

©Коллектив авторов

## ДИНАМИКА КОРТИЗОЛА У РЫБ *Danio rerio* ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СИНТЕТИЧЕСКОГО АНАЛОГА КИССПЕПТИНА 1

А.А. Нуэнова<sup>1,2\*</sup>, М.И. Костина<sup>1,2</sup>, А.А. Блаженко<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Отдел нейрофармакологии им. С.В.Аничкова, Институт Экспериментальной Медицины, 197022, Санкт-Петербург, улица Академика Павлова, 12; \*эл. почта: lin.panaiotis@yandex.ru

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет им. Петра Великого, Санкт-Петербург

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург

Исследовали воздействие синтетического аналога кисспептина 1 — пептида, участвующего в регуляции гипоталамо-гипофизарно-гонадной (ГГГ) стрессовой оси, — на уровень кортизола рыб *Danio rerio*. Кисспептин 1 вводили в дозах 2 мкг/кг и 8 мкг/кг с последующим покоем в течение 1 ч и 4 ч. Мы выяснили, что кисспептин в дозах 2 мкг/кг и 8 мкг/кг способствует повышению уровня кортизола, и значительный его всплеск приходится на 1 ч после инъекции.

**Ключевые слова:** кисспептин 1; *Danio rerio*; кортизол; гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось

**DOI:** 10.18097/PBMC20247003176

### ВВЕДЕНИЕ

Кисспептин — пептид, играющий существенную роль в регуляции гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси (ГГГ). Большинство нейронов, экспрессирующих кисспептин, находится в ростральной перивентрикулярной области третьего желудочка (RP3V) и дугообразном ядре (ARC) гипоталамуса [1]. Однако нейроны кисспептина имеют проекции и в другие области мозга, в том числе и перивентрикулярное ядро (AVPV) гипоталамуса [2], что позволяет сделать предположение о влиянии кисспептина на гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую (ГГН) ось [3]. Также сообщалось и о проекции нейронов кортикотропин-релизинг гормона (КРГ) на кисспептиновые нейроны [4]. В одной из первых работ, связанных с влиянием ГГН на кисспептин, было высказано предположение о том, что хронический или острый стресс приводит к снижению кисспептина, что объясняет подавление выработки лютеинизирующего гормона (ЛГ) [5].

В настоящее время кисспептин рассматривается как потенциальное фармакологическое средство при борьбе с заболеваниями репродуктивной системы, такими, как гипогонадотропный гипогонадизм, синдром поликистозных яичников и др. Также имеются основания рассмотреть его анксиогенный либо анксиолитический эффект.

Нуклеотидные последовательности генов кисспептина эволюционно консервативны и наблюдаются у многих позвоночных, в том числе млекопитающих. У *Danio rerio* (Гамильтон, 1822) идентифицированы два паралогичных кисспептина: *kiss1* и *kiss2*, из которых *kiss1* является ортологом единственного гена кисспептина человека [6]. У этих рыб мРНК *kiss1* найдены в вентральной области хабенулы, считающейся гомологичной латеральной области хабенулы

у млекопитающих [7]. Показано, что и у приматов, и у *D. rerio* хабенула вовлечена в нейромодуляцию дофамина и серотонина и таким образом связана со стрессовой реакцией [8, 9] и, соответственно, с ГГН осью.

Предшественник этого кисспептина состоит из 145 аминокислотных остатков (а.о.), и протеолитически расщепляется на изоформы, состоящие из 54, 14, 13 и 10 а.о. Наиболее короткие последовательности имеют самое высокое сродство к рецептору [10].

Длина синтетического аналога кисспептина соответствует изоформе из 13 а.о. Характер посттрансляционных модификаций аналогичен соответствующим молекулярным превращениям кисспептина человека. Данное соединение имитирует природный функциональный пептид у *D. rerio*, но получено путём твердофазного пептидного синтеза. В дальнейшем под аналогом кисспептина 1 будет подразумеваться синтетическая изоформа, состоящая из 13 а.о.

Целью данной работы было исследование динамики изменения кортизола как маркера активности ГГН на действие синтетического аналога кисспептина 1 у рыб *D. rerio*.

### МЕТОДИКА

Синтетический аналог кисспептина 1 был получен путём твердофазного пептидного синтеза с использованием защитных Fmoc-групп [11]. Чистота препарата составляет более 98%. В исследовании участвовали 6 групп рыб *D. rerio*.

Четырём опытным группам вводили 1 мкл пептида, контрольным — 1 мкл раствора 0,9% NaCl. Доза и длительность последующей экспозиции указана в таблице.

Таблица. Характеристика групп и соответствующих способов воздействий

Группа		Количество особей в группе	Вводимое вещество и время экспозиции
G0	G0.1	12	0,9% NaCl, 1 час
	G0.4	12	0,9% NaCl, 4 часа
G2	G2.1	8	Синтетический аналог кисспептина 1 в дозе 2 мкг/кг, 1 час
	G2.4	6	Синтетический аналог кисспептина 1 в дозе 2 мкг/кг, 4 часа
G8	G8.1	8	Синтетический аналог кисспептина 1 в дозе 8 мкг/кг, 1 час
	G8.4	7	Синтетический аналог кисспептина 1 в дозе 8 мкг/кг, 4 часа

Для процедур анестезии и фиксации рыбы *D. rerio* использовали лидокаин 6% (“Синтез”, Россия), который доводили до концентрации 40 мг/л. Рыбу помещали в этот раствор на 5–6 мин [12], затем фиксировали и вводили 1 мл раствора кисспептина интрацеребрально с помощью шприца, после чего оставляли в ёмкости со стандартной аквариумной водой (рН в пределах 6,8–8,5, температура 21–22°C, нитраты — менее 200 мг/л, углекислый газ — не более 20 мг/л, жёсткость воды — 75–200 мг/л, нитриты отсутствуют, растворённый кислород — не менее 4 мг/л) — на 1 ч или 4 ч. По окончании воздействий выводили из эксперимента и производили отбор хвостового мускула.

#### Гомогенизация образцов

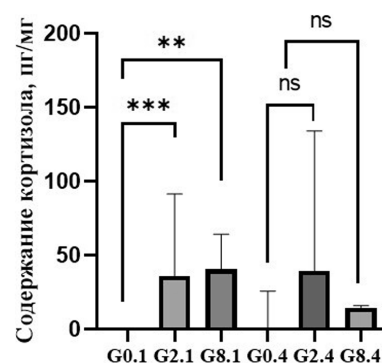
Криогенную гомогенизацию отобранных тканей проводили с использованием криогенной вибрационной мельницы Cryomil (“Retsch”, Германия) при температуре -198°C в течение 8 мин при 25 с<sup>-1</sup>. Охлаждение биоматериала проводили с подачей жидкого азота. Полученный гомогенат ткани разводили в 620 мкл калий-натрий-фосфатного буфера, рН 7,4 (хлорид натрия — 136 мМ, хлорид калия — 2 мМ, фосфатный буфер — 10 мМ).

#### Проведение иммуноферментного анализа (ИФА)

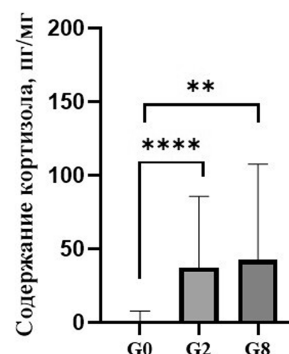
Для определения содержания кортизола использовали тест-систему ИФА “Алкор Био” (Россия). Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм с помощью фотометра Reader Synergy 2 (“Biotek”, США). Измерение общего содержания белка проводили с использованием метода Бредфорда. Содержание кортизола из расчёта на общий белок определяли с помощью пакета программ Elisa calculator (“arigo Biolaboratories Corp.”, Тайвань).

#### Статистическая обработка данных

Для статистической обработки данных использовали GraphPad Prism 8.0. В качестве проверки на нормальность использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Дальнейшую обработку с целью выявления значимых различий между опытными и контрольными группами проводили с помощью критерия Манна-Уитни и Краскела-Уоллиса с критерием множественных сравнений Данна. Статистические решения принимали на 5% уровне значимости. Данные представлены как медиана с интерквартильным разбросом (Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>).



**Рисунок 1.** Содержание кортизола в хвостовом мускуле *Danio rerio* через 1 ч и 4 ч после инъекции синтетического аналога кисспептина 1 в зависимости от дозы введённого вещества, пг/мг общего белка, медиана и межквартильное расстояние по Q<sub>3</sub>. \*\* –  $p < 0,01$  \*\*\* –  $p < 0,001$ .



**Рисунок 2.** Максимальное содержание кортизола в хвостовом мускуле *D. rerio* в зависимости от дозы введённого аналога кисспептина, пг/мг общего белка, медиана и межквартильное расстояние по Q<sub>3</sub>. \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\*\* –  $p < 0,0001$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы обнаружили статистически значимое увеличение уровня кортизола у опытных групп в сравнении с контрольной группой G0.1 (рис. 1). При этом отличий между опытными группами обнаружено не было.

Статистически значимых различий между группами, которых оставляли в покое в течение 4 ч после инъекции, обнаружено не было (рис. 1).

Сравнивая изменения уровня кортизола при различных дозах кисспептина 1 вне зависимости от последующего времени покоя, мы зафиксировали увеличение (рис. 2) секреции кортизола у групп G2 и G8 относительно контрольной группы.

При сравнении групп с различным временем покоя, но одинаковой дозе введенного кисспептина 1, статистически значимых изменений в уровне кортизола не зафиксировали. Следовательно, при введении кисспептина 1 максимальный регистрируемый уровень кортизола в хвостовом мускуле *D. rerio* не зависит от последующей временной экспозиции.

Таким образом, можно заключить, что под воздействием кисспептина 1, введенного в дозах 2 мкг/кг и 8 мкг/кг наблюдается увеличение уровня кортизола в хвостовом мускуле *D. rerio* относительно контроля. Более интенсивная секреция кортизола происходит в первый час после инъекции, в то время как спустя 4 ч после введения кисспептин 1, вероятно, не вносит вклад в изменение уровня гормона стресса. Нами показано, что временной фактор при одинаковой дозе препарата также не вносит вклад в изменение уровня кортизола.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами результаты указывают на повышение уровня кортизола при обеих дозах введенного аналога кисспептина 1. Значительное влияние препарата заметно через 1 ч после инъекции, а уровень кортизола возрастает с дозой препарата. Через 4 ч после введения эффект кисспептина 1 не зафиксировали. Таким образом, в нашем исследовании мы наблюдаем действие синтетического аналога кисспептина 1 на выброс кортизола.

Стимулирующий стрессовую ось эффект кисспептина также продемонстрировали Delmas и соавт. на самцах мышей с нокаутным геном рецептора кисспептина [13]. При интрацереброваскулярном введении кисспептина 8 и кисспептина 13 у крыс также наблюдали повышенную секрецию кортикостерона [14, 15]. Имеются и противоположные данные о том, что стресс в различных его вариациях (иммунный, психосоциальный и др.) способствует снижению мРНК кисспептина 1 гипоталамуса у крыс [16].

Однако показано, что добавление аналога кисспептина 1 в воду приводит к уменьшению тревожности у *D. rerio* [17]. В данном случае, вероятно, различия можно объяснить способом введения препарата и его долей попадания в мишень. Таким образом, доступные нам источники подтверждают сделанный нами вывод о фармакологическом действии кисспептина при интрацеребральном введении. Исходя из опубликованных Гольц и соавт. результатов, можно сделать предположение, что при инъекциях более низких доз можно достичь сниженного уровня стрессового гормона.

При обсуждении действия кисспептина также упоминалась возможность горметической реакции стрессовой оси [16], что косвенно подкрепляет предположение о вариативном эффекте нейропептида в зависимости от его дозы. Результаты нашего исследования на рыбах *Danio rerio* согласуются с таковыми у млекопитающих, однако механизм взаимодействия кисспептина 1 и ГГН в дальнейшем должен быть изучен более подробно.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, введение синтетического аналога кисспептина 1 в дозах 2 мкг/кг и 8 мкг/кг приводит к повышению кортизола в хвостовом мускуле рыб *D. rerio*; при этом значительное увеличение уровня этого гормона происходит через 1 ч после инъекции.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность старшему научному сотруднику Отдела нейрофармакологии Института экспериментальной медицины (ИЭМ) Хохлову П.П. за ценные консультации при интерпретации результатов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках государственного задания Минобрнауки России (2022–2025 гг.) “Поиск молекулярных мишеней для фармакологического воздействия при аддиктивных и нейроэндокринных нарушениях и создание новых фармакологически активных веществ, действующих на рецепторы ЦНС”, шифр FGWG-2022-0004.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными одобрены локальным этическим комитетом ИЭМ (протокол № 12 от 26.09.2019).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Harter C.J.L., Kavanagh G.S., Smith J.T. (2018) The role of kisspeptin neurons in reproduction and metabolism. *J. Endocrinol.*, **238**(3), R173–R183. DOI: 10.1530/JOE-18-0108
2. Prashar V., Arora T., Singh R., Sharma A., Parkash J. (2023) Hypothalamic kisspeptin neurons: integral elements of the GnRH system. *Reproductive Sciences*, **30**(3), 802–822. DOI: 10.1007/s43032-022-01027-5
3. Rao Y.S., Mott N.N., Pak T.R. (2011) Effects of kisspeptin on parameters of the HPA axis. *Endocrine*, **39**(3), 220–228. DOI: 10.1007/s12020-011-9439-4
4. Ozawa H. (2022) Kisspeptin neurons as an integration center of reproductive regulation: Observation of reproductive function based on a new concept of reproductive regulatory nervous system. *Reprod. Med. Biol.*, **21**(1), e12419. DOI: 10.1002/rmb2.12419
5. Kinsey-Jones J.S., Li X.F., Knox A.M.I., Wilkinson E.S., Zhu X.L., Chaudhary A.A., Milligan S.R., Lightman S.L., O'Byrne K.T. (2009) Down-regulation of hypothalamic kisspeptin and its receptor, kiss1r, mRNA expression is associated with stress-induced suppression of luteinising hormone secretion in the female rat. *J. Neuroendocrinol.*, **21**(1), 20–29. DOI: 10.1111/j.1365-2826.2008.01807.x

6. Sivalingam M., Ogawa S., Trudeau V.L., Parhar I.S. (2021) Conserved functions of hypothalamic kisspeptin in vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **317**(3), 113973. DOI: 10.1016/j.ygcen.2021.113973
7. Ogawa S., Nathan F.M., Parhar I.S. (2014) Habenular kisspeptin modulates fear in the zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**(10), 3841–3846. DOI: 10.1073/pnas.1314184111
8. Ogawa S., Parhar I.S. (2018) Biological significance of kisspeptin — kiss1 receptor signaling in the habenula of teleost species. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **9**, 222. DOI: 10.3389/fendo.2018.00222
9. Abdul Satar N.M., Ogawa S., Parhar I.S. (2020) Kisspeptin-1 regulates forebrain dopaminergic neurons in the zebrafish. *Sci. Rep.*, **10**, 19361. DOI: 10.1038/s41598-020-75777-0
10. Trevisan C.M., Montagna E., de Oliveira R., Christofolini D.M., Barbosa C.P., Crandall K.A., Bianco B. (2018) Kisspeptin/GPR54 system: What do we know about its role in human reproduction? *Cell. Physiol. Biochem.*, **49**(4), 1259–1276. DOI: 10.1159/000493406
11. Хохлов П.П., Блаженко А.А., Комлев А.С., Петрова П.Е., Шамова О.В., Бычков Е.Р., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. (2023) Синтетические аналоги пептидов кисспептинов обладают фармакологическими свойствами природных пептидов. VI съезд фармакологов России. Экспериментальная и клиническая фармакология, **86**(11S), 153–154. [Hohlov P.P., Blazhenko A.A., Komlev A.S., Petrova P.E., Shamova O.V., Bychkov E.R., Lebedev A.A., Shabanov P.D. (2023) Synthetic analogs of kisspeptin peptides have pharmacologic properties of natural peptides. VI s'ezd farmakologov Rossii. Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya, **86**(11S), 153–154.] DOI: 10.30906/ekf-2023-86s-153a
12. Блаженко А.А. (2020) Патент РФ на изобретение № 2766689 C1 от 15.03.2022 по заявке № 2020144338, Санкт-Петербург, ФГБНУ “ИЭМ” [Blazhenko A.A. (2020) Russian patent for invention No. 2766689 C1 dated 15.03.2022 under application No. 2020144338, St. Petersburg, FSBSI “IEM”]
13. Delmas S., Porteous R., Bergin D.H., Herbison A.E. (2018) Altered aspects of anxiety-related behavior in kisspeptin receptor-deleted male mice. *Sci. Rep.*, **8**(1), 2794. DOI: 10.1038/s41598-018-21042-4
14. Csabafi K., Jászberényi M., Bagosi Z., Lipták N., Telegdy G. (2013) Effects of kisspeptin-13 on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thermoregulation, anxiety and locomotor activity in rats. *Behav. Brain Res.*, **241**, 56–61. DOI: 10.1016/j.bbr.2012.11.039
15. Ibos K.E., Bodnár E., Bagosi Z. (2021) Kisspeptin-8 induces anxiety-like behavior and hypolocomotion by activating the HPA axis and increasing GABA release in the nucleus accumbens in rats. *Biomedicine*, **9**(2), 112. DOI: 10.3390/biomedicine9020112
16. Iwasa T., Matsuzaki T., Yano K. (2018) The roles of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in stress-induced reproductive disorders. *Endocrine J.*, **65**(2), 133–140. DOI: 10.1507/endocrj.EJ18-0026
17. Гольц В.А., Лебедев А.А., Блаженко А.А., Лебедев В.А., Байрамов А.А., Хохлов П.П., Бычков Е.Р., Пюрвеев С.С., Казаков С.В., Шабанов П.Д. (2023) Сравнение анксиолитического действия кисспептинов млекопитающих и костистых рыб у *Danio rerio*. Психофармакология и биологическая наркология, **14**(2), 85–96. [Golts V.A., Lebedev A.A., Blazhenko A.A., Lebedev V.A., Bayramov A.A., Khokhlov P.P., Bychkov E.R., Pyurveev S.S., Kazakov S.V., Shabanov P.D. (2023) Comparison of anxiolytic effects of mammalian and bony fish kisspeptins in *Danio rerio*. Psihofarmakologiya i Biologicheskaya Narkologiya, **14**(2), 85–96.] DOI: 10.17816/phbn501442

Поступила в редакцию: 22. 02. 2024.  
После доработки: 14. 04. 2024.  
Принята к печати: 23. 04. 2024.

## DYNAMICS IN CORTISOL LEVELS IN *DANIO RERIO* FISH UNDER THE INFLUENCE OF A SYNTHETIC ANALOG OF KISSPEPTIN 1

A.A. Nuzhnova<sup>1,2,\*</sup>, M.I. Kostina<sup>1,2</sup>, A.A. Blazhenko<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Anichkov Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine, 12 Akademika Pavlova str., St. Petersburg, 197022 Russia; \*e-mail: lin.panaiotis@yandex.ru

<sup>2</sup>Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup>D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russia

The effect of a synthetic analog of kisspeptin 1, a peptide involved in the regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) stress axis, on the cortisol level of *Danio rerio* fish was investigated. Kisspeptin 1 was administered at doses of 2 µg/kg and 8 µg/kg followed by resting for 1 h and 4 h. We found that kisspeptin at doses of 2 µg/kg and 8 µg/kg increased cortisol levels, with a significant spike in cortisol levels at 1 h post-injection.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

**Key words:** kisspeptin1; *Danio rerio*; cortisol; hypothalamic-pituitary-adrenal axis.

**Funding.** The study was performed within the framework of the state task of the Ministry of Education and Science of Russia (2022–2025) “Search for molecular targets for pharmacological action in addictive and neuroendocrine disorders and creation of new pharmacologically active substances acting on CNS receptors” (code FGWG-2022-0004).

Received: 22.02.2024; revised: 14.04.2024; accepted: 23.04.2024.