

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ КИССПЕПТИНОВ И ИХ РЕЦЕПТОРА В ОРГАНАХ ПЛОДА ЧЕЛОВЕКА В ПЕРИОД ВНУТРИУТРОБНОГО РАЗВИТИЯ

© 2017 г. В. Р. Родичкина^{а, б, *}, Т. С. Клейменова^б, А. О. Дробинцева^б,
В. О. Полякова^б, Р. П. Костюченко^а, И. М. Кветной^б

^аСанкт-Петербургский государственный университет
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

^бНИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта
199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3

*E-mail: rolerus@mail.ru

Поступила в редакцию 22.11.2016 г.

Известно, что кисспептины (КП) и их рецептор (KISS1R) играют важную роль во многих физиологических процессах организма, таких как половое созревание, функционирование репродуктивной системы, плацентация, секреция инсулина, сокращение сосудов. Наиболее высокий уровень кисспептинов и их рецептора наблюдается в органах гипоталамо-гипофизарно-гонадной и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой осей, как в виде иРНК, так и в виде пептида. Кисспептины были обнаружены в различных тканях организма: спинном мозге (Dun et al., 2003), поджелудочной железе (Song et al., 2014), пищеводе (Kostakis et al., 2013), надпочечниках и органах выделительной системы (Wahab et al., 2015), а также в злокачественных образованиях (Lee, Welch, 1997). Однако локализация и роль кисспептинов и их рецептора в органах при внутриутробном развитии до сих пор не изучена. При этом в различных источниках литературы встречается большое количество противоречивых данных о локализации кисспептинов и их рецепторов в органах и тканях человека, что требует отработки стандартной методики окраски препаратов. Представленная в данной работе модифицированная методика позволила выявить и оценить экспрессию кисспептинов и их рецептора в органах плода человека на разных сроках развития. Кисспептины и их рецептор были обнаружены во всех исследованных нами органах и тканях, однако степень выраженности реакции была различной. Наибольший уровень кисспептинов наблюдался в материале гипоталамуса на сроке 28–32 недели, а наименьшее количество белка было зафиксировано в материале матки на всех сроках. Максимальный уровень KISS1R выявлен в материале гипофиза на сроке 36–40 недель. Обнаружена корреляция между гестационным возрастом и уровнем кисспептинов в яичниках, матке и надпочечниках: зафиксировано достоверное увеличение количества белка. Было показано достоверное увеличение количества рецептора к кисспептинам в материале гипофиза, яичников и матки.

Ключевые слова: развитие человека, кисспептин, KISS1R, гипофиз, гипоталамус, матка, яичники, надпочечники, конфокальная микроскопия

DOI: 10.7868/S0475145017030107

ВВЕДЕНИЕ

Кисспептины: строение и локализация

Продукты генов человека и мыши *KISS1* и *Kiss1* известны как кисспептины (КП). *KISS1/Kiss1* кодируют предшественник кисспептина – пептид, состоящий из 145 аминокислотных остатков, который в дальнейшем подвергается протеолитическому расщеплению, формируя более короткие фрагменты: КП-54, КП-14, КП-13, КП-10 (West et al., 1998; Muir et al., 2001). Биологическая активность КП-54, КП-14, КП-13, КП-10 обусловлена наличием аргинина и фенилаланина на С-конце молекулы (Sonigo et al., 2012). У человека нейро-

ны, продуцирующие КП, обнаружены в гипоталамусе, а именно в базальных ганглиях и перивентрикулярной области, в то время как KISS1R нейроны расположены в гипоталамусе, базальных ганглиях, миндалинах, черном веществе среднего мозга, гиппокампе и спинном мозге (Ohtaki, 2001; Hrabovszky et al., 2010). Нейроны КП в области аркуатных (ARC) и антероперивентрикулярных (AVPV) ядер являются предполагаемыми генераторами импульсов гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ) у приматов (Ramaswamy et al., 2008). Введение антагонистов КП в эту область подавляет пульсацию ГнРГ у животных (Roseweir et al., 2009; Li et al., 2009), тем самым

предполагая, что КП нейроны формируют генератор импульсов ГнРГ. Пока остается неясным, регулируют ли КП непосредственно гипофизарную функцию. В отличие от влияния КП на секрецию лютеинизирующего гормона (ЛГ), секреция фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) в ответ на воздействие КП не настолько выражена у человека и крыс (Navarro et al., 2005; George et al., 2011).

Методом генетического нокаута генов *Kiss1* и *Kiss1R* на мышах исследователи представили убедительные доказательства того, что кисспептины играют важную роль в регуляции метастазирования рака молочной железы, жизнеспособности ооцитов, созревания фолликулов, овуляции и имплантации эмбриона (Lee, Welch, 1997).

Кисспептины и их рецепторы были обнаружены и у других видов позвоночных животных, также известно об общности процессов, регулируемых разными паралогами генов. Соответственно, система *Kiss1/Kiss1R* является эволюционно консервативной в геноме позвоночных животных (Lee et al., 2009).

Регуляция нейроэндокринно-репродуктивной оси кисспептинами

Гипоталамо-гипофизарно-гонадная и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая оси представляют собой единую систему, играющую чрезвычайно важную роль в поддержании гомеостаза и устойчивости организма к повреждениям, вызываемым стрессорными воздействиями внешней среды (Chrousos et al., 1998; Berga et al., 2003; Brun-du et al., 2006; Loon, 2015). Глюкокортикоиды негативно регулируют активность промотора ГнРГ и уменьшают транскрипцию рецепторов ГнРГ (Chandra et al., 1994), что приводит к снижению уровней циркулирующих стероидных гормонов и угнетению функции половых желез. В свою очередь тестостерон у мужчин снижает уровень циркулирующих глюкокортикоидов (Viau, Meaney, 2004), в то время как 17- β -эстрадиол имеет противоположный эффект у женщин (Weiser, Handa, 2009). Стероидные гормоны регулируют также центральную экспрессию кортиколиберина и вазопрессина, которые являются активаторами гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (Viau et al., 1999; Bingham, Viau, 2008). Таким образом, физиологическая взаимосвязь между этими двумя системами обеспечивает поддержание гомеостаза и нормального функционирования репродуктивной системы.

КП и *KISS1R* являются основными положительными регуляторами нейроэндокринно-репродуктивной оси у млекопитающих, и играют важную роль в процессах нормального полового развития и наступления половой зрелости (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003; Пальцев, Дробин-

цева, 2014). Что еще более важно, КП и *KISS1R* могут быть связующим звеном между энергетическим гомеостазом и репродуктивной системой. После полового созревания КП регулируют гипоталамо-гипофизарно-гонадную ось путем модуляции секреции гонадотропинов.

Установлено, что кисспептины действуют непосредственно на нейроны ГнРГ, вызывая секрецию ГнРГ и, соответственно, оказывая стимулирующий эффект на секрецию гонадотропинов в гипофизе (d'Anglemont de Tassigny, Colledge, 2010). В ходе многочисленных исследований было показано прямое действие кисспептинов на изолированные питуициты крысы, мыши, свиньи и коровы и их участие в регуляции экспрессии генов гонадотропинов (Gutierrez-Pascual et al., 2007; Suzuki et al., 2008; Witham et al., 2013). В дополнение к индуцируемой кисспептином транскрипции генов раннего ответа, а именно фактора раннего роста (*EGR-1*) и белка *c-fos*, в клетках гипофиза, экспрессия *Kiss1R* усиливается при эстрадиол-индуцированном выбросе ЛГ у самок мыши, тем самым демонстрируя, что КП регулирует экспрессию гипофизарных генов и, соответственно, репродуктивную функцию (Witham et al., 2013). Есть также данные (Kauffman et al., 2007), что антагонисты ГнРГ могут блокировать индуцированное кисспептином увеличение секреции гонадотропина, тем самым предполагая непосредственную активацию нейронов ГнРГ (Irwig et al., 2004; Matsui et al., 2004; Shahab et al., 2005).

В 2004 году основываясь на данных об экспрессии мРНК КП, были представлены убедительные доказательства существования сигнальной системы *Kiss1/Kiss1r* в матке и яичниках у крыс (Terao et al., 2004). Это позволило предположить, что КП способны регулировать процессы наступления и развития беременности независимо от нейроэндокринной оси. Впоследствии методами иммуногистохимии КП и *Kiss1r* были обнаружены в яичниках и яйцеводах крысы (Castellano et al., 2006; Gaytan et al., 2007; Gaytan et al., 2009), хомяка и игрунки (низшего примата) (Gaytan et al., 2009; Shahed et al., 2009), а также в яичниках, фаллопиевых трубах и матке человека (Gaytan et al., 2009; Sejudo et al., 2012).

Уровень экспрессии мРНК КП изменяется в течение эстрального цикла, причем увеличение характерно для предовуляторной фазы (Shahed et al., 2009). Кастелано и соавт. в своем исследовании показали, что предовуляторное увеличение *Kiss1* можно предотвратить путем блокирования пика гонадотропинов, а затем восстановить посредством введения хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) (Castellano et al., 2006). Индометацин (неселективный ингибитор циклооксигеназы-2), также уменьшает стимулирующее действие ХГЧ на овариальную экспрессию *KISS1* (Gaytan et al., 2009). Был исследован потенциаль-

ный механизм, лежащий в основе преждевременного угасания функции яичников у *Kiss1r* гетерозиготных мышей (Dorfman et al., 2014) и представлены доказательства того, что КП способствует выживанию ооцитов в антральных фолликулах посредством совместного действия КП и нейротрофина в клетках гранулезы. Учитывая эти данные, было предположено, что КП, синтезируемые в яичниках, влияют на стероидогенез (Castellano et al., 2006). Эти данные были подтверждены Калдер и соавт. на *Kiss1* и *Kiss1r* нокаутированных мышцах (Calder et al., 2014).

За последнее десятилетие значительные успехи были достигнуты в понимании механизма действия кисспептинов и во внедрении этих знаний в практическую медицину, например, при лечении стероидозависимых заболеваний, отсроченного или преждевременного полового созревания, субфертильности, метастатического рака (Nash et al., 2006; Nameed et al., 2011; Пальцев и др., 2014; Bhattacharya et al., 2015). Многие еще предстоит сделать, чтобы оценить, насколько важную роль играют кисспептины в регулировании некоторых из этих процессов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили архивные аутопсийные образцы тканей от 15 плодов женского пола, взятые на разных сроках внутриутробного развития (19–42 недели). По гестационным срокам материал разделяли следующим образом: 19–26 недель, 26–30 недель, 30–36 недель, 36–42 недели. В качестве объектов исследования были выбраны: гипоталамус, гипофиз, матка, яичники, надпочечники. Анализ морфофункционального состояния органов проводился с использованием клинических данных, а также заключений патоморфологических исследований, которые были проведены в лаборатории патоморфологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта. Критериями включения в исследование были случаи антенатальной гибели из-за преждевременной отслойки плаценты. Критериями исключения из исследования явились наличие инфекции и сахарного диабета всех типов у матери.

Иммунофлуоресцентное (ИФ) и иммунопероксидазное исследования проводили на парафиновых срезах. Образцы органов переносили в 10% нейтральный забуференный формалин. Проводку материала производили с помощью автоматической станции Microm STP120 (ThermoScientific, США) и заключали в парафин. Срезы ткани толщиной 4 мкм помещали на предметные стекла, покрытые пленкой из поли-L-лизина (ThermoScientific, США), высушивали препараты в течение 24 ч в термостате при температуре 37°C. Депарафинизацию осуществляли одним из двух способов: ксилолом (Вектон, Россия) и Signature

Series Clear-Rite (ThermoScientific, США). Для депарафинизации препаратов стекла помещали в емкость Шиффердекера с горизонтальной установкой на 15 мин, в случае использования ксилола, и на 25 мин, если депарафинизация осуществлялась в Signature Series Clear-Rite (ThermoScientific, США). После депарафинизации препараты необходимо тщательно промокнуть фильтровальной бумагой и поместить в емкость Шиффердекера с 95% этиловым спиртом. Далее стекла переносили в штатив для удобства дальнейших действий и промывали в кювете с дистиллированной водой в течение 20 мин при однократной смене воды. Для проведения ИГХ реакции использовали стандартный двухэтапный протокол с демаскировкой антигенов (высокотемпературной обработкой ткани) в 0.01 М цитратном буфере pH = 6.08–6.10. Контейнер со стеклами помещали в скороварку так, чтобы стекла были полностью покрыты буфером, и была исключена возможность формирования пузырей на поверхности срезов при кипячении, так как это может создать опасность получения ложноотрицательного результата. После демаскировки и далее после нанесения всех растворов использовали отмывочный буфер Wash Buffer 20× (Dako, Дания) на дистиллированной воде (1 : 20) с добавлением Tween 20 (0.5%) (AppliChem, Германия). Для ИФ блокировку неспецифического связывания также проводили одним из двух способов: 0.5% бычьим сывороточным альбумином (БСА) (БиолоТ, Россия), разведенным PBS (БиолоТ, Россия) и раствором Protein Block (Abcam, Англия). В обоих случаях стекла инкубировали в течение 10 минут во влажной камере при комнатной температуре. В методе ИГХ для блокады эндогенной пероксидазы применяли 3%-ный водный раствор пероксида водорода (15 мин). Инкубацию с первичными антителами (моноклональные антитела Anti-Kisspeptin (mouse, Abcam, Англия, 1 : 100) и Anti-KISS1R (rabbit, Abcam, Англия, 1 : 200)) производили во влажной камере в течение часа при комнатной температуре. В качестве вторичных антител для проведения ИФ реакции использовали антитела конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 647 и Alexa Fluor 488 (Abcam, Англия, 1 : 1000); инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте. Ядра клеток окрашивали Hoechst 33258 (Sigma, США) в течение 1 мин. Готовые препараты заключали под покровные стекла в монтирующую среду Fluorescent Mounting Medium (Dako, Дания). В ИГХ исследовании срезы инкубировали 30 мин с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой (Mouse and Rabbit Specific HRP Detection IHC Kit, Abcam, Англия). Выявление пероксидазы хрена проводили диаминобензидином (Dako, Дания) в течение 1 мин, проявление реакции контролировали под микроскопом. Для выявления ядер клеток использовали гематоксилин Майера: окраска в течение 1 мин при комнатной температуре с по-

следующей промывкой в горячей проточной воде. ИГХ исследование проводили дважды с приготовлением всех реактивов в день постановки. В качестве негативного контроля производили реакцию без использования первичных антител. Специфичность антител подтверждали в контрольных экспериментах.

Визуализацию результатов ИФ окрашивания осуществляли с помощью конфокального микроскопа FlueView 1000 (Olympus, Япония). Для оценки результатов иммунопероксидазного окрашивания проводили морфометрическое исследование с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящей из микроскопа Olympus BX46 (Olympus, Япония), цифровой камеры Olympus UC30 (Olympus, Япония) и программного обеспечения “CellSens Entry” (Olympus, Япония). При наличии иммуноположительной реакции на антитела измеряли площадь экспрессии. Площадь экспрессии рассчитывалась как отношение площади иммунопозитивной реакции, к общей площади ткани в поле зрения. С каждого препарата были получены 5 микрофотографий при увеличении $\times 400$.

Для проверки устойчивости флуоресцентных красителей к выгоранию хранение препаратов осуществлялось следующими способами: завернутыми в фольгу, в закрытом и в открытом планшете для стекол при комнатной температуре и в холодильнике. Для оценки свечения красителей через 3, 7 и 14 дней использовали показатель средней яркости и исследовали появление ложного, фонового свечения.

Статистический анализ проводили с использованием программ “Microsoft Excel” и “Statistica 7.0”. Проверку нормальности распределения результатов осуществляли по критерию согласия Пирсона. Для сравнения двух независимых выборок использовался непараметрический критерий Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследования был улучшен протокол окраски парафиновых срезов для флуоресцентной микроскопии. Показано, что использование Signature Series Clear-Rite, вместо ксилора, удлиняет методику, но, как известно, является менее вредным для исследователя, так как длительная и частая работа с ксилолом наносит серьезный вред кровеносной системе, слизистым оболочкам, вызывает болезни легких и кожи (Постановление Минтруда РФ от 10.05.2001 № 37). Однако в качестве недостатка стоит отметить, что при финальной дегидратации препаратов Signature Series Clear-Rite не удаляет гидрофобный карандаш, что ухудшает визуализацию препаратов.

При сравнении растворов для блокировки неспецифического связывания было показано, что действие БСА и Protein Block одинаково. Protein Block коммерческий продукт, в его составе содержится 0.5% БСА и консерванты, которые позволяют использовать его не прибегая к разведению, в отличие от раствора БСА, срок действия которого истекает спустя две недели. Однако при использовании в качестве вторичных антител системы Mouse and Rabbit Specific HRP Detection IHC Kit (Abcam, Англия), предпочтительно использовать именно ProteinBlock (Abcam, Англия).

При оценке флуоресцентного свечения через несколько дней/недель было показано, что хранение в холодильнике не отличается от хранения в закрытом планшете в темноте. Показатель средней яркости KISS1 и KISS1R уменьшался со временем, а общая средняя яркость по всему препарату увеличивалась, так как появлялось фоновое неспецифическое свечение.

Кисспептины и их рецептор были выявлены во всех изученных в рамках данного исследования органах (гипоталамус, гипофиз, матка, яичники, надпочечники). При попарном сравнении уровней белка кисспептина и KISS1R, характерных для одного органа, статистически достоверных различий обнаружено не было. Была проведена оценка уровней КП и KISS1R в органах гипоталамо-гипофизарно-гонадной и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой осей, в результате которой было показано, что наибольший уровень кисспептинов характерен для материала гипоталамуса (рис. 2) и гипофиза (рис. 1а) на сроке 28–32 недели, а наименьшее количество белка было зафиксировано в материале матки на всех сроках (рис. 2).

Статистически достоверные различия были выявлены при попарном сравнении показателей относительной площади иммунопозитивного окрашивания КП в материале матки и яичников ($p < 0.001$). Выявлена положительная корреляция между гестационным возрастом и значением показателя относительной площади экспрессии КП для материала яичников ($r = 0.92$), матки ($r = 0.87$) и надпочечников ($r = 0.81$), где с увеличением гестационного возраста увеличивалась площадь экспрессии кисспептинов.

При сравнении значений относительной площади окрашивания KISS1R в гипоталамусе, гипофизе, матке, яичниках и надпочечниках статистически достоверных различий выявлено не было (рис. 3).

Важно отметить, что наибольший уровень KISS1R выявлен в материале гипофиза на сроке 36–40 недель (рис. 1б). Для материала гипоталамуса и надпочечников максимальное значение относительной площади окрашивания было на сроке гестации 30 недель (рис. 3). Положительная корреляция между гестационным возрастом и уровнями

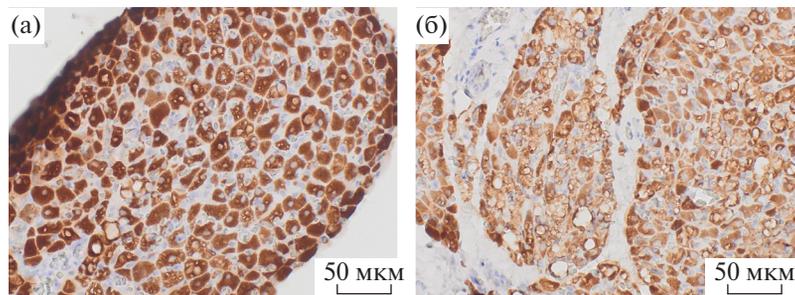


Рис. 1. Иммуногистохимическая реакция на антитела к КП (а) и KISS1R (б) в ткани гипофиза на 30 неделе внутриутробного развития, докрасивание ядер гематоксилином, $\times 400$. Данная иллюстрация выбрана в качестве демонстрации наиболее сильной реакции на антитела к КП и KISS1R.

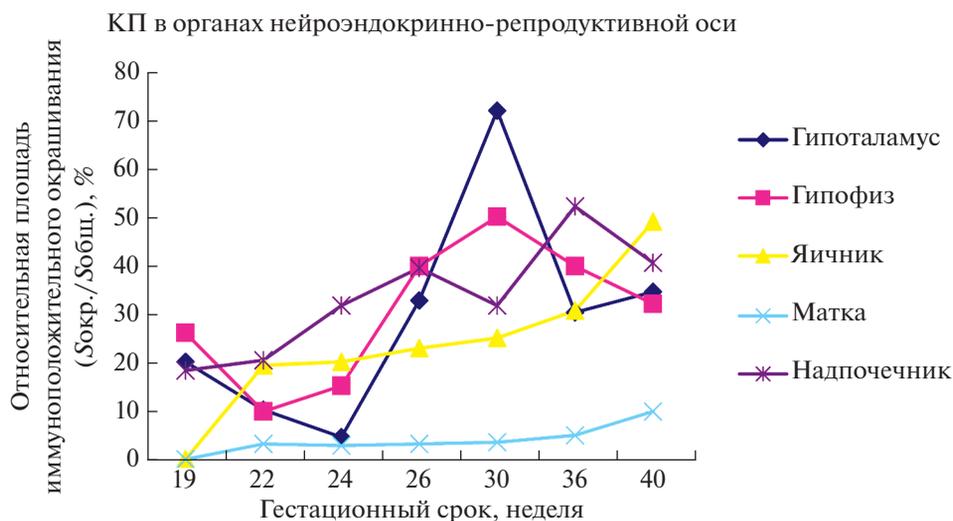


Рис. 2. Сравнение значений относительной площади окрашивания КП в центральных звеньях гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси.

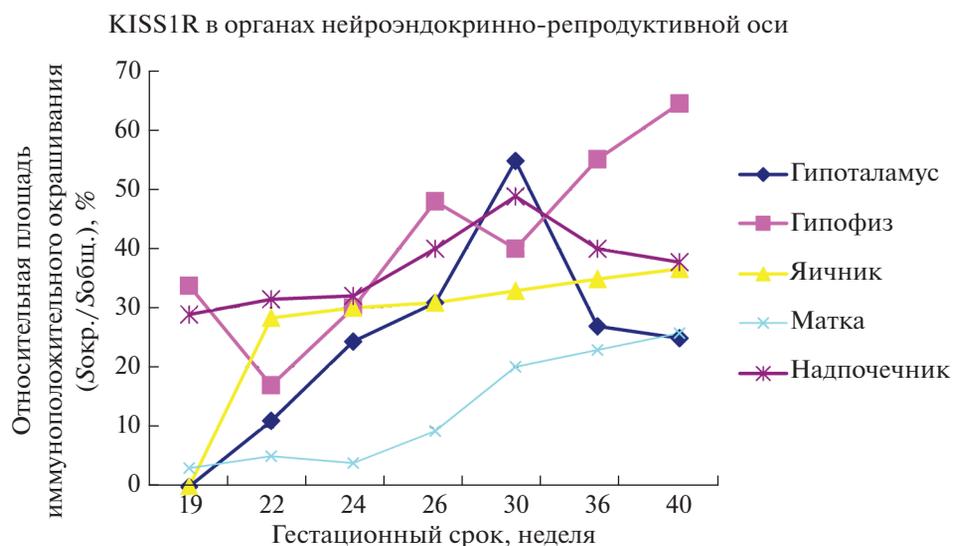


Рис. 3. Сравнение значений относительной площади окрашивания KISS1R в центральных звеньях гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси.

относительной площади окрашивания KISS1R наблюдалась в материале гипофиза ($r = 0.86$), яичников ($r = 0.99$) и матки ($r = 0.96$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Кисспептин и его рецептор были выявлены во всех изученных органах. При сравнении уровней экспрессии KISS1 и KISS1R, характерных для одного органа, статистически достоверных различий обнаружено не было. Анализ данных относительной площади окрашивания КП и KISS1R в органах гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси показал, что максимальный уровень экспрессии КП зарегистрирован в ткани гипоталамуса на 28–32 неделе внутриутробного развития, а минимальный – в ткани матки на всех сроках гестации. Вероятно, это связано с тем, что матка не принимает участия в гормональной регуляции процессов во время внутриутробного развития. Оценка экспрессии KISS1 и KISS1R в органах нейроэндокринно-гонадной оси выявила статистически достоверные различия при попарном сравнении показателей относительной площади иммунопозитивного окрашивания КП в ткани матки ($p < 0.001$).

На 30 неделе внутриутробного развития в ткани гипоталамуса, гипофиза, надпочечников зарегистрированы максимальные значения показателя относительной площади экспрессии KISS1 и KISS1R. Резкое снижение экспрессии KISS1 на данном сроке зафиксировано в ткани надпочечников, а KISS1R – в ткани гипофиза. Согласно данным литературы, эстрогены коры надпочечников у плодов женского пола способствуют развитию матки, влагалища, наружных половых органов (Курепина, 2014). Возможно, с этим связано снижение параметров относительной площади иммуноположительного окрашивания КП в ткани надпочечников в конце второго триместра беременности, что, вероятно, обусловлено участием КП в синтезе стероидных гормонов и процессах развития репродуктивной системы плода. Корреляция между гестационным возрастом и значениями параметра относительной площади иммуноположительного окрашивания КП характерна для ткани яичников ($r = 0.92$), матки ($r = 0.87$) и надпочечников ($r = 0.81$), а KISS1R – для ткани гипофиза ($r = 0.86$), яичников ($r = 0.99$) и матки ($r = 0.96$). Это может быть обусловлено участием кисспептинов в регуляции формирования органов репродуктивной системы и синхронизации работы нейроэндокринно-репродуктивной оси.

Исследования проведены с использованием оборудования ресурсного центра Научного парка СПбГУ “Развитие молекулярных и клеточных технологий”, а также при поддержке гранта Президента РФ (№ МД-6001.2016.7).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Карлсон Б. Основы эмбриологии по Пэттену: Пер. с англ. // Под ред. Колюхова Б.В. М.: Мир, 1983. Т. 2. С. 390.
- Курепина М.М., Ожигова А.П., Никитина А.А. Анатомия человека. М.: Гуманитар. Изд. ВЛАДОС, 2014. С. 374–375.
- Пальцев М.А., Дробинцева А.О., Полякова В.О. и др. Кисспептины – новое семейство регуляторных пептидов: роль в молекулярных механизмах патологии человека // Molmed (Russia). 2014. № 6. С. 3–9.
- Рыжавский Б.Я., Яковенко О.Б. Некоторые факторы, влияющие на развитие надпочечников плодов человека // Акуш. и гин. 1999. № 4. С. 38–41.
- Тиктинский О.Л., Михайличенко В.В. Андрология. СПб: Медиа Пресс, 1999. С. 274–298.
- Тонков В.Н. Учебник нормальной анатомии человека. М.: Книга по Требованию. 2013. С. 782.
- Baker T.G. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries // Proc. R. SocLond. B. BiolSci.. 1963. № 158. P. 417–433.
- Berga S.L., Marcus M.D., Loucks T.L. et al. Recovery of ovarian activity in women with functional hypothalamic amenorrhea who were treated with cognitive behavior therapy // Fertil. Steril. 2003. № 80. P. 976–981.
- Bhattacharya M., Babwah A.V. Kisspeptin: beyond the brain // Endocr. J. 2015. V. 156. № 4. P. 1218–1227.
- Brundu B., Loucks T.L., Adler L.J. et al. Increased cortisol in the cerebrospinal fluid of women with functional hypothalamic amenorrhea // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2006. № 91. P. 1561–1565.
- Calder M., Chan Y.M., Raj R. et al. Implantation failure in female Kiss1–/– mice is independent of their hypogonadic state and can be partially rescued by leukemia inhibitory factor // Endocr. J. 2014. № 155. P. 3065–3078.
- Castaño J.P., Martínez-Fuentes A.J., Gutiérrez-Pascual E. et al. Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: do multiple signals underlie function diversity? // Peptides. 2009. V. 30. № 1. P. 10–15.
- Castellano J.M., Gaytan M., Roa J. et al. Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? // Endocr. J. 2006. № 147. P. 4852–4862.
- Cejudo R.A., Pinto F.M., Dorta I. et al. Analysis of the expression of neurokinin B, kisspeptin, and their cognate receptors NK3R and KISS1R in the human female genital tract // Fertil. Steril. 2012. № 97. P. 1213–1219.
- Chandra U.R., Attardi B., Friedman R. et al. Glucocorticoid receptor-mediated repression of gonadotropin-releasing hormone promoter activity in GT1 hypothalamic cell lines // Endocr. J. 1994. № 134. P. 1467–1474.
- Chrousos G.P., Torpy D.J., Gold P.W. Interactions between the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications // Ann. Intern. Med. 1998. № 129. P. 229–240.
- d'Anglemont de Tassigny X., Colledge W.H. The role of kisspeptin signaling in reproduction // Physiology (Bethesda). 2010. V. 25. № 4. P. 207–217.
- de Roux N., Genin E., Carel J.C. et al. Hypogonadotropichypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. № 100. P. 10972–10976.

- Dorfman M.D., Garcia-Rudaz C., Alderman Z. et al.* Loss of Ntrk2/Kiss1r signaling in oocytes causes premature ovarian failure // *Endocr. J.* 2014. № 155. P. 3098–3111.
- Doskocil M.* The study of the proliferative activity of cells of Rathke's pouch and its surroundings in the chick ontogenesis // *Folia Morphol.* 1966. № 14. P. 107–116.
- Dun S.L., Brailoiu G.C., Parsons A. et al.* Metastin-like immunoreactivity in the rat medulla oblongata and spinal cord // *Neurosci. Lett.* 2003. V. 335. № 3. P. 197–201.
- Eng Loon Tng.* Kisspeptin signaling and its roles in humans // *Singapore Med. J.* 2015. V. 56. № 12. P. 649–656.
- George J.T., Veldhuis J.D., Roseweir A.K. et al.* Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011. № 96. P. 1228–1236.
- Gutierrez-Pascual E., Martínez-Fuentes A.J., Pinilla L. et al.* Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion // *J. Neuroendocrinol.* 2007. № 19. P. 521–530.
- Gaytan F., Gaytán M., Castellano J.M. et al.* KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KISS1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009. № 296. P. 520–531.
- Gaytan M., Castellano J.M., Roa J. et al.* Expression of KiSS-1 in rat oviduct: possible involvement in prevention of ectopic implantation? // *Cell Tissue Res.* 2007. № 329. P. 571–579.
- Hameed S., Jayasena C.N., Dhillon W.S.* Kisspeptin and fertility // *Endocr. J.* 2011. № 208. P. 97–105.
- Hrabovszky E., Ciofi P., Vida B. et al.* The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons // *Eur. J. Neurosci.* 2010. № 31. P. 1984–1998.
- Irwig M.S., Fraley G.S., Smith J.T. et al.* Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KISS1 mRNA in the male rat // *Neuroendocrinology.* 2004. № 80. P. 264–272.
- Kauffman A.S., Clifton D.K., Steiner R.A.* Emerging ideas about kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction // *Trends Neurosci. Educ.* 2007. № 30. P. 504–511.
- Kostakis I.D., Agrogiannis G., Vaiopoulos A.G. et al.* KISS1 expression in colorectal cancer // *APMIS.* 2013. V. 121. № 10. P. 1004–1010.
- Song W.-J., Mondal P., Wolfe A. et al.* Glucagon regulates hepatic kisspeptin to impair insulin secretion // *Cell Metab.* 2014. № 4. P. 667–681.
- Lee J.H., Welch D.R.* Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene *KiSS-1* // *Cancer Res.* 1997. № 57. P. 2384–2387.
- Lee Y.R., Tsunekawa K., Moon M.J. et al.* Molecular evolution of multiple forms of kisspeptins and GPR54 receptors in vertebrates // *Endocr. J.* 2009. V. 150. № 6. P. 2837–2846.
- Li X.F., Kinsey-Jones J.S., Cheng Y. et al.* Kisspeptin signaling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates GnRH pulse generator frequency in the rat // *PLoS One.* 2009. № 4.
- Matsui H., Takatsu Y., Kumano S. et al.* Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. № 320. P. 383–388.
- Moore K.L.* *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology.* 4th ed. Saunders Comp. Harcourt Brace Jovanovich, Inc., 1988.
- Musumeci G., Castorina S., Castrogiovanni P. et al.* A journey through the pituitary gland: Development, structure and function, with emphasis on embryo-fetal and later development // *Acta Histochem.* 2015. V. 117. № 4–5. P. 355–366.
- Muir A.I., Chamberlain L., Elshourbagy N.A. et al.* AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1 // *J. Biol. Chem.* 2001. № 276. P. 28969–28975.
- Nakamura Y. et al.* Metastin stimulates aldosterone synthesis in human adrenal cells // *Reprod. Sci.* 2007. V. 14. № 8. P. 836–845.
- Navarro V.M., Castellano J.M., Fernández-Fernández R. et al.* Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat // *Endocr. J.* 2005. № 146. P. 1689–1697.
- Nash K.T., Welch D.R.* The KISS1 metastasis suppressor: mechanistic insights and clinical utility // *Front Biosci.* 2006. № 11. P. 647–659.
- Ohtaki T., Shintani Y., Honda S. et al.* Metastasis suppressor gene *KiSS-1* encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor // *Nature.* 2001. № 411. P. 613–617.
- O'Rahilly R., Muller F.* Developmental stages in human embryos: Including a revision of Streeter's "Horizons" and Survey of the Carnegie collection // *Contrib. Embryol. Carneg. Inst.* 1987. № 637. P. 65–201.
- Ramaswamy S., Guerriero K.A., Gibbs R.B. et al.* Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy // *Endocr. J.* 2008. № 149. P. 4387–4395.
- Rathke H.* Über die entstehung der glandulapituitaria // *Arch. Anat. Physiol. Wissen. Med.* 1838. № 5. P. 482–485.
- Roseweir A.K., Kauffman A.S., Smith J.T. et al.* Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation // *J. Neurosci.* 2009. № 29. P. 3920–3929.
- Seminara S.B., Messenger S., Chatzidaki E.E. et al.* The *GPR54* gene as a regulator of puberty // *N. Engl. J. Med.* 2003. V. 3. № 49. P. 1614–1627.
- Shahab M., Mastronardi C., Seminara S.B. et al.* Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. № 102. P. 2129–2134.
- Schwind J.L.* The development of the hypophysiscerebri of the albino rat // *Amer. J. Anat.* 1928. № 41. P. 295–315.
- Sonigo C., Binart N.* Overview of the impact of kisspeptin on reproductive function // *Ann. Endocrinol. (Paris).* 2012. V. 73. № 5. P. 448–548.
- Shahed A., Young K.A.* Differential ovarian expression of *KiSS-1* and *GPR-54* during the estrous cycle and photo-period induced recrudescence in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*) // *Mol. Reprod. Dev.* 2009. № 76. P. 444–452.

- Suzuki S., Kadokawa H., Hashizume T.* Direct kisspeptin-10 stimulation on luteinizing hormone secretion from bovine and porcine anterior pituitary cells // *Anim. Reprod. Sci.* 2008. № 103. P. 360–365.
- Takahashi K., Shoji I., Shibasaki A. et al.* Presence of Kisspeptin-like immunoreactivity in human adrenal glands and adrenal tumor // *J. Mol. Neurosci.* 2010. № 41. P. 138–144.
- Terao Y., Kumano S., Takatsu Y. et al.* Expression of *KiSS-1*, a metastasis suppressor gene, in trophoblastic giant cells of the rat placenta // *Biochim. Biophys. Acta.* 2004. № 1678. P. 102–110.
- Viau V., Chu A., Soriano L. et al.* Independent and overlapping effects of corticosterone and testosterone on corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and stress-induced adrenocorticotrophic hormone release // *J. Neurosci.* 1999. № 19. P. 6684–6693.
- Viau V., Meaney M.J.* Testosterone-dependent variations in plasma and intrapituitary corticosteroid binding globulin and stress hypothalamic–pituitary–adrenal activity in the male rat // *J. Endocrinol.* 2004. № 181. P. 223–231.
- Wahab F., Atika B., Shahab M. et al.* Kisspeptin signaling in the physiology and pathophysiology of the urogenital system // *Nat. Rev. Urol.* 2015. № 13. P. 21–32.
- Weiser M.J., Handa R.J.* Estrogen impairs glucocorticoid dependent negative feedback on the hypothalamic–pituitary–adrenal axis via estrogen receptor alpha within the hypothalamus // *Nat. Neurosci.* 2009. № 159. P. 883–895.
- West A., Vojta P.J., Welch D.R. et al.* Chromosome localization and genomic structure of the *KiSS-1* metastasis suppressor gene (*KISS1*) // *Genomics.* 1998. № 54. P. 145–148.
- Witham E.A., Meadows J.D., Hoffmann H.M. et al.* Kisspeptin regulates gonadotropin genes via immediate early gene induction in pituitary gonadotropes // *Mol. Endocrinol.* 2013. № 27. P. 1283–1294.

Immunohistochemical Verification of Kisspeptins and Their Receptor in Human Fetal Organs during Prenatal Development

V. R. Rodichkina^{a, b, *}, T. S. Kleimenova^b, A. O. Drobintseva^b,
V. O. Polyakova^b, R. P. Kostyuchenko^a, and I. M. Kvetnoi^b

^aSt. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

^bOtt Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Science, St. Petersburg, 3199034 Russia

*e-mail: rolerus@mail.ru

Received November 22, 2016

Kisspeptins (KPs) and their receptor (KISS1R) play an important role in many physiological processes in the body, such as sexual maturation, reproductive system functioning, placentation, insulin secretion, and vasoconstriction. The highest level of kisspeptins and their receptor is observed in the organs of hypothalamic-pituitary-gonadal and hypothalamic-pituitary-adrenal axes, both in the form of mRNA and peptide. Kisspeptins are found in various body tissues: spinal cord (Dun et al., 2003), pancreas (Song et al., 2014), esophagus (Kostakis et al., 2013), adrenal glands and secretory system organs (Wahab et al., 2015), and in malignancies (Lee and Welch, 1997). However, the localization and the role of kisspeptins and their receptor in organs during fetal development have not yet been studied. At the same time, ample published data regarding the localization of kisspeptins and their receptors in human organs and tissues are discrepant, which requires the development of a standard staining technique. The modified technique presented in this paper made it possible to identify and evaluate the expression of kisspeptins and their receptor in human fetal organs at different stages of development. Kisspeptins and their receptors were found in all organs and tissues examined by us, but the degree of reaction was different. The highest level was observed in the hypothalamus material in the 28–32-week period, and the lowest amount of the protein was detected in the uterine material at all stages. Maximum level of KISS1R was detected in the pituitary material in the 36–40-week period. A correlation between gestational age and the level of kisspeptins in the ovaries, uterus, and adrenal glands was found: a significant increase in the amount of protein was detected. A significant increase in the amount of the kisspeptin receptor in pituitary, ovary, and uterus material was shown.

Keywords: human development, kisspeptin, KISS1R, pituitary gland, hypothalamus, uterus, ovaries, adrenal glands, confocal microscopy