



УДК 591.47:612.6

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ В ТЕСТИКУЛАХ ЩУРІВ ПРЕПУБЕРТАТНОГО ВІКУ ПІД ВПЛИВОМ КІСПЕПТИНА НА ФОНІ БЛОКАДИ ТА АКТИВАЦІЇ АЛЬФА-АДРЕНОРЕЦЕПТОРІВ І ПРИ ВВЕДЕННІ МЕЛАТОНІНА

Матвієнко М.Г., Пустовалов А.С., Бузинська Н.О., Держинський М.Е.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

Надійшла до редакції 29.01.2010

Установлена активація функції тестикул у щурів препубертатного віку після введення кіспептина як на фоні фізіологічного розчину, так і в комбінації з празозином і мелатоніном. Натомість, ін'єкції антагоніста кіспептинових рецепторів спричинили інактивацію гонад як на фоні фізіологічного розчину, так і в комплексі з мезатоном і мелатоніном.

Ключові слова: тестикули, кіспептин, мезатон, празозин, мелатонін.

ВСТУП

Кіспептин був відкритий 1999 року в місті Херші, штат Пенсільванія. В 2001 році його ідентифікували як ендогенний ліганд орфанового G-білок спряженого рецептора GPR54 [1]. Білок є продуктом гена Kiss1, який відомий як супресор метастазів [2]. Ліганд спочатку іменували метастином, та в даний час називають кіспептином. Продукт гена Kiss1 складається зі 145 амінокислот. Високі рівні експресії як рецептора, так і як пептида, спостерігаються в плаценті, більш низькі рівні - в мозку, зокрема, в гіпоталамусі та гіпофізі. мРНК Kiss1r (рецептора) в щурів була виявлена в таких регіонах мозку, як міст, середній мозок, таламус, гіпоталамус, гіпокамп, мигдалина, кора і смугасте тіло, а також у печінці та кишечнику [3]. Інші дослідження також підтвердили локалізацію Kiss1r мРНК у вищезазначених областях мозку, в тому числі діагональних смугах Брока, медіальних перегородках, медіальній преоптичній області, бічній преоптичній області, преоптичному ядрі гіпоталамуса [4]. Kiss1r мРНК також експресувалася в гіпофізі [5]. мРНК Kiss1 (кіспептина) була виявлена в центральній нервовій системі і, зокрема, в таких гіпоталамічних ділянках, як аркуатне ядро, антеровентральне перивентрикулярне ядро і преоптичне ядро. [6]. Експресія мРНК Kiss1 також спостерігалася в гіпофізі, аркуатному, паравентрикулярному і вентромедіальному ядрах гіпоталамуса [7].

Важливу роль кіспептина і його рецептора в регуляції репродуктивної системи було вперше зазначено в дослідженнях мутацій рецепторів кіспептина в деяких пацієнтів з ідіопатичним гіпогонадотропним гіпогонадізмом [8] і підтверджено

на моделі трансгенних мишей. Кіспептин відтоді визнаний основним регулятором гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної осі, що керує пубертатом, все в більшій кількості видів тварин. Кіспептин стимулює вивільнення гонадотропіну (ГнРГ). ГнРГ є прямим посередником цього ефекту, як було показано у мавп [9], овець [10], свиней [11] і кіз [12]. Антагоністи ГнРГ блокують кіспептин-індуковане вивільнення гонадотропінів [13]. Подальші дослідження встановили, що ГнРГ-нейрони експресують рецептори кіспептина [4, 10]. І ключові експерименти з Kiss1r- і Kiss1-нокаутованими мишами показали, що функціональний рецептор кіспептина необхідний для секреції ГнРГ і викиду лютеїнізуючого гормону (ЛГ) та фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) [8, 14]. Дослідження механізму комунікації між кіспептином і ГнРГ нейронами методом c-Fos імунореактивності виявили, що активність ГнРГ-нейронів збільшується під дією кіспептина [4], і що кіспептин деполаризує ГнРГ-нейрони [15].

Існує чимало доказів того, що кіспептин-рецепторна сигналізація необхідна для початку статевого дозрівання. Люди і миші з порушенням Kiss1r або гена Kiss1 не в змозі пройти через пубертат [8, 14]. Введення кіспептина щурам препубертатного віку індувало передчасний пубертат, в той час як центральні ін'єкції антагоністом кіспептина затримували статеве дозрівання [16]. У пубертатний період зростає зв'язок між кіспептином і ГнРГ-нейронами, що проявляється в збільшенні гіпоталамічної експресії мРНК Kiss1 і Kiss1r, збільшенні контактів між волокнами ГнРГ-нейронів і підвищенні чутливості ГнРГ-нейронів до

кіспетина. Кіспетин також може діяти на рівні гіпофіза, хоча це остаточно не доведено і вимагає подальшого розслідування [17]. Все більше даних свідчать про те, що система кіспетин-рецептор кіспетина інтегрує два метаболічних сигнали, з одного боку - харчування та обмін речовин [18], з іншого боку - сигнали навколишнього середовища (в тому числі фотоперіод) [19], та впливає на репродуктивну систему.

Гонадостимулюючий ефект альфа-адренергічної системи головного мозку загально визнаний [20, 21], але взаємодія механізмів кіспетинергічної та альфа-адренергічної активації гонад остаточно не вивчена. Тому метою даної роботи було дослідження впливу кіспетина на активність тестикул статевонезрілих щурів за умов активації та блокади альфа-адренорецепторів і при введенні мелатоніна. Оцінювалися зміни діаметра тестикулярних каналців та площі поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга, які є показниками функціональної активності репродуктивної системи в самців.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Експеримент проведений на 50 самцях білих нелінійних щурів *Rattus norvegicus* одномісячного віку масою 55-60 г. Відповідно координатам атласу мозку щура [22] у перебігу стереотаксичної операції досліджувався вплив інтрацеребрального введення кіспетина (метастин -(45-54)-амід, Sigma, США) на гонади, а також його комбінації з гормоном епіфізу мелатоніном (віта-мелатонін, ВАТ «Київський вітамінний завод», Україна) і альфа-адреноблокатором празозином (празозин-ратіофарм, Меркле Гмбх, Німеччина). Також досліджувався вплив інтрацеребрального введення блокатора кіспетинових рецепторів (кіспетин-234-трифлюороацетат, Sigma, США), а також його комбінованого введення в комплексі з мелатоніном та альфа-адреноміметиком мезатоном (ТОВ «Дослідний завод «ГНЦЛС», Україна).

Контрольну групу складали щури, які отримували ін'єкції по 0,5 мл 0,9 % ізотонічного розчину хлориду натрія (АТЗТ по виробництву інсулінів "Індар", Україна) один раз на добу. Ведення кіспетина здійснювалося протягом трьох діб до взяття матеріалу інтрацеребрально у лівий шлуночок мозку на стереотаксичному приладі за допомогою спеціально переобладнаного шприця у дозі 3 мкг/100 г ваги тіла один раз на добу. Блокатор кіспетинових рецепторів ін'єкувався протягом трьох діб до взяття матеріалу інтрацеребрально у лівий шлуночок мозку на стереотаксичному приладі за допомогою спеціально переобладнаного шприця у дозі 3 мкг/100 г ваги тіла один раз на добу. Мелатонін вводився перорально протягом 10 діб до взяття матеріалу в дозі 100 мкг/100 г ваги тіла один раз на добу. Празозин вводили перорально протягом 10 діб до взяття матеріалу у дозі 100 мкг/100 г ваги тіла один раз на добу. Мезатон вколювався парентерально протягом 10 діб до взяття

матеріалу у дозі 100 мкг/100 г ваги тіла один раз на добу.

Експериментальний матеріал оброблявся за стандартною гістологічною методикою. На мікротомі LKB Ultratom ME III ТУР 888802 виготовлялися препарати гонад товщиною 5 мкм, які фарбували гематоксиліном та еозином. На гістологічних препаратах за допомогою мікроскопа Olympus BX51 і системи аналізу зображень Olympus DP-Soft 3.2 вимірювали площу поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга при збільшенні X400 та діаметр тестикулярних каналців при збільшенні X100. Отримані виміри аналізувалися за допомогою методів варіаційної статистики. Статистична вірогідність змін між морфометричними показниками контрольних та піддослідних груп щурів оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Достовірною вважали різницю між контрольними та піддослідними серіями при $p < 0,05$. Статистична обробка даних здійснювалася за допомогою програмного забезпечення Sewws Statistica 7.0. for Windows.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У щурів контрольної групи (ФР), яким вводили лише фізіологічний розчин, площа поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга становить $10,33 \pm 0,09$ мкм², а діаметр тестикулярних каналців – $152,74 \pm 0,86$ мкм. Площа поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга достовірно зменшилася в щурів після введення блокатора кіспетинових рецепторів кіспетин-234-трифлюороацетата на фоні фізіологічного розчину (ФР+Бл) ($7,49 \pm 0,11$ мкм²). Також у цій групі зменшився діаметр тестикулярних каналців ($140,47 \pm 0,63$ мкм), порівняно з контрольною групою. Щури, яким вводили кіспетин на фоні фізіологічного розчину (ФР+Кіс), продемонстрували достовірне зростання показників площі поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга ($15,64 \pm 0,09$ мкм²) та діаметра тестикулярних каналців ($167,57 \pm 0,67$ мкм), в порівнянні з тваринами групи ФР. Таким чином, зменшення морфометричних параметрів гонад піддослідних щурів пояснюється гальмуванням функції гонад після введення антагоніста кіспетинових рецепторів. Натомість, ін'єкції кіспетина на фоні фізіологічного розчину проявилися в достовірному збільшенні вимірюваних показників активності тестикул, що вказує на активацію репродуктивної функції, і це не суперечить отриманим експериментальним даним інших дослідників [13].

Щури, які отримували ін'єкції мелатоніном (Мел), проявили достовірне зростання за обома вимірюваними параметрами: площею поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга ($12,26 \pm 0,08$ мкм²) та діаметром тестикулярних каналців ($160,66 \pm 0,47$ мкм), порівняно з контрольною групою. Показник площі поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга зазнав статистично достовірного зменшення в групі щурів, які отримували блокатор кіспетинових

рецепторів на фоні мелатоніна (Мел+Бл) ($8,73 \pm 0,06$ мкм²), на відміну від тварин групи Мел. Діаметр тестикулярних каналців також достовірно зменшився в групі щурів після введення блокатора кіспептинових рецепторів ($153,66 \pm 0,56$ мкм), порівняно з групою тварин, яким вводили лише мелатонін. Група тварин, якій ін'єктувався кіспептин на фоні мелатоніна (Мел+Кіс), проявила достовірне зростання площі поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга ($16,12 \pm 0,07$ мкм²) та діаметра тестикулярних каналців ($170,29 \pm 0,05$ мкм), в порівнянні з щурами групи Мел. Загалом можна констатувати активацію функції тестикул під дією мелатоніна в досліджуваній концентрації. При введенні мелатоніна з кіспептином морфометричні параметри гонад показали ще більшу активацію, ніж при ін'єкціях одним мелатоніном.

Отримані дані свідчать про гонадостимулюючий вплив одочасного введення мелатоніна і кіспептина, що не суперечить попередньому висновку про кіспептинопосередкований характер гонадостимулюючого ефекту мелатоніна в одномісячних щурах. Але після впливу блокатора рецепторів кіспептина на фоні мелатоніна площа поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга і діаметр тестикулярних каналців достовірно зменшувалися, що пов'язується з пригніченням функції гонад. Отже, блокада рецепторів кіспептина знімала активацію тестикул, що дає підставу припустити наявність певного гонадостимулюючого ефекту мелатоніна. Аналогічний ефект блокатора кіспептинових рецепторів спостерігали й інші автори [16].

Таблиця 1

Площа поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга та діаметр тестикулярних каналців

Група	Параметр	Площа перерізу ядер клітин Лейдіга, мкм ² , M±m	Діаметр тестикулярних каналців, мкм, M±m
	Фізіологічний розчин	10,33±0,09	152,74±0,86
	Фізіологічний розчин+блокатор	7,49±0,11*	140,47±0,63*
	Фізіологічний розчин+кіспептин	15,64±0,09*	167,57±0,67*
	Мелатонін	12,26±0,08*	160,66±0,47*
	Мелатонін+блокатор	8,73±0,06^	153,66±0,56^
	Мелатонін+кіспептин	16,12±0,07#	170,29±0,05#
	Мезатон	12,98±0,11*	166,30±0,07*
	Мезатон+блокатор	8,83±0,08^	152,68±0,76^
	Празозин	7,95±0,07*	140,43±0,68*
	Празозин+кіспептин	11,89±0,08#	159,09±0,68#

- p<0,05, порівняно з групою ФР;

- p<0,05, порівняно з відповідною групою без кіспептина;

^ - p<0,05, порівняно з відповідною групою без блокатора.

Група щурів після введення мезатона (Мез) показали достовірне зростання показників площі поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга ($12,98 \pm 0,11$ мкм²) і діаметра тестикулярних каналців ($166,30 \pm 0,07$ мкм), порівняно з контрольною групою ФР. Ці ж морфометричні показники достовірно зменшилися в тварин після введення блокатора кіспептинових рецепторів на фоні мезатона (Мез+Бл), в порівнянні з групою Мез. Площа поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга в щурів групи Мез+Бл становить $8,83 \pm 0,08$ мкм², а діаметр тестикулярних каналців – $152,68 \pm 0,76$ мкм. Так, збільшення досліджуваних параметрів тестикул одномісячних щурів після введення мезатона в даному дослідженні відбулося в результаті стимуляції альфа-адренорецепторів та подальшої активації гонад. А зменшення площі поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга і діаметра тестикулярних каналців у групі тварин, яким вводили антагоніст кіспептинових рецепторів на фоні мезатона, пояснюється інактивациєю функції тестикул. Отже, блокада кіспептинових рецепторів гальмувала прояв гонадостимулюючого ефекту мезатона, що також може свідчити на користь

кіспептинопосередкованої дії альфа-адренергічної системи на гіпоталамо-гонадну вісь.

Вимірювані параметри тварин, яким вводили празозин (Пр), зазнали статистично достовірного зменшення, в порівнянні з показниками щурів контрольної групи. Так, площа поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга в тварин групи Пр сягає $7,95 \pm 0,07$ мкм², а діаметр тестикулярних каналців – $140,43 \pm 0,68$ мкм. Після ін'єкцій кіспептина на фоні празозина (Пр+Кіс) достовірно збільшилася як площа поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга ($11,89 \pm 0,08$ мкм²), так і діаметр тестикулярних каналців ($159,09 \pm 0,68$ мкм), порівняно з щурами групи Пр. (Таблиця 1). Достовірне зменшення морфометричних параметрів гонад у щурів, які отримали празозин, демонструє зниження функції тестикул у досліджуваних щурів. Таким чином, блокада альфа-адренергічної системи призводить до гальмування репродуктивної функції гонад піддослідних тварин. Активуючий ефект кіспептина проявився в зростанні площі поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга і діаметра тестикулярних каналців, незважаючи на комбінований вплив празозина. З отриманих даних випливає, що активація гонад здійснюється за участі

як альфа-адренергічної, так і кіссептинергічної системи одночасно. Блокада будь-якої з цих систем призводить до інактивації гонад.

ВИСНОВКИ

У щурів одномісячного віку введення кіссептина спричинило гонадостимулюючий ефект, який проявився в зростанні вимірюваних морфометричних параметрів гонад (площі поперечного перерізу ядер клітин Лейдига і діаметра тестикулярних каналців). Активація гонад під дією кіссептина спостерігалася навіть при комбінованому впливі празозина. Мезатон і мелатонін також вплинули на збільшення морфометричних параметрів гонад, що вказує на активацію функції останніх. Введення празозина спричинило інактивацію тестикул щурів, на що вказувало зменшення досліджуваних морфометричних параметрів. Ін'єкції антагоніста кіссептинових рецепторів гальмували активність тестикул у тварин, що підтверджувалося зменшенням відповідних морфометричних параметрів гонад. Блокада кіссептинових рецепторів гальмувала прояв гонадостимулюючого ефекту мезатона та знімала активацію тестикул внаслідок дії мелатоніна, що може свідчити про кіссептинопосередковану дію альфа-адренергічної системи на гіпоталамо-гонадну вісь. Активація гонад здійснюється за участі як альфа-адренергічної, так і кіссептинергічної системи одночасно. Блокада будь-якої з цих систем призводить до інактивації гонад.

Література

1. Kotani M., Detheux M., et al. The Metastasis Suppressor Gene KiSS-1 Encodes Kisspeptins, the Natural Ligands of the Orphan G Protein-coupled Receptor GPR54 // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 37, № 276. – P. 34631-34636.
2. Lee J.H., Miele M. E., et al. Kiss-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1996. – Vol. 23, № 88. – P.1731-1737.
3. Lee D. K., Nguyenc T., et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors // *FEBS Lett.* – 1999. – Vol. 446, № 5. – P. 103-107.
4. Irwig M.S., Fraley G.S., et al. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat // *Neuroendocrinology.* – 2004. - Vol. 4, № 80. – P. 264-272.
5. Richard N., Galmiche G., et al. KiSS-1 and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and gonadotrophin-releasing hormone // *J. Neuroendocrinol.* – 2008. - Vol. 3, № 20. – P. 381-393.
6. Adachi S., Yamada S., et al. Involvement of Anteroventral Periventricular Metastin/Kisspeptin Neurons in Estrogen Positive Feedback Action on Luteinizing Hormone Release in Female Rats // *Journal of Reproduction and Development.* – 2007. – Vol. 53, № 2. – P. 367-378.
7. Brailoiu G.C., Dun S.L., et al. KiSS-1 expression and metastin-like immunoreactivity in the rat brain // *J. Comp. Neurol.* – 2005. – Vol.3, № 481. - P.314-329.
8. Seminara S.B., Messager S., et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty // *N. Engl. J. Med.* –2003. – Vol. 23, № 349. – P. 1614-1627.
9. Keen K.L., Wegner F.H., et al. An increase in kisspeptin-54 release occurs with the pubertal increase in luteinizing hormone-releasing hormone-1 release in the stalk-median eminence of female rhesus monkeys in vivo // *Endocrinology.* – 2008. - Vol.8, № 149. – P. 4151-4157.
10. Messager S., Chatzidaki E., et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54 // *Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – Vol. 102, №. 5. – P. 1761-1766.
11. Lents C.A., Heidorn N.L., et al. Central and peripheral administration of kisspeptin activates gonadotropin but not somatotropin secretion in prepubertal gilts // *Reproduction.* – 2008. - Vol. 6, № 135. – P. 879-887.
12. Hashizume T., Saito H., et al. Characteristics of stimulation of gonadotropin secretion by kisspeptin-10 in female goats // *Anim. Reprod. Sci.* – 2010. - Vol. 1, № 118. – P. 37-41.
13. Navarro V. M., Castellano J. M., et al. Developmental and Hormonally Regulated Messenger Ribonucleic Acid Expression of KiSS-1 and Its Putative Receptor, GPR54, in Rat Hypothalamus and Potent Luteinizing Hormone-Releasing Activity of KiSS-1 Peptide // *Endocrinology.* – 2004. – Vol. 145, №. 10. – P. 4565-4574.
14. Lapatto R., Pallais J. C., et al. Kiss1- Mice Exhibit More Variable Hypogonadism than Gpr54-/- Mice // *Endocrinology.* – 2007. – Vol. 148, № 10. – P. 4927-4936.
15. Zhang C., Roepke T.A., et al. Kisspeptin depolarizes gonadotropin-releasing hormone neurons through activation of TRPC-like cationic channels // *J. Neurosci.* – 2008. - Vol. 8, № 28. – P. 4423-4434.
16. Pineda R., Garcia-Galiano D., et al. Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist // *Endocrinology.* – 2010. - Vol.2, 151. – P. 722-730.
17. Richard N., Corvaisier S., et al. KiSS-1 and GPR54 at the pituitary level: overview and recent insights // *Peptides.* – 2009. - Vol. 1, № 30. – P. 123-129.
18. Castellano J. M., Navarro V. M., et al. Changes in Hypothalamic KiSS-1 System and Restoration of Pubertal Activation of the Reproductive Axis by Kisspeptin in Undernutrition // *Endocrinology.* – 2005. – Vol. 146, № 9. – P. 3917-3925.
19. Wagner G.C., Johnston J.D., et al. Redefining the limits of day length responsiveness in a seasonal mammal // *Endocrinology.* - 2008. - Vol.1, № 149. – P. 32-39.
20. Moger W.H., Murphy P.R. Beta-adrenergic agonist induced androgen production during primary culture of mouse Leydig cells // *Arch. Androl.* – 1983. – Vol. 1, № 10. – P. 135-142.
21. Mayerhofer A., Bartke A., Began T. Catecholamines stimulate testicular steroidogenesis in vitro in the Siberian hamster, *Phodopus sungorus* // *Biology of reproduction.* – 1993. – Vol. 48, № 4. – P. 883-888.
22. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. – New York: Acad. Press, 1997. - 29 p.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТЕСТИКУЛАХ КРЫС ПРЕПУБЕРТАТНОГО ВОЗРАСТА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ КИССПЕПТИНА НА ФОНЕ БЛОКАДЫ И АКТИВАЦИИ АЛЬФА-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ И ПРИ ВВЕДЕНИИ МЕЛАТОНИНА

Матвиенко М.Г., Пустовалов А.С., Бузинская Н.А., Держинский Н.Э.

Установлена активация функции тестикул у крыс препубертатного возраста после введения киссептина как на фоне физиологического раствора, так и в комбинации с празозином и мелатонином. Напротив, инъекции антагониста киссептиновых рецепторов вызвали инактивацию гонад как на фоне физиологического раствора, так и в комплексе с мезатоном и мелатонином.

Ключевые слова: тестикулы, киссептин, мезатон, празозин, мелатонин.

MORPHOFUNCTIONAL CHANGES IN PREPUBERTAL RAT TESTES UNDER KISSPEPTIN INFLUENCE AGAINST BLOCKADE AND ACTIVATION OF ALPHA-ADRENERGIC RECEPTORS AND MELATONIN ADMINISTRATION

Matvienko M.G., Pustovalov A.S., Buzynska N.O., Dzerzhinsky M.E.

Activation of testicular function is revealed in prepubertal rats after kisspeptin administration both comparing to physiological solution and in combination with prazosin and melatonin. In contrast, injections of kisspeptin receptor antagonist resulted inactivation of the gonads both comparing to physiological solution and in in complex with mezaton and melatonin.

Key words: testes, kisspeptin, mezaton, prazosin, melatonin.
