



УДК 591.147; 612.45; 612.4.09

ДІЯ KISSПЕПТИНУ І МЕЛАТОНІНУ НА ГОНАДИ І КОРУ НАДНИРНИКІВ САМЦІВ ЩУРІВ

Держинський М.Е., Пустовалов А.С., Пазюк Л.М., Бузинська Н.О.,
Калиновський В.Є., Катькова О.В.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка,

Навчально-науковий центр «Інститут біології»

E-mail: luba.pazuk@gmail.com

Надійшла до редакції 14.05.2011

При введенні kissпептину щурам посилюється виключно функція клітин Лейдіга у сім'яниках. При цьому мелатонін викликав вірогідне зменшення діаметрів сім'яних каналців і пригнічував останні стадії сперматогенезу, але не змінював показники клітин Лейдіга. При одночасному введенні мелатоніну і kissпептину нами виявлено водночас посилення синтетичної активності клітин Лейдіга і зменшення діаметра сім'яних каналців. На підставі цього можна припустити існування двох ланок регуляції статевої функції: стимулююча ланка kissпептин – ЛГ- клітини Лейдіга - тестостерон, пригнічуюча ланка мелатонін – ФСГ – звивисті сім'яні каналні -сперматогенез. Разом з тим встановлено інгібіторний вплив окремо для мелатоніну і kiss-пептину на синтетичну активність спонгіоцитів кори наднирників. При одночасному їх застосуванні, навпаки, у корі наднирників посилюється кортикостероїдогенез. Ймовірно отримані результати досліджень можна пояснити конкурентним впливом мелатоніну та kissпептину як на регуляторні системи головного мозку, зокрема гіпоталамус і аденогіпофіз, так і на ендокринні залози.

Ключові слова: кіспептин, мелатонін, сім'яник, кора наднирників.

ВСТУП

Відомо, що кіспептинові нейрони стимулюють функцію нейронів гіпоталамуса, що синтезують специфічний регулятор гонадотропної функції люліберин. До того ж кіспептинові нейрони експресують рецептори до андрогенів та естрогенів, які задіяні у негативному зворотному зв'язку між гонадами і гіпоталамусом. Існують дані про дію кіспептину на рівні дистальної частки аденогіпофіза. [1-5]. Інший гормон, що має неоднозначний вплив на репродуктивну систему – це мелатонін. Вважають, що мелатонін негативно впливає на статеву функцію як на рівні гіпоталамуса і гіпофіза, так і безпосередньо діючи на гонади. Його ефекти залежать також від різних факторів, зокрема години введення цього гормону, тривалості введення мелатоніну, дози введеного гормону, довжини фотоперіоду. Встановлено, що кіспептинові нейрони перебувають під впливом мелатоніну епіфіза [6-8]. Існують також припущення, що кіспептин і мелатонін ймовірно залучаються до контролю кортикостероїдогенезу [9,10].

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У досліді використано статевозрілі самці щурів лінії Вістар двомісячного віку із віварію ННЦ

«Інститут біології». Експерименти планували таким чином, що у кожній групі піддослідних тварин було 5 – 7 особин. Під час проведення дослідів всіх щурів утримували в умовах одного віварію на стандартному харчовому раціоні. Щурів кожної серії дослідів утримували в окремій клітці. Температура у віварії становила 22 – 24⁰ С.

Контрольну групу складали щури, які одержували ін'єкції 0,5 мл ізотонічного розчину хлориду натрія. Наступні серії дослідів проводили на тваринах, що одержували фармакологічні препарати: мелатонін, кіспептин, мелатонін + кіспептин. Дози фармакологічних препаратів розраховували на 100 г маси тіла. У першій серії дослідів мелатонін вводили тваринам 14 діб перорально у дозі 100 мкг. Мелатонін – це гормон, що продукується пінеалоцитами епіфіза. У другій серії дослідів кіспептин вводили за 1 добу до забою внутрішньошлуночково у дозі 10 мкг. Кіспептин – це пептид, який синтезується у нейронах гіпоталамуса. В третій серії дослідів одноразова ін'єкція kissпептину внутрішшлуночково була зроблена тваринам на тлі хронічного введення мелатоніну.

Наприкінці дослідів щурів усіх груп декапітували. Матеріал для гістологічних досліджень (сім'яники і наднирники) фіксували у 10% розчині формальдегіда. Далі залози обробляли традиційними гістологічними методиками і виготовляли гістологічні препарати.

Зрізи завтовшки 5-6 мкм забарвлювали гематоксилином Бьюера та еозином.

Функціональний стан клітин кори наднирників оцінювали за діаметром ядер спонгіоцитів, оскільки відомо про прямий зв'язок даного параметру із синтетичною активністю клітин. У сім'яниках вимірювали діаметр звивистих сім'яних каналців, який є одним з морфологічних еквівалентів сперматогенезу, і площу поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга, що синтезують тестостерон. Водночас візуально оцінювали стадії сперматогенезу.

Одержані гістологічні препарати всіх серій дослідів аналізували на світловому мікроскопі. Мікрофотографії робили за допомогою установки System Microscope з відеокамерою Olympus BX 41 system, обладнаного цифровою фотокамерою Camedia C-5050 zoom і програмним забезпеченням Olympus DP 80 FT 3.2 на базі комп'ютера Pentium 4 з операційною системою Windows XP. Обробку мікрофотографій гістологічних препаратів отриманих на цифровому аналізаторі проводили за допомогою програми Medical Image Analyser (Version 1.0 (c) 2000 Powered by Ander).

Вірогідність різниці між морфометричними показниками контрольних та піддослідних груп птахів оцінювали за t-критерієм Ст'юдента. Статистичну обробку здійснювали за допомогою програмного забезпечення STATISTICA for Windows 5.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У відповідності з метою досліджень проведено морфологічний аналіз реакції сім'яників та

наднирників двомісячник щурів при введенні кіссептину і мелатоніну.

Встановлено, що сперматогенний епітелій у звивистих сім'яних каналцях сім'яників щурів контрольної групи представлений сперматогоніями, сперматоцитами I та II порядку, сперматидами та численними зрілими сперматозоїдами. Інтерстиціальні клітини Лейдіга утворюють скупчення поблизу капілярів. Вони мають округлі світлі ядра з добре помітними ядерцями. У щурів контрольної серії дослідів середній діаметр звивистих сім'яних каналців становить $208,10 \pm 2,26$ мкм, а середня площа перерізу ядер клітин Лейдіга - $21,80 \pm 0,61$ мкм² (табл.1). Виявлені морфометричні показники свідчать про помірну секреторну активність, а стадії сперматогенезу відповідають розвитку статевозрілих тварин.

За отриманими даними введення кіссептину щурам викликало посилення функції клітин Лейдіга у сім'яниках, оскільки їх площа перерізу достовірно збільшувалась у порівнянні з контролем, але діаметр звивистих сім'яних каналців зменшувався: середній діаметр сім'яних каналців становить $205,94 \pm 2,29$ мкм порівняно з контролем $208,10 \pm 2,26$ мкм, а площа перерізу ядра клітини Лейдіга сягає $26,43 \pm 0,55$ мкм². У пінистій цитоплазмі клітин Лейдіга виявляли великі еухроматизовані округлі ядра з яскраво вираженими ядерцями, що вказує на посилення процесів стероїдогенезу. При цьому діаметр звивистих сім'яних каналців хоча зменшувався до $205,94 \pm 2,29$ мкм, але в ньому були наявні у достатній кількості зрілі спермії (табл.1).

Таблиця 1

Морфометричні показники сім'яників у контрольних та піддослідних щурів

Серії дослідів	Діаметр звивистих сім'яних каналців, мкм ²	Площа перерізу ядер клітин Лейдіга, мкм ²
Контроль	$208,10 \pm 2,26$	$21,80 \pm 0,61$
Кіссептин	$205,94 \pm 2,29^*$	$26,43 \pm 0,55^*$
Мелатонін	$193,08 \pm 2,22^*$	$22,15 \pm 0,45$
Мелатонін+кіссептин	$198,49 \pm 2,96^*$	$24,21 \pm 0,45^*$

* - різниця між контрольною та піддослідною групами вірогідна при $p \leq 0,05$

Одержані результати збігаються з літературними даними про причетність кіссептину до регуляції статевої функції у ссавців, і як ми вважаємо, через посилення синтезу ЛГ гонадотропоцитами аденогіпофіза, оскільки загальновідомо, що ЛГ стимулює секрецію тестостерона.

При цьому претендент на роль антагоніста функції гонад мелатонін викликав вірогідне зменшення діаметрів звивистих сім'яних каналців і уповільнював хід сперматогенезу, але не змінював показники клітин Лейдіга, ймовірно пригнічуючи лише синтез ФСГ гонадотропоцитами аденогіпофіза. Так встановлено, що діаметр сім'яних каналців різко зужувався до $193,08 \pm 2,22$ мкм, а площа перерізу ядер

клітин Лейдіга відповідала розмірам $22,15 \pm 0,45$ мкм² близьким до контрольних значень. У складі звивистих сім'яних каналців виявляли сперматогонії, сперматоцити I і II порядків та розрізнені малочисленні сперматозоїди. Клітини Лейдіга виглядали більш темними і мали округлі або витягнуті ядра, що говорить про посилення процесів депонування гормонів у цитоплазмі.

На підставі наведених даних можна зробити висновок про пригнічення останніх стадій сперматогенезу під впливом введення мелатоніну і появи морфологічних ознак зниження секреторної активності клітин Лейдіга.

Навпаки при сумісному введенні мелатоніну і kissпептину нами виявлено, що діаметри звивистих сім'яних каналців зменшуються до $198,49 \pm 2,96$ мкм порівняно з контролем, а площа перерізу ядер клітин Лейдіга збільшується до $24,21 \pm 0,45$ мкм² проти $21,80 \pm 0,61$ мкм² у контрольній серії досліду. Клітини Лейдіга мають світлу пінисту цитоплазму, де є округлі, світлі ядра з добре помітними ядерцями. У складі сперматогенного епітелію виявляються всі типи клітин, включаючи зрілі сперматозоїди.

Отже оскільки при одночасному введенні мелатоніну і kissпептину нами виявлено водночас посилення синтетичної активності клітин Лейдіга і зменшення діаметра сім'яних каналців можна припустити існування двох ланок регуляції статевих функцій: стимулююча ланка kissпептин – ЛГ- клітини

Лейдіга - тестостерон, пригнічуюча ланка мелатонін – ФСГ – звивисті сім'яні каналці - сперматогенез.

Аналіз гістологічних препаратів наднирників показав, що при введенні тваринам kissпептину вірогідно зменшується функціональну активність спонгіоцитів пучкової і сітчастої зони кори порівняно з контролем (табл. 2), де виробляються переважно глюкокортикоїди і незначна кількість статевих гормонів. Ці клітини були темнозбарвлені, що вказує на зниження процесів секреції гормонів.

При цьому також встановлено інгібіторний вплив мелатоніну на синтетичну активність спонгіоцитів клубочкової, пучкової і сітчастої зон кори наднирників, про що свідчать морфофункціональні дані вимірювань і відповідний стан клітин, для яких було характерна більш темна гомогенна цитоплазма, без ознак накопичення стероїдів (табл. 2).

Таблиця 2

Морфометричні показники наднирників у контрольних та піддослідних щурів

Серії досліду	Діаметри поперечного розрізу ядер спонгіоцитів кори наднирників, мкм		
	Клубочкова зона	Пучкова зона	Сітчаста зона
Контроль	$4,70 \pm 0,05$	$5,52 \pm 0,05$	$4,94 \pm 0,05$
Кісспептин	$4,65 \pm 0,05$	$5,22 \pm 0,04^*$	$4,58 \pm 0,05^*$
Мелатонін	$4,57 \pm 0,05^*$	$5,35 \pm 0,05^*$	$4,09 \pm 0,04^*$
Мелатонін+Кісспептин	$4,85 \pm 0,07^{*\diamond}$	$5,55 \pm 0,05^\diamond$	$5,20 \pm 0,06^{*\diamond}$

* - різниця між контрольною та піддослідною групами вірогідна при $p \leq 0,05$

$\diamond$ - різниця між групами мелатонін і мелатонін + кісспептин вірогідна при $p \leq 0,05$

Разом з тим при одночасному введенні піддослідним тваринам мелатоніну і kissпептину у корі наднирників переважно посилюється кортикостероїдогенез порівняно з введенням мелатоніну і контролем. Такі висновки нами зроблені на підставі достовірного збільшення площі поперечного перерізу ядер спонгіоцитів кори до $4,85 \pm 0,07$ мкм у клубочковій зоні, до $5,55 \pm 0,05$ мкм у пучковій зоні і до $5,20 \pm 0,06$ мкм у сітчастій зоні. Спонгіоцити цих зон мають пінисту цитоплазму, що свідчить про наявність ліпідних крапель, округлі еухроматизовані ядра з чіткими ядерцями, що означає посилення секреторної активності.

Вважаємо, що отримані результати досліджень про вплив мелатоніну і kissпептину на функцію наднирників можна пояснити їх конкурентним впливом на регуляторні системи головного мозку, зокрема гіпоталамус і аденогіпофіз, і складною системою взаємозв'язку між цими гормонами в організмі.

ВИСНОВКИ

При введення kissпептину щурам достовірно збільшується площа перерізу ядер клітин Лейдіга, що свідчить про посилення синтезу тестостерона. Одержані результати можна пояснити дією kissпептину на синтез ЛГ аденогіпофіза, що є

специфічним регулятором стероїдогенезу. Введення мелатоніну пригнічує останні стадії сперматогенезу і посилює процеси депонування статевих стероїдів у цитоплазмі клітин Лейдіга. Одночасне введення kissпептину і мелатоніну підтверджує попередні висновки. Отже можна припустити існування двох ланок регуляції статевих функцій: стимулююча ланка kissпептин – ЛГ- клітини Лейдіга (синтез тестостерона), пригнічуюча ланка мелатонін – ФСГ – звивисті сім'яні каналці (сперматогенез).

Разом з тим встановлено інгібіторний вплив окремо для мелатоніну і kissпептину на синтетичну активність спонгіоцитів кори наднирників. При одночасному їх застосуванні, навпаки, у корі наднирників посилюється кортикостероїдогенез. Ймовірно отримані результати досліджень можна пояснити конкурентним впливом мелатоніну та kissпептину як на регуляторні системи головного мозку, зокрема гіпоталамус і аденогіпофіз, так і на ендокринні залози.

Література

1. Colledge W. H. Kisspeptins and GnRH neuronal signaling // Trends Endocrinol. Metab. – 2009. – Vol. 20. – P.115–121.
2. Irwig M.S., Fraley G.S., Smith J.T., Acohido B.V., Popa S.M., Cunningham M.J., Gottsch M.L., Clifton D.K., Steiner R.A. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the

- male rat // *Neuroendocrinology*. – 2004. – Vol. 80. – P. 264–272.
3. Decourt C., Tillet Y., Caraty A., Franceschini I., Briant C. Kisspeptin immunoreactive neurons in the equine hypothalamus interactions with GnRH neuronal system // *J. Chem. Neuroanat.* – 2008. – Vol. 36. – P.131–137.
 4. Gutiérrez-Pascual E., Martínez-Fuentes A.J., Pinilla L., Tena-Sempere M., Malagyn M.M., Castaco J.P. Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion // *Neuroendocrinol.* – 2007. – Vol. 19. – P. 521–530.
 5. Justyna Pielecka-Fortuna, R. Anthony DeFazio, Suzanne M. Moenter. Feedback regulation and kisspeptin action on gonadotropin-releasing hormone neurons in mice // *Biol. Reprod.* – 2011. – Vol. 85. – P. 987-995.
 6. Пустовалов А.С. Вплив імунізації, введення мелатоніну, серотоніну та епіфізектомії на гіпоталамо-гонаду систему птахів (гістофізіологічний аналіз): Автореф. дис. на здобуття вч.ст. канд. біол. наук: 03.00.11. – К., 2003. – 16 с.
 7. Monica B. Frungieri, Artur Mayerhofer, Karina Zitta, Omar P. Pignataro, Ricardo S. Calandra, Silvia I. Gonzalez-Calvar. Direct effect of melatonin on syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system // *Endocrinology*. – 2005 -146: - P. 1541-1552.
 8. Nicolette L. McGuire, Kristina Kangas, George E. Bentley. Effects of melatonin on peripheral reproductive function: regulation of testicular gnih and testosterone // *Endocrinology*. – 2011. – 152, N 9. – P. 3461-3470.
 9. 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. - Vol. 147, N 3. - P 1154-1158.
 10. Oakley A.E. , Clifton D.K., Steiner R. A. Kisspeptin Signaling in the Brain // *Endocrine Reviews*. – 2009. - Vol. 30, N 6. – P. 713-743.

ДЕЙСТВИЕ КИСПЕПТИНА И МЕЛАТОНИНА НА ГОНАДЫ И КОРУ НАДПОЧЕЧНИКОВ САМЦОВ КРЫС

Дзержинський М.Е., Пустовалов А.С., Пазюк Л.М., Бузинська Н.О., Калиновський В.Є., Катькова О.В.

При введении ксипептина крысам усиливается исключительно функция клеток Лейдига в семенниках. При этом мелатонин вызывал достоверное уменьшение диаметров семенных канальцев и подавлял последние стадии сперматогенеза, но не изменял показатели клеток Лейдига. При одновременном введении мелатонина и ксипептина нами выявлено усиление синтетической активности клеток Лейдига и уменьшение диаметра семенных канальцев. На основании этого можно предположить существование двух элементов регуляции половой функции: стимулирующего (ксипептин – ЛГ – клетки Лейдига – тестостерон) и подавляющего (мелатонин – ФСГ – извитые семенные канальцы – сперматогенез). В то же время установлено ингибиторное влияние отдельно для мелатонина и ксипептина на синтетическую активность спонгиозитов коры надпочечников. При одновременном их введении, наоборот, в коре надпочечников усиливается кортикостероидогенез. Вероятно полученные результаты исследований можно объяснить конкурентным влиянием мелатонина и ксипептина как на регуляторные системы головного мозга, в частности гипоталамус и аденогипофиз, так и на эндокринные железы.

Ключевые слова: ксипептин, мела тонин, семенник, кора надпочечников.

ACTION OF KISSPEPTIN AND MELATONIN ON GONADS AND ADRENAL CORTEX OF MALE RATS

Dzerzhinsky M.E., Pustovalov A.S., Pazyuk L.M., Buzinska N.O., Kalynovskyi V.E., Katkova O.V.

Kisspeptin administration activate Leudig cells on rat testis. Thus melatonin caused decrease of diameter of testis tubules and suppress last stages of spermatogenesis, but no effect on Leudig cells. It was shown that melatonin and kisspeptin combined administration caused activate Leudig cells function and decrease of diameter of testis tubules. It was suggested two-ways regulation of rat reproductive function. The stimulate way is kisspeptin-LH-Leudig cells-testosterone. The suppress way is melatonin-FSH-testis tubules-spermatogenesis. At the same time both melatonin and kisspeptin inhibit adrenal spongiocytes. On the contrary melatonin and kisspeptin combined administration increased steroidogenesis in the adrenal cortex. It is possible that melatonin and kisspeptin have rival interactions on brain regulation level (hypothalamus and adenohipophysis) and endocrine gland directly.

Key words: kisspeptin, melatonin, testis, adrenal cortex