и *mPer2*, что инициирует транскрипцию этих *mPer*-генов [38, 41]. В результате формируются соответствующие мРНК, которые в цитоплазме транслируются в белки *mPER1* и *mPER2*. Данные белки транслоцируются в ядро, образуя стабильные комплексы (включающие в себя также белки *mCRY1* и *mCRY2*), подавляющие транскрипцию генов *mPer1* и *mPer2* посредством связывания с позитивными факторами *CLOCK/BMAL1*. В результате формируется чередование подъемов и спадов содержания мРНК, а затем и самих белков *mPER1* и *mPER2* с фазой, равной приблизительно 24 ч. Содержание мРНК *mPer2* минимально при переходе от ночной фазы к дневной, максимум приходится на время перехода к ночной фазе [29, 37].

Существует несколько дополнительных молекулярных циклов, регулирующих циклическую экспрессию генов *mPer1* и *mPer2*. Один из этих циклов включает в себя циклическую продукцию позитивного фактора *BMAL1*, которая находится в противофазе с ритмом экспрессии генов *mPer1/2*. Транскрипция гена *Bmal1* индуцируется белком *PER2* и тормозится фактором *REV-ERB $\alpha$*  [29]. Другой тип регуляции – антагонистическая регуляция со стороны *PAR*-белков (*HLF*, *TEF*, *DBP*) и белка *E4BP4*. В гене *mPer1* имеется специфическая последовательность *ATTACGTAAC*, с которой эти белки способны связываться. *DBP* и *E4BP4* непосредственно связываются с *upstream*-участком во втором сайте инициации транскрипции (1B-сайт) гена *mPer1*; *DBP* усиливает, а *E4BP4* снижает *CLOCK/BMAL1*-индуцируемую транскрипцию *mPer1*. В случае гена *dbp* *CLOCK/BMAL1*-гетеродимер связывается уже с его E-боксом во втором интроне и инициирует транскрипцию *dbp*. Поэтому *PAR*-белки, такие как *DBP*, экспрессируются в большом количестве в начале дневной фазы и содействуют повышению уровня транскрипции *mPer1*. *E4BP4* в обилии продуцируется в начале ночи и содействует супрессии транскрипции *mPer1* [37].

Уровень белков *mPER*, сформировавшихся в результате экспрессии генов *mPer*, также регулируется несколькими факторами, обеспечивающими его стабильность и, по всей видимости, способность проникать в ядро. Фосфорилирование *PER* киназой-1 $\epsilon$  обеспечивает цитоплазматическую деградацию *PER*, не связанного с *CRY*, и предотвращает преждевременное накопление *PER* в цитоплазме. Также, белок *PER* менее стабилен в отсутствие *CRY* и может легко деградировать посредством убиквитинирования / по

протеасомному пути. Существует предположение, что именно белок CRY опосредует подстройку биологических часов под внешний ритм освещенности, являясь ингибитором транскрипции *mPer* и регулируя уровень *mPER* [37, 52].

Следует отметить, что в промоторах генов *Cry1* и *Cry2* также содержится E-бокс, вследствие чего транскрипция генов *Cry* позитивно регулируется комплексом CLOCK/BMAL1 [29]. То же справедливо и в отношении транскрипции гена *Rev-Erb $\alpha$*  [33].

Относительно недавно были обнаружены гены *dec1* и *dec2*, вносящие вклад в ритмичность молекулярного осциллятора. Для этих генов тоже характерно наличие E-бокса в их промоторных последовательностях. Ингибируя транскрипцию собственных генов путем взаимодействия с CLOCK/BMAL1, белки DEC1 и DEC2 наряду с белками PER и CRY репрессируют транскрипцию генов *Per* и *Cry* [10, 29] (Рис.1).

### **Путь поступления входящей информации о фотоцикле в циркадианный осциллятор**

Нейроны СХЯ, т.е. доминирующие клеточные структуры циркадианной системы, получают информацию об уровне освещенности от сетчатки глаза через ретино-гипоталамический тракт, содержащий коллатерали клеток сетчатки, которые на уровне зрительного перекреста отходят от зрительного тракта и направляются к вентро-латеральной зоне СХЯ. Данные пути опосредуют ежедневную подстройку молекулярного таймера в соответствии с фотоциклом [42]. Регистрацию и передачу информации о фотоцикле связывают с клетками сетчатки, называемыми ганглиозными клетками [16, 44]. Преимущественными нейротрансмиттерами ретино-гипоталамического тракта, служащими для передачи данной информации, являются глутамат и PACAP (пептид, активирующий гипофизарную аденилатциклазу). Нейрональные пути, проходящие через промежуточный листок латерального коленчатого тела, где медиаторами служат нейропептид Y, энкефалин и  $\gamma$ -аминомасляная кислота (ГАМК), и через ядра шва, содержащие серотонин, также передают СХЯ информацию об уровне освещенности [44].

### **Исходящие пути, обеспечивающие передачу осцилляций гонадолиберинэргическим нейронам**

Очевидно, что осцилляции, генерируемые на уровне генов и их белковых продуктов, амплифицируются и распространяются за пределы циркадианного осциллятора в СХЯ. Существует представление о наличии двух способов передачи ритмического сигнала от основного осциллирующего механизма на молекулярном уровне. Первый подразумевает прямой контроль посредством CLOCK/BMAL1-гетеродимера, который, будучи негативно регулируемым PER/CRY-комплексами, контролирует экспрессию вазопрессина, одного из медиаторов нейронов СХЯ, ген которого имеет промотор, содержащий E-бокс (рис.1). Второй путь, не прямой, состоит в регуляции посредством PAR-белков и E4BP4. В данном механизме PAR-белки действуют на гены-мишени как позитивные, а E4BP4 – как негативный регуляторы [37]. Таким образом возможно формирование ритмов экспрессии нейротрансмиттеров в нейронах СХЯ и, как следствие, ритмы активности данных нейронов.

К настоящему времени накоплены данные о нейрональных путях, указывающие на возможность как прямого контроля над активностью гонадолиберинэргических нейронов со стороны СХЯ, так и опосредованного различными нейротрансмиттерными системами, медиаторами в которых служат глутамат, ГАМК, пептиды и моноамины (рис. 2). Более того, циркадианный контроль над процессами синтеза и секреции ГРГ осуществляется нейро-гуморальным путем, а именно с вовлечением эпифизарного гормона мелатонина.

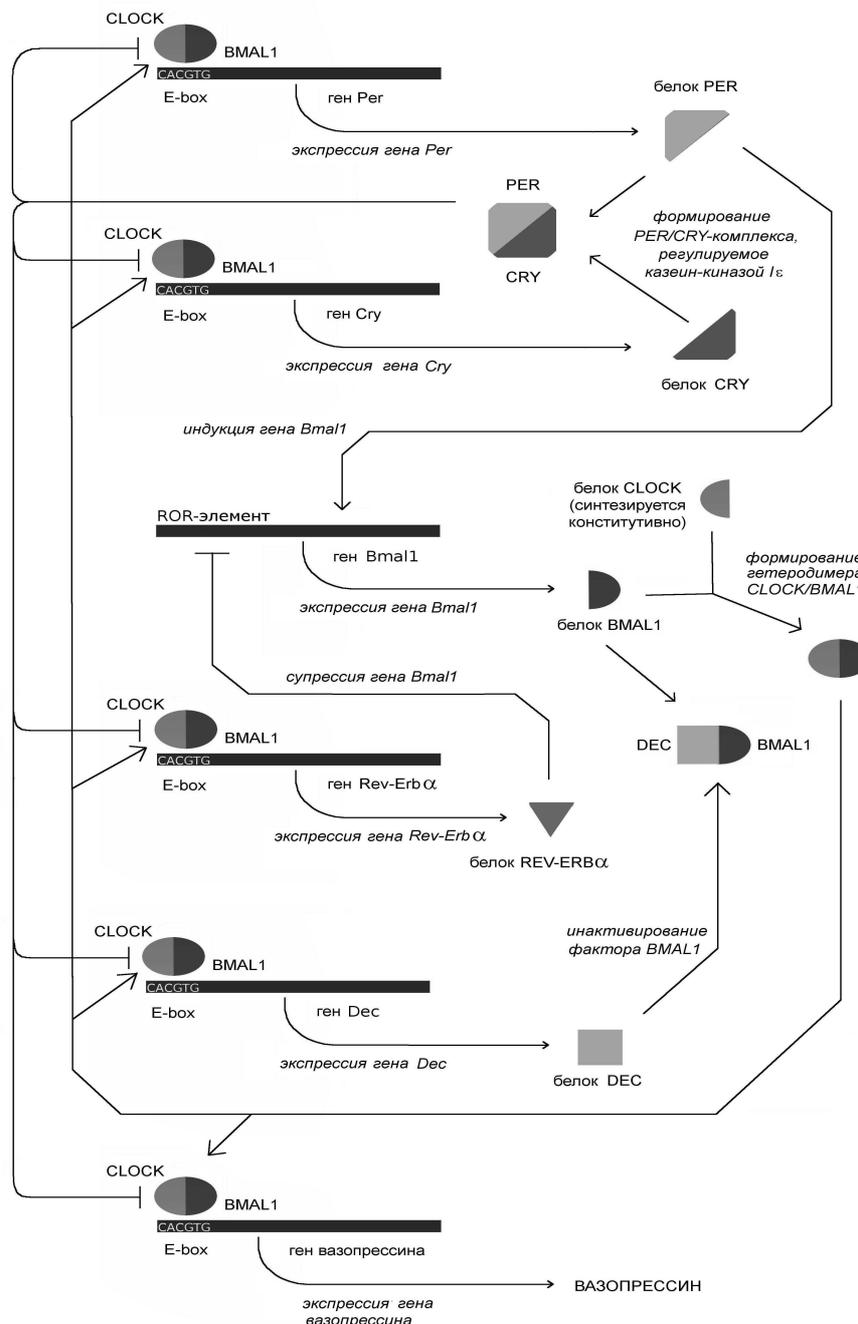


Рис.1. Упрощенная схема взаимодействий молекулярных компонентов циркадианного осциллятора. Прямая регуляция синтеза нейротрансмиттера (на примере вазопрессина).

В действительности в состав молекулярного осциллятора входят по два гена Per, Cry и Dec (т.е. Per1, Per2, Cry1, Cry2, Dec1 и Dec2). То же самое касается и соответствующих белков.

На возможность *прямого контроля* со стороны СХЯ указывают данные анатомических исследований, в которых у крыс были обнаружены прямые моносинаптические пути, связывающие нейроны СХЯ с гонадолиберинэргическими нейронами преоптической области гипоталамуса [20, 49]. Одним из нейромедиаторов в нейронах СХЯ, иннервирующих гонадолиберинэргические нейроны, является вазоактивный интестинальный пептид (ВИП) [31]. Физиологические эксперименты подтверждают роль ВИП в регуляции пика секреции ЛГ [13, 50]. Имеются данные, указывающие на вазопрессин как на медиатор, опосредующий передачу циркадианного сигнала от СХЯ к ГРГ-эргическим нейронам [47, 50]. Вазопрессинэргические нейроны являются одними из наиболее распространенных нейронов, входящих в состав СХЯ. Т. к. экспрессия гена вазопрессина регулируется CLOCK/BMAL1-

гетеродимером, вазопрессинэргические моносинаптические пути от нейронов СХЯ к гонадолиберинэргическим нейронам могут считаться наиболее простой системой регуляции продукции ГРГ со стороны молекулярного осциллятора. Содержание вазопрессина в СХЯ претерпевает суточные изменения, сохраняющиеся в условиях постоянной темноты (т.е. вне зависимости от фотоцикла), с максимумом во время так называемого “критического периода” – в то время, когда, как предполагается, поступает циркадианный сигнал от СХЯ к гонадолиберинэргическим нейронам [26].

Среди систем, контролирующей продукцию ГРГ, ведущая роль принадлежит *глутамат- и ГАМК-эргической системам*. Электрофизиологические эксперименты на мышах позволили установить, что подавляющее большинство постсинаптических электрических сигналов гонадолиберинэргических нейронов генерируются в ответ на действие ГАМК и глутамата. Более того, установлено, что 100% гонадолиберинэргических нейронов реагируют на эти две аминокислоты [23].

К настоящему времени накопленные сведения о ритмической активности глутамат- и ГАМК-эргической систем гипоталамуса позволяют рассматривать их как вставочные системы, участвующие в передаче циркадианного сигнала от СХЯ к нейронам, продуцирующим ГРГ. Показано, что гонадолиберинэргические нейроны экспрессируют субъединицы ГАМК-рецептора типа А и получают синаптические входы от ГАМК-эргических нейронов. В опытах на овариэктомированных крысах с имплантированными капсулами с эстрогеном показано, что в присутствии высокого уровня эстрогена уровень секреции ГАМК в преоптической области гипоталамуса снижается перед наступлением эстроген-индуцированного пика секреции ЛГ [9, 28]. В опытах на нормально циклирующих самках крыс [21] продемонстрировано повышение секреции ГАМК в МПО в день проэструса, по времени предшествующее пику секреции ЛГ. При этом существенно, что в день, предшествующий дню проэструса (т.е. когда нормально циклирующее животное находится на стадии диэструса-2 и уровень эстрадиола в крови уже имеет тенденцию к повышению [46]) наблюдаются менее выраженное повышение и дальнейшее снижение секреции ГАМК. Такие данные позволяют полагать, что повышенный уровень эстрогенов позволяет реализоваться сигналу (скорее всего, ингибирующему), *ежедневно* поступающему к гонадолиберинэргическим нейронам со стороны ГАМК-эргических систем. Зависимость данного сигнала от циркадианного осциллятора весьма вероятна, но пока однозначные свидетельства этого не получены. Выявленный суточный ритм может быть навязан циклическими условиями освещения.

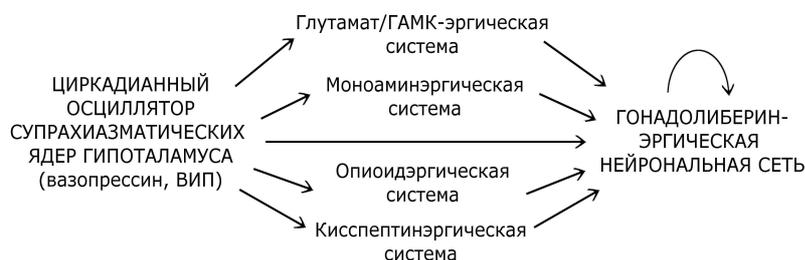


Рис. 2. Схема нейрональных путей передачи циркадианных сигналов гонадолиберинпродуцирующей системе.

В гистологических исследованиях было выявлено, что к антеровентральному перивентрикулярному ядру гипоталамуса крыс поступает массивная афферентная связь от СХЯ, причем нейроны СХЯ и прилежащей к ним области контактируют со многими перикарионами антеровентрального перивентрикулярного ядра, содержащими рецепторы эстрогенов [19]. Имеются сведения о том, что большинство нейронов антеровентрального перивентрикулярного ядра являются одновременно глутамат- и ГАМК-эргическими. Глутамат/ГАМК-эргические нейроны контактируют с нейронами, продуцирующими ГРГ.

Терминали этих «двойных» нейронов содержат два типа везикул, один из которых характеризуется наличием везикулярного транспортера-2 для глутамата, а другой — транспортера для ГАМК. Во время пика ЛГ количество везикул с транспортером глутамата растет наряду с уменьшением количества ГАМК-транспортер-позитивных везикул. Предполагается противоположно направленная реакция данных нейронов в отношении секреции глутамата и ГАМК в ответ на изменения уровня эстрадиола [17]. Таким образом, по всей видимости, одни и те же нейроны стимулируют продукцию ГРГ через секрецию глутамата и ингибируют ее посредством секреции ГАМК с чередованием данных активностей.

Другой системой, имеющей, по всей видимости, важное значение для передачи циркадианного сигнала от СХЯ гонадолиберинпродуцирующим клеткам, является *система кисспептинэргических нейронов*. Недавно было установлено, что нейроны антеровентрального перивентрикулярного ядра, экспрессирующие белок Kiss1, находятся под влиянием половых стероидов и вовлечены в механизм индукции преовуляторного пика ЛГ на гипоталамическом уровне [18]. В опытах на овариэктомированных мышах, которым были имплантированы капсулы с эстрадиолом, было показано наличие циркадианных паттернов экспрессии Kiss1 в антеровентральном перивентрикулярном ядре и сопряженной экспрессии *c-fos* в Kiss1-нейронах, причем пики экспрессии совпадали с увеличением секреции ЛГ. Изменения, наблюдаемые в отношении Kiss1-нейронов при постоянно высоком уровне эстрадиола, дают основание считать, что активность данных нейронов регулируется посредством циркадианных сигналов. В отсутствие эстрадиола для животных не было характерно наличие циркадианных ритмов секреции ЛГ или экспрессии Kiss1. Таким образом, полученные сведения подтверждают представление о том, что система кисспептинэргических нейронов антеровентрального перивентрикулярного ядра является эстрадиолзависимым посредником в трансдукции сигнала, поступающего от СХЯ и обуславливающего временную зависимость продукции ГРГ [12].

Существуют сведения, позволяющие предполагать наличие зависимости работы *опиоидэргической системы*, вовлеченной в контроль синтеза и секреции ГРГ, от циркадианного осциллятора. У взрослых самок крыс уровень  $\beta$ -эндорфина в медиобазальном гипоталамусе претерпевает суточные изменения, сохраняющиеся на всех стадиях эстрального цикла [27].

Морфологические исследования указывают на возможность контроля продукции ГРГ, опосредованного *моноаминэргическими системами*. В отношении грызунов имеются сведения о наличии контактов терминалей моноаминэргических нейронов с гонадолиберинэргическими нейронами медиальной преоптической области (МПО) гипоталамуса [3, 30]. У этих животных именно МПО является основным местом сосредоточения тел гонадолиберинэргических нейронов, посылающих свои проекции в срединное возвышение [43]. Срединное возвышение, по всей видимости, является местом аксон-аксональных взаимодействий, что видно на примере тесного расположения дофаминэргических и гонадолиберинэргических окончаний, особенно во внешнем слое [3].

В исследованиях с применением биохимических методов в гипоталамических областях, содержащих тела и терминали гонадолиберинэргических нейронов, выявлены суточные изменения содержания и секреции моноаминов. Часть данных указывает на сохранность выявляемых суточных ритмов содержания моноаминов на протяжении нескольких стадий эстрального цикла самок крыс; по другим сведениям, выраженные изменения в секреции моноаминов наблюдаются лишь на стадии проэструса, что связывают с моноаминэргической регуляцией синтеза и секреции ГРГ [7, 35, 48].

В нашей лаборатории было показано, что содержание норадреналина, дофамина и серотонина в МПО снижается в интервале от 3-4 ч до 9-10 ч от начала дневной фазы экспериментальных суток (режим – 12 ч света:12 ч темноты) [4, 6, 8]. Результаты более поздних исследований [5, 7] позволили уточнить время экспериментальных суток, в которое происходит снижение содержания норадреналина в МПО: на стадиях проэструса и диэструса

содержание данного моноамина в МПО снижалось в узком интервале от 9,5-10 ч до 11-12 ч от начала дневной фазы, т.е. приблизительно в то время, когда происходит проэстральный пик секреции ГРГ. Важно отметить, что описанные изменения содержания (не секреции!) норадреналина в МПО обнаруживаются как в проэструсе, так и в диэструсе (метэструс + диэструс-2), т.е. их наличие, по-видимому, не связано с уровнем половых стероидов, и может являться проявлением циркадианного контроля продукции ГРГ.

Исследования уровней секреции моноаминов в медиабазальном гипоталамусе самок крыс на различных стадиях эстрального цикла показывают наличие повышенного уровня секреции норадреналина в вечернее время на стадии проэструса за 1-2 ч до окончания дневной фазы экспериментальных суток (режим 12 ч света: 12 ч темноты); высвобождение дофамина снижается в интервале от 6 до 12 ч от начала дневной фазы [48]. В МПО также выявлен пик высвобождения норадреналина у овариэктомированных крыс, обработанных эстрогеном, наблюдаемый в вечернее время, отсутствующий у животных, лишенных соответствующего уровня полового стероида [35].

Отличия, выявляемые при сравнении результатов исследований содержания моноаминов в областях с данными по динамике высвобождения этих нейромедиаторов, возможно, связаны с различиями в динамике процессов синтеза и накопления медиаторов и их высвобождения при осуществлении нейромедиаторной функции. Полученные данные позволяют считать, что в вечернее время на стадии проэструса выброс норадреналина усиливается в МПО и вентромедиальном гипоталамусе, что, вероятно, сопряжено с активирующим действием данного катехоламина на синтез и секрецию ГРГ, соответственно. Пониженный уровень высвобождения дофамина в медиальном базальном гипоталамусе на стадии проэструса, по всей видимости, обеспечивает снятие тормозного эффекта дофамина на секрецию ГРГ.

К настоящему времени мы располагаем предварительными данными о том, что суточные изменения содержания норадреналина в МПО и дофамина в срединном возвышении с аркуатными ядрами сохраняются в условиях постоянной темноты. Если такие данные будут подтверждены дальнейшими экспериментами, то это будет свидетельствовать об истинной циркадианной природе данных ритмов, т.е. о циркадианном контроле активности норадренэргической системы со стороны осциллятора СХЯ.

Поскольку для норадреналина известно активирующее влияние на продукцию ГРГ, можно полагать, что обнаруживаемые изменения *содержания* этого нейромедиатора вовлечены в передачу гонадолиберинэргическим нейронам ежедневных стимулирующих сигналов от СХЯ, тогда как действительная реализация активирующего действия норадреналина осуществляется при его *секреции*, обусловленной соответствующим уровнем эстрогенов, характерным для стадии проэструса.

Контроль со стороны СХЯ над продукцией *мелатонина* шишковидной железой также представляет собой механизм регуляции активности нейрональной системы, продуцирующей ГРГ. Мелатонин действует непосредственно на гонадолиберинэргические нейроны, на нейромедиаторные системы, регулирующие активность этих нейронов, и на циркадианный осциллятор СХЯ, модулируя его работу по принципу обратной связи.

В то время как вентро-латеральные части СХЯ считаются областями, принимающими входящие синхронизирующие сигналы, дорсо-медиальные части содержат собственно осциллятор и представляют собой сайт выхода его регуляторных сигналов, направляющихся по различным нейрональным путям, один из которых — гипоталамо-эпифизарный, обеспечивающий ритмическую секрецию мелатонина. СХЯ образуют нейрональные связи с паравентрикулярными ядрами (ПВЯ) гипоталамуса; нейромедиаторами этих связей служат, очевидно, ВИП, вазопрессин и ГАМК. Последний из упомянутых нейротрансмиттеров опосредует дневное ингибирование стимулирующей активности нейронов ПВЯ в отношении выработки мелатонина эпифизом. Дорсальные и латеральные мелкоклеточные (парвоцеллюлярные) нейроны ПВЯ, медиаторами в которых служат вазопрессин и окситоцин, проецируются к интермедиолатеральным клеткам верхних трех сегментов

спинного мозга. Интермедиолатеральные нейроны (преимущественно холинэргические) посылают свои проекции к верхнему шейному ганглию, нейроны которого иннервируют эпифиз. К медиаторам нейронов верхнего шейного ганглия относят норадреналин и нейропептид Y [44].

Мелатонин, находясь под контролем со стороны СХЯ, выполняет функцию гуморального водителя циркадианных ритмов, вызывая через свои рецепторы ритмические процессы в органах-мишенях. Так как концентрация мелатонина в крови изменяется в соответствии с фазой циркадианного осциллятора, то и физиологические процессы, вызываемые мелатонином, также изменяются циклично. Таким образом органам-мишеням доставляется информация о текущей фазе циркадианного осциллятора [11, 34].

СХЯ, являясь основным генератором циркадианных осцилляций, в то же время находится под контролем со стороны мелатонина, осуществляемым через рецепторы этого гормона, находящиеся в СХЯ [22]. Воздействие мелатонина на эндогенные ритмы в СХЯ у взрослых животных отчетливее всего проявляется при помещении их в условия постоянной темноты. В этих условиях ритмы активности животных находятся под воздействием только циркадианного осциллятора и поэтому протекают с периодом, равным эндогенному периоду циркадианных ритмов в СХЯ, несколько отличающемуся от 24 ч [45]. Такое состояние циркадианного ритма, когда он проявляет собственный эндогенный период, не навязанный внешними условиями, называют “свободным бегом” ритма, а сам ритм – свободнотекущим. Обнаружено, что введение эпифизарного гормона через каждые 24 часа в течение нескольких недель интактным или пинеалэктомированными крысам приводит к синхронизации свободнотекущих ритмов их активности с 24-часовым циклом введения мелатонина [51]. При этом синхронизирующий эффект мелатонина наблюдался только при введении его в определенное время, соответствующее поздним вечерним часам в условиях нормального цикла свет/темнота. Этот феномен, как показали дальнейшие исследования *in vitro*, базируется на способности мелатонина вызывать быстрое смещение фазы циркадианных ритмов электрической активности в нейронах СХЯ [22]. Нейроны СХЯ чувствительны к воздействию гормона эпифиза только в определенные часы, соответствующие границе дня и ночи с максимумом за 2 часа до наступления темноты. Возможно, это связано с обнаруженными в СХЯ циркадианными ритмами плотности рецепторов мелатонина с максимальными значениями этого показателя на границе дня и ночи [15]. Отмечено, что у эпифизэктомированных животных быстрее происходит сдвиг фазы локомоторной активности в ответ на изменение светового режима [2]. На основании вышеизложенных фактов предполагается, что у взрослых животных воздействие мелатонина на СХЯ играет стабилизирующую роль, препятствуя слишком быстрому и резкому ответу этих структур на случайные изменения светового режима и других внешних факторов [1].

Обнаружено, что мелатонин в культуре гонадолиберинпродуцирующих нейронов, вызывает репрессию гена, контролирующего синтез ГРГ [14]. Действие мелатонина зависит от времени суток и приводит к циклическим изменениям уровня мРНК ГРГ с периодом, равным 24 ч. Получены сведения о возможности влияния мелатонина на синтез и секрецию ГРГ через моноаминэргические системы. В опытах *in vitro* наблюдалось снижение под влиянием мелатонина секреции ГРГ из срединного возвышения самцов крыс [39]. Вместе с тем мелатонин повышал уровень секреции ГРГ из препаратов, содержащих срединное возвышение совместно с аркуатными ядрами. Причину подобных различий объясняют тем, что препараты срединного возвышения содержат лишь аксоны пептидэргических и моноаминэргических нейронов, в то время как в препаратах, содержащих также аркуатные ядра, заключены целостные тубероинфундибулярная дофаминэргическая и  $\beta$ -эндорфинэргическая нейромедиаторные системы. Было показано, что дофамин *in vitro* стимулирует выброс ГРГ из изолированного срединного возвышения [36], однако ингибирует секрецию этого нейропептида из препарата срединного возвышения с аркуатными ядрами, и это ингибирование, по-видимому, обусловлено повышением активности опиоидной системы под воздействием дофамина [40]. Это дает основание предположить, что в препаратах

срединного возвышения мелатонин, снижая выброс дофамина, вызывает ингибирование дофаминэргической стимуляции гонадолиберинэргических терминалей, что приводит к последующему снижению секреции ГРГ. В препаратах же, содержащих срединное возвышение совместно с аркуатными ядрами, снижение секреции дофамина под действием гормона эпифиза приводит к снижению активности целостной опиоидной системы, тонически ингибирующей секрецию ГРГ. Воздействие мелатонина на секрецию ГРГ наблюдалось только в утренние, но не в вечерние часы. Этот факт может указывать на наличие суточных ритмов чувствительности к мелатонину нейромедиаторных систем, контролирующей секрецию ГРГ. Действительно, есть данные о наличии суточного ритма ингибирования мелатонином высвобождения дофамина в гипоталамусе самцов крыс под действием электрической стимуляции. Максимальное ингибирование наблюдалось в утреннее время, минимальное – в ранние ночные часы [53].

### **Пути передачи циркадианного сигнала и эстрогены**

Для формирования преовуляторного пика секреции ГРГ критическим фактором является повышение уровня эстадиола в крови, причем данный овариальный сигнал должен вступить во взаимодействие с сигналом нейрональной природы, ежедневно поступающим от СХЯ. Возникает вопрос о локализации эстроген-чувствительного звена на пути передачи циркадианного сигнала гонадолиберинэргическим нейронам.

Проекции нейронов СХЯ были обнаружены на эстроген-рецептор-экспрессирующих клетках в преоптической области грызунов, включая антеровентральную перивентрикулярную область (антеровентральное перивентрикулярное ядро), участвующую в эстрогензависимой регуляции активности гонадолиберинэргических нейронов. Наиболее вероятно, что антеровентральная перивентрикулярная область является главной структурой, интегрирующей стероидный и циркадианный сигналы, входящие в гонадолиберинэргическую нейрональную сеть [24]. Это означает, что именно не прямые нейрональные пути (т.е. имеющие в своем составе вставочные регулируемые элементы), проходящие от СХЯ к клеткам, продуцирующим ГРГ, должны быть способны принимать овариальный сигнал.

Не исключена также возможность конвергенции сигналов, поступающих от эстроген-рецептирующих структур и от циркадианного осциллятора, непосредственно на телах гонадолиберинэргических нейронов. Более того, было показано, что гонадолиберинэргические нейроны способны экспрессировать  $\beta$ -рецептор эстрогенов, что может обеспечивать наличие прямого пути эстрогензависимой регуляции экспрессии генов в данных клетках [23].

### **Заключение**

В целом имеющиеся на настоящий момент сведения позволяют утверждать, что циклическая продукция ГРГ обусловлена регуляторным воздействием со стороны циркадианного осциллятора СХЯ, осуществляемым посредством нейрональных связей с ГРГ-эргическими нейронами, а также гуморальным путем посредством эпифизарного гормона мелатонина. В случае нейромедиаторов СХЯ может осуществляться прямой контроль транскрипции их генов посредством позитивных регуляторных CLOCK/BMAL1-комплексов и негативных регуляторов PER/CRY, которые в совокупности являются ядром молекулярного осциллятора. Нейрональные связи СХЯ с ГРГ-продуцирующими клетками могут быть как прямыми, так и опосредованными, а именно с участием медиаторных систем, нейротрансмиттерами в которых являются моноамины, пептиды и аминокислоты. Вовлечение данных вставочных систем обуславливает скоординированную позитивную и негативную регуляцию продукции ГРГ. Вставочные системы вовлечены в рецепцию эстрогенного сигнала, критически необходимого для формирования преовуляторного пика

продукции ГРГ. Нейрональные связи осуществляют свое регуляторное влияние на уровнях перикарионов и терминалей гонадолиберинэргических нейронов. Непрямой, т. е. нейрогуморальный, контроль с вовлечением мелатонина обеспечивает синхронизацию продукции ГРГ с фотоциклом.

*Авторы выражают благодарность к.б.н. Корневскому А.В. за полезные замечания при оформлении статьи.*

## Литература

1. Арушанян Э.Б. Комплексное взаимодействие супрахиазматических ядер гипоталамуса с эпифизом и полосатым телом - функционально единая система регуляции суточных колебаний поведения // Журн. высш. нерв. деят. - 1996. - Т. 46, №1. - С. 15-22.
2. Арушанян Э.Б., Батурин В.А., Попов А.В. О реципрокных отношениях между супрахиазматическими ядрами гипоталамуса и эпифизом в процессе перестройки циркадианной подвижности крыс при изменении светового режима // Журн. высш. нерв. деят. - 1993. - Т. 43, №1. - С. 69.
3. Бабичев В.Н. Нейроэндокринная регуляция репродуктивной системы. - Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН, 1995. - 227 с.
4. Влияние мелатонина на гипоталамическую регуляцию репродуктивной функции крыс при хроническом воздействии ксенобиотиков / Керкешко Г.О. [и др.] // Нейрохимия – 2001. - Т.18 – №.1 – С.67 – 74.
5. Динамика содержания катехоламинов в гипоталамических структурах самок крыс в преовуляторный период / Разыграев А.В. [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней - 2010. - №4. - С.76-80.
6. Нарушение гипоталамической регуляции репродуктивной функции при воздействии нейротоксических соединений и мелатонина / Арутюнян А.В. [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней - 2003. - №2. - С. 77-84.
7. О взаимосвязи циркадианных и овариальных циклов в гипоталамической регуляции репродукции (экспериментальное исследование) / Корневский А.В. [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней - 2007. - №4. - С.24-30.
8. Экспериментальное изучение механизмов нарушений гипоталамической регуляции репродуктивной функции / Арутюнян А.В. [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней - 2005. - №1. - С.57-63.
9. Amino acid neurotransmitter release in the preoptic area of rats during the positive feedback actions of estradiol on LH release / Jarry, H. [et al.] // Neuroendocrinology — 1992. - Vol. 56. - P.133-140.
10. Boden M.J., Kennaway D.J. Circadian rhythms and reproduction // Reproduction. - 2006. - Vol.132. - P.379-392.
11. Cassone V.M. Melatonin's role in vertebrate circadian rhythms. // Chronobiol. Int. - 1998. - Vol.15, №5. - P.457-457.
12. Circadian regulation of Kiss1 neurons: implications for timing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge / Robertson J.L. [et al.] // Endocrinology. – 2009. – V.150, №8. – P.3664-3671.
13. Christian C.A., Moenter S.M. Vasoactive intestinal polypeptide can excite gonadotropin-releasing hormone neurons in a manner dependent on estradiol and gated by time of day // Endocrinology. - 2008. - Vol.149, №6. - P.3130-3136.
14. Cyclical regulation of GnRH gene expression in GT1-7 GnRH-secreting neurons by melatonin / Roy D. [et al.] // Endocrinology. – 2001. – V.142, N.11. - P.4711-4720.
15. Daily variations in melatonin receptor density of rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei are distinctly regulated / Gauer F. [et al.] // Brain Res. - 1994. - Vol.641, №.1. - P.92-98.
16. Devlin P.F. Signs of time: environmental input to the circadian clock // Journal of Experimental Botany. - 2002. - Vol.53, №374. - P.1535-1550.
17. Dual-phenotype GABA/glutamate neurons in adult preoptic area: sexual dimorphism and function / Ottem E.N. [et al.] // The Journal of Neuroscience. - 2004. - Vol.24, №37 — P.8097-8105.
18. Dungan H.M., Clifton D.K., Steiner R.A. Minireview: Kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion // Endocrinology. – 2006. – V.147, №3. – P.1154-1158.
19. Estrogen-receptive neurons in the anteroventral periventricular nucleus are synaptic targets of the suprachiasmatic nucleus and peri-suprachiasmatic region / Watson R.E. [et al.] // Brain Res. -1995. - V.689. - P.254-264.
20. Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies / Van der Beek E.M. [et al.] // J. Comp. Neurol. - 1997. - Vol.384, №4. - P.569-579.
21. GABA release in the medial preoptic area of cycling female rats / Mitsushima D. [et al.] // Neuroscience. - 2002. - Vol.113. - №1. - P.109-114.
22. Gillette M.U., McArthur A.J. Circadian actions of melatonin at the suprachiasmatic nucleus // Behav. Brain Res. - 1996. - Vol.73. - P. 135-139.
23. Herbison A.E. Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron / In: Encyclopedia of Hormones. Elsevier Science (USA), 2003.
24. Herbison A.E. Physiology of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network / Neill D.J. (editor) Knobil and Neill's physiology of reproduction. Third edition. - Elsevier, 2006. -P. 1415-1482.
25. Horvath T.L., Cela V., van der Beek E.M. Gender-specific apposition between vasoactive intestinal peptide-containing

- axons and gonadotrophin-releasing hormone-producing neurons in the rat. // *Brain Res.* - 1998. - Vol. 795. - P.277-281.
26. Inouye S. I. T. Circadian rhythms of neuropeptides in the suprachiasmatic nucleus. // Buijs R.M., Kalsbeek A., Romijn H.J., Pennartz C.M.A., Mirmiran M. (Eds.), *Hypothalamic Integration of Circadian Rhythms. Progress in Brain Research.* Vol. 111. -Amsterdam: Elsevier, 1996. - P.75- 90.
  27. Jamali K.A., Tramu G. Control of rat hypothalamic pro-opiomelanocortin neurons by a circadian clock that is entrained by the daily light-off signal. // *Neuroscience.* - 1999. - Vol.93, №3. - P.1051-1061.
  28. Jarri H., Perschl A., Wuttke W. Further evidence that preoptic anterior hypothalamic GABAergic neurons are part of the GnRH pulse and surge generator // *Acta Endocrinol (Copenh).* - 1988. - V.118, №4. - P.573-579.
  29. Kennaway D.J. The role of circadian rhythmicity in reproduction // *Human Reproduction Update.* - 2005. - V. 11. N. 1. - P. 91-101.
  30. Kiss J., Halasz B. Demonstration of serotonergic axons termination on luteinizing hormone-releasing hormone neurones in the preoptic area of the rat using a combination of immunocytochemistry and high resolution autoradiography // *Neurosci.* - 1985. - Vol. 14 – P.69-78.
  31. Lesions of the suprachiasmatic nucleus indicate the presence of a direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection to gonadotrophin-releasing hormone neurons in the female rat / Van der Beek E.M. [et al.] // *J. Neuroendocrinol.* - 1993. - Vol.5, №2. - P.137-144.
  32. Levine J.E. Gonadotropin-releasing hormone / In: *Encyclopedia of Hormones.* Elsevier Science (USA), 2003.
  33. Maywood E.S., O'Brien A.O., Hastings M.H. Expression of mCLOCK and other circadian clock-relevant proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei // *Journal of Neuroendocrinology.* - 2003. - V.15. - P.329-334.
  34. Melatonin, the pineal gland, and circadian rhythms / Cassone V.M. [et al.] // *J. Biol. Rhythms.* - 1993. - Vol.8. (Suppl). - P.S73-81.
  35. Mohankumar S.M.J., Mohankumar P.S. Aging alters norepinephrine release in the medial preoptic area in response to steroid priming in ovariectomized rats // *Brain Research.* 2004. V. 1023. P.24-30.
  36. Negro-Vilar A., Ojeda S.R., McCann S.M. Catecholaminergic modulation of luteinizing hormone-releasing hormone release by median eminence terminals in vitro. // *Endocrinology.* - 1979. - Vol.104, №6. - P.1749-1757.
  37. Okamura, H. Integration of mammalian circadian clock signals: from molecule to behavior // *Journal of Endocrinology.* – 2003. – V.177. – P.3-6.
  38. Panda S., Hogenesch J.B., Kay S.A. Circadian rhythms from flies to human // *Nature.* - 2002. - V.417. - P.329-335.
  39. Rasmussen D.D. Diurnal modulation of rat hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release by melatonin in vitro. // *J. Endocrinol. Invest.* - 1993. - Vol.16, №1. - P.1-7.
  40. Rasmussen D.D. The interaction between mediobasohypothalamic dopaminergic and endorphinergic neuronal systems as a key regulator of reproduction: an hypothesis. // *J. Endocrinol. Invest.* - 1991. - Vol.14, №4. - P.323-352.
  41. Reppert S.M., Weaver D.R. Coordination of circadian timing in mammals // *Nature.* - 2002. - V.418. - P.935-441.
  42. Reuss S. Components and connections of the circadian timing system in animals // *Cell Tissue Res.* - 1996. - Vol.285. - P. 353-378.
  43. Rivest, S., Rivier, C. The role of corticotropin-releasing factor and interleukin-1 in the regulation of neurons controlling reproductive functions // *Endocrine Reviews.* 1995. V. 16. N. 2. P. 177-199.
  44. Simonneaux V., Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters // *Pharmacol Rev.* - 2003. - Vol. 55. - P. 325-395.
  45. Sloten H.A., Pitrovsky B., Pevet P. Influence of the mode of daily melatonin administration on entrainment of rat circadian rhythms. // *J. Biol. Rhythm.* - 1999. - Vol.14, №5. - P. 347-353.
  46. Smith M.S., Freeman M.E., Neill J.D. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy // *Endocrinology.* 1975. V. 96. P. 219-226.
  47. The stimulatory effect of vasopressin on the luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol-treated rats is time-dependent / Palm I.F. [et al.] // *Brain Res.* - 2001. - Vol.901, №1-2. - P.109-116.
  48. Thyagarajan S., Mohankumar P.S., Quadri S.K. Cyclic changes in the release of norepinephrine and dopamine in the medial basal hypothalamus: effects of aging // *Brain Research.* 1995. V.689. P.122-128.
  49. Van der Beek E.M. Circadian control of reproduction in the female rat. // *Prog. Brain Res.* - 1996. - Vol.111. - P.295-320.
  50. Vasopressin induces a luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol-treated rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus / Palm I.F. [et al.] // *Neuroscience.* - 1999. - Vol.93, №2. - P.659-666.
  51. Warren W.S., Hodges D.B., Cassone V.M. Pinealectomized rat entrain and phase-shift to melatonin injections in dose-dependent manner. // *J. Biol. Rhythms.* 1993. - Vol. 8. - P. 233-245.
  52. Young M.W., Kay S.A. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. // *Nat. Rev. Genet.* - 2001. - Vol.2, №9. - P. 702-715.
  53. Zisapel N., Egozi Y., Laudon M. Circadian variations in the inhibition of dopamine release from adult and newborn rat hypothalamus by melatonin. // *Neuroendocrinology.* - 1985. - Vol.40, №2. - P.102-108.