

Kavernöz sinir hasarlanması sonrası major pelvik ganglionda artmış galanin ekspresyonu

Weyne E, Albersen M, Hannan JL, et al
J Sex Med 2014;11:1685-1693

Radikal prostatektomi öncesinde erektil fonksiyonları iyi olan hastaların operasyon sonrasında erektil fonksiyonların korunması ile ilgili beklentileri yüksektir. Ancak, erektil disfonksiyon (ED) radikal prostatektomi sonrasında korpus kavernozumdaki erektil dokuların inervasyonunu sağlayan kavernöz sinirlerin (CN) hasarlanmasına bağlı sık görülür.

Bazı çalışmalar, fosfodiesteraz 5-inhibitörü kullanımı ile korpus kavernozumun yapısal bütünlüğünü ve fonksiyonlarını korumayı amaçlarken, bu çalışmaların fonksiyonel sonuçları hayal kırıklığıdır. Bundan dolayı, araştırmacılar erektil dokuların inervasyonsuz kaldığı zamanı azaltmak amacı ile CN rejenerasyonunun artırılması ile ilgilenmektedir. Sinir hasarı sonrasında major pelvik ganglion (MPG) ve CN'lerde meydana gelen değişiklikler bu girişimlerin arka planını oluşturmaktadır. Nöropraksi ve aksonotmezis sonrasında MPG ve CN hücrelerinde moleküler yollardaki değişiklikleri anlamak uygun tedavileri geliştirmek için yardımcı olur. Bu düşünce ile, CN hasarı sonrasında fare MPG'lerinde mRNA ekspresyonundaki önemli değişiklikleri tanımlayan yeni bir mikroarray çalışması yapıldı. Galanin nöropeptidi en dikkat çekici şekilde upregüle olan gendi.

Galanin, 29 aminoasit içeren peptid (N-terminal glisin ve C-terminal alanin) olup, ilk defa 1983 yılında domuz bağırsak ektresinde tanımlanmıştır ve ağırlıklı olarak inhibitör bir nöropeptittir. Galaninin, kedilerdeki erektil biyolojide NO-cGMP sinyali ile sinerjistik etkili bir kotransmitter olduğu gösterilmiştir. Santral sinir sisteminde (CNS) ve arka kök gangliyonlarının sensörial nöronlarında galanin peptidinin üç reseptörü eksprese edilmektedir. Galanin ekspresyon ve regülasyonu ile onun parasempatik sinir sistemindeki reseptörleri hakkında bilinenler sınırlıdır. Otonom nöronların aksonal hasara yanıtı sıklıkla çeşitli nöropeptitlerin ekspresyonunu artırma şeklindedir. Hasar sonrasında artmış peptid ekspresyonunun, nöron sağkalı-

mını ve sinir rejenerasyonunu arttırdığına inanılmaktadır. Galanin ve diğer nöropeptidlerin upregülasyonu, nörorejeneratif ve nöroprotektif mekanizmaların çalışması için önerilmektedir. Girard ve ark. galanin ve onun reseptörlerinin MPG'de olduğunu yakın zamanda onaylamıştır ve tek taraflı CN transeksiyonu ve MPG eksplantasyonundan sonra MPG'de galanin upregülasyonunu göstermişlerdir. Ancak bu modeller radikal prostatektomi sırasında oluşan nöropraksiyi yansıtmamaktadır ve bundan dolayı galanin ile in vivo nörorejenerasyon arasındaki ilişkiyi araştırmak için uygun değildir. Bu çalışmada, bilateral CN ezilme hasarı (BCNI) sonrasında MPG'deki geçici galanin ekspresyonunu ve galaninin fonksiyonel sinir rejenerasyonu ile ilişkisini değerlendirmek amaçlanmıştır.

Erişkin Sprague-Dawley cinsi 150-250 gr. ağırlığında (7-9 haftalık yaşında) erkek fareler kullanıldı (n=66). Hayvanlara intraperitoneal ketamin/xylazine (100+10 mg/kg) karışımı ile anestezi uygulandı. Orta hat abdominal insizyon ile prostat açığa çıkartıldı. Prostatın posterolateralinde CN ve MPG'lar bulundu. MPG'da CN hasarındaki moleküler sinyal patofizyolojisini çalışma amacı ile deney fareleri şu gruplara ayrıldı: (i) bilateral CN'ler bulundu ve sinirlere herhangi bir işlem uygulanmadı, (ii) bilateral CN'ler bulundu ve sinirlerde ezilme hasarı oluşturuldu. Ezilme hasarı daha önceden tanımlandığı şekilde Dumont #5 forceps (Fine Science Tools, Foster City, CA, USA) ile sinirin MPG'dan 2-3 mm distaline yapıldı. Klinik nöropraksi ve aksonotmezisi gösteren orta ezilme hasarını oluşturmak amacı ile forceps üç sefer ve her seferinde 15 saniye olacak şekilde kapatıldı.

Farelere intraperitoneal ketamin/xylazine (100+10 mg/kg) enjeksiyonu ile anestezi uygulandıktan sonra fareler termoregülasyonlu cerrahi masaya konuldu ve basınç kaydeden iğnenin krus kavernozumuna yerleştirilmesi ile standart in vivo deney protokolü uygulandı (n=6-8/

grup). Kısaca, CN, 20 Hz sıklıkta kare darbe uyarımı ile distalde ezilme hasarı oluşturularak uyarıldı. 8V uygulanması ile anlamlı ve uygun maksimal erektil yanıt ulaşıldı. Uyarımın verildiği süre, ardışık üç sikludan oluşuyordu ve her siklus 1 dakikalık uyarım ile 5–10 dakikalık dinlenme periyodundan oluşmaktaydı. Analize en iyi uyarım alındı. Maksimal intrakavernozal basınç (ICP) ile ortalama arteriyel basıncının (MAP, [2X diastolik + 1 sistolik kan basıncı]/3 ile hesaplandı) oranı ile tepe erektil yanıt elde edildi. Tepe erektil yanıtının hesaplanması ile sistemik kan basıncındaki varyasyonlar normalize edildi. Sistemik kan basıncı karotid arterin kanülasyonu ile ölçüldü.

Sahte opere edilen hayvanlar ve CN-hasarlı farelerden hasardan 48 saat sonra mikroarray analizi için izole RNA alındı ve Agilent 44K ile farenin tüm genom dizilimi incelendi. Amplifikasyon, etiketleme, hibridizasyon, ve 400 ng'lık total RNA örneklerinin tespiti üretici talimatları doğrultusunda uygulandı. Mikroarraylar Agilent SCAN CONTROL yazılımı versiyon 7.0 tarafından kontrol edilen Agilent G2565A Scanner ile tarandı. Veriler orijinal mikroarray analizinden seçildi.

Sahte opere edilen ve CN hasarlı farelerin MPG ve CN'de galanin, galanin reseptörleri ve c-JUN ekspresyonlarını belirlemek için eş-zamanlı kalitatif PCR (qPCR) kullanıldı. Dondurulmuş MPG'ler homojenize edildi ve total RNA RNeasy sistemi ile saflaştırıldı, kalitatif hale getirildi, sonra Superscript 2 ile ters transkripsiyon yapıldı. StepOnePlus sistemi ile eş zamanlı qPCR yapıldı. TaqMan gen ekspresyon dizisi galanin, galR1, galR2, galR3, c-JUN ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) ile endojen kontrol olarak GAPDH kullanıldı. Her örnek PCR ile çoğaltıldı ve üç kopya tekniği ile beş (T= 14,21,30 ve 60. gün) veya 10 (T=48 saat, 7 gün ve sahte operasyon) farenin MPG hücre kesitlerinin tümü ile tüm deneyler ayrı ayrı yapıldı.

CN elektrostimülasyonu ile oluşan erektil yanıt BCNI sonrasında farklı zamanlarda ölçüldü. Sinir ezilme hasarı sonrasında 48. saatten itibaren erektil fonksiyonlar azaldı. BCNI yapılan fareler ile yaşa göre eşleştirilen sahte opere edilen farelerin intrakavernozal basınçları çalışmanın tüm zaman dilimlerinde karşılaştırıldığında BCNI grubunda anlamlı azalma olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Hasar sonrasında 60. günde ICP/MAP oranı 14. ve 30. gün ile karşılaştırıldığında erektil yanıtta anlamlı olarak daha iyi düzelme başladı.

Mikrodizi analizinde hasar sonrası 48. saatte 12-kat galanin up regülasyonu saptandı ($p=0.0004$). Üç galanin spesifik reseptör kodlayan mRNA tespit edildi, ancak hasar sonrası erken dönemde anlamlı değişiklik saptanmadı. Hasar 48. saatte, c-JUN 1.7 kat artmıştı ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı.

Hasar sonrası erken dönemde MPG'de galanin mRNA'sının up regülasyonu gözlemlenmiş olup sahte opere edilen gruba göre 186 ± 27 kat ve 185 ± 36 kat, BCNI sonrasında sırası ile 48. saat ve 7. günde artmaktadır ($p<0.0001$). Hasar sonrasında takip eden zaman dilimlerinde, galanin ekspresyonu kademeli olarak azaldı. Sahte opere edilen gruba göre hasar sonrasında 30. ve 60. günde galanin ekspresyonunda anlamlı farklılık yoktu.

Spearman's rank korelasyon katsayısı (Rho, ρ) -0.645 idi, bu da galanin ekspresyonu ve CN elektrostimülasyonuna bağlı erektil cevap arasında negatif korelasyonu göstermektedir. Bu korelasyon istatistiksel olarak anlamlıydı ($p>0.0001$).

Galanin reseptör mRNA ekspresyonu hasarlanmadan sonra zamanla azaldı ve 60 gün sonunda galR2 seviyesi sahte opere edilenlere göre anlamlı olarak azdı. Muhtemelen bireylerin nörojeneratif yanıtlardaki biyolojik varyasyonları ve tam aksonotomi yerine ezilme hasarı oluşturulması nedeni ile diğer iki reseptörün 14 ve 21. günlerdeki seviyesinde belirgin farklılık saptanmadı.

c-JUN molekülünün galanin transkripsiyonunu indüklediğine inanılmaktadır ve nöron hücreleri gövdesindeki sinir büyüme faktörü (NGF) azalmasına bağlı salınmaktadır.

Sahte opere edilenler ile CN'de hasar yapılanlar arasında 5. günde galanin için yapılan immunohistokimyasal boyamada farklı ekspresyon paterni tespit edildi. Kontrol grubundaki hayvanlarda galanin ile boyanma olmazken, CN hasarı olan MPG'lerde galanin ile boyanan nöronal hücre gövdeleri saptandı. İmmunoflorasan incelemenin, galanin ve nNOS ile üç galanin reseptörünün aynı lokalizasyonda olduğunu göstermesi, korpus kavernoza düz kasında innervasyonu sağlayan nöronların varlığına işaret etmektedir.

Bu çalışma CN'in ezilme yaralanması sonrası erken dönemdeki nöroprotektif yanıtındaki gen ekspresyonundaki değişiklikleri aydınlatmayı amaçlayan bir dizi araştırmanın bir parçasıdır. Bu çalışmada farelerdeki CN yaralanmasının

erken dönemde, MPG'de galanın ekspresyonunun up-regülasyonu gösterilmiştir. Zamanla galanın ekspresyonunun kademeli olarak bazal düzeye inmesi ve buna paralel olarak erektil fonksiyonda düzelme, fonksiyonel sinir yenilenmesini gösteriyor. Galanın ekspresyonu ve erektil iyileşme arasındaki güçlü ters korelasyon galanın endojen sinir yenilenmesinde rolü olduğunu düşündürüyor. Bu korelasyon, erektil fonksiyon bozulduğunda galanın ekspresyonunun artmasının gerektiğini gösterir. Erektil fonksiyon 60 gün sonunda düzelince, azalmış galanın ekspresyonu, galanın up-regülasyonunun hücre yenilenmesinden sonra biyolojik olarak önemsiz olduğunu gösteriyor.

Galanin up-regülasyonu sinir hasarlanmasından sonra çeşitli sinir hücresi popülasyonlarında gösterilmiştir. Hasarlanma bölgesindeki retrograd sinyaller, c-JUN gibi aksonal rejenerasyon için gerekli olan transkripsiyonel değişiklikleri başlatan transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonunu düzenler. Galanın promotor bölgesi c-JUN için spesifik cevap elementi olarak bilinen aktivatör protein-1 ve CRE (cAMP cevap elementi) içerir ve bu aksotomi sonrası c-JUN'u galanın promotorunun aktivasyonu için önemli bir aday yapar. Ayrıca, c-JUN ekspresyonu siyatik sinir transeksiyonundan sonra artar ve DRG nöronlarında galanın ile aynı lokalizasyonda görülür. Bu çalışmada, c-JUN CN hasarlanmasından sonra belirgin olarak artmıştır. Hipoteze göre hedef organ derivasyonlu NGF azalmasına bağlı artan c-JUN, galanın transkripsiyonunu sağlar.

Ezilme hasarı sonrası oluşan siyatik sinir hasarında, yetişkin galanın üretimi hasarlanmış hayvanlarda, kontrol grubuna göre sinir rejenerasyonu azalmıştır ve bu da uzun dönem sensörimotor fonksiyonlarda defisitle ilişkili bulunmuştur. Galanın üretimi hasarlı hayvanlardaki nöron uzantılarındaki eksiklik, galanın peptidinin eklenmesi ile kurtarılabilir. In vitro çalışmalar, galanın uyarımı ile sensöriyal nöronlarda oluşan nöronal filizlenmeyi ve farelerin dorsal kök gangliyonlarının kesilmesi sonrasında galR2 eksikliğine bağlı erişkin sensöriyal nöron uzantılarında azalmayı göstermiştir. Bu sonuçlar galR2'nin galanine bağlı nörorejeneratif rolü olabileceğini göstermektedir. Benzer sonuçlar galR1 üreteimi bozulmuş farelerde gözlenmemiştir.

Immunofloran mikroskopisi galR1-, galR2-, ve galR3-pozitif nöronların MPG'de nNOS ile aynı yerlerde (lokalizasyon) olduğunu göstermiştir. Bu üç reseptör içinde, galR2'nin nörorejenerasyon için en önemli faktör olduğu

düşünülmektedir. Nörorejeneratif etkileri sensöriyal nöronlarda protein kinaz C'nin aktivasyonu, cdc42 inhibisyonuna bağlı nöron uzantılarının uyarımı, rho GTPaz ve cofilin aktivasyonu aracılığı ile olmaktadır. Bunların sonucunda büyüme faktörlerinde artış ve hedef organda tekrar innervasyon oluşmaktadır. Çalışmada, galanın boyası sonrasında normal mikroskopi incelemesinde, galanın proteinin BCNI grubunda sahte opere edilenlere göre daha güçlü eksprese olduğu gösterilmiştir. Bulgularımız transkripsiyonel seviye ile benzerlik göstermekteydi. Immunofloran incelemede nNOS-pozitif nöronlar, nöron hücresinin gövdesi kadar galanın eksprese ederken, benzer patern galanın reseptörü içinde gözlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda galanın rejeneratif etkisinin galR2 aktivasyonu aracılığıyla olduğu gösterilmişti, bu çalışma galanın erektil dokular içerisindeki düz kas hücreleri içine yayılan nöronda nNOS ekspresyonu etkileyerek otokrin veya jukstakrin nörorejeneratif etkili olabileceği, bundan dolayı nöropraksi sonrasında endojen CN rejenerasyonunda rol oynayabileceği hipotezini doğrumuştur.

Galanin reseptör ekspresyonu hasarlanma sonrasında zamanla azalmaktadır, ancak sahte opere edilen gruba göre galR2 ekspresyonu sadece hasarlanma sonrasındaki 60. günde anlamlı olarak azdır. Anlamlı farklılık diğer galanın reseptörlerinde saptanmamıştır. Komplet aksotomi yerine ezilme hasarı yapıldığında, nöronal hücre cisimlerinde sınırlı apoptozis meydana geldiğini varsaydık, ve buna bağlı olarak da nöron gövdesinde galanın reseptörler ekspresyonunda orta seviyede azalma görüldü.

Farelerin MPG'lerinde nNOS ve galanın reseptörlerinin birlikte bulunması, kedilerde in vivo olarak ekzojen galantide (galanın antagonisti) verilmesine bağlı erektil aktivitenin NO-cGMP sinyali ile sinerjistik arttığını açıklayabilir. Galanın reseptörlerinin nNOS immunoreaktif nöronlarda bulunması, bu reseptörlerin nitrik oksit salınımında düzenleyici olması ile uyumludur. Çalışmamızda sahte opere edilen farelerin MPG'sinde az miktarda galanın immunoekspresyonu görülsede, galanın pelvik pleksus hasarı olmayanlarda erektil fonksiyonun kontrolünde fizyolojik ana rolü yoktur. Galanın ve nNOS'un erektil aktivitede koordineli rolünü tanımlamayı amaçlayan daha ileri in vitro ve in vivo çalışmalara başlanmıştır.

Çalışmanın ele alınması gereken sınırlılığı, hasar sonrasında CN rejenerasyonunda galanın rolü hakkında kesin

sonuç vermemesidir. Çalışma, BCNI sonrasında MPG'de galanin regülasyonu hakkında bilgi versede, galaninin nöroprotektif yada nörorejeneratif rolü hakkında kesin kanıt içermemektedir. Bu konuyu ele alabilmek için, şu anda enstitülerimizde yapılmakta olan galanin veya c-JUN sisteminin farmakolojik inhibisyonu ile sinir rejenerasyonundaki fonksiyonel rolü doğrulanmalıdır.

CN hasarı sonrasında erken evrede MPG'de galanin up regülasyonu olur ve kademeli olarak azalır. CN hasarını takiben nNOS içeren nöronlarda galanin ortaya çıkar. Galanin ekspresyonu, fonksiyonel son organ ile temasını

kaybeden nöronlarda galanin transkripsiyonunu harekete geçirmeyi amaçlayan c-JUN'un up regülasyonu ile paralellik gösterir. Sonuçlarımıza göre,galanin up regülasyonu CN hasarına endojen nörorejeneratif yanıtta ve galanin peptidi ile reseptörlerinin düzenlenmesinde önemli bir faktördür, veya CN hasarı sonrasında erektil fonksiyonların iyileşmesinde galanin up regülasyonuna yol açan yollar ilgi çekici yeni bir yol sunmaktadır.

Çeviri

Dr. Gökhan Ekin, Uzm. Dr. Orçun Çelik

Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği