

УДК 612.826.4

НЕЙРОХИМИЧЕСКИЙ РЕГУЛЯТОР РЕПРОДУКЦИИ КИССПЕПТИН КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ РЕГУЛЯТОР ЦИРКАДИАНЫХ РИТМОВ

М. А. Ткачёва, А. Н. Инюшкин

Кисспептин является важнейшим пептидом, отвечающим за половое созревание и нормальное функционирование репродуктивной системы млекопитающих и человека. Данный нейропептид стимулирует высвобождение гонадолиберина, который является носителем гормонального репродуктивного сигнала. Кроме того, имеются данные, что кисспептиновые рецепторы вовлечены в механизмы регуляции питания, метаболизма и реакции на стрессогенные факторы. Одним из слабо изученных сторон в спектре физиологической активности кисспептина является его потенциальное участие в регуляции биологических ритмов млекопитающих и человека. В работе представлены данные литературы о спектре физиологической активности кисспептина и результаты собственных электрофизиологических исследований о влиянии пептида на активность нейронов циркадианного осциллятора супрахиазматического ядра.

Ключевые слова: супрахиазматическое ядро гипоталамуса, репродуктивная система, нейропептиды, биологические ритмы.

Открытие полипептидного регулятора кисспептина произошло в 1996 году, однако сначала он рассматривался в качестве супрессора метастазов клеточных линий меланомы [1]. Впоследствии, с 2003 года, началось активное изучение кисспептина в качестве регулятора фертильности млекопитающих и человека. Высокое содержание данного полипептида сначала было обнаружено в плаценте [2; 3], а затем и в семенниках, яичниках [2]. В центральной нервной системе экспрессия кисспептина и его рецепторов осуществляется в основном в пределах гипоталамуса: аркуатном ядре и анте-рентральном перивентрикулярном ядре [4]. Функционально кисспептиновые нейроны находятся в тесном взаимодействии с нейроэндокринной системой гонадотропин релизинг-гормона (далее – ГнРГ). Кисспептин стимулирует нейроны, продуцирующие ГнРГ, что приводит к высвобождению данного гормона [5]. Помимо этого кисспептин

регулирует высвобождение лютеинизирующего гормона [6].

О непосредственной связи кисспептина с репродуктивной функцией свидетельствуют данные о том, что у людей с врожденным гипогонадотропным гипогонадизмом имеются мутации гена, кодирующего рецептор кисспептина [7]. Использование мышей с нокаутом генов, кодирующих кисспептин, позволило более подробно исследовать механизм функционирования кисспептиновой системы в период полового созревания и половой зрелости [8]. Прежде всего, у животных с данным дефектом был обнаружен гипогонадотропный гипогонадизм. Введение же кисспептина приводило к стимуляции секреции эндогенного ГнРГ [9]. В последующих исследованиях данные результаты получили новые экспериментальные подтверждения [10]. Важно отметить тот факт, что в случае наличия полиморфизма в гене рецептора кисспептина у млекопитающих и человека наблюдается преждевременное половое созревание [11].

В некоторых работах показано, что репродуктивная активность кисспептина может носить сезонный характер, что выражается в его регулирующем влиянии на сезонное воспроизведение потомства. Эта особенность полипептидного регулятора подтверждена в исследованиях на сирийских хомяках. Эксперименты проводились в условиях

© Ткачёва М. А., Инюшкин А. Н., 2016.

Ткачёва Маргарита Андреевна,

(tkachevara@mail.ru),

аспирант кафедры физиологии человека и животных;

Инюшкин Алексей Николаевич,

(ainyushkin@mail.ru),

заведующий кафедрой физиологии

человека и животных

Самарского университета,

443086, Россия, г. Самара, Московское шоссе, 34.

различного светового режима, отличавшегося продолжительностью светлого и тёмного времени суток. Увеличение продолжительности ежесуточного периода дневного освещения закономерно приводило к увеличению сексуальной активности животных [12]. При этом введение кисспептина-10 сирийским хомякам в условиях фотоингибирования (короткого светового периода), приводило к восстановлению репродуктивной активности [13]. Известно так же, что у овец репродуктивная активность повышается при небольшом увеличении светового периода, но снижается при более значительном его увеличении [14]. Установлено, что введение кисспептина в анэструс также провоцирует овуляцию [15]. Относительно недавно было показано, что подъём концентрации ГнРГ и лютеинизирующего гормона (далее – ЛГ) в ответ на введение кисспептина у овцематок более выражен в период анэструса по сравнению с лютеиновой фазой [16]. Кроме того, экспрессия кисспептина оказалась более выраженной в условиях сезонного анэструса по сравнению с сезоном репродуктивной активности [17].

В настоящее время хорошо известно, что стероидные гормоны, которые вырабатываются половыми железами, кроме своей основной гормональной функции одновременно являются нейрохимическими сигналами обратной связи с гипоталамусом. Данный контур обратной связи необходим для адекватной регуляции продукции и высвобождения ГнРГ. Рецепторы эстрогенов в этом контуре являются факторами транскрипции, и существуют в виде двух изоформ: Эра и ЭРβ. В данном случае эстрогены стимулируют продукцию и высвобождение ЛГ [18; 19]. Однако, у некоторых животных (например, у крыс) нейроны, продуцирующие ГнРГ, характеризуются дефицитом Эра [20]. Это может свидетельствовать о наличии нейрохимического посредника в цепи передачи сигнала. Таким посредником в эстроген-индуцированном выбросе ЛГ может служить кисспептин. Кроме того, было отмечено, что экспрессия кисспептина в паравентрикулярном ядре (далее – ПВЯ) крыс наиболее высока в фазу проэструса в вечернее время, в то время как уровень экспрессии кисспептина в аркуатном ядре в это время

наоборот был на самом низком уровне. Экспрессия кисспептина возрастала в ПВЯ во время выброса ЛГ у крыс с удаленными яичниками, в то время как экспрессия кисспептина в аркуатном ядре была на самом низком уровне в течение этого времени. Экспрессия кисспептина в ПВЯ способствует выбросу ЛГ; в то же время, кисспептиновые нейроны в аркуатном ядре неактивны во время выброса ЛГ. Кроме того, большинство кисспептиновых нейронов в ПВЯ и аркуатном ядре экспрессируют Эра. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что кисспептиновые нейроны в ПВЯ играют заметную роль в опосредовании сигналов эстрогена для генерации преовуляторных выбросов ЛГ у крыс [21]. Рядом исследований подтверждена роль кисспептина в регуляции секреции ЛГ. Введение экзогенного кисспептина вызывает секрецию ЛГ, что приводит к овуляции, например, у крыс [22; 23]. Кроме того, у крыс эстроген-индуцированный преовуляторный выброс ЛГ, индуцированный эстрогенами, подавляется введением антител к кисспептину [24; 25].

Наиболее выраженная экспрессия периферического кисспептина в организме была обнаружена в синцитиотрофобластных клетках плаценты [26; 27]. Прогрессивное повышение уровня кисспептина в плаценте обнаруживается по ходу увеличения срока беременности; этот уровень был до 7000 раз выше, чем у контрольной группы небеременных [28; 29]. Помимо беременности, уровень кисспептина может увеличиваться при трофобластической болезни и гестационной неоплазии трофобласта [30; 31]. Точная функция кисспептина в этих случаях остается неясной, хотя имеется предположение о том, что он может действовать в качестве регулятора активности клеток трофобласта [28]. На основании дальнейших исследований кисспептина было сделано предложение о наличии связи между уровнем кисспептина и степенью угрозы выкидыша. Было отмечено, что уровни плацентарного кисспептина были ниже у женщин с повторными выкидышами по сравнению с уровнем кисспептина в плацентарной ткани при планово прерванной беременности [32]. В результате таких исследований были сделаны предположения, что кисспептин может использовать-

ся в качестве нового потенциального маркера для выявления беременных женщин с повышенным риском выкидыша.

Хорошо известно, что масса тела может влиять на фертильность. К настоящему времени относительно подробно изучена роль ряда нейропептидных регуляторов, влияющих на вес тела и расход энергии. Один из них – лептин представляет собой пептидный регулятор, вырабатываемый адипоцитами [33]. Кроме своей наиболее известной функции – угнетающего влияния на потребление пищи, лептин может участвовать в регуляции репродукции. В частности, описаны случаи бесплодия, возникающего в условиях дефицита лептина [34; 35]. Однако, ГнРГ нейроны не имеют рецепторов для многих основных метаболических сигнальных пептидов, в том числе инсулина и лептина [36]. Предполагается, что кисспептин выполняет роль посредника между сигнализацией лептина и функцией ГнРГ нейронов. Известно, что уровень кисспептина повышается после введения экзогенного лептина [37]. В ходе исследований влияния ограничения пищевого рациона у крыс было, в частности, показано, что наблюдающееся в данных условиях уменьшение уровня гипоталамической мРНК кисспептина вызывает отсрочку в наступлении половой зрелости. Кроме того, введение кисспептина крысам с хронической его недостаточностью в препубертатном периоде в определённой степени восстанавливает скорость полового созревания [38]. Тем не менее, специфический нокаут рецепторов лептина не ингибирует размножение грызунов, и данные результаты позволяют предположить, что кисспептин не является критическим компонентом для реализации роли лептина в воспроизводстве потомства [39].

Опосредующие эффекты лептина на фертильность были исследованы также путем целенаправленных генетических манипуляций в отношении ГАМКергических (преимущественно ингибирующих) нейронов, и глутаматергических (возбуждающих) нейронов первого порядка у мышей. Было обнаружено, что у мышей с ГАМКергической ко-экспрессией наблюдается задержка полового созревания и снижение параметров репродуктивной функции, в то время как

мышь с нормальной глутаминэргической ко-экспрессией имели нормальное пубертатное развитие репродуктивной функции. Эти данные свидетельствуют о том, что лептин, регулирующий активность ГАМКергических нейронов, может передавать сигналы энергетического баланса через кисспептиновые нейроны и таким образом регулировать репродуктивную функцию [40]. В другом исследовании изучали влияние введения кисспептина на обезьянах в условиях ограниченного пищевого рациона. У обезьян, которым пища давалась по определённым часам с промежутками в 12, 18 или 24 часа, в ответ на внутривенное введение кисспептина происходило высвобождение тестостерона, хотя средний уровень тестостерона через 3 часа после инъекции был ниже у животных с режимом кормления через 18 и 24 часа по сравнению с режимом кормления через 12 часов. Кроме того, длительное голодание (18 и 24 ч) привело к задержке первоначального подъема тестостерона в ответ на инъекции кисспептина. Эти результаты свидетельствуют о том, что пост-индуцированное подавление репродуктивной оси может включать в себя ослабленную восприимчивость к эндогенному кисспептину, хотя точный механизм этого явления требует дальнейшей проверки [41].

Недавние исследования показали, что осциллятор супрахиазматического ядра гипоталамуса может задавать ритм высвобождения важнейшего полипептидного регулятора фертильности кисспептина. Помимо этих данных, был сделан ряд предположений, в том числе и о том, что кисспептин способен регулировать активность нейронов супрахиазматического ядра по принципу обратной связи, однако эти данные до сих пор не были экспериментально подтверждены. В ходе проведенного нами исследования *in vitro* на фронтальных срезах гипоталамуса крыс-самцов весом 70–120 г было исследовано влияние кисспептина на показатели спайковой активности и мембранный потенциал, а так же входное сопротивление мембраны нейронов супрахиазматического ядра гипоталамуса. Для проведения исследований, была использована техника внеклеточной регистрации спайковой активности нейронов супрахиазматического ядра. В ходе

проведенного исследования были выявлены следующие особенности: аппликация 50 нМ кисспептина в перфузионный раствор способствовала увеличению роста средней частоты генерации потенциалов действия на 0,73 имп/с ($P < 0,05$, $n = 24$). При этом одновременно с увеличением средней частоты генерации потенциалов действия, происходило снижение энтропии логарифма распределения межспайковых интервалов ($P < 0,05$). Данные результаты были свидетельством того, что происходило уменьшение степени нерегулярности генерации спайков. Исследование также включало в себя проведение пэтч-клэмп регистрации мембранного потенциала ($n = 17$). Было установлено, что при воздействии кисспептина наблюдается небольшая, но статистически значимая деполяризация мембраны на $2,2 \pm 0,7$ мВ ($P < 0,05$) при одновременном повышении входного сопротивления мембраны клеток на 131 ± 41 мОм ($P < 0,05$).

В результате исследования была подтверждена гипотеза о влиянии кисспептина на показатели активности нейронов супрахиазматического ядра. Полученные результаты в совокупности с данными об экспрессии кисспептиновых рецепторов в данном ядре позволяют сделать вывод о том, что регулятор фертильности кисспептин представляет собой нейрохимический фактор, который выполняет роль нейрохимического сигнала в петле хронобиологической циркадианной обратной связи и оказывает непосредственное влияние на функцию супрахиазматического ядра гипоталамуса.

Литература

1. KISS-1, New gene malignant melanoma metastasis suppressor human / D. X. Lee, M. E. Miele, K. K. Phillips [et al.] // *Journal of the National Cancer Institute*. 1996. 88. P. 1731–1737.
2. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor / T. Ohtaki, Y. Shintani, S. Honda [et al.] // *Nature*. 2001. Vol. 411 P. 613–617.
3. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1 / A. I. Muir, L. Chamberlain, N. A. Elshourbagy [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. P. 28969–28975.

4. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse / M. L. Gottsch, M. J. Cunningham, J. T. Smith [et al.] // *Endocrinology*. 2004. Vol. 145. P. 4073–4077.

5. Liu X., Lee K., Herbison A. E. Kisspeptin excites gonadotropin-releasing hormone neurons through a phospholipase C/calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels // *Endocrinology*. 2008. Vol. 149. P. 4605–4614.

6. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis / E. L. Thompson, M. Patterson, K. G. Murphy [et al.] // *J. Neuroendocrinol.* 2004. Vol. 16. P. 850–858.

7. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54 / N. de Roux, E. Genin, J. C. Carel [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003. Vol. 100. P. 10972–10976.

8. The GPR54 gene as a regulator of puberty / S. B. Seminara, S. Messager, E. E. Chatzidakis [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. 2003. Vol. 349. P. 1614–1627.

9. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene / X. d'Anglemon de Tassigny, L. A. Fagg, J. P. Dixon [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007. Vol. 104. P. 10714–10719.

10. Kiss1^{-/-} mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54^{-/-} mice / R. Lapatto, J. C. Pallais, D. Zhang [et al.] // *Endocrinology*. 2007. Vol. 148. P. 4927–4936.

11. Ko J. M, Lee H. S, Hwang J. S. KISS1 gene analysis in Korean girls with central precocious puberty: a polymorphism, p.P110T, suggested to exert a protective effect // *Endocr. J.* 2010. Vol. 57. P. 701–709.

12. Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters / F. G. Revel, M. Saboureau, M. M. Masson-Pevet [et al.] // *Curr. Biol.* 2006. Vol. 16. P. 1730–1735.

13. Kisspeptin and seasonality in sheep. Peptides / I. J. Clarke, J. T. Smith, A. Caraty [et al.] // 2009. Vol. 30. P. 154–163.

14. KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season / J. T. Smith, C. M. Clay, A. Caraty [et al.] // *Endocrinology*. 2007. Vol. 148. P. 1150–1157.

15. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes / A. Caraty, J. T. Smith, D. Lomet [et al.] // *Endocrinology*. 2007. Vol. 148. P. 5258–5267.
16. Seasonal variation in the gonadotropin-releasing hormone response to kisspeptin in sheep: possible kisspeptin regulation of the kisspeptin receptor / Q. Li, A. Roa, I. J. Clarke [et al.] // *Neuroendocrinology*. 2012. Vol. 96. P. 212–221.
17. Effects of pinealectomy and short day lengths on reproduction and neuronal RFRP-3, kisspeptin, and GnRH in female Turkish hamsters / D. J. Piekarski, S. G. Jarjisian, L. Perez [et al.] // *J. Biol. Rhythms*. 2014. Vol. 29. P. 181–191.
18. Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) Null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ERalpha but not ERbeta / J. F. Couse, M. M. Yates, V. R. Walker [et al.] // *Mol. Endocrinol.* 2003. Vol. 17. P. 1039–1053.
19. Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility / T. M. Wintermantel, R. E. Campbell, R. Porteous [et al.] // *Neuron*. 2006. Vol. 52. P. 271–280.
20. Herbison A. E., Theodosios D. T. Immunocytochemical identification of oestrogen receptors in preoptic neurones containing calcitonin gene-related peptide in the male and female rat // *Neuroendocrinology*. 1992. Vol. 56. P. 761–764.
21. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge / J. T. Smith, S. M. Popa, D. K. Clifton [et al.] // *J. Neurosci.* 2006. Vol. 26. P. 6687–6694.
22. Administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat / H. Matsui, Y. Takatsu, S. Kumano [et al.] // *Peripheral Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. Vol. 320. P. 383–388.
23. Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54 / V. M. Navarro, J. M. Castellano, R. Fernandez-Fernandez [et al.] // *Endocrinology*. 2005. Vol. 146. P. 156–163.
24. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats / S. Adachi, S. Yamada, Y. Takatsu [et al.] // *J. Reprod. Dev.* 2007. Vol. 53. P. 367–378.
25. Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats / M. Kinoshita, H. Tsukamura, S. Adachi [et al.] // *Endocrinology*. 2005. Vol. 146. P. 4431–4436.
26. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts / M. Bilban, N. Ghaffari-Tabrizi, E. Hintermann [et al.] // *J. Cell Sci.* 2004. Vol. 117. Pt. 8. P. 1319–1328.
27. Roseweir A. K, Katz A. A, Millar R. P. Kisspeptin-10 inhibits cell migration in vitro via a receptor-GSK3 beta-FAK feedback loop in HTR8SVneo cells // *Placenta*. 2012. Vol. 33. P. 408–415.
28. Dramatic elevation of plasma metastin concentrations in human pregnancy: metastin as a novel placenta-derived hormone in humans / Y. Horikoshi, H. Matsumoto, Y. Takatsu [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003. Vol. 88. P. 914–919.
29. Reduced levels of plasma kisspeptin during the antenatal booking visit are associated with increased risk of miscarriage / C. N. Jayasena, A. Abbara, C. Izzi-Engbeaya [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014. Vol. 99. P. 2652–2660.
30. Transcriptional expression of genes involved in cell invasion and migration by normal and tumoral trophoblast cells / J. L. Janneau, J. Maldonado-Estrada, G. Tachdjian [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002. Vol. 87. P. 5336–5339.
31. Plasma kisspeptin is raised in patients with gestational trophoblastic neoplasia and falls during treatment / W. S. Dhillon, P. Savage, K. G. Murphy [et al.] // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2006. Vol. 291. P. 878–884.
32. Expression of Kisspeptin and its receptor GPR54 in the first trimester trophoblast of women with recurrent pregnancy loss / D. W. Park, S. K. Lee, S. R. Hong [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2012. Vol. 67. P. 132–139.
33. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue / Y. Zhang,

- R. Proenca, M. Maffei [et al.] // *Nature*. 1994. Vol. 372. P. 425–432.
34. Chehab F. F., Lim M. E., Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin // *Nat. Genet.* 1996. Vol. 12. P. 318–320.
35. Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea / C. K. Welt, J. L. Chan, J. Bullen [et al.] // *N. Engl. J. Med.* 2004. Vol. 351. P. 987–997.
36. Gene networks and the neuroendocrine regulation of puberty / S. R. Ojeda, C. Dubay, A. Lomniczi [et al.] // *Mol. Cell Endocrinol.* 2010. Vol. 324. P. 3–11.
37. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse / J. T. Smith, B. V. Acohido, D. K. Clifton [et al.] // *J. Neuroendocrinol.* 2006. Vol. 18. P. 298–303.
38. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition / J. M. Castellano, V. M. Navarro, R. Fernandez-Fernandez [et al.] // *Endocrinology*. 2005. Vol. 146. P. 3917–3925.
39. Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons / J. Jr. Donato, R. M. Cravo, R. Frazao [et al.] // *J. Clin. Invest.* 2011. Vol. 121. P. 355–368.
40. Leptin-responsive GABAergic neurons regulate fertility through pathways that result in reduced kisspeptinergic tone / C. Martin, V. M. Navarro, S. Simavli [et al.] // *J. Neurosci.* 2014. Vol. 34. P. 6047–6056.
41. Primate HPT axis response to the peripheral kisspeptin challenge under different time periods of food restriction in monkeys / F. Wahab, B. Atika, T. Huma [et al.] // *Horm. Metab. Res.* 2014. Vol. 46. P. 187–192.

NEUROCHEMICAL REGULATOR OF REPRODUCTION KISSPEPTIN AS A POTENTIAL REGULATOR OF CIRCADIAN RHYTHMS

M. A. Tkacheva, A. N. Inyushkin

Kisspeptin is a most important peptide responsible for fertility and normal functioning of the reproductive system in mammals including human. The peptide stimulates a release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), which is a messenger of hormonal reproductive signal. Besides, there are evidences that kisspeptin receptors are involved in regulatory mechanisms of feeding, metabolism, and responses to stress. One of the poorly studied aspects of kisspeptin physiological activity is its potential involvement in the control of biological rhythms in mammals including human. In the paper, the data of literature on physiological activity of kisspeptin alone with own results of author's electrophysiological studies on the peptide effects on activity of neurons of the suprachiasmatic nucleus circadian oscillator are presented.

Key words: suprachiasmatic nucleus of hypothalamus, reproductive function, neuropeptides, biological rhythms.

Статья поступила в редакцию 12.09.2016 г.

© Tkacheva M. A., Inyushkin A. N., 2016.
 Tkacheva Margarita Andreevna,
 (tkachevara@mail.ru),
 postgraduate student of the Human
 and Animal Physiology Department;
 Inyushkin Alexey Nikolaevich,
 (ainyushkin@mail.ru),
 chief professor of the Human
 and Animal Physiology Department
 of the Samara University,
 443086, Russia, Samara, Moskovskoye Shosse, 34.