

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Kisspeptin'in Gelişimsel Döneme Bağlı Olarak Dişi Sıçanlarda Medial Preoptik Bölgede in Vitro Noradrenalin Salıverilmesi Üzerine Etkisi*

Zülfiye GÜL¹, Rıfat Levent BÜYÜKUYSAL²

¹ Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

² Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Bursa.

ÖZET

Üçüncü ventrikülün rostral periventriküler bölgesinde lokalize olan kisspeptin nöronlarının, ovulasyon öncesi LH salıverilmesinden sorumlu olan GnRH nöronlarının major stimülatörü olduğu son yıllarda yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. GnRH salıverilmesinin bir diğer ana modülatörü ise noradrenerjik sistemdir. Kisspeptinerjik ve noradrenerjik nöronların medial preoptik bölgedeki (MPB) yerleşimleri çok yakınlık göstermekle birlikte, bu iki sistem arasındaki ilişkinin yapılacak çalışmalar ile aydınlatılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan bu çalışma gelişim dönemi farklı dişi Sprague Dawley sıçanların MPB'sinden hazırlanan beyin dilimleri kullanılarak kisspeptinin noradrenalin (NA) salıverilmesi üzerine direk etkisinin olup olmadığını ortaya koymak amacı ile yapılmıştır. Oksijenlenmiş Krebs solüsyonu içeren inkübasyon kuyucuklarına yerleştirilen dilimler preinkübasyon dönemi ardından 60 dakika boyunca kisspeptin (40 ve 400 µM) ile inkübe edildi. Inkübasyon periyodu sonrasında inkübasyon ortamı salınan NA düzeylerinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Salıverilmenin Ca²⁺ ile ilişkisini incelemek amacıyla Ca²⁺-suz Krebs solüsyonu ve hücre dışı Ca²⁺ şelasyonu için 400 µM BAPTA kullanıldı. Prepubertal, adolesan ve yetişkin dişi sıçanların MPB'den elde edilen dilimlerin 40 ve 400 µM kisspeptin ile inkübasyonu prepubertal dönemdeki dilimlerden NA salıverilmesini etkilemezken, adolesan ve yetişkin sıçanlarda ise salıverilmenin anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. Ca²⁺'un ortamdan uzaklaştırılmasının kisspeptin kaynaklı NA salıverilmesinde anlamlı bir düşüşe (p<0.05) neden olması veziküler salım mekanizmasının ekstrasellüler Ca²⁺ iyonlarına bağımlı olduğunu göstermiştir. Kisspeptinin NA salıverilmesini direkt olarak uyurabildiğini gösteren bu bulgular, söz konusu peptidin NA salıverilmesi üzerinden GnRH salıverilmesini indirekt olarak modüle edebileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kisspeptin. Noradrenalin. GnRH. Medial preoptik alan. Beyin dilimleri.

Kisspeptin Stimulates In Vitro Noradrenaline Release in Medial Preoptic Area of the Female Rats Depending on Developmental Stage

ABSTRACT

Kisspeptin neurons localized in the rostral periventricular area of the third ventricle are considered to provide a major stimulatory input to the GnRH neuronal network which is responsible for triggering the preovulatory LH surge. Noradrenaline (NA) is one of the main modulators of GnRH release. Although NA fibers are found in close opposition to kisspeptin neurons, interaction between kisspeptin and NA neurons needs to be clarified. Thus, present study was undertaken to determine whether kisspeptin can directly regulate NA release from brain slices prepared from medial preoptic area (MPOA) of the rats. Brain slices prepared from female prepubertal, adolescents or adult Sprague Dawley rats were placed incubation wells containing oxygenated Krebs. After preincubation period, slices were incubated with two different concentrations of kisspeptin (40 and 400 µM) for 60 min. At the end of kisspeptin incubation, incubation medium was used for determination of NA released from the slices. When used Ca²⁺-free medium, 400 µM of BAPTA was also added into the medium to chelate the extracellular Ca²⁺. Incubation of the brain slices prepared from MPOA of the adolescent and adult female rats with 40 and 400 µM of kisspeptin caused significant increase in NA release, unlike prepubertal rat. Since removal of the Ca²⁺ from the medium caused significant decline in kisspeptin-induced NA release (p<0.05), a vesicular release mechanism seems to be likely involved. The results presented here probably indicate that in addition to direct effect of kisspeptin, it may also modulate GnRH release indirectly by increasing NA release from MPOA of hypothalamus.

Key Words: Kisspeptin. Noradrenaline. GnRH. Medial preoptic area. Brain slices.

Geliş Tarihi: 17.Nisan.2020

Kabul Tarihi: 07.Ağustos.2020

Dr. Zülfiye GÜL
Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı,
İstanbul.
Tel: 0541 384 12 68
E-posta: zulfkiye.gul@med.bau.edu.tr

* "17th European Congress of Neuroendocrinology" kongresinde (Milano/İtalya, 2015) poster bildiri olarak sunulmuştur.

Yazarların ORCID ID Bilgisi:
Zülfiye GÜL: 0000-0002-8872-0074
Rıfat Levent BÜYÜKUYSAL: 0000-0003-0749-2426

Hipotalamo-hipofizer-gonadal aks, üreme yeteneğinin kazanılması ve sürdürülmesine aracılık eden ve diğer sistemlerle kompleks ilişkileri olan merkezi bir sistem olarak bilinmektedir¹. Pubertede üreme sistemi aktivasyonunun nöroendokrin kontrolünde rol alan başlıca hormonlar pulsatil salgılanan gonadotropin saliverici hormon (GnRH), folikül stimüle edici hormon (FSH) ve lüteinleştirici hormondur (LH)¹. GnRH sistemi, hormon saliverilmesini inhibitör ve eksitatör sinyallerle düzenleyen ve hipotalamusun farklı bölgelerinde kümelenmiş nöronlardan oluşmaktadır¹. Puberte sırasında bu sistemin nasıl aktive olduğu, uyarıcı veya inhibitör sistemler arasındaki ilişki uzun yıllar araştırılmış, ancak aydınlatılamayan yönleri ile popüler bir araştırma alanı olma özelliğini korumuştur. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile, GnRH etkinliğinin hipotalamustan salıverilen kisspeptinler tarafından regüle edildiği saptanmış ve kisspeptinin puberte başlangıcındaki tetikleyici mekanizmanın kritik bir bileşeni olduğu ortaya konmuştur²⁻⁶.

Kisspeptinler, Kiss-1 geni tarafından transkribe edilen öncül bir proteinden türeyen, puberte ve fertilitede önemli roller aldıkları yapılan çalışmalarla gösterilen, farklı aminoasit uzunluklarındaki peptidler olarak bilinmektedirler³⁻⁵. Hipotalamusta biri rostral periventriküler alanda (RP3V) diğeri arkuat çekirdekte olmak üzere iki ana kisspeptin nöron popülasyonu bulunur⁷. Hem RP3V'daki hem de ARC'daki kisspeptin nöronlarının doğrudan GnRH nöronlarına projeksiyon yaptıkları gösterilmiştir^{8,9}. Kisspeptinin ve reseptörü olan G-protein reseptör 54'ün (GPR54) üreme fonksiyonlarının kazanılması ve bu fonksiyonların sürdürülmesine aracılık ettiği literatürde birçok çalışma ile rapor edilmiştir³. Kisspeptin reseptörü GPR54 ile ilgili insan ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda, bu reseptör fonksiyonunun kaybına neden olan mutasyonların pubertal gelişim geriliği ve üreme fonksiyon kaybı ile karakterize hipogonadotropik hipogonadizme neden olduğu tespit edilmiştir; bu bulgular GPR54 reseptörünün puberte döneminde normal GnRH aktivitesi için gerekli olduğunu göstermektedir^{2,6,7}. GPR54 -/- farelerde yapılan bir çalışmada pubertal gelişim geriliği ve üreme fonksiyon kaybı görülmesine rağmen, GnRH nöronlarının median eminense projeksiyon yaptıkları ve normal morfolojiye sahip oldukları gösterilmiş ve kisspeptin-GPR54 sisteminin, GnRH sistemi üzerinde yer alacak bir mekanizma olarak devreye girebileceği yorumu yapılmıştır¹⁰. Bu bilgilere ek olarak kisspeptinin sıçanlarda ve primatlarda GnRH antagonistleri ile geri döndürülebilir LH ve FSH düzeylerini arttırdığı^{11,12} ve prepubertal dişilerde kisspeptinin ovulasyonu indüklediği de bildirilmiştir¹³.

Alfa adrenerjik reseptör antagonistleri ile tedavi altındaki hastalarda gözlenen önemli bir bulgu, GnRH salgılanmasının bozulması ve buna bağlı olarak FSH ve LH düzeylerinin azalmasıdır¹⁴⁻¹⁷. Bu bulgular ile

birlikte noradrenalin (NA) nöronlarının hipotalamusta GnRH nöronlarının terminalleriyle aynı bölgede bulunduğu gösterilmesi sonrası GnRH ve NA arasında salıverilme miktarı ve ritmi açısından yakın bir ilişki olduğu da gösterilmiştir¹⁸⁻²². Diğer taraftan NA geri alım inhibitörü desmetilimipramin (DMİ) kullanılarak yapılan bir mikrodializ çalışmasında, söz konusu ilacın hipotalamusta GnRH ve NA salıverilmesini benzer aralıklarla arttırdığı rapor edilmiştir²³.

GPR54-null farelerde yapılan bir çalışmada, intraserebroventriküler NMDA enjeksiyonu ile düşük olan LH düzeylerinde kontrol düzeylerine varan bir artış gözlenmiş ve immünohistokimyasal analizler ile bu artışa medial preoptik alandaki (MPOA) katekolaminerjik nöronların aktivasyonunun aracılık ettiği bulunmuştur²⁴. Kisspeptin nöronlarının, noradrenerjik ve GnRH nöronları ile aynı bölgede bulunması ve GnRH salıverilmesini doğrudan etkilemesi, kisspeptin ve NA arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmekle birlikte, kisspeptin salıverilmesinin ve/veya kisspeptin reseptör aktivasyonunun söz konusu bölgede NA düzeylerini nasıl etkilediği bilinmemektedir. Bu çalışma ile kisspeptinin MPOA'da NA salıverilmesi üzerine direkt bir etkisinin varlığı ve eğer varsa bu etkinin gelişimsel dönem ile ilişkili olup olmadığı araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Materyaller

Deneylerde kullanılan Kisspeptin-10 Tocris Bioscience (Bristol, UK) firmasından, BAPTA, NA ve albumin Sigma Chem Co firmasından (St. Louis, MO, USA) temin edilmiştir. Krebs solüsyonu hazırlamada kullanılan kimyasallar ile diğer kimyasallar Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, FR) veya Merck firmalarından temin edilmiştir.

Deney Hayvanı:

Bu çalışmada yapılan deneyler için Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (HADYEK) 16.02.2016 tarih ve 2016-03/05 numaralı etik kurul onayı alındı. Tüm deneysel çalışmalarda hipogonadal aksın farklı çalıştığı zaman aralıkları göz önünde bulundurularak, henüz efektif çalışmaya başlamadığı için prepubertal (23-25 günlük), çalışmaya yeni başladığı adolesan (35-40 gün) ve düzenli çalışmaya devam ettiği yetişkin (2-3 aylık) dişi Sprague Dawley sıçanlar kullanıldı. Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen sıçanlar, ısısı 20-24 °C olacak şekilde sabit tutulan, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık (07.00-19.00 arası aydınlık) döngüsüyle çalışan bir ortamda barındırıldı ve herhangi bir su ve yem kısıtlaması yapılmadı.

Kisspeptin'in Noradrenalin Salıverilmesi Üzerine Etkisi

Beyin dilimlerinin hazırlanması ve inkübasyonu:

Dekapitasyon sonrası en kısa sürede çıkartılan beyinler önceden soğutulmuş ve oksijenlendirilmiş (%95 O₂ ve %5 CO₂ ile) fizyolojik Krebs içine alındı. Kullanılan Krebs çözeltisinin kompozisyonu şöyledir (mmol/L): NaCl 120, CaCl₂ 1.3, MgSO₄ 1.2, NaH₂PO₄ 1.2, KCl 3.5, NaHCO₃ 25 ve 10 mmol/L glukoz. Hızlı bir şekilde preoptik bölge diseke edildi ve doku dilimleyicisine (McIlwain) yerleştirilerek 0.3 mm kalınlığında dilimlendi. Dilimlenmiş doku, içinde soğuk ve oksijenlenmiş fizyolojik sıvı bulunan petri kabına alınıp ve fırça yardımıyla dilimler birbirlerinden ayrıldı. Elde edilen doku dilimleri fırça yardımıyla 0.3 ml oksijenlenmiş Krebs içeren ve 37°C dereceye ayarlanmış su banyosu içindeki inkübasyon kuyucuklarına, her bir kuyucukta 1 dilim olacak şekilde yerleştirildi^{25,26}. Bir sıçandan elde edilen dilimler her gruba n sayısı 1 olarak dağıtıldı ve her deney 7 kez tekrar edildi (her grup için n=7 sıçan). Bir saatlik preinkübasyon döneminde, dilimlerin inkübe edildikleri ortam her 15 dakikada bir taze oksijenlenmiş Krebs ile değiştirildi. Denge döneminin ardından aşağıdaki deney protokolleri uygulandı.

Deney Protokolü

Protokol 1: Prepubertal, adölesan ve yetişkin sıçanlardan hazırlanan preoptik dilimlerde bazal NA salıverilmesinin ve doku NA düzeylerinin incelenmesi

0.3 ml Krebs içeren inkübasyon kuyucuklarına yerleştirilen dilimler 60 dakikalık pre-inkübasyon döneminin ardından 60 dakika boyunca 0.3 ml Krebs içinde inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda inkübasyon ortamları salıverilen NA ölçümü için toplandı ve NA oksidasyonunu önlemek için HClO₄ ile asitlendirildi (son konsantrasyon 0.4 N). Dokular ise 0.3 ml 0.4 N HClO₄ içine alınarak homojenize edildi. Homojenatın bir kısmı (50 µl) doku total protein ölçümü için kullanılırken, kalan homojenat santrifüj edildi (10 dakika, 12.000 rpm) ve elde edilen süpernatant doku NA düzeyinin ölçümü için kullanıldı.

Protokol 2: Prepubertal, adölesan ve yetişkin sıçanlardan hazırlanan preoptik dilimlerden NA salıverilmesi üzerine kisspeptidin etkisi:

Çalışmamızda kullanılacak kisspeptin dozunu belirlemek amacıyla değişen kisspeptin dozlarında (0,1, 1, 10, 40, 400 µM) adölesan sıçanlardan elde edilen dilimlerde tarama testi yapıldı ve çalışmanın devamında etkili bulunan 40 ve 400 µM dozlarında kullanıldı. Pre-inkübasyon döneminin ardından dilimler kisspeptin (40, 400 µM) içeren veya içermeyen ortamda 60 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresinin bitmesinin ardından dokular 0.4 N perklorik asit içine alındı. Bu sürenin sonunda toplanan inkübasyon ortamları ve dokular *Protokol 1*'de belirtildiği salıverilen ve doku NA düzeylerinin ölçümü için kullanıldı.

Protokol 3: Kisspeptinin preoptik dilimlerde NA salıverilmesi üzerine etkisinin ekstrasellüler Ca⁺² ile ilişkisi:

Protokol 2'de inkübasyon ortamına eklenen kisspeptinin preoptik dilimlerden NA salıverilmesini arttırdığı gösterildikten sonra, bu artışın ekstrasellüler Ca⁺² ile bağımlılığı Ca⁺² içermeyen ve ekstrasellüler Ca⁺² ile şelat oluşturarak onu bağlayan BAPTA (200 µM; 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) eklenmiş Krebs kullanılarak test edildi.

Noradrenalin ölçümü

Dilimlerden salıverilen ve doku NA düzeyleri elektrokimyasal dedektör (Electrochemical cell: Model 5041, Guard cell: Model 5020) bağlantılı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (ESA, Coulochem 3, Model 5300-32) sistemi kullanılarak ölçülmüştür. Bu sistemde mobil faz olarak 150 mM NaH₂PO₄ tamponu, (1 mM 1-Octane sulfonik asit, 100 µM EDTA, %15 Metanol), analitik kolon olarak da C₁₈ kolon (ESA C18 narrowbore) kullanıldı. Sistemde kolon sıcaklığı 30 °C olacak ve mobil faz akış hızı 0,4 ml/dakikaya ayarlandı. HClO₄ ile asitlendirilmiş inkübasyon ortamları (20 µl) ve doku süpernatant örnekleri (20 µl) direkt olarak HPLC sistemine enjekte edildi. Kromatografik analiz sonrası elde edilen pikler, 0,4 N asit içinde hazırlanan ve örneklerle paralel bir şekilde çalışılan standartların pikleri ile karşılaştırılarak miktar tayini yapıldı.

Protein Ölçümü

Ölçülen NA miktarları total doku proteinine oranlanarak verildi. Total doku protein düzeyi Lowry ve arkadaşlarının⁴⁶ yöntemine göre 50 µl doku homojenatı kullanılarak ölçüldü. Protein standartları koyun serum albümini kullanılarak 0,4 N HClO₄ içinde hazırlandı ve doku örnekleriyle birlikte çalışıldı.

İstatistiksel Analizler

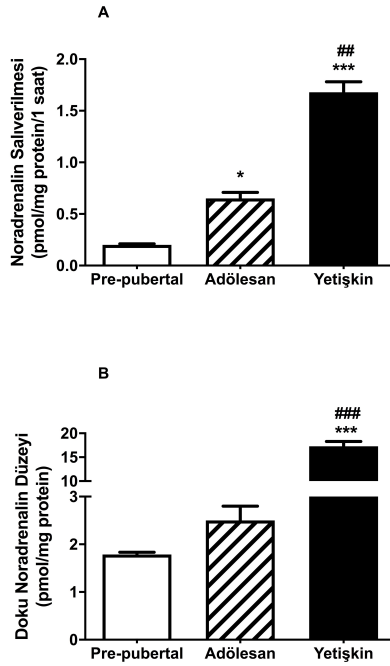
Elde edilen bütün değerler "ortalama ± standart sapma" şeklinde verildi. İstatistiksel analizler SPSS 22.0 programı kullanılarak yapıldı (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Verilerin normallik analizleri Kolmogorov-Smirnov Z testi ile gerçekleştirildi. Karşılaştırmalarda One Way ANOVA testi ardından post-hoc testi olarak, Tukey testi kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel anlamlılık değeri p<0,05 olarak kabul edildi.

Bulgular

Prepubertal, adölesan ve yetişkin sıçanlardan hazırlanan preoptik dilimlerden bazal NA salıverilmesi ve doku NA düzeyleri:

Bir saatlik kontrol koşullarında bazal NA salıverilmesi prepubertal sıçanlarda 0,2 ± 0,01 pmol/mg protein,

adölesan sıçanlarda $0,65 \pm 0,06$ pmol/mg protein, yetişkin sıçanlarda ise $1,68 \pm 0,1$ pmol/mg protein bulundu. İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında spontan NA salıverilmesinin adölesan ($p < 0,05$) ve yetişkin sıçanlarda ($p < 0,01$) prepubertal sıçanlara göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı (Şekil 1A). Doku NA düzeyleri prepubertal ve adölesan sıçanlarda sırası ile $1,79 \pm 0,05$ ve $2,50 \pm 0,3$ pmol/mg protein bulundu ($p > 0,05$). Yetişkin sıçanlarda ölçülen doku NA miktarının ise diğer iki yaş grubundaki sıçanlardan çok daha yüksek olduğu saptandı ($17,3 \pm 1$ pmol/mg protein; $p < 0,001$; Şekil 1B).



Şekil 1.

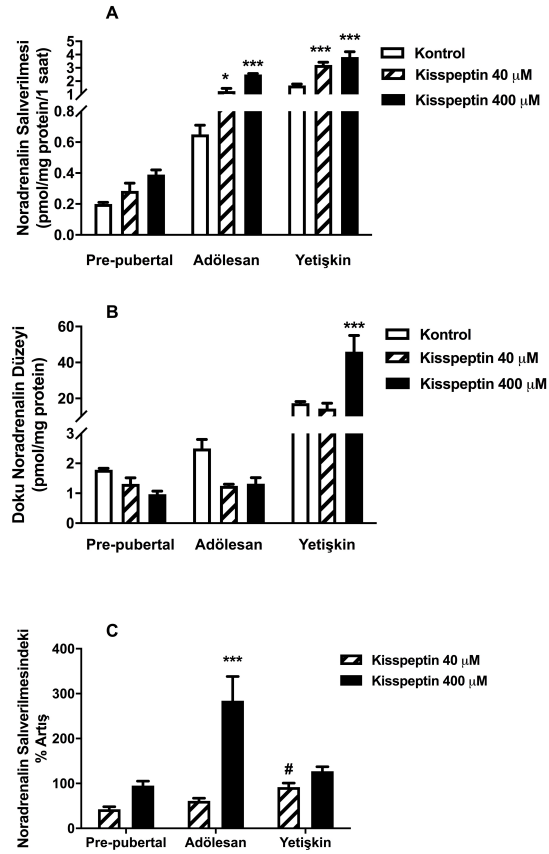
Yaşın MPOA'daki NA salıverilmesi (A) ve doku düzeyleri (B) üzerine etkisinin pre-pubertal, adölesan ve yetişkin dişi sıçanlarda değerlendirilmesi

Pre-pubertal, adölesan ve yetişkin sıçanlardan hazırlanan beyin dilimlerinin kontrol koşullarında 1 saatlik inkübasyon sonrası ortama salıverilen NA düzeyleri (A) ve inkübasyon sonrası homojenize edilen dokulardan elde edilen süpernatant doku NA düzeyleri (B) elektrokimyasal detektörlü HPLC aracılığı ile ölçüldü. Data ortalama \pm standart hata olarak sunuldu ($n=7$). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ pre-pubertal gruba göre anlamlı; # $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ adölesan gruba göre anlamlı.

Prepubertal, adölesan ve yetişkin sıçanlardan hazırlanan preoptik dilimlerden NA salıverilmesi üzerine kisspeptinin etkisi:

İnkübasyon ortamına eklenen kisspeptin (40 ve 400 μ M) pre-pubertal sıçanlardan hazırlanan preoptik dilimlerden NA salıverilmesini hafif arttırsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlılık seviyesine ulaşmadı (40 μ M için $0,29 \pm 0,05$ pmol/mg protein, 400 μ M için

$0,39 \pm 0,03$ pmol/mg protein; $p > 0,05$, Şekil 2A). Doku NA düzeylerinin de NA salıverilmesi ile benzer olarak 40 ve 400 μ M kisspeptin dozunda bir miktar azaldığı ancak bu azalmanın da anlamlı olmadığı tespit edildi ($p > 0,05$, Şekil 2B).



Şekil 2.

Kisspeptin dozlarının MPOA'daki NA salıverilmesi (A), doku düzeyleri (B) ve kontrole göre yüzde salıverilmesi (C) üzerine etkisinin pre-pubertal, adölesan ve yetişkin dişi sıçanlarda değerlendirilmesi

Pre-pubertal, adölesan ve yetişkin sıçanlardan hazırlanan beyin dilimlerinin kisspeptin dozları ile (40 ve 400 μ M) 1 saatlik inkübasyon sonrası ortama salıverilen NA düzeyleri (A) ve inkübasyon sonrası homojenize edilen dokulardan elde edilen süpernatant doku NA düzeyleri (B) elektrokimyasal detektörlü HPLC aracılığı ile ölçüldü. Grupların NA salınım yüzdeleri kontrol NA düzeylerine göre oranlanarak hesaplandı (C). Data ortalama \pm standart hata olarak sunuldu ($n=7$). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ kendi kontrol grubuna göre anlamlı.

Adölesan sıçanlardan hazırlanan preoptik dilimlerde 40 μ M konsantrasyonda kisspeptin NA salıverilmesini bazal değeri olan $0,65 \pm 0,06$ pmol/mg proteinden $1,25 \pm 0,2$ pmol/mg proteine yükseltti ($p < 0,05$). İnkübasyon ortamındaki kisspeptin miktarı 400 μ M'a çıkartıldığında ise NA salıverilmesinin daha da arttığı saptandı ($2,5 \pm 0,08$ pmol/mg protein, $p < 0,001$, Şekil 2A). Doku NA düzeylerinin ise 40 ve 400 μ M

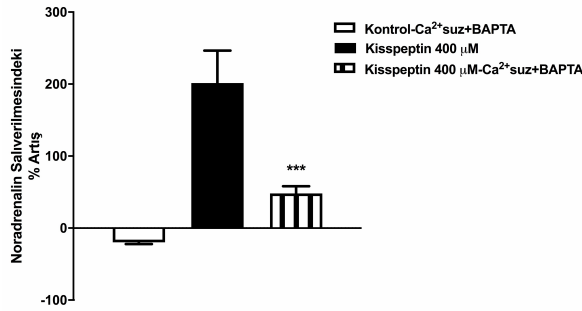
Kisspeptin'in Noradrenalin Salıverilmesi Üzerine Etkisi

kisspeptin konsantrasyonlarında bir miktar azaldığı ancak bu azalmanın anlamlılık seviyesine ulaşmadığı görüldü ($p>0,05$, Şekil 2B ve Şekil 2C).

Yetişkin sıçanlardan elde edilen veriler değerlendirildiğinde, 40 μM konsantrasyonda kisspeptinin NA salıverilmesini $3,22 \pm 0,2$ pmol/mg protein'e, 400 μM dozunda ise $3,82 \pm 0,4$ pmol/mg protein'e yükselttiği saptandı (her iki kisspeptin konsantrasyonu için de $p<0,001$; Şekil 2A). Doku NA düzeylerinin ise 400 μM kisspeptin ile anlamlı olarak arttığı görüldü ($p<0,001$, Şekil 2B ve Şekil 2C).

Kisspeptinin preoptik dilimlerde NA salıverilmesi üzerine olan etkisinde ekstrasellüler Ca^{2+} 'un rolü:

Kisspeptinin neden olduğu NA salıverilmesinde ekstrasellüler Ca^{2+} 'un rolü adölesan sıçanlardan hazırlanan preoptik dilimlerde test edildi ve ölçülen değerler kontrol koşullarda saptanan NA salıverilme miktarlarına göre yüzde değişim olarak hesaplandı. Buna göre inkübasyon ortamından ekstrasellüler Ca^{2+} 'un çıkartılması bazal NA salıverilmesini $\%19,7 \pm 2,5$, ($p>0,05$), 400 μM kisspeptin'in neden olduğu NA salıverilmesini ise anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($\%153,3$; $p<0,001$, Şekil 3).



Şekil 3.

Ca^{2+} 'un kisspeptin ile indüklenen NA salıverilmesi üzerine etkisinin adölesan dişi sıçanlarda değerlendirilmesi

Adölesan sıçanlardan hazırlanan beyin dilimlerinin kisspeptin ile 1 saatlik normal Krebs ve Ca^{2+} suz Krebs+BAPTA çözeltisinde inkübasyon sonrası ortama salıverilen NA düzeyleri elektrokimyasal detektörlü HPLC aracılığı ile ölçüldü. Data ortalama \pm standart hata olarak sunuldu ($n=7$). *** $p<0,001$ Kisspeptin 400 μM grubunun Kisspeptin 400 μM - Ca^{2+} suz-BAPTA grubuna göre anlamlı.

Tartışma ve Sonuç

Noradrenerjik sistemin GnRH salıverilmesinin regülasyonunda önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir²⁷. A1, A2 ve A6 noradrenerjik hücre grupları GnRH nöronlarının perikarya ve terminalerinde yerleşim gösterirler ve buradan MPOA ve medial bazal hipotalamusa projeksiyon yaparlar^{28,29}. NA salıverilmesi ile ilgili çalışmalarda, ovariektomize sıçanlarda

proestrus fazında LH dalgalanmasından hemen önce NA salıverilmesinin arttığı bildirilmiştir^{30,31}. GnRH nöronlarının adrenerjik reseptörlere sahip olduğu bilgisi de literatürde mevcuttur^{34,48}. Bu bilgilere ek olarak, NA sentez inhibisyonunun^{32,33}, alfa-adrenerjik reseptörlerin bloke edilmesinin^{34,35} veya A6 noradrenerjik çekirdeğin³⁶ elektrolitik lezyonunun sıçanlarda LH artışını baskıladığı da çalışmalar ile ortaya konmuştur. Farelerde yapılan diğer bir çalışmada da A2 ve A6 noradrenerjik hücrelerin GnRH nöronları ile direkt bağlantılı olduğu saptanmıştır⁴⁹. Elektrofizyoloji çalışmaları ile NA'nın GnRH nöron aktivitesi üzerinde direk bir etkisinin olduğu da gösterilmiştir³⁷. Bütün bu bulgular noradrenerjik sistemin GnRH salıverilmesinin regülasyonunda oldukça önemli bir role sahip olduğunu açık bir şekilde ortaya koymaktadır.

Kisspeptin ile bunun reseptörü olan GPR54'ün GnRH ve LH salıverilmelerinin regülasyonunda önemli bir role sahip olduğu özellikle son 10 yıldır yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir²⁻⁶. Kisspeptin preoptik bölgedeki GnRH nöronlarını stimüle ederek GnRH salıverilmesini artırır. Bu stimülasyonun, insan ve hayvanlarda pubertal gelişimin başlaması ve üreme fonksiyonları için gerekli ve temel bir fizyolojik fonksiyon olduğu araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur³⁻⁷. Kisspeptinlerin pubertede ve hipotalamus-hipofiz-gonadal aksdaki kritik rollerinin aydınlatılması sonrası, infertilite ve üreme bozukluklarının tedavisinde yeni bir potansiyel terapötik hedef olarak görülmeye başlanmıştır⁴. Kisspeptinin GnRH salıverilmesi üzerinde sadece direkt etkili olmadığı, bazı düzenleyici mekanizmalar aracılığı ile GnRH salıverilmesi üzerinde indirekt etkisinin olabileceği bildirilmiştir³⁸. Bu çalışmalar detaylı incelendiğinde, GnRH salıverilmesi üzerinde etkili nöropeptid Y³⁹, agouti ilişkili protein⁴⁰ ve melanosit stimüle edici hormon⁴¹ gibi nöropeptidlerin kisspeptin ile direkt veya indirekt ilişkisinin olabileceği görülmektedir. Bu çalışmalara ek olarak nörotransmitterler ile ilgili yapılan çalışmalarda, kisspeptinin glutamat⁴², GABA⁴³ ve serotonin⁵⁰ gibi nörotransmitterler ile direkt veya indirekt ilişkisi olduğu rapor edilmiştir

NA ve kisspeptin ilişkisi literatürde detaylı incelendiğinde, Fernandois ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yaş ile beraber sıçan yumurtalıklarında kisspeptin ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte yumurtalık NA düzeylerinin de yaş ile beraber arttığı ve bu artışın kisspeptin artışı ile yüksek korelasyon gösterdiği ortaya konmuştur⁴⁴. Fernandois ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada ise beta adrenerjik blokerlerin yumurtalık kisspeptin ekspresyonunu azalttığı bulgusu⁴⁵, kisspeptin ile noradrenerjik sistem arasındaki ilişki olabileceğini göstermiştir. Diğer taraftan alfa-1 antagonist prazosinin sıçanlarda MPOA'da kisspeptin ve GnRH ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir⁴⁶. Yukarı-

rıda özetlenen konu ile ilgili çalışmalar bu iki sistemin ilişkili olabileceğini göstermesine rağmen, kisspeptinin NA salıverilmesi üzerine direkt etkisi olup olmadığına dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızdaki bulgulardan ilki MPOA'daki spontan NA salıverilmesinin ve doku düzeylerinin gelişimsel dönemle ilişkili olarak arttığının gösterilmesidir. Bu bulgu literatürdeki daha önceki çalışmalar ile uyumludur^{27-31,44,45}. Yaş ile beraber MPOA'da kisspeptin ekspresyonunun değişimi ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma olmamasına rağmen yumurtalıklarda yaş ile birlikte kisspeptin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir^{44,46}. Çalışmamızdaki diğer bir önemli bulgu da adölesan ve yetişkin sıçanlardan (fakat prepubertal değil) elde edilen dilimlerin kisspeptin ile inkübasyonu sonucu NA salıverilmesinin artmış olmasıdır. Ancak bu artışın bazal NA salıverilmesine göre yüzdesi hesaplandığında en yüksek yüzde artışın adölesan grupta meydana gelmiş olmasıdır. Bu bulguların ışığında adölesan MPOA'daki noradrenerjik nöronların kisspeptine karşı daha duyarlı olduğu söylenebilir. Kisspeptin ile NA salıverilmesi adölesan ve yetişkin sıçanlarda artmasına rağmen, doku NA düzeyleri sadece yetişkin sıçanlarda değişiklik göstermiştir. Pre-pubertal ve adölesan sıçanlarda kisspeptin ile doku NA düzeylerinin bir miktar azaldığı ancak bu azalışın anlamlı olmadığı, yetişkin sıçanlarda ise düşük doz kisspeptin de değişmeyip yüksek doz kisspeptin ile arttığını gözlemledik. Bu durum ile, kisspeptinin pre-pubertal ve adölesan sıçanlarda veziküllerde biriken NA salıverilmesini uyardığını, ancak yetişkin sıçanlarda hem salıverilmeyi, hem de NA sentezini arttırdığı ileri sürülebilir. Ancak bu hipotezin ekspresyon çalışmaları ile desteklenmesi gerekmektedir. Diğer taraftan kisspeptin ile uyarılan NA salıverilmesinin, ekstrasellüler Ca²⁺ iyonlarına bağlı olması, salıverilmenin veziküler olabileceğini düşündürmekle, mekanizmanın tam olarak aydınlatılması (endojen firing veya voltaja duyarlı Na⁺ kanallarının rolü gibi) için daha fazla çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Beyin dilimlerini kullanarak daha önce yaptığımız çalışmaların bir kısmında, cinsiyete bağlı bir farklılık görmediğimiz için dişi sıçanları kullanmıştık^{25,51}. Her ne kadar, dişi sıçanlarda menstural siklusun hipotalamus nörotransmitter düzeylerinin değiştirdiği gösterilmişse de⁵⁰, in vitro beyin dilimlerinde siklusun nörotransmitter salıverilmesi etkileyebileceği ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Siklusun in vitro nörotransmitter salıverilmesi üzerinde olası bir etkisinin olabileceği düşünülürse, bu çalışmada kullanılan yetişkin sıçanların sikluslarının göz ardı edilmiş olması, çalışma sonuçlarının yorumlanmasını sınırlayan bir olasılık gibi görülmektedir. Bu nedenle, konunun aydınlatılması için daha fazla çalışma yapılması gerektiği kanısındayız.

Sonuç olarak bu çalışma, kisspeptinin NA salıverilmesini direkt olarak arttırabildiğini göstermesi ve bu etkinin kisspeptin ile noradrenerjik sistemin direkt ilişkisinin ortaya koyan literatür bilgileri ile uyumlu olması açısından önemlidir. Hipotalamo-hipofizer-gonadal aks üzerinde kisspeptin molekülünün rolünün daha detaylı bir şekilde incelenerek ortaya konması, kisspeptin reseptör mutasyonlu hastalarda yeni tedavi seçeneklerinin araştırılması veya puperteden sorumlu hormonların salgılanmasının düzenlemeleri konusunda yeni çalışmalara ışık tutabilir.

Etik Kurul Onay Bilgisi:

Onaylayan Kurul: Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu.

Onay Tarihi: 16.02.2016

Karar No: 216-03/05

Kaynaklar

1. Herbison AE. Physiology of the adult gonadotropin-releasing hormone neuronal network. In: Plant T, Zeleznik A, eds. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 4th ed. London: Elsevier 2015;399-467.
2. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. N Engl J Med 2003;349:1614-27.
3. Dhillo WS. Kisspeptin: a novel regulator of reproductive function. J Neuroendocrinol 2008;20:963-70.
4. Seminara SB, Crowley WF Jr. Kisspeptin and GPR54: discovery of a novel pathway in reproduction. J Neuroendocrinol 2008;20:727-31.
5. Jayasena CN, Dhillo WS, Bloom SR. Kisspeptin and the control of gonadotropin secretion in humans. Peptides 2009;30:76-82
6. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:10972-6.
7. Dungan HM, Gottsch ML, Zeng H, et al. The role of kisspeptin GPR54 signaling in the tonic regulation and surge release of gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone. J Neurosci 2007; 27(44):12088-95.
8. Herbison AE. Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). Brain Res Rev. 2008;57(2):277-287.
9. Han S-K, Gottsch ML, Lee KJ, et al. Activation of gonadotropin releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. J Neurosci. 2005;25(49):11349-56.
10. Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:1761-6.
11. Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T. Peripheral administration of metastatin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. Biochem Biophys Res Commun 2004;320:383-8.
12. Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, et al. Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. Endocrinology 2005;146:1689-97.

Kisspeptin'in Noradrenalin Salıverilmesi Üzerine Etkisi

13. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:2129-34.
14. Sawyer CH. First Geoffrey Harris Memorial lecture. Some recent developments in brain-pituitary-ovarian physiology. *Neuroendocrinology* 1975;17: 97-124.
15. Weiner RI, Ganong WF. Role of brain monoamines and histamine in regulation of anterior pituitary secretion. *Physiol Rev* 1978; 58: 905-976.
16. Gallo RV. Neuroendocrine regulation of pulsatile luteinizing hormone release in the rat. *Neuroendocrinology* 1980; 30: 122-131.
17. Kalra SP. Neural circuitry involved in the control of LHRH secretion: a model for preovulatory LH release. *Front Neuroendocrinol* 1986; 9: 31-75.
18. Ramirez VD, Ramirez AD, Slamet W, Nduka E. Functional characteristics of the luteinizing hormone-releasing hormone pulse generator in intact, unrestrained female rabbits: activation by norepinephrine. *Endocrinology* 1986; 118: 2331-2339.
19. Terasawa E, Krook C, Hei DL, Gearing M, Schultz NJ, Davis GA. Norepinephrine is a possible neurotransmitter stimulating pulsatile release of luteinizing hormone-releasing hormone in the rhesus monkey. *Endocrinology* 1988; 123: 1808-1816.
20. Pau KY, Hess DL, Kaynard AH, Ji WZ, Gliessman PM, Spies HG. Suppression of mediobasal hypothalamic gonadotropin-releasing hormone and plasma luteinizing hormone pulsatile patterns by phentolamine in ovariectomized rhesus macaques. *Endocrinology* 1989; 124: 891-898.
21. Pau KY, Gliessman PM, Oyama T, Spies HG. Disruption of GnRH pulses by anti-GnRH serum and phentolamine obliterates pulsatile LH but not FSH secretion in ovariectomized rabbits. *Neuroendocrinology* 1991; 53: 382-391.
22. Kafa MI, Eyigör Ö. Kisspeptins and Kisspeptin Neurons: Effects on Reproductive System and Hypothalamic Localizations. *Uludağ Tıp Fakültesi Dergisi* 2011;37 (1) 53-60,
23. Francis Pau KY, Cyrus JL, Cowles A, Yang SP, Hess DL, Spies HG. Possible Involvement of Norepinephrine Transporter Activity in the Pulsatility of Hypothalamic Gonadotropin-Releasing Hormone Release: Influence of the Gonad. *Journal of Neuroendocrinology* 1998; 10:21-29.
24. Tassigny X, Ackroyd K.J, Chatzidaki E.E, Colledge WH. Kisspeptin Signaling Is Required for Peripheral But Not Central Stimulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons by NMDA. *The Journal of Neuroscience*, June 23, 2010. 30(25):8581- 8590.
25. Gul Z, Buyukuysal MC, Buyukuysal RL. Brain slice viability determined under normoxic and oxidative stress conditions: involvement of slice quantity in the medium. *Neurological Research* 2020;42:228-238.
26. Gul Z, Demircan C, Bagdas D, Buyukuysal RL. Aging protects rat cortical slices against to oxygen-glucose deprivation induced damage. *International Journal of Neuroscience* 2020;1-9.
27. Herbison AE. Noradrenergic regulation of cyclic GnRH secretion. *Rev Reprod* 1997;2(1):1- 6.
28. Helena CVV, Szawka RE, Anselmo-Franci JA. Noradrenaline involvement in the negative-feedback effects of ovarian steroids on luteinizing hormone secretion. *J Neuroendocrinol* 2009;21(10):805-12.
29. Haywood SA, Simonian SX, van der Beek EM, Bicknell RJ, Herbison AE. Fluctuating estrogen and progesterone receptor expression in brainstem norepinephrine neurons through the rat estrous cycle. *Endocrinology* 1999;140(7):3255-63.
30. Szawka RE, Franci CR, Anselmo-Franci JA. Noradrenaline release in the medial preoptic area during the rat oestrous cycle: temporal relationship with plasma secretory surges of prolactin and luteinising hormone. *J Neuroendocrinol* 2007;19(5):374-382.
31. Szawka RE, Poletini MO, Leite CM, et al. Release of norepinephrine in the preoptic area activates anteroventral periventricular nucleus neurons and stimulates the surge of luteinizing hormone. *Endocrinology* 2013;154(1):363-374.
32. Gnodde HP, Schuiling GA. Involvement of catecholaminergic and cholinergic mechanisms in the pulsatile release of LH in the longterm ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 1976;20(3):212-23.
33. Kalra PS, Kalra SP, Krulich L, Fawcett CP, McCann SM. Involvement of norepinephrine in transmission of the stimulatory influence of progesterone on gonadotropin release. *Endocrinology* 1972;90(5):1168-76.
34. Le W, Berghorn KA, Smith MS, Hoffman GE. 1-Adrenergic receptor blockade blocks LH secretion but not LHRH cFos activation. *Brain Res* 1997;747(96):236-45.
35. Weick RF. Acute effects of adrenergic receptor blocking drugs and neuroleptic agents on pulsatile discharges of luteinizing hormone in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 1978;26(2):108-17.
36. Anselmo-Franci JA, Franci CR, Krulich L, Antunes-Rodrigues J, McCann SM. Locus coeruleus lesions decrease norepinephrine input into the medial preoptic area and medial basal hypothalamus and block the LH, FSH and prolactin preovulatory surge. *Brain Res* 1997;767(2):289-296.
37. Han S-K, Herbison AE. Norepinephrine suppresses gonadotropin releasing hormone neuron excitability in the adult mouse. *Endocrinology* 2008;149(3):1129-35.
38. Marraudino M, Miceli D, Farinetti A, Ponti G, Panzica G, Gotti S. Kisspeptin innervation of the hypothalamic paraventricular nucleus: sexual dimorphism and effect of estrous cycle in female mice. *J Anat* 2017;230:775-86.
39. Navarro VM, Castellano JM, McConkey SM, et al. Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;300:E202-E210.
40. Padilla SL, Qiu J, Nestor CC, et al. AgRP to Kiss1 neuron signaling links nutritional state and fertility. *Proc Natl Acad Sci USA Biol Sci* 2017: 201621065.
41. Manfredi-Lozano M, Roa J, Ruiz-Pino F, et al. Defining a novel leptin-melanocortin-kisspeptin pathway involved in the metabolic control of puberty. *Mol Metab* 2016;5:844-57.
42. Min L, Adeola O, Carroll RS, Kaiser UB. Glutamate Acts as a Cofactor in the Activation of KISS1R by Kisspeptin, Signaling Originating from Membrane Receptors. *Endocrine Society* 2013; SUN-402-SUN-402.
43. Cheong RY, Czielesky K, Porteous R, Herbison AE. Expression of ESRI in glutamatergic and GABAergic neurons is essential for normal puberty onset, estrogen feedback, and fertility in female mice. *J Neurosci* 2015;35:14533-43.
44. Fernandois D, Na E, Cuevas F, Cruz G, Lara H, Paredes AH. Kisspeptin is involved in ovarian follicular development during aging in rats. *J Endocrinol* 2016;228:161-70.
45. Fernandois D, Cruz G, Na EK, Lara HE, Paredes AH. Kisspeptin level in the aging ovary is regulated by the sympathetic nervous system. *J Endocrinol* 2017;232:97-105.
46. Kalil B, Ribeiro AB, Leite CM, et al. The Increase in Signaling by Kisspeptin Neurons in the Preoptic Area and Associated Changes in Clock Gene Expression That Trigger the LH Surge in Female Rats Are Dependent on the Facilitatory Action of a Noradrenaline Input. *Endocrinology* 2016;157:323-35.
47. Du XJ, Bobik A, Esler MD, Dart MA. Effects of Intracellular Ca²⁺ Chelating on Noradrenaline Release in Normoxic and Anoxic Hearts. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 1997;24:819-23.

48. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951;193: 265-275.
49. Campbell RE, Herbison AE. Definition of brainstem afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons in the mouse using conditional viral tract tracing. *Endocrinology* 2007;148:5884-90.
50. Barth C, Villringer A, Sacher J. Sex hormones affect neurotransmitters and shape the adult female brain during hormonal transition periods. *Front Neurosci* 2015;37:1-20.
51. Demircan C, Gul Z, Buyukuysal RL. High glutamate attenuates S100B and LDH outputs from rat cortical slices enhanced by either oxygen-glucose deprivation or menadione. *Neurochemical research* 2014;39:1232-1244.