

**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W LUBLINIE**

**Wydział Medycyny Weterynaryjnej**

Dyscyplina naukowa: Weterynaria

lek. wet. Natalia Szysiak

*Praca doktorska*

**Udział neurokininy B, dynorfiny i kisspeptyn  
w etiopatogenezie opóźnienia dojrzewania płciowego u owiec**

*Ph.D. thesis title*

*Role of neurokinin B, dynorphin and kisspeptins  
in the etiopathogenesis of delayed puberty in ewes*

Praca doktorska została wykonana w Zakładzie Patofizjologii,  
Katedrze Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych,  
na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

**Promotor:**

**dr hab. Urszula Kosior-Korzecka, prof. Uczelni**

Lublin, 2026

***Składam serdeczne podziękowania***

*Pani Promotor dr hab. Urszuli Kosior-Korzeckiej, profesor Uczelni za poświęcony czas, życzliwość oraz pomoc w realizacji pracy.*

*Moim Najbliższym za okazane bezcenne wsparcie, motywację oraz wyrozumiałość.*

*Niniejszą pracę chciałabym zadedykować mojemu synkowi Antoniemu.*

### Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 15.06.2026

Podpis promotora

*Marta Rosas-Roneclo*

### Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/~~Promotorów/Promotora pomocniczego~~\* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD/pendrive wersją elektroniczną.

Data 15.06.2026

Podpis autora

*Natalia Szyslak*

\* niepotrzebne skreślić

## WYKAZ PRAC NAUKOWYCH WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU:

1. **Szysiak Natalia**, Kosior-Korzecka Urszula<sup>✉</sup>, Longo Vincenzo, Patkowski Krzysztof, Greguła-Kania Monika, Nowakiewicz Aneta, Bochniarz Mariola, Junkuszew Andrzej. *Influence of neurokinin B, dynorphin A and kisspeptin-10 on in vitro gonadotropin secretion by anterior pituitary cells isolated from pubescent ewes*. Journal of Veterinary Research 2025; 69(1):121-129. doi: 10.2478/jvetres-2025-0003 (MEiN =140 pkt., IF 2025 =1,5).

*Indywidualny wkład pracy w publikację (55%): współudział w opracowaniu koncepcji pracy, realizacja badań, zestawianie, analiza i interpretacja danych, napisanie pierwszej wersji manuskryptu, dokonanie korekty po recenzjach, krytyczna ocena artykułu oraz ostateczna akceptacja artykułu.*

2. **Szysiak Natalia**, Kosior-Korzecka Urszula<sup>✉</sup>, Greguła-Kania Monika, Patkowski Krzysztof, Fila Mateusz, Junkuszew Andrzej. *Effect of neurokinin B and dynorphin A on kisspeptin-10 secretion from the anterior pituitary cells of pubescent ewes in vitro*. Journal of Veterinary Research 2025; 69(2):299-304. doi: 10.2478/jvetres-2025-0026 (MEiN =140 pkt., IF 2025 =1,5).

*Indywidualny wkład pracy w publikację (55%): współudział w opracowaniu koncepcji pracy, realizacja badań, zestawianie, analiza i interpretacja danych, napisanie pierwszej wersji manuskryptu, dokonanie korekty po recenzjach, krytyczna ocena artykułu oraz ostateczna akceptacja artykułu.*

3. **Szysiak Natalia**, Kosior-Korzecka Urszula<sup>✉</sup>, Greguła-Kania Monika, Patkowski Krzysztof, Fila Mateusz, Junkuszew Andrzej. *Relationship between Kisspeptin-10, Neurokinin B, and Dynorphin A in the course of normal and delayed puberty in ewes*. Journal of Veterinary Research 2026; 70(1), 139-147, doi: 10.2478/jvetres-2026-0010 (MEiN=140 pkt., IF 2026 =1,5).

*Indywidualny wkład pracy w publikację (55%): współudział w opracowaniu koncepcji pracy, realizacja badań, zestawianie, analiza i interpretacja danych, napisanie pierwszej wersji manuskryptu, dokonanie korekty po recenzjach, krytyczna ocena artykułu oraz ostateczna akceptacja artykułu.*

**Sumaryczny IF: 4,5**

**Suma punktów MNiSW: 420**

## Spis treści

|   |    |
|---|----|
| WYKAZ PRAC NAUKOWYCH WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU:.....  | 4  |
| WYKAZ SKRÓTÓW .....   | 6  |
| STRESZCZENIE .....  | 8  |
| SUMMARY .....   | 11 |
| WSTĘP .....   | 14 |
| HIPOTEZA I CEL BADAŃ .....  | 18 |
| MATERIAŁY I METODY .....  | 20 |
| Etap I: Schemat i metodyka doświadczenia w warunkach <i>in vivo</i> .....   | 20 |
| Etap II: Schemat i metodyka doświadczeń w warunkach <i>in vitro</i> .....   | 21 |
| WYNIKI BADAŃ .....  | 25 |
| Etap 1: Wyniki doświadczenia w warunkach <i>in vivo</i> .....   | 25 |
| 1.1 Zmiany w masie ciała owiec pochodzących z ciąży pojedynczej oraz bliźniaczej .....                                | 25 |
| 1.2. Zmiany stężenia KiSS-10 w osoczu krwi owiec w okresie dojrzewania płciowego.....                                 | 26 |
| 1.3. Zmiany stężenia NKB w osoczu krwi owiec w okresie dojrzewania płciowego .....                                    | 27 |
| 1.4. Zmiany stężenia Dyn A w osoczu krwi owiec w okresie dojrzewania płciowego .....                                  | 28 |
| 1.5. Zależności między zmianami stężeń KiSS-10, NKB i Dyn A w osoczu krwi owiec w okresie dojrzewania płciowego ..... | 29 |
| Etap 2: Wyniki doświadczeń w warunkach <i>in vitro</i> .....  | 31 |
| 2.1. Wpływ KiSS-10 na wydzielanie LH przez komórki przysadki gruczołowej jarek <i>in vitro</i> .....                  | 32 |
| 2.2. Wpływ KiSS-10 na wydzielanie FSH przez komórki przysadki gruczołowej jarek <i>in vitro</i> .....                 | 33 |
| 2.3. Wpływ NKB na wydzielanie LH przez komórki przysadki gruczołowej jarek <i>in vitro</i> .....                      | 34 |
| 2.4. Wpływ NKB na wydzielanie FSH przez komórki przysadki gruczołowej jarek <i>in vitro</i> .....                     | 35 |
| 2.5. Wpływ Dyn A na wydzielanie LH przez komórki przysadki gruczołowej jarek <i>in vitro</i> .....                    | 36 |
| 2.6. Wpływ Dyn A na wydzielanie FSH przez komórki przysadki gruczołowej jarek <i>in vitro</i> .....                   | 37 |
| 2.7. Wpływ NKB na wydzielanie KiSS-10 przez komórki przysadki gruczołowej jarek <i>in vitro</i> .....                 | 38 |
| 2.8. Wpływ Dyn A na wydzielanie KiSS-10 przez komórki przysadki gruczołowej jarek <i>in vitro</i> .....               | 39 |
| DYSKUSJA.....   | 40 |
| WNIOSKI.....  | 45 |
| BIBLIOGRAFIA .....  | 46 |
| PUBLIKACJE NAUKOWE WCHODZĄCE W SKŁAD CYKLU .....  | 50 |

## WYKAZ SKRÓTÓW

|              |   |
|--------------|---|
| ARC          | jądro łukowate podwzgórza (arcuate nucleus of the hypothalamus)   |
| BSA          | albumina surowicy bydłej (bovine serum albumin)   |
| DMEM         | podłoże DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)   |
| Dyn A        | dynorfina A (dynorphin A)   |
| FSH          | hormon folikulotropowy (follicle stimulating hormone)   |
| GnRH         | gonadoliberyna (gonadotrophin -releasing hormone)   |
| GPR54        | receptor błonowy związany z białkiem G54 (G protein-coupled receptor 54)  |
| HEPES        | kwas 2-(4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazyno)-etanosulfonowy<br>(4-(2-hydroxyethyl)piperazine -1-ethanesulfonic acid) |
| HPG          | oś podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalna (hypothalamic-pituitary-gonadal axis)                                       |
| HPO          | oś podwzgórzowo-przysadkowo-jajnikowa (hypothalamic-pituitary-ovarian axis)                                       |
| <i>KISS1</i> | gen kodujący kisspeptynę (kisspeptin coding gene)   |
| KiSS         | kisspeptyna (kisspeptin)  |
| KiSS-10      | kisspeptyna – 10 (kisspeptin-10)  |
| KNDy         | kisspeptyna, neurokinina B i dynorfina A (kisspeptin, neurokinin B and dynorphin A)                               |
| KOR          | receptor opioidowy kappa (kappa opioid receptor)  |
| LH           | hormon luteinizujący (luteinizing hormone)  |
| McCoy 5A     | podłoże McCoy 5A (McCoy 5A medium)  |
| NK1R         | receptor neurokininy 1 (neurokinin 1 receptor)  |
| NK2R         | receptor neurokininy 2 (neurokinin 2 receptor)  |

|              |  |
|--------------|--|
| NK3R         | receptor neurokininy 3 (neurokinin 3 receptor)                 |
| NKB          | neurokinina B (neurokinin B)                                   |
| OB-Ra        | krótka forma receptora leptyny (short form of leptin receptor) |
| OB-Rb        | długa forma receptora leptyny (long form of leptin receptor)   |
| <i>Pdyn</i>  | gen kodujący dynorfinę A (dynorphin A coding gene)             |
| POA          | pole przedwzrokowe (preoptic area)                             |
| S            | owce pochodzące z ciąży pojedynczej (singletons)               |
| T            | owce pochodzące z ciąży mnogiej (twins)                        |
| <i>TAC3</i>  | gen kodujący neurokininę B (neurokinin B coding gene)          |
| <i>TACR3</i> | gen kodujący receptor NK3R (neurokinin B receptor coding gene) |

## STRESZCZENIE

Dojrzewanie płciowe to wieloczynnikowy i złożony proces, warunkowany między innymi osiągnięciem odpowiedniej masy ciała oraz krytycznej masy tkanki tłuszczowej a także właściwym funkcjonowaniem endokrynych mechanizmów regulacyjnych. W przypadku przeżuwaczy terminowe osiągnięcie dojrzałości płciowej przyczynia się do zwiększenia wydajności rozrodczej stada oraz ekonomicznej efektywności hodowli. Jednym z problemów, obserwowanych w pierwszym roku życia zwierząt, jest opóźnienie dojrzewania, które wiąże się z zaburzeniami metabolicznymi i neurohormonalnymi.

KNDy (K – kisspeptyna, N – neurokinina B, Dy – dynorfina) to neuropeptydy produkowane i wydzielane m.in. przez jądro łukowate podwzgórza, uczestniczące w neuroendokrynej regulacji rozwoju i funkcjonowania układu rozrodczego. Kisspeptyny, w tym kisspeptyna-10 (KiSS-10), odgrywają ważną rolę w inicjowaniu procesu dojrzewania, aktywują neurony GnRH, pobudzając produkcję i wydzielanie gonadoliberyny, a w konsekwencji sekrecję LH oraz FSH z przysadki mózgowej. Nieliczne doniesienia dowodzą, że neurokinina B (NKB) i dynorfina A (Dyn A) również mogą uczestniczyć w regulacji procesów rozrodczych u przeżuwaczy. Dotychczas brakowało jednak danych nt. zależności pomiędzy układem neurohormonów KiSS, NKB i Dyn A a czasem inicjacji dojrzewania płciowego u owiec. Ponadto, dostępne doniesienia na temat wpływu NKB i Dyn A na wydzielanie gonadotropin przez komórki przysadki mózgowej *in vitro* są nieliczne, niejednoznaczne i nie odnoszą się do owiec. Brak też danych o bezpośrednim oddziaływaniu NKB i Dyn A na sekrecję KiSS-10 na poziomie przysadki mózgowej owiec w okresie dojrzewania płciowego.

Doświadczenie zostało przeprowadzone w dwóch etapach. W pierwszym, zrealizowanym w warunkach *in vivo*, zostały wykorzystane dwadzieścia cztery jarki rasy Uhuska. Pierwsza grupa składała się z jagniąt pochodzących z ciąży pojedynczej (S; n = 13), natomiast druga grupa z jarek pochodzących z ciąży bliźniaczej i tym samym predysponowanych do opóźnionego dojrzewania płciowego (T; n = 11). Celem pracy było określenie zmian stężeń KiSS-10, NKB, Dyn A w osoczu krwi jarek w okresie od czwartego do dziesiątego miesiąca życia jak również analiza zależności pomiędzy stężeniem tych neuropeptydów a terminem pierwszej owulacji obu badanych grup owiec. Celem drugiego etapu doświadczenia, przeprowadzonego w warunkach *in vitro*, było

z kolei zbadanie wpływu KiSS-10, NKB i Dyn A na wydzielanie LH oraz FSH oraz analiza oddziaływania NKB i Dyn A na wydzielanie KiSS - 10 przez komórki przysadki gruczołowej jarek.

Badania przeprowadzone w warunkach *in vivo* wykazały, iż wiek, w którym jarki osiągają dojrzałość płciową, zależy od typu ciąży, z której pochodzą (pojedyncza/mnoga), tempa przyrostów masy ciała oraz stężenia analizowanych neuropeptydów w osoczu krwi. U owiec pochodzących z ciąży pojedynczej pierwszą owulację stwierdzono w wieku 8 miesięcy, natomiast z ciąży bliźniaczej 2 miesiące później. Średnia masa ciała owiec pochodzących z ciąży pojedynczej przez cały okres badań była wyższa niż w grupie owiec pochodzących z ciąży bliźniaczej. Zarówno u owiec z grupy S jak i T wykazano dodatnią korelację między zmianami stężeń KiSS-10 i NKB w osoczu krwi wraz z wiekiem (S:  $r = 0.86$ , T:  $r = 0.89$ ). Równocześnie, w tych samych warunkach, stwierdzono ujemną korelację między KiSS-10 a Dyn A (S:  $r = -0.55$ , T:  $r = -0.98$ ) oraz między NKB a Dyn A (S:  $r = -0.89$ , T:  $r = -0.94$ ). U owiec pochodzących z ciąży pojedynczej zapoczątkowanie aktywności jajników związane było z istotnym statystycznie ( $P \leq 0,05$ ) wzrostem stężeń KiSS-10 (S:  $95,28 \pm 5,21$  ng/l) oraz NKB (S:  $384,19 \pm 38,36$  ng/l) po ukończeniu 8. miesiąca życia, natomiast u owiec pochodzących z ciąży bliźniaczej ze znaczącym wzrostem stężenia KiSS-10 (T:  $95,80 \pm 7,4$  ng/l) w 10. miesiącu życia, poprzedzonym wzrostem stężenia NKB (T:  $364,70 \pm 47,52$  ng/l) po ukończeniu 9. miesiąca życia. Opóźnienie dojrzewania płciowego u owiec pochodzących z grupy T powiązane było z utrzymującym się do ukończenia 8. miesiąca życia wyższym poziomem Dyn A przy równocześnie niższych stężeniach KiSS-10 i NKB w osoczu krwi w porównaniu do grupy S (publikacja nr 3).

W drugim etapie badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro* wykazano bezpośredni wpływ KiSS-10, NKB i Dyn A na wydzielanie gonadotropin przez komórki przysadki gruczołowej owiec. Po 4, 12 i 24 godzinach ekspozycji na KiSS-10 stwierdzono wzrost wydzielania LH ( $10^{-11}$ - $10^{-8}$  M KiSS-10) oraz FSH ( $10^{-11}$ - $10^{-7}$  M KiSS-10) w porównaniu z kontrolą. Najwyższy poziom wydzielania LH odnotowano po 24-godzinnej ekspozycji komórek na  $10^{-8}$  M KiSS-10. Statystycznie istotny ( $P \leq 0,05$ ) wzrost wydzielania FSH zaobserwowano po 12 i 24 godzinach przy stężeniu  $10^{-9}$  M KiSS-10 w porównaniu z kontrolą. NKB i Dyn A we wszystkich zastosowanych stężeniach ( $10^{-11}$ - $10^{-7}$  M) pobudzały wydzielanie zarówno LH, jak i FSH. Najsilniejsze działanie stymulujące ( $P \leq 0,05$ ) na wydzielanie LH zaobserwowano po 12- i 24-godzinnej ekspozycji na  $10^{-8}$  M NKB. Wydzielanie FSH osiągnęło maksimum po 12 i 24 godzinach

ekspozycji komórek na najwyższe stężenie ( $10^{-7}$  M) NKB. Wartości te były statystycznie istotnie ( $P \leq 0,05$ ) wyższe w porównaniu z kontrolą. Dyn A w stężeniach  $10^{-10}$ - $10^{-7}$  M istotnie statystycznie ( $P \leq 0,05$ ) zwiększała wydzielanie LH, natomiast w stężeniach  $10^{-11}$ - $10^{-9}$  M ( $P \leq 0,05$ ) wydzielanie FSH w porównaniu do kontroli (publikacja nr 1). Wpływ NKB na wydzielanie KiSS-10 przez komórki przysadki gruczołowej zależał od czasu ekspozycji i jej stężenia w podłożu hodowlanym. NKB, w przeciwieństwie do Dyn A, miała znaczący ( $P \leq 0,05$ ) wpływ na wydzielanie KiSS-10 z komórek przysadki gruczołowej owiec po 6, 12, 18, 24 godzinach w stężeniu  $10^{-8}$  M oraz po 24 godzinach w stężeniu  $10^{-7}$  M. Dyn A we wszystkich zastosowanych stężeniach ( $10^{-11}$ - $10^{-7}$  M) przez cały okres trwania doświadczenia nie miała znaczącego wpływu na wydzielanie KiSS-10 (publikacja nr 2).

Uzyskane pionierskie wyniki wskazują na znaczącą rolę badanych neuropeptydów w kontroli inicjacji aktywności rozrodczej u owiec. Stwierdzono bezpośrednie oddziaływanie KiSS-10, NKB i Dyn A na sekrecję gonadotropin na poziomie przysadki gruczołowej. Ponadto pobudzający wpływ NKB na wydzielanie KiSS-10 z komórek przysadki świadczy o możliwości pośredniego oddziaływania tego neuropeptydu na wydzielanie gonadotropin (głównie LH).

**Słowa kluczowe:** dojrzewanie płciowe, dynorfina A, gonadotropiny, kisspeptyna-10, neurokinina B

## SUMMARY

Puberty is a multifactorial and complex process determined, among others, by the attainment of an appropriate body weight and a critical adipose tissue mass and the proper functioning of endocrine regulatory mechanisms. In ruminants, the timely attainment of sexual maturity contributes to increased reproductive performance of the flock and to the economic efficiency of breeding. One of the problems observed during the first year of life in animals is delayed puberty, which is associated with metabolic and neurohormonal disturbances.

KNDy (K – kisspeptin, N – neurokinin B, Dy – dynorphin) are neuropeptides produced and secreted, among others, by the arcuate nucleus of the hypothalamus. They are involved in the neuroendocrine regulation of the development and functioning of the reproductive system. Kisspeptins, including kisspeptin-10 (KiSS-10), play an important role in the initiation of puberty; they activate GnRH neurons, thereby stimulating the production and secretion of gonadoliberein and, consequently, the secretion of LH and FSH from the pituitary gland. Limited reports indicate that neurokinin B (NKB) and dynorphin A (Dyn A) may also participate in the regulation of reproductive processes in ruminants. However, to date, there have been no data on the relationship between the KiSS, NKB, and Dyn A neurohormone system and the timing of puberty initiation in sheep. Moreover, the available reports on the effects of NKB and Dyn A on gonadotropin secretion by pituitary cells *in vitro* are ambiguous and do not relate to sheep. There are also no data on the direct effects of NKB and Dyn A on KiSS-10 secretion at the pituitary level in ewes during puberty.

The experiment was conducted in two stages. In the first stage, carried out under *in vivo* conditions, twenty-four Uhruska ewe lambs were used. The first group consisted of lambs derived from singleton pregnancies (S; n = 13), whereas the second group comprised ewe lambs from twin pregnancies and thus predisposed to delayed puberty (T; n = 11). The aim of the study was to determine changes in plasma concentrations of KiSS-10, NKB, and Dyn A in ewe lambs from the fourth to the tenth month of life and to analyse the relationship between the concentrations of these neuropeptides and the timing of the first ovulation in both groups of sheep. The aim of the second stage of the experiment, conducted under *in vitro* conditions, was to investigate the effects of KiSS-10, NKB, and Dyn A on LH and FSH secretion and to analyse the influence of NKB and Dyn A on KiSS-10 secretion by anterior pituitary cells in ewe lambs.

The *in vivo* studies demonstrated that the age at which ewe lambs attain sexual maturity depends on the type of pregnancy from which they originate (singleton/multiple), the rate of body weight gain, and the concentrations of the analysed neuropeptides in blood plasma. In sheep originating from singleton pregnancies, the first ovulation was observed at 8 months of age, whereas in those derived from twin pregnancies it occurred 2 months later. The mean body weight of ewes from singleton pregnancies was higher throughout the entire experimental period than in the group coming from twin pregnancies. In both the S and T groups, a positive correlation was demonstrated between changes in plasma KiSS-10 and NKB concentrations with age (S:  $r = 0.86$ , T:  $r = 0.89$ ). At the same time, under the same conditions, a negative correlation was found between KiSS-10 and Dyn A (S:  $r = -0.55$ , T:  $r = -0.98$ ), as well as between NKB and Dyn A (S:  $r = -0.89$ , T:  $r = -0.94$ ). In singleton ewes, the initiation of ovarian activity was associated with a statistically significant ( $P \leq 0.05$ ) increase in KiSS-10 (S:  $95.28 \pm 5.21$  ng/l) and NKB (S:  $384.19 \pm 38.36$  ng/l) concentrations after 8 months of age, whereas in sheep coming from twin pregnancies, it was associated with a significant increase in KiSS-10 concentration (T:  $95.80 \pm 7.4$  ng/l) in the 10th month of life, preceded by an increase in NKB concentration (T:  $364.70 \pm 47.52$  ng/l) after 9 months of age. Delayed puberty in sheep from group T was associated with a persistently higher level of Dyn A up to 8 months of age, accompanied by lower plasma concentrations of KiSS-10 and NKB compared with group S (publication no. 3).

In the second stage of the study, conducted under *in vitro* conditions, a direct effect of KiSS-10, NKB, and Dyn A on gonadotropin secretion by ovine anterior pituitary cells was demonstrated. After 4, 12, and 24 hours of exposure to KiSS-10, an increase in LH secretion ( $10^{-11}$ – $10^{-8}$  M KiSS-10) and FSH secretion ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M KiSS-10) was found, compared with the control. The highest level of LH secretion was recorded after 24-hour exposure of cells to  $10^{-8}$  M KiSS-10. A statistically significant ( $P \leq 0.05$ ) increase in FSH secretion was observed after 12 and 24 hours at a concentration of  $10^{-9}$  M KiSS-10 compared with the control. NKB and Dyn A, at all concentrations used ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M), stimulated the secretion of both LH and FSH. The strongest stimulatory effect ( $P \leq 0.05$ ) on LH secretion was observed after 12- and 24-hour exposure to  $10^{-8}$  M NKB. FSH secretion reached its maximum after 12 and 24 hours of cell exposure to the highest concentration ( $10^{-7}$  M) of NKB. These values were statistically significantly higher ( $P \leq 0.05$ ) than those in the control. Dyn A at concentrations of  $10^{-10}$ – $10^{-7}$  M significantly increased LH secretion ( $P \leq 0.05$ ), whereas at concentrations of  $10^{-11}$ – $10^{-9}$  M,

it significantly increased FSH secretion ( $P \leq 0.05$ ), compared with the control (publication no. 1). The effect of NKB on KiSS-10 secretion by anterior pituitary cells depended on the duration of exposure and its concentration in the culture medium. NKB, unlike Dyn A, had a significant effect ( $P \leq 0.05$ ) on KiSS-10 secretion from ovine pituitary cells after 6, 12, 18, and 24 hours at a concentration of  $10^{-8}$  M, and after 24 hours at a concentration of  $10^{-7}$  M. Dyn A, at all concentrations used ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M), had no significant effect on KiSS-10 secretion throughout the duration of the experiment (publication no. 2).

The obtained pioneering results indicate a significant role of the studied neuropeptides in the control of initiation of reproductive activity in sheep. A direct effect of KiSS-10, NKB, and Dyn A on gonadotropin secretion at the pituitary level was demonstrated. Moreover, the stimulatory effect of NKB on KiSS-10 secretion by ovine anterior pituitary cells indicates the possibility of an indirect effect of this neuropeptide on gonadotropin secretion, mainly LH.

**Keywords:** dynorphin A, gonadotropins, kisspeptin-10, neurokinin B, puberty

## WSTĘP

Dojrzewanie płciowe to wieloczynnikowy i złożony proces, warunkowany między innymi osiągnięciem odpowiedniej masy ciała oraz krytycznej masy tkanki tłuszczowej, a także właściwym funkcjonowaniem endokrynych mechanizmów regulacyjnych. W przypadku przeżuwaczy terminowe osiągnięcie dojrzałości płciowej przyczynia się do zwiększenia wydajności rozrodczej stada jak również ekonomicznej efektywności hodowli. Jednym z problemów, obserwowanych w pierwszym roku życia zwierząt, jest opóźnienie dojrzewania, które wiąże się z zaburzeniami metabolicznymi jak i neurohormonalnymi (Abadjieva i in. 2011, Castellano i in. 2005, Seminara i in. 2003). Niska urodzeniowa masa ciała jest jedną z przyczyn opóźnionego dojrzewania płciowego u owiec. Problem ten dotyczy przede wszystkim jagniąt pochodzących z ciąży mnogiej oraz będących potomstwem matek o wysokiej masie ciała (Kosior -Korzecka i in. 2012, Rosales Nieto C.A. i in. 2013, Rosales Nieto C.A. i in. 2014). Osiągnięcie dojrzałości płciowej poprzez aktywację osi podwzgórze-przysadka-jajniki (HPO) zależy od obecności zapasów tłuszczu zawartych w podskórnej jak i trzewnej tkance tłuszczowej, a także kluczowych sygnałów metabolicznych, m. in. odpowiedniego stężenia leptyny w osoczu krwi (Woller i in. 2001). Leptyna, peptyd uwalniany z białej tkanki tłuszczowej, wiążąc się z receptorami OB-Rb i OB-Ra w podwzgórze, powoduje aktywację neuronów GnRH, doprowadzając do uwalniania gonadoliberyny, a w konsekwencji do sekrecji LH i FSH przez przedni płat przysadki mózgowej (Smith i in. 2006, Woller i in. 2001). W podwzgórze, w oddziaływaniu tym, pośredniczą liczne czynniki neuronalne, w tym kisspeptyny (KiSS) (Ahima i in. 2011, Hausman i in. 2012, Qiu i in. 2011). KiSS, razem z neurokininą B (NKB) oraz dynorfiną A (Dyn A), zbiorczo określane jako KNDy, to kluczowe neuropeptydy produkowane i wydzielane przez jądro łukowate podwzgórza (ARC), biorące udział w endokrynej kontroli dojrzewania płciowego.

KiSS, kodowane przez gen *KISS1*, należą do rodziny hormonów RF-amidowych. Wiążąc się ze swoim receptorem sprzężonym z białkiem G 54 (GPR54) na neuronach ARC i pola przedwzrostowego (POA) podwzgórza inicjują wzrost pulsacyjnego wydzielania GnRH, co doprowadza do uwalniania LH oraz FSH. Wiadomo, że centralne podanie KiSS-1 zwiększa stężenie LH w osoczu u samic szczurów Wistar przed osiągnięciem dojrzałości płciowej (Navarro i in. 2004), natomiast KiSS podana dokomorowo u owiec stymuluje wydzielanie LH w okresie anestrus (Messenger i in. 2005).

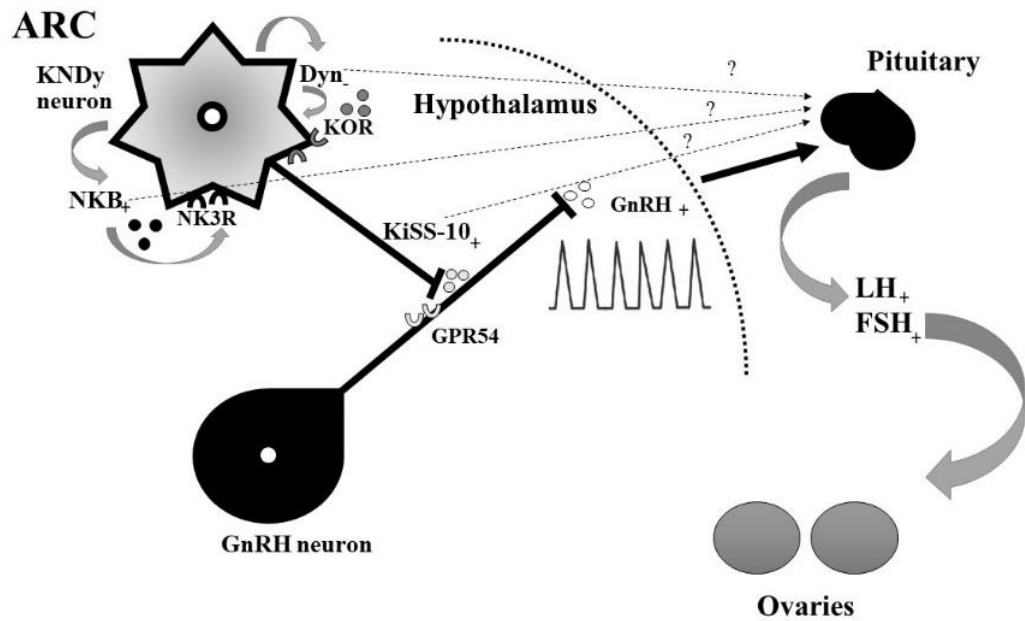
Redmond i in. (2011) wykazali, że dożylnie podanie KiSS u owiec przed okresem dojrzewania nasila pulsacyjne wydzielanie LH. Dodatkowo, badania przeprowadzone na jarkach rasy Small Tail Han Sheep dowiodły, iż dożylna administracja KiSS-10 w stężeniach 0,5; 1 i 2 mg zwiększała sekrecję LH (Wang i in. 2012). Wysoki poziom ekspresji receptorów GPR54 stwierdzono także w komórkach gonadotropowych, co wskazuje na możliwość bezpośredniego oddziaływania KiSS na poziomie przysadki mózgowej (Luque i in. 2011, Richard i in. 2009). Suzuki i in. (2008) wykazali bezpośredni stymulujący wpływ KiSS-10 na wydzielanie LH przez komórki przedniego płata przysadki bydła i świni. Wszelkie nieprawidłowości w układzie KiSS/GPR54 mogą powodować różne formy zaburzeń rozrodczych, m. in. opóźnienie dojrzewania płciowego lub idiopatyczny hipogonadyzm hipogonadotropowy (Kant i in. 2020).

KiSS wraz z NKB są kluczowymi neuropeptydami, biorącymi udział w endokrynnej regulacji procesu dojrzewania płciowego (Navarro 2013). NKB kodowana przez gen *TAC3* u owiec (Li i in. 2020), to 10-aminokwasowy peptyd należący do rodziny tachykinin, m.in. razem z neurokininą A oraz substancją P (Pinilla i in. 2012). Do tej pory zidentyfikowano trzy receptory tachykinin: dla neurokininy-1 (NK1R), neurokininy-2 (NK2R) oraz neurokininy-3 (NK3R), który jest receptorem dla NKB (Pinilla i in. 2012). Receptor NK3R występuje głównie w ośrodkowym układzie nerwowym, gdzie jest ekspresjonowany przez neurony KNDy w ARC (Navarro i in. 2009). Układ NKB/NK3R jest regulowanym przez hormony płciowe, jednym z głównych modulatorów osi HPO (Navarro i in. 2009). NKB jest ważną składową mechanizmu odpowiedzialnego za inicjację procesu dojrzewania płciowego owiec, ponieważ aktywacja receptora NK3 dla NKB wywołuje wydzielanie LH w sposób zależny od GnRH (Bedenbaugh i in. 2020). Wiadomo, że mutacje w genach *TAC3* lub *TACR3*, kodujących odpowiednio neurokininę B (NKB) lub jej receptor NK3R, powodują wystąpienie hipogonadyzmu hipogonadotropowego u ludzi (Rance i in. 2010, Topaloglu i in. 2009, Young i in. 2010). Badania przeprowadzone przez Nestor i in. (2012) wykazały, iż jednokrotne dożylnie podanie senktydu (agonisty NKB) zwiększało wydzielanie LH u samic owiec przed okresem dojrzewania płciowego. Co więcej, Aerts i in. (2024) wykazali, że uszkodzenie neuronów KNDy u owiec spowodowane podaniem NK3-Saporyny do obszaru ARC, doprowadziło do wystąpienia opóźnionego dojrzewania płciowego.

Dyn A, kodowana przez gen *Pdyn*, to związek z rodziny endogennych peptydów opioidowych, która obejmuje również  $\beta$ -endorfinę i enkefalinę (Uenoyama i in. 2021).

Receptorem dla dynorfiny jest opioidowy receptor kappa (KOR), silnie ekspresjonowany w ośrodkowym układzie nerwowym, zwłaszcza w neuronach KNDy oraz GnRH (Weems i in. 2018). Funkcja dynorfiny jako endogennego peptydu opioidowego polega na inhibicji wydzielania hormonów gonadotropowych oraz zmniejszeniu odpowiedzi LH na kisspeptynę -10 (KiSS – 10) (Pinilla i in. 2012). Lopez i in. (2016) wykazali, że dokomorowe podanie antagonisty KOR (norbinaltorfiminu) znacząco podnosiło średnie poziomy LH w porównaniu z grupą kontrolną u owiec poddanych ovariectomii przed osiągnięciem dojrzałości płciowej, po aplikacji implantu estrogenowego. NKB i Dyn A mogą odgrywać ważną rolę w syntezie oraz sekrecji hormonów na poziomie przedniego płata przysadki (Mijiddorj i in. 2012). Badania przeprowadzone na mysiej linii komórkowej LβT2 wykazały obecność NK3R i KOR, jednak zarówno NKB jak i Dyn nie aktywowały promotora FSHβ i LHβ (Mijiddorj i in. 2012).

Dostępne doniesienia na temat wpływu NKB i Dyn A na wydzielanie gonadotropin przez komórki przysadki gruczołowej *in vitro* są nieliczne, niejednoznaczne i nie odnoszą się do owiec (Ryc. 1.). Brakuje również danych dotyczących bezpośredniego oddziaływania NKB i Dyn A na sekrecję KiSS-10 na poziomie przysadki mózgowej owiec w okresie dojrzewania płciowego, jak również zależności pomiędzy układem neurohormonów KiSS, NKB i Dyn A a czasem inicjacji dojrzewania płciowego u owiec.



**Ryc. 1.** Rola kisspeptyny-10 (KiSS-10), neurokininy B (NKB) i dynorfiny A w regulacji hormonalnej dojrzewania płciowego, ARC – jądro łukowate podwzgórza; KNDy – kisspeptyna, neurokinina B i dynorfina; GPR54 – receptor błonowy związany z białkiem G54; NK3R – receptor neurokininy 3; KOR – receptor opioidowy kappa; GnRH – gonadoliberyna; LH – hormon luteinizujący; FSH – hormon folikulotropowy; + – działanie pobudzające; – – działanie hamujące; ? – rola nieznana

(źródło: Szysiak N., Kosior-Korzecka U., Longo V., Patkowski K., Greguła-Kania M., Nowakiewicz A., Bochniarz M., Junkuszew A.: Influence of neurokinin B, dynorphin A and kisspeptin-10 on *in vitro* gonadotropin secretion by anterior pituitary cells isolated from pubescent ewes. J Vet Res 2025, 69, 121–129, doi: 10.2478/jvetres-2025-0003.)

## HIPOTEZA I CEL BADAŃ

Niska urodzeniowa masa ciała jest jednym z czynników powodujących zaburzenia aktywności reprodukcyjnej poprzez opóźnienie dojrzewania płciowego, co stanowi problem natury ekonomicznej u owiec ras wysokoplennych. Owce nie osiągają wtedy dojrzałości płciowej w pierwszym sezonie rozplodowym. KiSS-10, NKB i Dyn A, zbiorczo określane jako neuropeptydy KNDy i uznawane za kluczowe związki produkowane i wydzielane przez jądro łukowate podwzgórza (ARC), biorą udział w endokrynej regulacji początku dojrzewania. W związku z powyższym prowadzone badania mają również istotny aspekt ekonomiczny w odniesieniu do hodowli zwierząt gospodarczych. Dotychczas brakowało jednak danych nt. zależności pomiędzy układem neurohormonów KiSS, NKB i Dyn A a czasem inicjacji dojrzewania płciowego u owiec. Ponadto, dostępne doniesienia na temat wpływu NKB i Dyn A na wydzielanie gonadotropin przez komórki przysadki mózgowej *in vitro* są nieliczne, niejednoznaczne i nie odnoszą się do owiec. Brak też danych o bezpośrednim oddziaływaniu NKB i Dyn A na sekrecję KiSS-10 na poziomie przysadki mózgowej owiec w okresie dojrzewania płciowego. W związku z powyższym postawiono następujące hipotezy badawcze:

- Istnieje zależność pomiędzy stężeniem kisspeptyny-10, neurokininy B i dynorfiny A w osoczu krwi oraz masą ciała owiec a terminem pierwszej owulacji.
- Kisspeptyna-10, neurokinina B oraz dynorfina A oddziałują na wydzielanie hormonów gonadotropowych przez komórki przysadki gruczołowej jarek *in vitro*.
- Neurokinina B i dynorfina A mają wpływ na sekrecję kisspeptyny-10 przez komórki przysadki gruczołowej jarek w warunkach *in vitro*.

Weryfikacja powyższych hipotez badawczych wymagała realizacji następujących celów szczegółowych takich jak:

1. Analiza zmian stężeń kisspeptyny-10, neurokininy B i dynorfiny A w osoczu krwi oraz masy ciała owiec pochodzących z ciąży pojedynczej i mnogiej w okresie od czwartego do dziesiątego miesiąca życia.

2. Analiza zależności pomiędzy stężeniem kisspeptyny-10, neurokininy B i dynorfiny A w osoczu krwi a terminem pierwszej owulacji u owiec pochodzących z ciąży mnogiej, predysponowanych do opóźnienia dojrzewania płciowego, oraz u owiec pochodzących z ciąży pojedynczej.
  
3. Określenie wpływu kisspeptyny-10, neurokininy B i dynorfiny A na wydzielanie LH i FSH przez komórki przedniego płata przysadki gruczołowej jarek w warunkach *in vitro*.
  
4. Analizy wpływu neurokininy B i dynorfiny A na wydzielanie kisspeptyny-10 przez komórki przedniego płata przysadki gruczołowej jarek *in vitro*.

# MATERIAŁY I METODY

## Układ doświadczalny

Protokół doświadczenia oraz związane z nim wszystkie procedury zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Lublinie (UCHWAŁA NR 65/2023).

### **Etap I: Schemat i metodyka doświadczenia w warunkach *in vivo***

**(publikacja nr 3: Szysiak et al., *J Vet Res* 2026, 70, 139-147, doi: 10.2478/jvetres-2026-0010)**

#### **Realizacja celu nr 1 i 2.**

W badaniu wykorzystano dwadzieścia cztery owce płci żeńskiej rasy Uhruska. Pierwsza grupa składała się z jagniąt pochodzących z ciąży pojedynczej ( $n = 13$ ), natomiast druga grupa pochodzących z ciąży bliźniaczej, predysponowanych do opóźnionego dojrzewania płciowego ( $n = 11$ ). Doświadczenie zostało przeprowadzone w miesiącach od stycznia do listopada. Zwierzęta były utrzymywane w identycznych warunkach środowiskowych i karmione zgodnie z systemem żywieniowym francuskiego *Institut National de la Recherche Agronomique* (zgodnie ze statusem fizjologicznym).

Owce były ważone co 2 tygodnie od urodzenia do ukończenia 10. miesiąca życia. Równocześnie od 6. do 10. miesiąca metodą laparoskopową (R.Wolf Laparoscope) monitorowana była aktywność jajników pod kątem obecności, liczby i średnicy pęcherzyków jajnikowych i/lub obecności ciałek żółtych. Celem określenia stężenia NKB, Dyn A i KiSS-10 po ukończeniu 4., 5., 6., 7., 8., 9. i 10. miesiąca życia, przez 2 godziny co 15 minut, pobierana była krew z żyły szyjnej zewnętrznej owiec obu badanych grup (Ryc. 2.). Osocze krwi przechowywano w temperaturze  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do dalszych analiz. Stężenia ww. neuropeptydów w osoczu zostały oznaczone metodą ELISA z użyciem specyficznych gatunkowo przeciwciał (Sheep NKB ELISA Kit, Sheep Dyn ELISA Kit (Sunred Biological Technology, Shanghai, China) oraz KiSS-1 (112–121)

Amide/Kisspeptin10/Metastin (45–54) Amide EIA (enzyme immunoassay) Kit (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, USA)).

Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem programu Statistica 13.3 PL (TIBCO, Palo Alto, Kalifornia, USA). Uzyskane dane zaprezentowano jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ( $x \pm S.D.$ ). W celu weryfikacji istotności różnic między parametrami mierzonymi u jagniąt pochodzących z ciąży pojedynczych oraz bliźniaczych zastosowano analizę wariancji oraz sparowane testy t-Studenta. Zależności pomiędzy badanymi zmiennymi (NKB, KiSS-10 i Dyn A) określono na podstawie współczynników korelacji liniowej Pearsona. We wszystkich analizach za próg istotności statystycznej przyjęto poziom  $P \leq 0,05$ .

## **Etap II: Schemat i metodyka doświadczeń w warunkach *in vitro***

**(publikacja nr 1 i 2: Szysiak et al., *J Vet Res* 2025, 69, 121–129, doi: 10.2478/jvetres-2025-0003 oraz Szysiak et al., *J Vet Res* 2025, 69, 299–304, doi: 10.2478/jvetres-2025-0026)**

### **Realizacja celu nr 3 i 4**

Przysadki mózgowe zostały pobrane od 10-miesięcznych owiec płci żeńskiej rasy Uhruska ( $n = 12$  (6 owiec z grupy S oraz 6 z grupy T)) w celu założenia hodowli pierwotnych *in vitro* (Fot. 1, 2, 3). Izolację komórek przeprowadzono wielokrotnie trawiąc przysadki 0,25% roztworem trypsyny (16-18 cykli). Po każdym cyklu trawienia komórki przemywano trzykrotnie podłożem DMEM zawierającym 0,59% HEPES, 0,1% BSA, 0,08% glukozy oraz gentamycynę w stężeniu 20  $\mu\text{g/ml}$ , a następnie odwirowywano (1200 obr./min, 10 min). Żywotność komórek określano poprzez barwienie błękitem trypanu (10  $\mu\text{l}$  zawiesiny komórek + 90  $\mu\text{l}$  0,4% roztworu błękitu trypanu). Komórki przysadki mózgowej zawieszano następnie w medium McCoy'a 5A zawierającym 2,5% surowicy cielęcej, 10% surowicy końskiej, 0,59% HEPES, mieszaniny aminokwasów i witamin oraz gentamycynę (20  $\mu\text{g/ml}$ ) (pH 7,4) (250 000 komórek/ml) oraz umieszczano w 24-dołkowych płytkach hodowlanych (1 ml/dołek). Hodowlę przeprowadzano w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$  i 95% powietrza, w temperaturze 37°C.

W celu określenia wpływu na wydzielanie LH i FSH, komórki przedniego płata przysadki gruczołowej były hodowane w podłożu McCoy'a 5A:

- 1) bez hormonów (kontrola);
- 2) z KiSS-10 ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M),
- 3) z NKB ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M),
- 4) z Dyn A ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M)

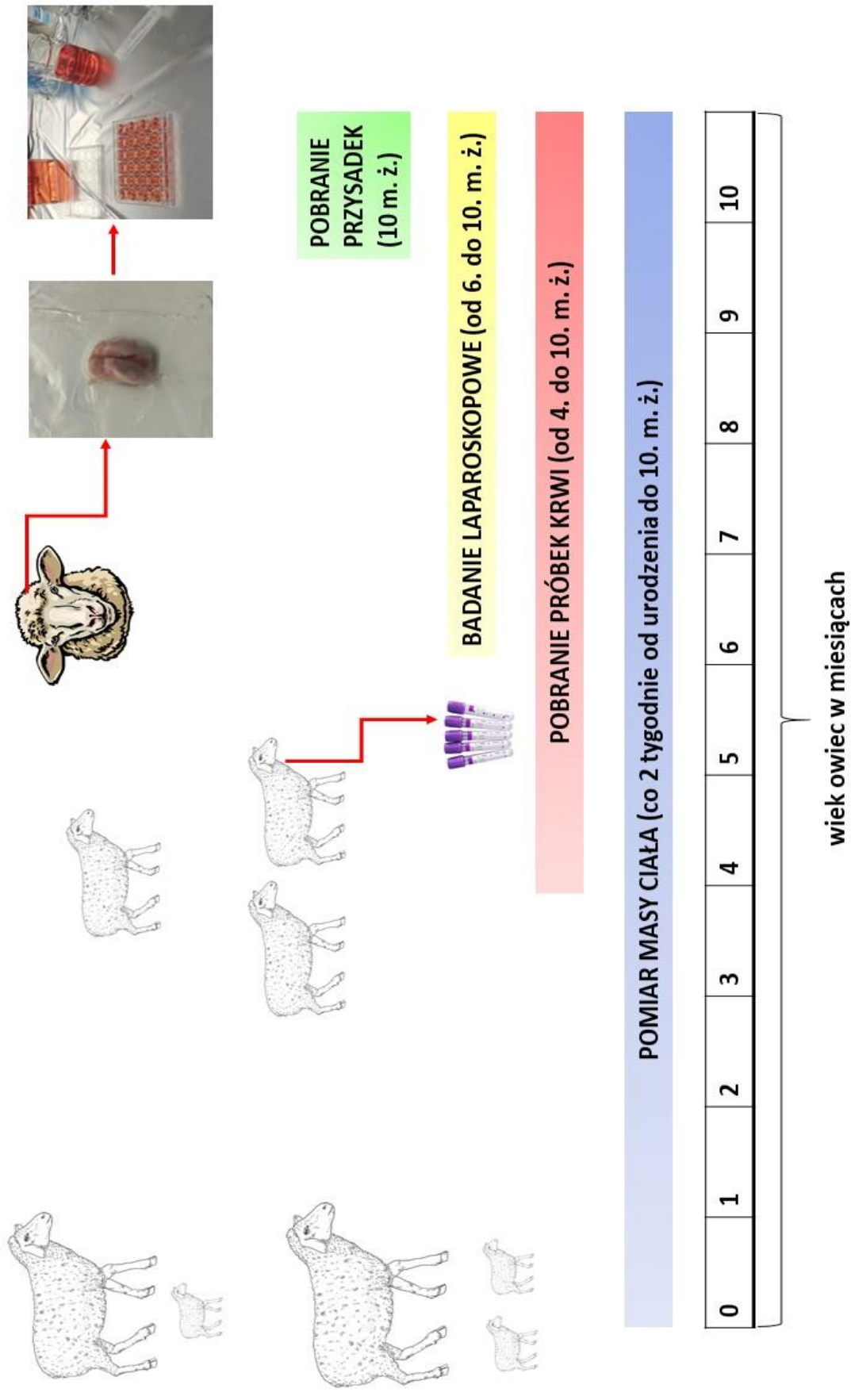
Po 4, 12, 24 godzinach zbierano podłoże, a następnie oznaczano stężenie hormonów gonadotropowych metodą ELISA z użyciem specyficznych gatunkowo przeciwciał (Sheep LH ELISA Kit; Sunred Biological Technology, Shanghai, China oraz Sheep FSH ELISA Kit; Sunred Biological Technology, Shanghai, China). Wydzielanie LH i FSH wyrażano jako stężenie (mIU/mL) hormonu uwalnianego do medium hodowlanego przez 250 000 komórek odpowiednio w ciągu 4, 12 i 24 godzin.

W celu określenia wpływu neurokininy B i dynorfiny A na wydzielanie kisspeptyny-10, komórki przysadki gruczołowej były hodowane w podłożu McCoy'a 5A:

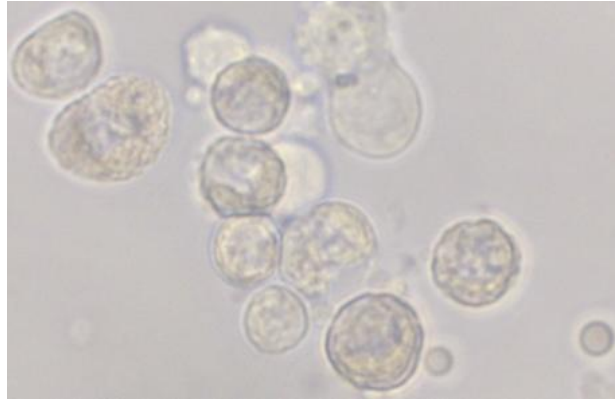
- 1) bez hormonów (kontrola);
- 2) z NKB ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M),
- 3) z Dyn A ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M)

Po 2, 4, 6, 12, 18, 24 godzinach zbierano podłoże, a następnie oznaczano stężenie kisspeptyny-10 metodą ELISA z użyciem specyficznych gatunkowo przeciwciał (KiSS-1 (112–121) Amide/Kisspeptin10/Metastin (45–54) Amide EIA Kit (Phoenix Pharmaceuticals Inc., CA, USA). Wydzielanie KiSS-10 wyrażano jako stężenie (ng/mL) hormonu uwalnianego do medium hodowlanego przez 250 000 komórek odpowiednio w ciągu 2, 4, 6, 12, 18 i 24 godzin.

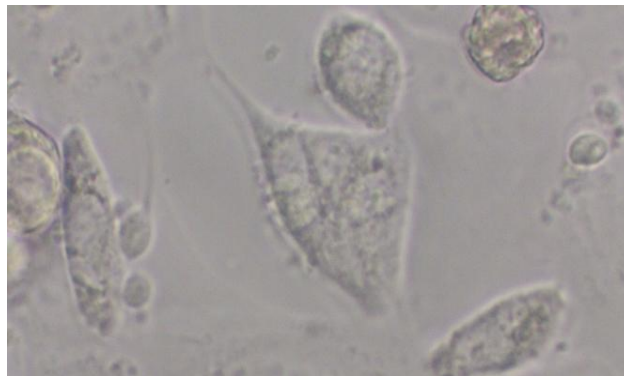
Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem programu Statistica 13.0 PL (TIBCO, Palo Alto, CA, USA). Uzyskane dane zaprezentowano jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ( $\bar{x} \pm S.D.$ ). Porównania między hodowlami kontrolnymi a doświadczalnymi oceniono za pomocą analizy wariancji oraz testów t-Studenta. Zależności pomiędzy badanymi zmiennymi (stężeniem KiSS-10 a wydzielaniem LH lub FSH, stężeniem NKB a wydzielaniem LH lub FSH, stężeniem Dyn A a wydzielaniem LH lub FSH, jak również stężeniem NKB lub stężeniem Dyn A a wydzielaniem KiSS-10) określono na podstawie współczynników korelacji liniowej Pearsona. We wszystkich analizach za próg istotności statystycznej przyjęto poziom  $P \leq 0,05$ .



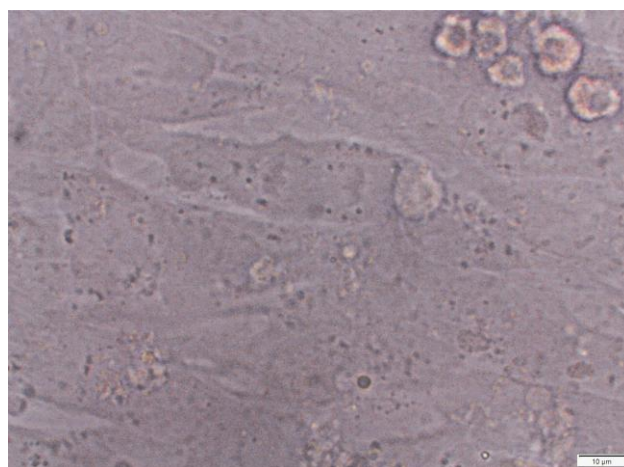
Ryc. 2. Schemat doświadczenia w warunkach *in vivo* (zdjęcia autorskie)



Fot. 1. Hodowla komórek przysadki gruczołowej owiec *in vitro* 12 godzin po izolacji (obraz spod mikroskopu odwróconego pola, Olympus CK 40; pow. 400x) (zdjęcie autorskie).



Fot. 2. Hodowla komórek przysadki mózgowej owiec *in vitro* 48 godzin po izolacji (obraz spod mikroskopu odwróconego pola, Olympus CK 40; pow. 400x). Komórki ulegają adhezji do dna studzienki i zaczynają się wzajemnie ze sobą kontaktować za pomocą wypustek cytoplazmatycznych (zdjęcie autorskie).



Fot. 3. Hodowla komórek przysadki mózgowej owiec *in vitro* 96 godzin po izolacji (obraz spod mikroskopu odwróconego pola, Olympus CK 40; pow. 400x). Komórki uległy adhezji do dna studzienki tworząc monowarstwę (zdjęcie autorskie)

# WYNIKI BADAŃ

## Etap 1: Wyniki doświadczenia w warunkach *in vivo*

(publikacja nr 3: Szysiak et al., *J Vet Res* 2026, 70, 139-147, doi: 10.2478/jvetres-2026-0010)

### 1.1 Zmiany w masie ciała owiec pochodzących z ciąży pojedynczej oraz bliźniaczej

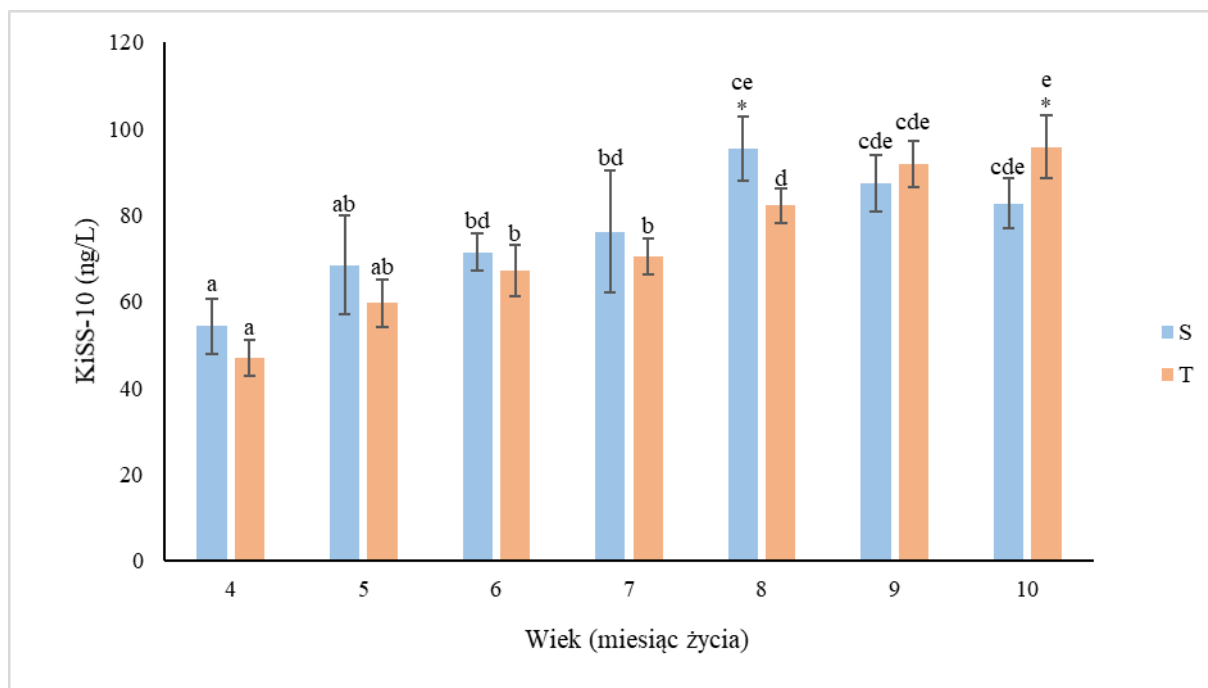
Średnia masa ciała owiec pochodzących z ciąży pojedynczej (S) w okresie od urodzenia do 10-go miesiąca życia była wyższa niż w grupie owiec pochodzących z ciąży bliźniaczej (T). Największą procentową różnicę w średniej masie ciała między grupami zaobserwowano bezpośrednio po urodzeniu. Dodatkowo, od narodzin do ukończenia dziewiątego miesiąca życia stwierdzano spadek procentowej różnicy średniej masy ciała między owcami z grupy S i T (Tab. 1.).

|   |   | Wiek (miesiąc życia) |             |             |             |             |             |             |             |
|---|---|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|   |   | 0                    | 4           | 5           | 6           | 7           | 8           | 9           | 10          |
| Średnia masa ciała (kg) ± SD                            | S | 5.60 ± 0.6           | 32.16 ± 4.6 | 34.69 ± 4.1 | 35.26 ± 4.2 | 37.57 ± 4.2 | 37.96 ± 3.9 | 39.27 ± 3.8 | 40.96 ± 3.9 |
|   | T | 4.70 ± 0.5           | 29.51 ± 5.1 | 31.86 ± 3.2 | 33.11 ± 2.9 | 35.97 ± 2.9 | 36.68 ± 3.1 | 38.23 ± 2.7 | 39.15 ± 2.6 |
| Procentowa różnica średniej masy ciała (%) między S a T |   | 16.07                | 8.24        | 8.16        | 6.10        | 4.26        | 3.37        | 2.65        | 4.42        |

**Tab. 1.** Średnia masa ciała (kg) (±SD) oraz procentowa różnica średniej masy ciała (%) między owcami z grupy S (owce pochodzące z ciąży pojedynczej) oraz T (owce pochodzące z ciąży bliźniaczej) w poszczególnych miesiącach życia

## 1.2. Zmiany stężenia KiSS-10 w osoczu krwi owiec w okresie dojrzewania płciowego

Stężenie KiSS-10 w osoczu krwi zmieniało się wraz z wiekiem jarek (Ryc. 3.). U owiec pochodzących z ciąży pojedynczej (S) poziom KiSS-10 wzrastał do 8. miesiąca, przy czym znaczny ( $P \leq 0,05$ ) wzrost odnotowano między 7. a 8. miesiącem. Wartość ta, powiązana z zapoczątkowaniem aktywności jajników, była znacząco wyższa ( $P \leq 0,05$ ) niż w okresie od 4. do 7. miesiąca. U owiec pochodzących z ciąży bliźniaczej (T) obserwowano ciągły wzrost poziomu KiSS-10 przez cały okres trwania doświadczenia. Najwyższe średnie stężenie KiSS-10 w osoczu stwierdzono po zakończeniu 10. miesiąca życia. Wartość stężenia KiSS-10 po ukończeniu 10. miesiąca życia u bliźniąt ( $95,80 \pm 7,4$  ng/l) była zbliżona do wartości stężenia KiSS-10 u owiec pochodzących z ciąży pojedynczej w 8. miesiącu ( $95,28 \pm 5,21$  ng/l), co w przypadku obu grup było skorelowane z rozpoczęciem aktywności jajników. Wykazano dodatnią korelację między stężeniem KiSS-10 a wiekiem ( $r = 0,84$  i  $r = 0,99$  dla odpowiednio S i T) owiec. Stwierdzono istotną statystycznie ( $P \leq 0,05$ ) różnicę w stężeniu KiSS-10 w osoczu między grupami po 8. i 10. miesiącu życia, związaną z ujemną korelacją między stężeniem KiSS-10 a wiekiem jarek pochodzących z ciąży pojedynczej w tym okresie (Ryc. 3.).



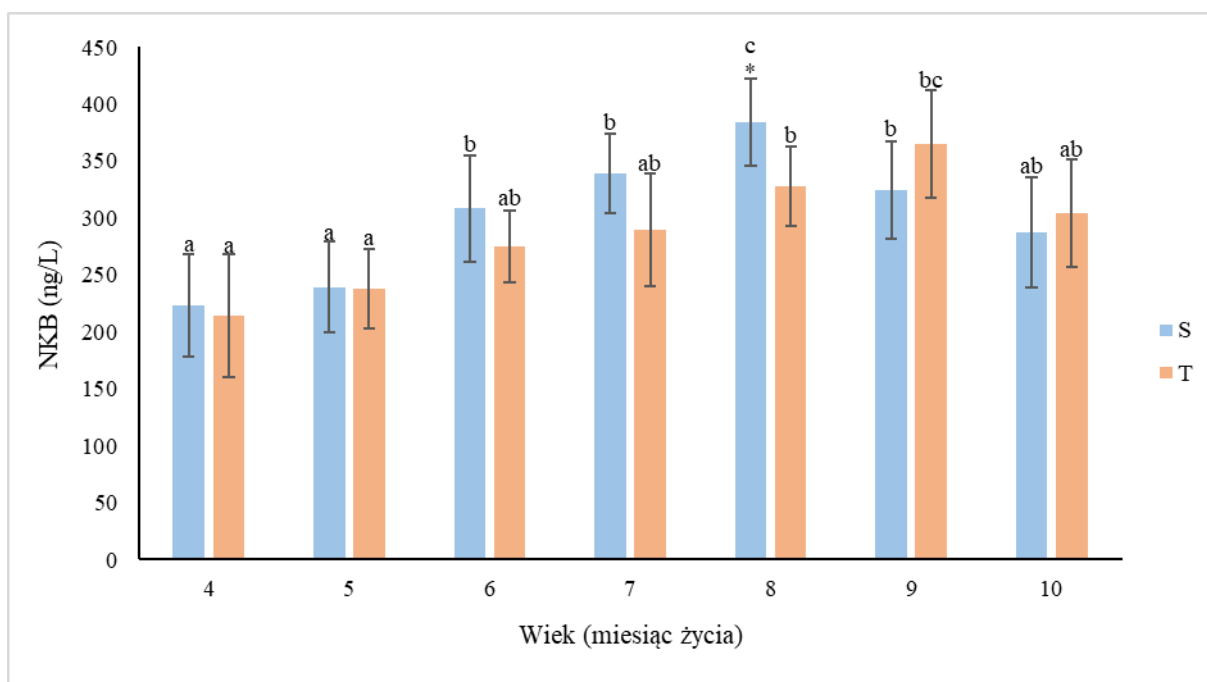
**Ryc. 3.** Stężenie kisspeptyny-10 (ng/L) w poszczególnych miesiącach życia owiec (S – owce pochodzące z ciąży pojedynczej (n = 13), T – bliźnięta (n = 11)). Wartości przedstawione na wykresie to średnie ( $\pm$ SD) stężenia KiSS-10 w osoczu krwi pobieranym od 4. do 10. miesiąca życia, co miesiąc, co 15 minut przez 2 godziny.

\* statystycznie istotna różnica między S a T w poszczególnych miesiącach życia ( $P \leq 0,05$ )

a, b, c, d, e – średnie wartości stężenia KiSS-10 w poszczególnych miesiącach życia oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ( $P \leq 0,05$ )

### 1.3. Zmiany stężenia NKB w osoczu krwi owiec w okresie dojrzewania płciowego

Podobnie jak w przypadku KiSS-10, stężenie NKB w osoczu zmieniało się wraz z wiekiem owiec (Ryc. 4.). U jarek pochodzących z ciąży pojedynczej (S) stężenie NKB wzrastało od 4. do 8. miesiąca życia, osiągając najwyższy ( $P \leq 0,05$ ) poziom w 8. miesiącu. Natomiast u bliźniąt (T) zaobserwowano wzrost stężenia NKB w osoczu od 4. do 9. miesiąca życia, przy czym NKB osiągnęła maksymalne stężenie w 9. miesiącu. Do 8. miesiąca życia stężenie NKB u S było wyższe w porównaniu z T. Jedynie w 9. i 10. miesiącu wykazano odwrotną zależność. Najwyższe stężenie NKB w osoczu krwi zaobserwowano w 9. miesiącu ( $364,70 \pm 47,52$  ng/l) u T i w 8. miesiącu życia u S ( $384,19 \pm 38,36$  ng/l). Było to skorelowane z rozpoczęciem aktywności jajników w tych grupach. Stwierdzono dodatnią korelację między stężeniem NKB w osoczu a wiekiem owiec ( $r = 0,60$  i  $r = 0,87$  odpowiednio dla grup S i T). Po ukończeniu 8. miesiąca życia stwierdzono istotną statystycznie różnicę ( $P \leq 0,05$ ) w stężeniu NKB w osoczu między grupami (Ryc. 4.).



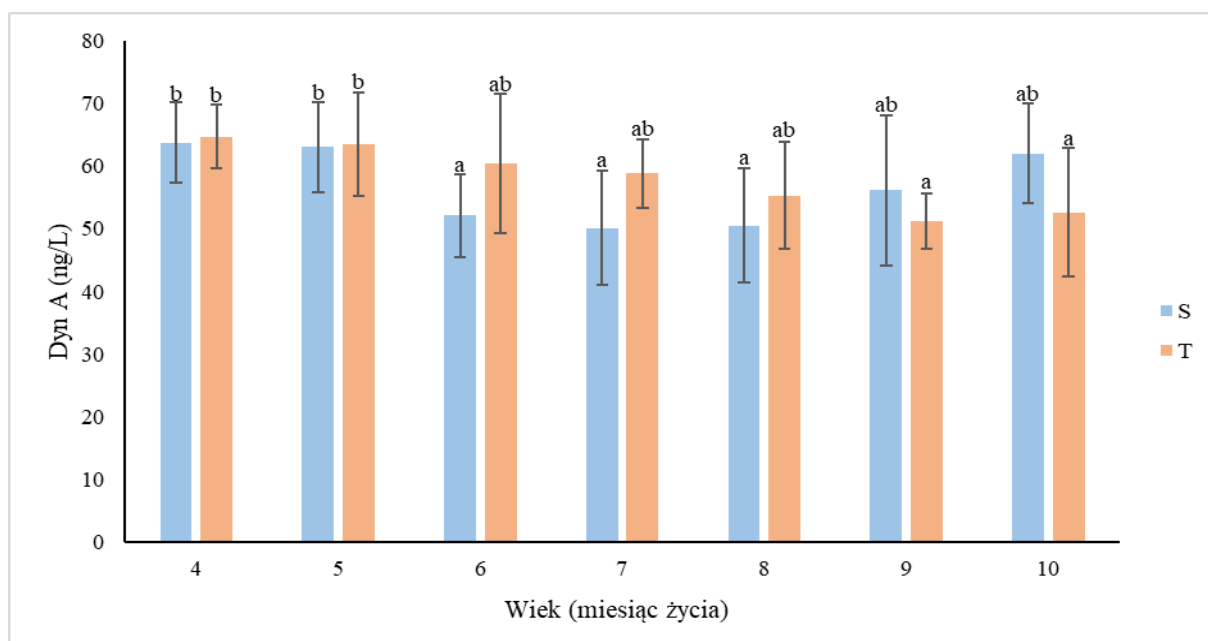
**Ryc. 4.** Stężenie neurokininy B (ng/L) w pojedynczych miesiącach życia owiec (S – owce pochodzące z ciąży pojedynczej ( $n = 13$ ), T – bliźnięta ( $n = 11$ )). Wartości przedstawione na wykresie to średnie ( $\pm$ SD) stężenia NKB w osoczu krwi pobieranej co miesiąc co 15 minut przez 2 godziny.

\*statystycznie istotna różnica ( $P \leq 0,05$ )

a, b, c – średnie wartości stężenia NKB w poszczególnych miesiącach życia oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ( $P \leq 0,05$ )

#### 1.4. Zmiany stężenia Dyn A w osoczu krwi owiec w okresie dojrzewania płciowego

W przypadku Dyn A, w przeciwieństwie do KiSS-10 oraz NKB, wykazano ujemną korelację między stężeniem tego neuropeptydu w osoczu krwi a wiekiem jarek ( $r = -0,26$  i  $r = -0,97$  odpowiednio dla S i T) (Ryc. 5.) U obu badanych grup owiec (S i T) najwyższe poziomy Dyn A obserwowano w 4. i 5. miesiącu życia. U zwierząt z grupy S wykazano istotny spadek ( $P \leq 0,05$ ) stężenia Dyn A pomiędzy 5. a 6. miesiącem, a najniższe poziomy obserwowano w 7. i 8. miesiącu życia. Z kolei u owiec z grupy T średnie stężenie Dyn A ulegało obniżeniu, osiągając najniższą wartość w 9. miesiącu. W przeciwieństwie do KiSS-10 i NKB, wartości stężeń Dyn A były niższe w grupie S w porównaniu do grupy T pomiędzy 4. a 8. miesiącem życia. Jedynie w 9. i 10. miesiącu stężenia Dyn A w grupie S były wyższe niż w grupie T. Nie wykazano istotnych różnic między stężeniami Dyn A u S i T w poszczególnych miesiącach życia. Nie stwierdzono również istotnej korelacji między zmianami stężenia Dyn A w osoczu zarówno w grupie S jak i T wraz z wiekiem ( $r = 0,30$ ) (Ryc. 5.).



**Ryc. 5.** Stężenie dynorfiny A (ng/L) w pojedynczych miesiącach życia owiec (S – owce pochodzące z ciąży pojedynczej ( $n = 13$ ), T – bliźnięta ( $n = 11$ )). Wartości przedstawione na wykresie to średnie ( $\pm$ SD) stężenia Dyn w osoczu krwi pobieranym co miesiąc co 15 minut przez 2 godziny.

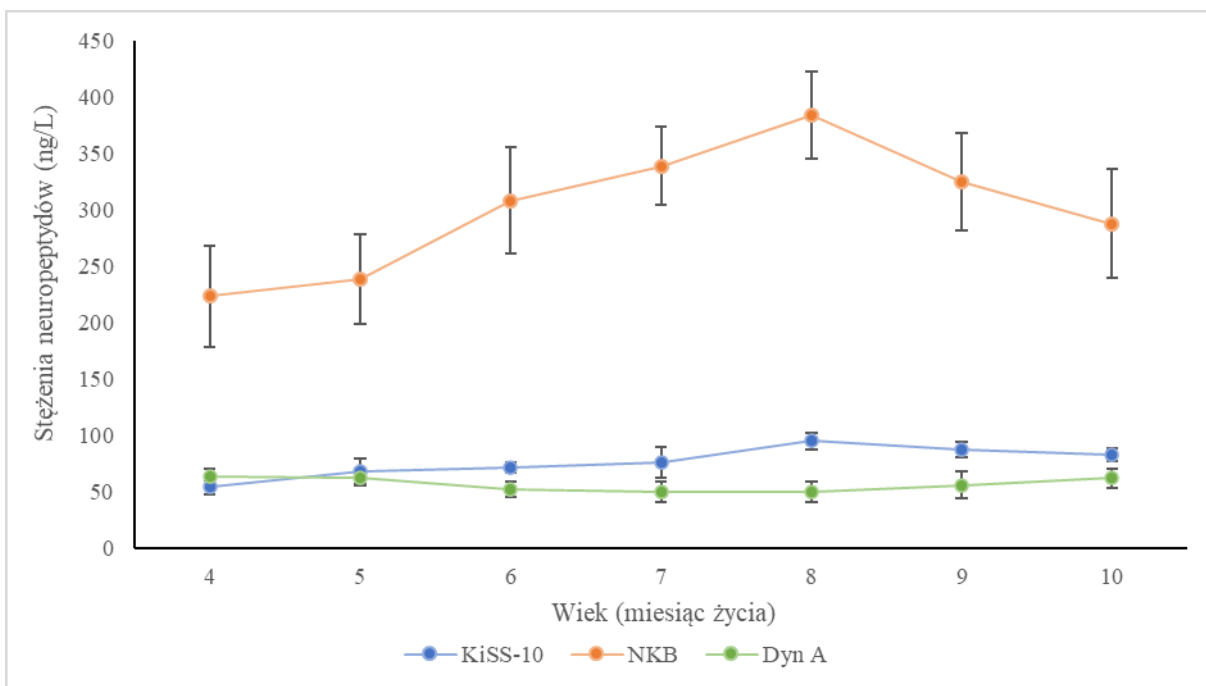
a, b – średnie wartości stężenia Dyn A w poszczególnych miesiącach życia oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ( $P \leq 0,05$ )

### 1.5. Zależności między zmianami stężeń KiSS-10, NKB i Dyn A w osoczu krwi owiec w okresie dojrzewania płciowego

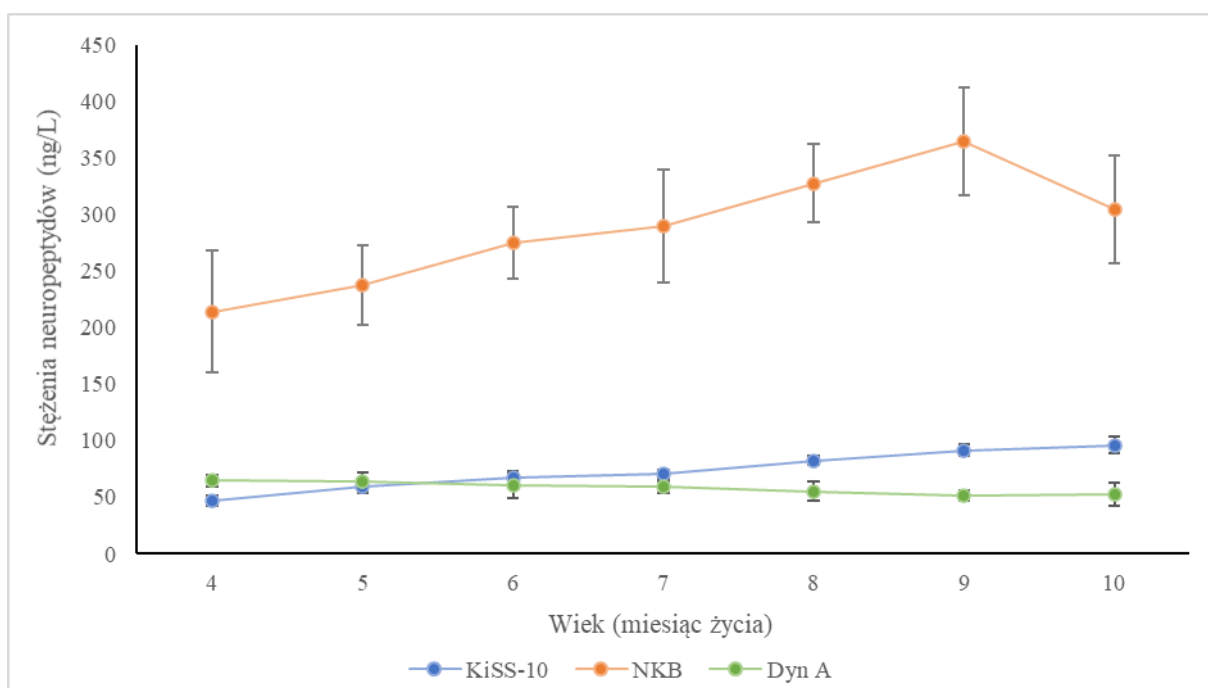
Stwierdzono dodatnią korelację między zmianami stężenia KiSS-10 i NKB ( $r = 0.86$  oraz  $r = 0.89$ , odpowiednio dla S i T), jednocześnie wykazując ujemną korelację między stężeniami KiSS-10 i Dyn A ( $r = -0.55$  oraz  $r = -0.98$ , odpowiednio dla S i T) oraz między NKB i Dyn A ( $r = -0.89$  oraz  $r = -0.94$ , odpowiednio dla S i T) w osoczu krwi a wiekiem (4.-10. miesiąca życia) owiec obu badanych grup (Tab. 2., Ryc. 6., 7.).

|   |         | KiSS-10 | NKB   | Dyn A |
|---|---------|---------|-------|-------|
| S | KiSS-10 | –       | 0.86  | -0.55 |
|   | NKB     | 0.86    | –     | -0.89 |
|   | DynA    | -0.55   | -0.89 | –     |
| T | KiSS-10 | –       | 0.89  | -0.98 |
|   | NKB     | 0.89    | –     | -0.94 |
|   | DynA    | -0.98   | -0.94 | –     |

**Tab. 2.** Współczynnik korelacji Pearsona ( $r$ ) ( $P \leq 0,05$ ) między stężeniami KiSS-10 (kisspeptyna-10), NKB (neurokinina B) i/lub Dyn A (dynorfina A) w osoczu krwi owiec pochodzących z ciąży pojedynczej (S) i mnogiej (T) (4.-10. miesiąca życia).



**Ryc. 6.** Zmiany w stężeniach kisspeptyny-10 (KiSS-10), neurokininy B (NKB) i dynorfiny A (Dyn A) w osoczu krwi owiec pochodzących z ciąży pojedynczej od 4. do 10. miesiąca życia.



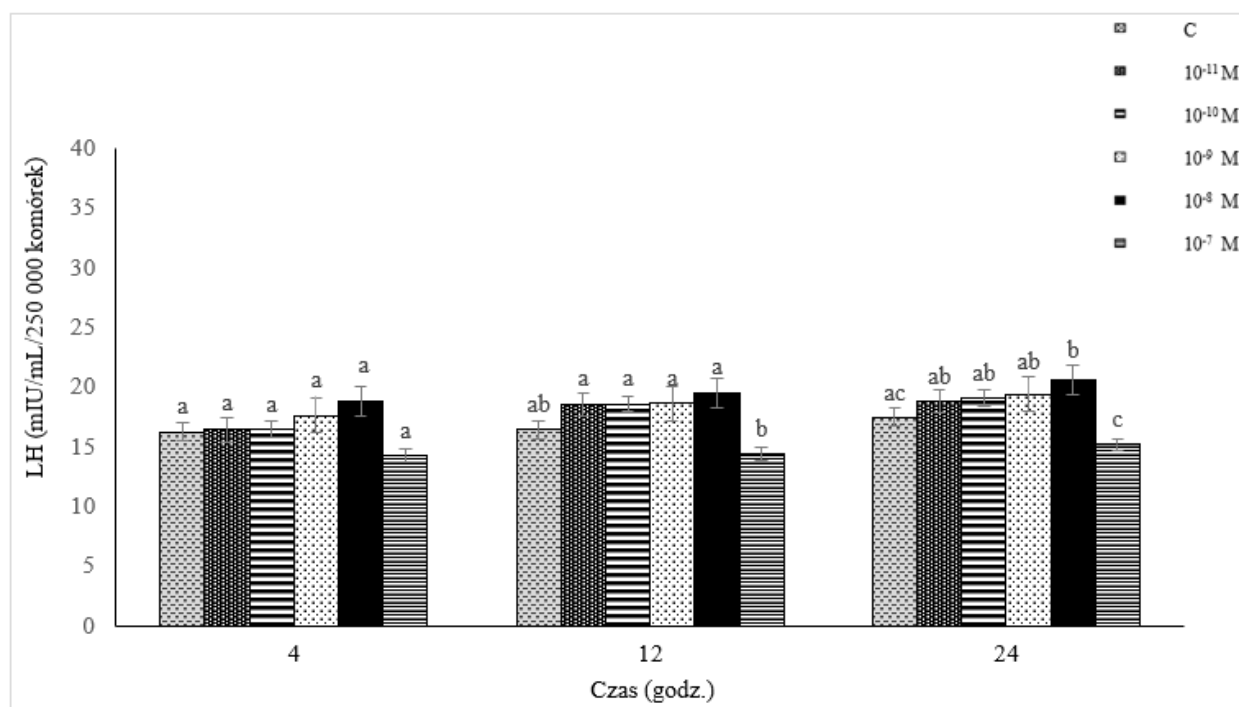
**Ryc. 7.** Zmiany w stężeniach kisspeptyny-10 (KiSS-10), neurokininy B (NKB) i dynorfiny A (Dyn A) w osoczu krwi owiec pochodzących z ciąży mnogiej od 4. do 10. miesiąca życia.

## **Etap 2: Wyniki doświadczeń w warunkach *in vitro***

*(publikacja nr 1 i 2: Szysiak et al., J Vet Res 2025, 69, 121–129, doi: 10.2478/jvetres-2025-0003 oraz Szysiak et al., J Vet Res 2025, 69, 299–304, doi: 10.2478/jvetres-2025-0026)*

## 2.1. Wpływ KiSS-10 na wydzielanie LH przez komórki przysadki gruczołowej jarek *in vitro*

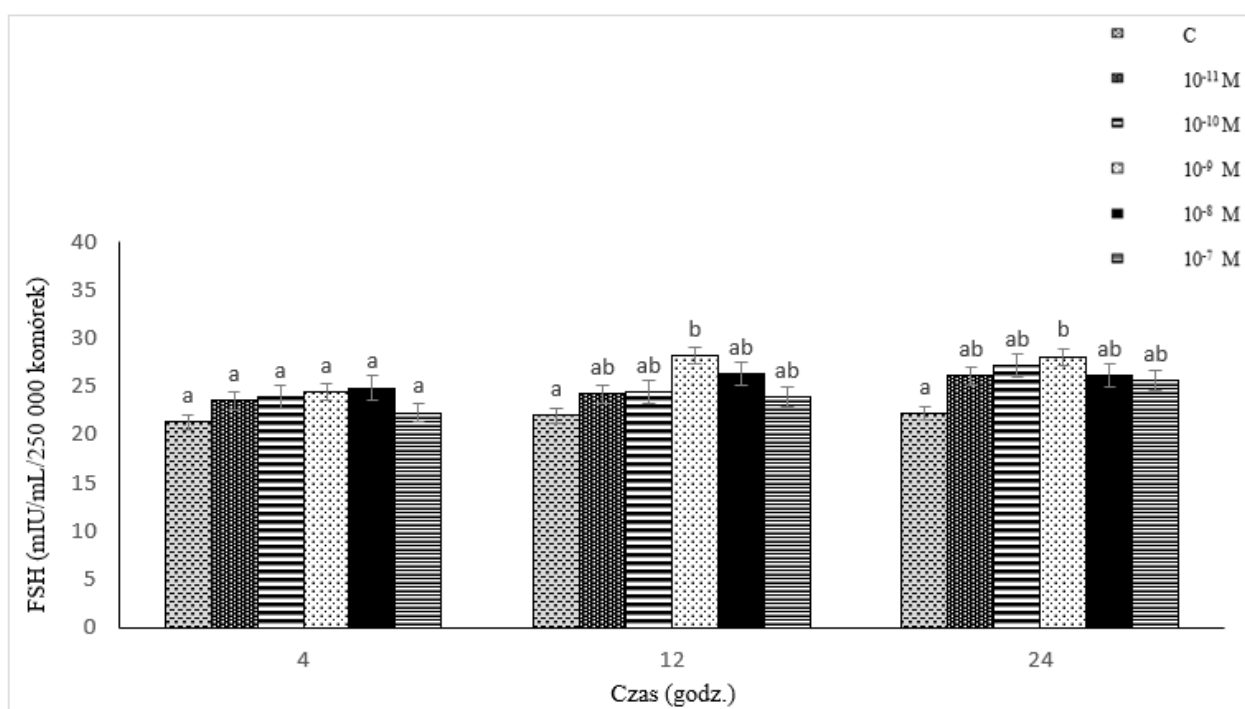
Oddziaływanie KiSS-10 na wydzielanie LH uzależnione było od czasu trwania doświadczenia oraz stężenia tego neuropeptydu w podłożu hodowlanym ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) (Ryc. 8.). KiSS-10 w stężeniu  $10^{-11}$ – $10^{-8}$  M powodowała wzrost wydzielania LH w porównaniu z kontrolą przez cały czas trwania doświadczenia. Największe wydzielanie LH wykazano po 24 godz. ekspozycji komórek na  $10^{-8}$  M KiSS-10. Wartość ta była istotnie wyższa ( $P \leq 0,05$ ) w porównaniu z kontrolą. Jednak w najwyższym zastosowanym stężeniu ( $10^{-7}$  M) KiSS-10 powodowała spadek sekrecji LH w porównaniu z kontrolą i pozostałymi hodowlami. Istotnie wyższe ( $P \leq 0,05$ ) wydzielanie LH zaobserwowano po 12 i 24 godzinach w stężeniach  $10^{-11}$ – $10^{-8}$  M KiSS-10 w porównaniu z  $10^{-7}$  M. Wyniki wykazały wysoką lub bardzo wysoką ujemną korelację między stężeniem KiSS-10 ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) a wydzielaniem LH z komórek przysadki gruczołowej ( $r = -0,76$ ,  $r = -0,96$  i  $r = -0,91$  odpowiednio po 4, 12 i 24 godzinach). Dodatnią korelację między stężeniami KiSS-10 a wydzielaniem LH stwierdzono tylko w zakresie stężeń  $10^{-11}$ – $10^{-8}$  M ( $r = 0,90$ ,  $r = 0,99$  i  $r = 0,96$  odpowiednio po 4, 12 i 24 godzinach) (Ryc. 8.).



**Ryc. 8.** Wpływ kisspeptyny-10 ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) na wydzielanie hormonu luteinizującego (LH) z komórek przysadki owiec *in vitro*  
a, b, c – średnie wartości uzyskane w określonym czasie inkubacji oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ( $P \leq 0,05$ )

## 2.2. Wpływ KiSS-10 na wydzielanie FSH przez komórki przysadki gruczołowej jarek *in vitro*

Kisspeptyna-10 we wszystkich zastosowanych stężeniach ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) spowodowała wzrost wydzielania FSH w porównaniu z kontrolą w trakcie całego okresu doświadczenia (Ryc. 9.). Statystycznie istotny ( $P \leq 0,05$ ) wzrost wydzielania FSH zaobserwowano po 12 i 24 godzinach przy stężeniu  $10^{-9}$  M w porównaniu z kontrolą. Jednak ekspozycja komórek na  $10^{-7}$  M KiSS-10 spowodowała nieznaczny spadek wydzielania FSH w porównaniu do niższych zastosowanych stężeń. Wyniki wykazały ujemną korelację między stężeniem KiSS-10 ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) a wydzielaniem FSH z komórek przysadki gruczołowej ( $r = -0,81$ ,  $r = -0,43$  i  $r = -0,59$  odpowiednio po 4, 12 i 24 godzinach) (Ryc. 9.).

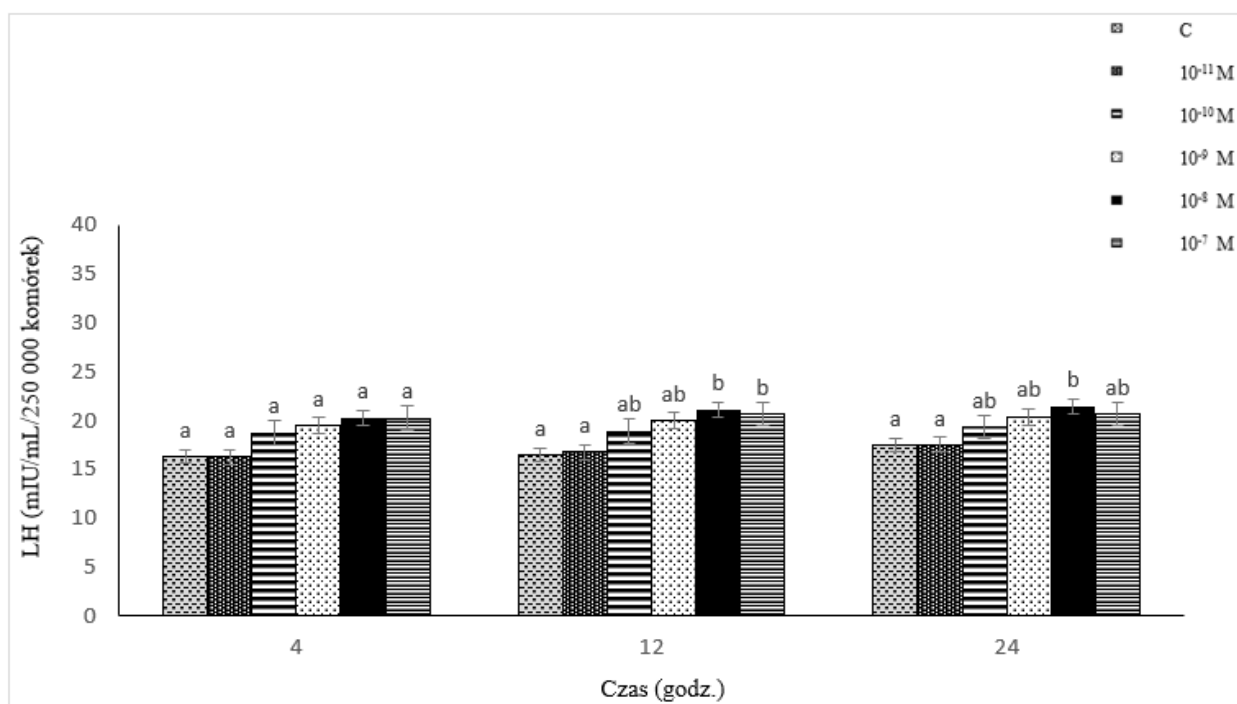


**Ryc. 9.** Wpływ kisspeptyny-10 ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) na wydzielanie hormonu folikulotropowego (FSH) z komórek przysadki owiec *in vitro*

a, b – średnie wartości uzyskane w określonym czasie inkubacji oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ( $P \leq 0,05$ )

### 2.3. Wpływ NKB na wydzielanie LH przez komórki przysadki gruczołowej jarek *in vitro*

Oddziaływanie NKB na wydzielanie LH, podobnie jak wpływ KiSS-10, było uzależnione od jej stężenia w podłożu hodowlanym i czasu trwania doświadczenia (Ryc. 10.). NKB we wszystkich zastosowanych dawkach miała stymulujący wpływ na wydzielanie LH w porównaniu do kontroli. Wykazano wzrost wydzielania LH pod wpływem NKB w stężeniach  $10^{-10}$ – $10^{-7}$  M po 4, 12, 24 godz. Najsilniejsze działanie pobudzające ( $P \leq 0,05$ ) zaobserwowano po 12- i 24-godzinnej ekspozycji na  $10^{-8}$  M NKB. Statystycznie istotnie wyższe ( $P \leq 0,05$ ) wydzielanie LH pod wpływem NKB stwierdzono przy stężeniu  $10^{-8}$ – $10^{-7}$  M (po 12 godz.) i  $10^{-8}$  M (po 24 godz.) w porównaniu ze stężeniem  $10^{-11}$  M. Wykazano umiarkowaną dodatnią oraz słabą dodatnią korelację między stężeniem NKB ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) a wydzielaniem LH z komórek przysadki gruczołowej ( $r = 0,48$ ,  $r = 0,45$  i  $r = 0,37$  odpowiednio po 4, 12 i 24 godzinach) (Ryc. 10).

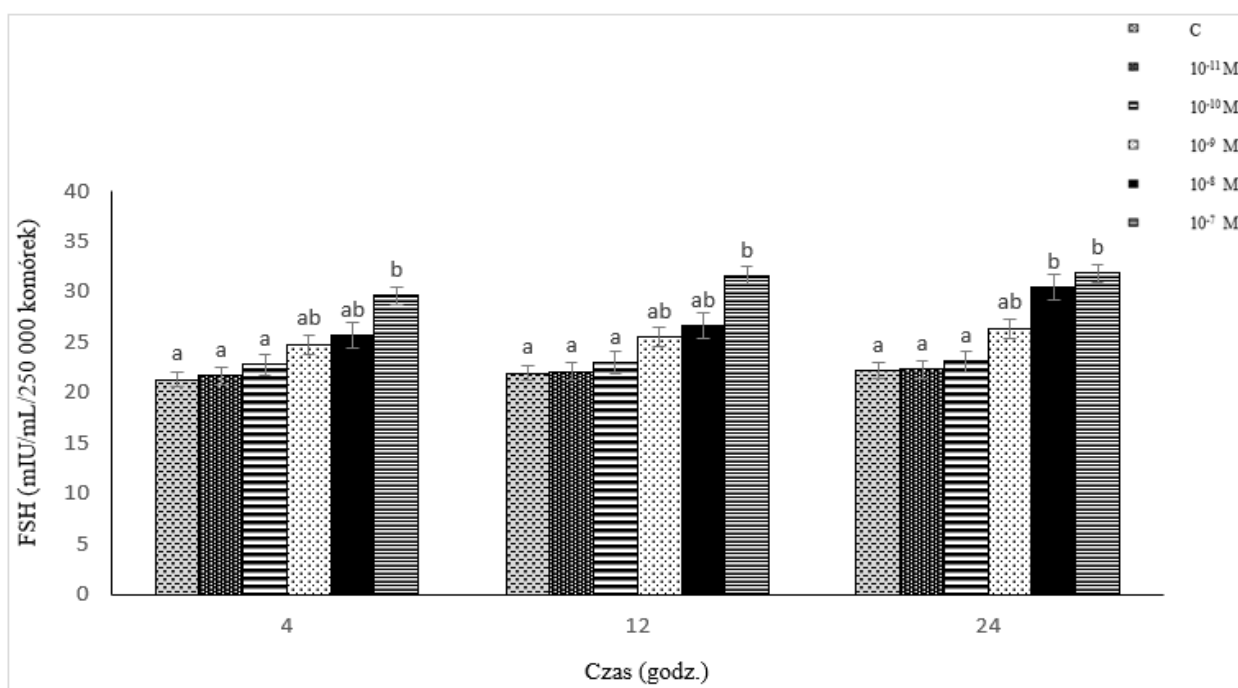


**Ryc. 10.** Wpływ neurokininy B ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) na wydzielanie hormonu luteinizującego (LH) z komórek przysadki owiec *in vitro*

a, b – średnie wartości uzyskane w określonym czasie inkubacji oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ( $P \leq 0,05$ )

## 2.4. Wpływ NKB na wydzielanie FSH przez komórki przysadki gruczołowej jarek *in vitro*

Ekspozycja komórek na NKB we wszystkich zastosowanych stężeniach ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) spowodowała wzrost wydzielania FSH w trakcie całego okresu doświadczenia w porównaniu z kontrolą (Ryc. 11.). Najbardziej znaczący efekt stymulujący wydzielanie FSH stwierdzono po 4, 12 i 24 godzinach przy stężeniu NKB wynoszącym  $10^{-7}$  M. Wydzielanie hormonu folikulotropowego osiągnęło maksimum po 12 i 24 godzinach ekspozycji komórek na najwyższe stężenie NKB ( $10^{-7}$  M). Wartość ta była istotnie wyższa ( $P \leq 0,05$ ) w porównaniu z kontrolą i pozostałymi hodowlami. Stwierdzono bardzo wysoką oraz wysoką dodatnią korelację między stężeniem NKB ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) a wydzielaniem FSH z komórek przysadki gruczołowej ( $r = 0,89$ ,  $r = 0,90$  i  $r = 0,73$  odpowiednio po 4, 12 i 24 godzinach) (Ryc. 11.).

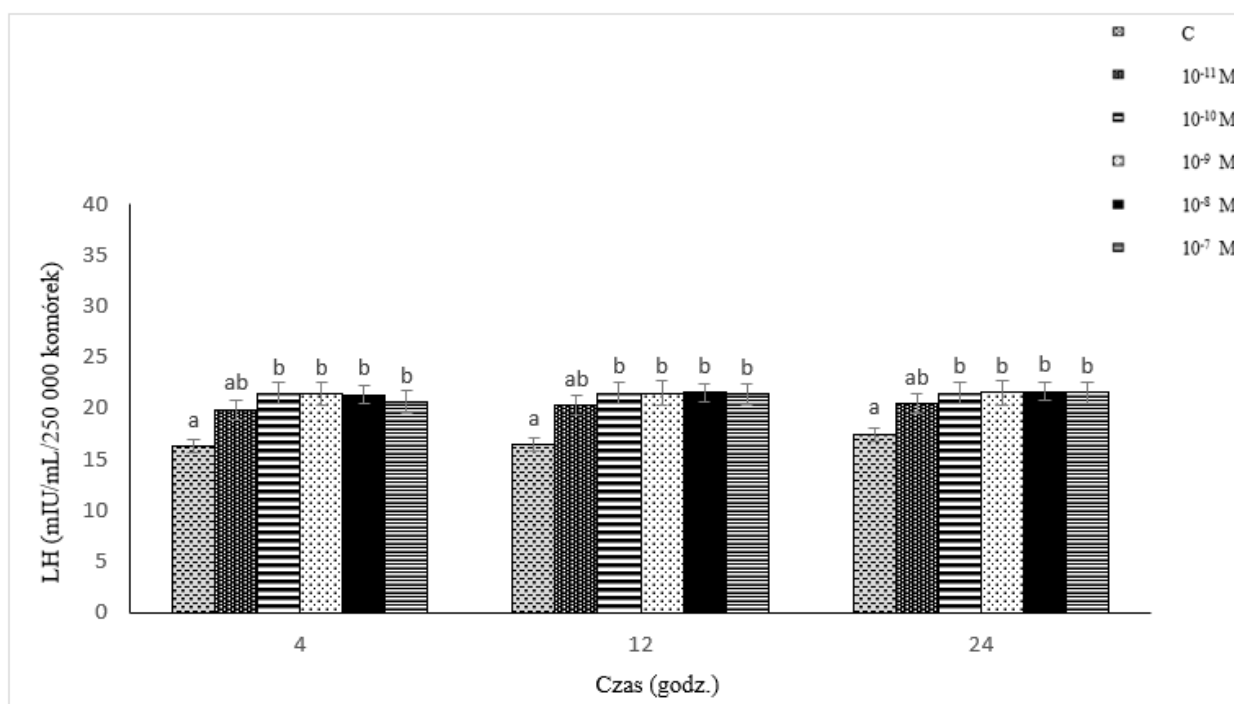


**Ryc. 11.** Wpływ neurokininy B ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) na wydzielanie hormonu folikulotropowego (FSH) z komórek przysadki owiec *in vitro*

a, b – średnie wartości uzyskane w określonym czasie inkubacji oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ( $P \leq 0,05$ )

## 2.5. Wpływ Dyn A na wydzielanie LH przez komórki przysadki gruczołowej jarek *in vitro*

Oddziaływanie Dyn A na wydzielanie LH było uzależnione od czasu ekspozycji i stężenia tego neuropeptydu w podłożu hodowlanym (Ryc. 12.). Ekspozycja komórek na Dyn A w stężeniach  $10^{-10}$ – $10^{-7}$  M spowodowała istotny ( $P \leq 0,05$ ) wzrost wydzielania LH w porównaniu z kontrolą. Sekrecja LH osiągnęła maksymalny poziom po 24 godzinach w odpowiedzi na  $10^{-8}$  M Dyn A. Nie wykazano jednak istotnych różnic między poziomami wydzielania LH pod wpływem różnych stężeń Dyn A ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) w poszczególnych punktach czasowych. Nie stwierdzono także istotnych zależności pomiędzy stężeniem Dyn A ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) a wydzielaniem LH ( $r = -0,24$ ,  $r = 0,17$  i  $r = 0,26$  odpowiednio po 4, 12 i 24 godz.) (Ryc. 12.).

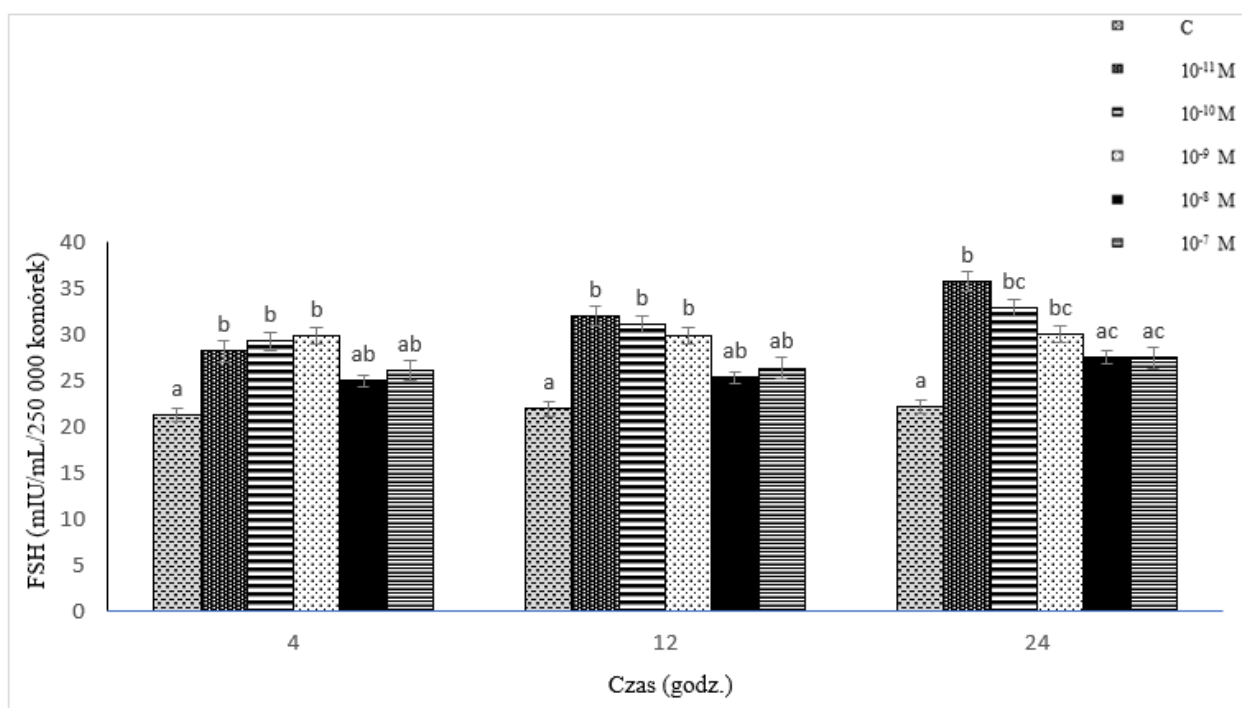


**Ryc. 12.** Wpływ dynorfiny A ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) na wydzielanie hormonu luteinizującego (LH) z komórek przysadki owiec *in vitro*

a, b – średnie wartości uzyskane w określonym czasie inkubacji oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ( $P \leq 0,05$ )

## 2.6. Wpływ Dyn A na wydzielanie FSH przez komórki przysadki gruczołowej jarek *in vitro*

Ekspozycja komórek na Dyn A we wszystkich zastosowanych stężeniach ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) spowodowała wzrost wydzielania FSH w trakcie całego okresu doświadczenia w porównaniu z kontrolą (Ryc. 13.). Znaczący efekt ( $P \leq 0,05$ ) zaobserwowano przy stężeniach  $10^{-11}$ – $10^{-9}$  M po 4, 12, 24 godz. Najsilniejsze działanie stymulujące ( $P \leq 0,05$ ) wykazano po 24 godzinach przy stężeniu  $10^{-11}$  M Dyn A. Wykazano umiarkowaną ujemną korelację między stężeniem Dyn A ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) a wydzielaniem FSH z komórek przysadki mózgowej ( $r = -0,50$ ,  $r = -0,57$  i  $r = -0,57$  odpowiednio po 4, 12 i 24 godzinach) (Ryc. 13.).

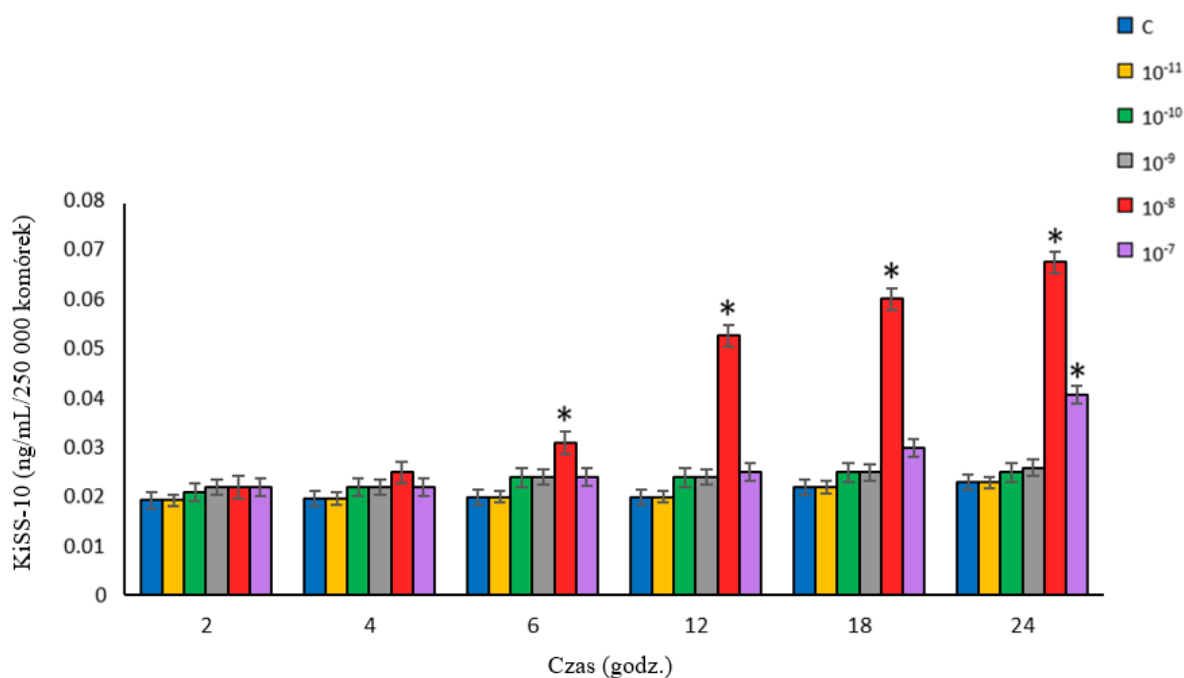


**Ryc. 13.** Wpływ dynorfiny A ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) na wydzielanie hormonu folikulotropowego (FSH) z komórek przysadki owiec *in vitro*

a, b, c – średnie wartości uzyskane w określonym czasie inkubacji oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ( $P \leq 0,05$ )

## 2.7. Wpływ NKB na wydzielanie KiSS-10 przez komórki przysadki gruczołowej jarek *in vitro*

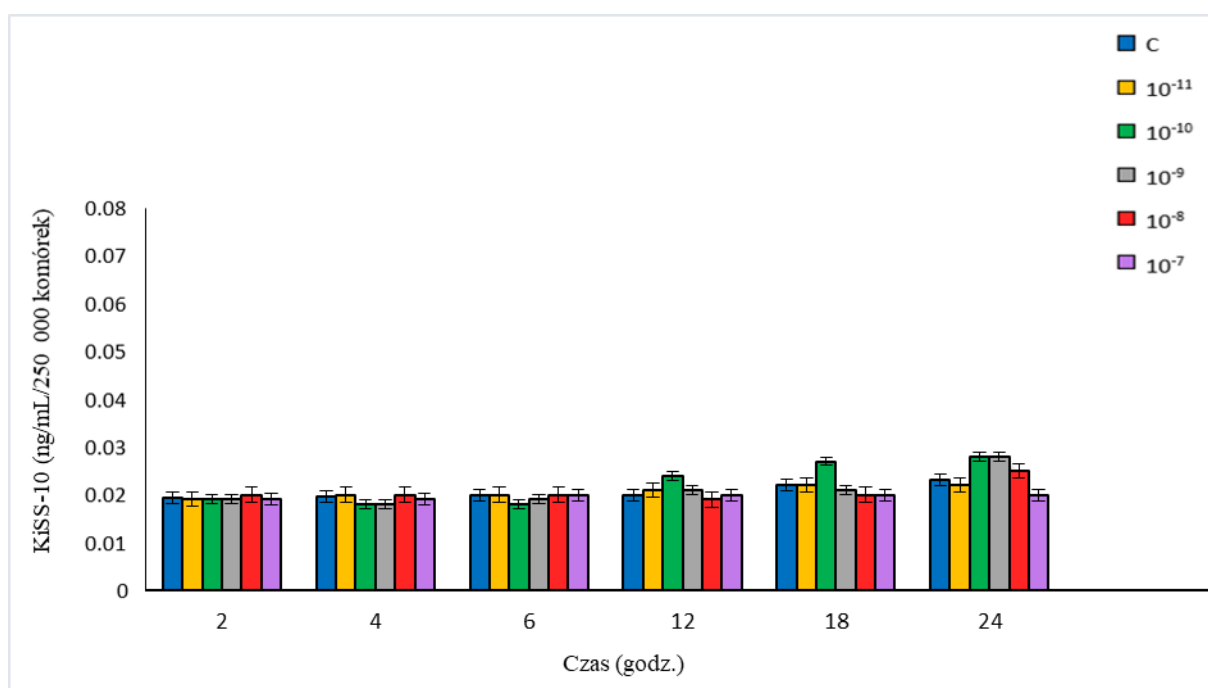
Oddziaływanie NKB na wydzielanie KiSS-10 przez komórki przysadki gruczołowej zależało od czasu ekspozycji i jej stężenia w podłożu hodowlanym ( $10^{-11}$  –  $10^{-7}$  M) (Ryc. 15.). NKB w stężeniach  $10^{-10}$ – $10^{-7}$  M spowodowała zwiększone wydzielanie KiSS-10 w trakcie całego czasu trwania doświadczenia w porównaniu z kontrolą. Znaczący wpływ NKB ( $P \leq 0,05$ ) na KiSS-10 wykazano po 6–24 godz. w stężeniu  $10^{-8}$  M oraz po 24 godz. w stężeniu  $10^{-7}$  M. Wydzielanie KiSS-10 osiągnęło maksimum po 24-godzinnej ekspozycji komórek na NKB w stężeniu  $10^{-8}$  M. Wartość ta była istotnie statystycznie wyższa ( $P \leq 0,05$ ) w porównaniu z kontrolą i z innymi hodowlami z NKB. Wykazano umiarkowaną dodatnią korelację między stężeniem NKB w zakresie  $10^{-11}$  –  $10^{-7}$  M i NKB  $10^{-11}$  –  $10^{-8}$  M a wydzielaniem KiSS-10 po 2 godzinach (odpowiednio  $r = 0,40$ ,  $r = 0,55$ ). Po 4, 6, 12, 18 i 24 godz. stwierdzono bardzo wysoką lub doskonałą dodatnią korelację pomiędzy  $10^{-11}$  –  $10^{-8}$  M NKB a sekrecją KiSS-10 (odpowiednio  $r = 0,89$ ,  $r = 0,93$ ,  $r = 0,99$ ,  $r = 1,0$ ,  $r = 1,0$ ) (Ryc. 14.).



**Ryc. 14.** Wpływ neurokininy B ( $10^{-11}$  –  $10^{-7}$  M) na wydzielanie kisspeptyny-10 z komórek przysadki gruczołowej owiec *in vitro*; \* – statystycznie istotna różnica ( $P \leq 0,05$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej w tym samym punkcie czasowym

## 2.8. Wpływ Dyn A na wydzielanie KiSS-10 przez komórki przysadki gruczołowej jarek *in vitro*

Dyn A nie wykazywała znaczącego wpływu na wydzielanie KiSS-10 we wszystkich zastosowanych stężeniach ( $10^{-11}$  –  $10^{-7}$  M) przez cały czas trwania doświadczenia (Ryc. 16.). Natomiast neuropeptyd ten w stężeniu  $10^{-10}$  M spowodował niewielki wzrost KiSS-10 po 12, 18, 24 godz., a w stężeniu  $10^{-9}$  –  $10^{-8}$  M po 24 godz. w porównaniu z kontrolą i pozostałymi hodowlami. Stwierdzono umiarkowaną dodatnią korelację między stężeniem Dyn A ( $10^{-11}$  –  $10^{-7}$  M) a wydzielaniem KiSS-10 po 6 godz. ( $r = 0,42$ ), słabą ujemną oraz umiarkowaną ujemną korelację po 12 i 18 godz. (odpowiednio  $r = -0,37$ ,  $r = -0,43$ ), a także wysoką ujemną korelację po 24 godz. ( $r = -0,72$ ) (Ryc. 15.).



Ryc. 15. Wpływ dynorfiny A ( $10^{-11}$  –  $10^{-7}$  M) na wydzielanie kisspeptyny-10 z komórek przysadki gruczołowej owiec *in vitro*

## DYSKUSJA

Dojrzewanie płciowe jest złożonym, wieloczynnikowym procesem neuroendokrynnym prowadzącym do uzyskania zdolności rozrodczej. U owiec termin osiągnięcia dojrzałości płciowej jest modulowany przez wiele czynników m. in. genetycznych, żywieniowych, metabolicznych i środowiskowych, a opóźnione dojrzewanie stwierdzone jest głównie u jagniąt pochodzących z ciąży mnogiej lub od matek o wysokiej, wynikającej z otyłości, masie ciała (Abadjieva i in. 2011, Castellano i in. 2005, Kosior -Korzecka i in. 2012, Rosales Nieto C.A. i in. 2013, Rosales Nieto C.A. i in. 2014, Seminara i in. 2003, Tolson i in. 2012). Chociaż dokładne mechanizmy leżące u podstaw zapoczątkowania dojrzewania nadal nie są w pełni poznane, coraz więcej danych wskazuje, że kisspeptyna (KiSS), neurokinina B (NKB) i dynorfina A (Dyn A) odgrywają kluczową rolę regulacyjną w tym procesie (Backholer i in. 2010, Bedenbaugh i in. 2020, Li i in. 2020, Navarro 2013, Pinilla i in. 2012, Weems i in. 2018).

Spśród trzech neuropeptydów KNDy rola KiSS w kontroli funkcji rozrodczych jest najlepiej udokumentowana. Liczne badania wykazały, że KiSS stymuluje wydzielanie gonadotropin głównie poprzez mechanizmy zależne od GnRH. Centralne podanie KiSS-1 zwiększa stężenie LH w osoczu u samic szczura przed osiągnięciem dojrzałości płciowej (Navarro i in. 2004), natomiast KiSS podana dokomorowo u owiec stymuluje wydzielanie LH w okresie anestrus (Nestor i in. 2012). Dożylna iniekcja KiSS-10 nasila wydzielanie LH u jagniąt przed osiągnięciem dojrzałości płciowej (Wang i in. 2012). Badania *in vitro* wskazują, że KiSS-10 stymuluje wydzielanie GnRH i może w konsekwencji zwiększać wydzielanie FSH przez komórki przedniego płata przysadki (Kosior-Korzecka i in. 2014). Wykazanie ekspresji GPR54 w przednim płacie przysadki dodatkowo wspiera hipotezę, że KiSS może działać bezpośrednio na poziomie przysadki, niezależnie od wpływu podwzgórza (Luque i in. 2011, Richard i in. 2009). Co więcej, wyniki badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro*, uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej, są zgodne z tą koncepcją. W komórkach przysadki gruczołowej izolowanych od jarek w okresie dojrzewania płciowego KiSS-10 zwiększała wydzielanie zarówno LH, jak i FSH, przy czym najsilniejszą odpowiedź LH obserwowano po 24 godzinach przy stężeniu  $10^{-8}$  M, a najwyższe wydzielanie FSH po 12–24 godzinach przy stężeniu  $10^{-9}$  M (publikacja nr 1). Obserwacje te są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, wskazującymi na bezpośredni stymulujący wpływ KiSS-10 na aktywność komórek gonadotropowych przysadki świń oraz bydła (Suzuki i in. 2008). Łącznie dane te

wskazują, że KiSS może uczestniczyć w aktywacji dojrzewania płciowego nie tylko na poziomie podwzgórza, poprzez pobudzanie neuronów GnRH, lecz również bezpośrednio na poziomie przysadki. Ponadto, taką interpretację potwierdzają także wyniki naszego doświadczenia przeprowadzonego w warunkach *in vivo* (publikacja nr 3). Stężenie KiSS-10 w osoczu zwiększało się wraz z wiekiem zarówno w grupie owiec pochodzących z ciąży pojedynczej, jak i mnogiej. Jednak u jarek pochodzących z ciąży pojedynczej najwyższe stężenia KiSS-10 obserwowano wcześniej niż u owiec pochodzących z ciąży mnogiej. Wyniki zrealizowanego doświadczenia pokazują, że wzrost stężenia KiSS-10 w osoczu krwi jest związany z początkiem cyklicznej aktywności jajników. Opóźniony wzrost stężenia KiSS-10 u owiec pochodzących z ciąży mnogiej może zatem odzwierciedlać opóźniony proces aktywacji osi rozrodczej. Podobne obserwacje u ludzi, w tym podwyższone stężenie KiSS w osoczu podczas zapoczątkowania tego procesu, potwierdzają koncepcję, że KiSS jest kluczowym markerem i mediatorem dojrzewania płciowego (De Roux i in. 2003, Messenger i in. 2005, Yang i in. 2015).

NKB to kolejny kluczowy element układu KNDy, powszechnie uznawanego za nadrzędny regulator generowania pulsów GnRH. Na poziomie podwzgórza NKB działa przez receptory NK3, stymulując aktywność neuronów KNDy i ułatwiając zależną od kisspeptyny aktywację wydzielania GnRH (Aerts i in. 2021, Bedenbaugh i in. 2020, Billings i in. 2010). Badania przeprowadzone na owcach, szczurach i naczelnych wykazały, że senktyd, agonista NK3R, stymuluje wydzielanie LH (Billings i in. 2010, Nestor i in. 2012, Navarro i in. 2010, Terasawa i in. 2018), natomiast mutacje w genach *TAC3* lub *TACR3* u ludzi prowadzą do hipogonadyzmu hipogonadotropowego oraz braku rozpoczęcia dojrzewania płciowego (Topaloglu i in. 2009). Wyniki te podkreślają podstawowe znaczenie NKB w inicjacji funkcji rozrodczych. Badania zrealizowane w ramach pracy doktorskiej potwierdzają koncepcję, że NKB wywiera również bezpośrednie działanie na przysadkę. Ekspozycja komórek przedniego płata przysadki gruczołowej owiec na NKB w warunkach *in vitro* zwiększała wydzielanie LH i FSH przez cały czas trwania doświadczenia, przy czym najsilniejszą odpowiedź LH obserwowano po 24 godzinach przy stężeniu  $10^{-8}$  M, a najwyższe wydzielanie FSH po 24 godzinach przy stężeniu  $10^{-7}$  M (publikacja nr 1). Co istotne, NKB stymulowała również wydzielanie KiSS-10 przez komórki przysadki gruczołowej owiec, szczególnie przy stężeniach  $10^{-10}$ – $10^{-7}$  M, a największy efekt obserwowano po 24 godzinach przy stężeniu  $10^{-8}$  M (publikacja nr 2). Wyniki te pokazują, że NKB może nasilać

wydzielanie gonadotropin nie tylko bezpośrednio, ale także pośrednio, poprzez stymulację wydzielania KiSS-10 w przysadce. Wcześniejsze badania ograniczały się głównie do ryb i syntetycznych linii komórek przysadki, nasze wyniki dostarczają nowych argumentów przemawiających za rolą NKB na poziomie przysadki u wyższych kręgowców (Mijiddorj i in. 2012, Mizrahi i in. 2019, Mun i in. 2022). Profil NKB obserwowany *in vivo* w naszym badaniu jest zgodny z tą interpretacją. Stężenie NKB w osoczu wzrastało stopniowo wraz z wiekiem, osiągając wartości maksymalne wcześniej u owiec pochodzących z ciąży pojedynczej, a później u bliźniąt, co odzwierciedlało zmiany zależne od wieku obserwowane dla KiSS-10 (publikacja nr 3). Ponadto dodatnia korelacja pomiędzy stężeniami NKB i KiSS-10 w osoczu potwierdza koncepcję ścisłej zależności tych neuropeptydów w okresie dojrzewania płciowego.

W przeciwieństwie do KiSS-10 i NKB, Dyn A jest zwykle uznawana za hamujący czynnik układu KNDy. Poprzez aktywację receptorów  $\kappa$ -opiodowych Dyn A hamuje częstotliwość pulsów GnRH, a tym samym ogranicza wydzielanie gonadotropin (Merkley i in. 2012, Navarro i in. 2009, Pinilla i in. 2012). Badania przeprowadzone na owcach i szczurach wskazują, że osłabienie sygnalizacji Dyn A na poziomie podwzgórza, zwiększa sekrecję LH, szczególnie przed okresem osiągnięcia dojrzałości płciowej, co sugeruje, że hamowanie zależne od Dyn A jest istotnym mechanizmem utrzymującym wyciszenie osi HPG (Lopez i in. 2016, Nakahara i in. 2013, Weems i in. 2018). Wyniki *in vivo* uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej potwierdzają tę hipotezę. Stężenia Dyn A w osoczu były najwyższe we wcześniejszych miesiącach życia i obniżały się w okolicach osiągnięcia dojrzałości płciowej. Najniższe wartości stężenia Dyn A stwierdzono w okresie inicjacji aktywności jajników, gdy stężenia KiSS-10 i NKB były najwyższe. Ponadto wykazano ujemne korelacje między stężeniami Dyn A i KiSS-10 oraz między Dyn A i NKB (publikacja nr 3). Uzyskane wyniki sugerują, że zmniejszanie się hamującego wpływu Dyn A może być istotnym elementem w zapoczątkowaniu aktywności rozrodczej, podczas gdy utrzymywanie się stężenia tego neuropeptydu na wyższym poziomie może sprzyjać opóźnionemu dojrzewaniu płciowemu. Badania, przeprowadzone w warunkach *in vitro*, wykazały, iż Dyn A zwiększała wydzielanie LH i FSH przez komórki przysadki gruczołowej owiec, mimo że nie wywierała istotnego wpływu na wydzielanie KiSS-10 (publikacja nr 1 i 2). Powyższe doniesienia mogą wydawać się niezgodne z danymi wskazującymi na hamującą rolę Dyn A, klasycznie przypisywaną jej na poziomie podwzgórza. Jednak ta pozorna rozbieżność najprawdopodobniej odzwierciedla zależne od miejsca działania różnice w efektach biologicznych tego neuropeptydu. Podczas

gdy Dyn A hamuje centralne generowanie pulsów GnRH, może wywierać bezpośredni efekt stymulujący na komórki gonadotropowe przysadki mózgowej. Brak wpływu na przysadkowe wydzielanie KiSS-10 sugeruje, że działanie to jest niezależne od lokalnego pośrednictwa kisspeptyny. Oznacza to, że biologiczna rola Dyn A w obrębie osi rozrodczej w znacznym stopniu może zależeć od poziomu anatomicznego, na którym działa.

Uzyskane wyniki badań wskazują, że KiSS-10, NKB i Dyn A uczestniczą w regulacji dojrzewania płciowego u owiec poprzez mechanizmy komplementarne, ale odrębne. KiSS-10 i NKB wydają się pełnić przede wszystkim funkcję czynników stymulujących związanych z aktywacją czynności jajników, działając nie tylko poprzez szlaki podwzgórzowe, ale potencjalnie również poprzez bezpośrednie mechanizmy przysadkowe. Dyn A *in vivo* wydaje się wywierać głównie hamujący wpływ przed rozpoczęciem aktywności rozrodczej, zachowując jednocześnie zdolność do bezpośredniego pobudzania wydzielania gonadotropin na poziomie przysadki. Równowaga pomiędzy sygnałami stymulującymi i hamującymi może zatem stanowić jeden z kluczowych czynników determinujących moment osiągnięcia dojrzałości płciowej. Obserwacje te są szczególnie istotne z punktu widzenia patomechanizmu opóźnionego dojrzewania płciowego. U jarek, predysponowanych do opóźnionego dojrzewania płciowego, wzrost stężeń KiSS-10 i NKB w osoczu w dalszym terminie, wraz z późniejszym spadkiem stężenia Dyn A, sugeruje zmieniony czas sygnalizacji związanej z układem KiSS-10, NKB, Dyn A w obrębie osi HPO. Analogiczne nieprawidłowości szlaków KiSS-10 i NKB są opisywane w zaburzeniach pokwitania u kobiet, w związku z tym model owczy może dostarczać użytecznych informacji dotyczących neuroendokrynnych podstaw opóźnionego dojrzewania płciowego oraz następczych zaburzeń funkcji rozrodczych (Topaloglu i in. 2009, Yang i in. 2015, Young i in. 2010). Należy jednak uwzględnić kilka ograniczeń. Chociaż związek czasowy między zmianami stężeń krążących neuropeptydów a aktywacją jajników jest przekonujący, stężenia w osoczu nie odzwierciedlają bezpośrednio lokalnego wydzielania GnRH w podwzgórzu ani gonadotropin w przysadce. Ponadto mechanizmy łączące ogólnoustrojowe profile KiSS-10, NKB, Dyn A z generowaniem pulsów GnRH pozostają niewyjaśnione. Przyszłe badania powinny zatem łączyć wpływ neuropeptydów KNDy z bezpośrednią oceną pulsacyjnego wydzielania GnRH/LH, ekspresją ich receptorów oraz lokalnej syntezy KiSS-10, NKB oraz Dyn A w podwzgórzu. Dalsze analizy są także konieczne, aby ustalić, czy NKB wywiera stymulujący wpływ na wydzielanie

gonadotropin za pośrednictwem przysadkowej KiSS-10, oraz by wyjaśnić mechanizm, poprzez który Dyn A nasila wydzielanie LH i FSH na poziomie przysadki.

Podsumowując, uzyskane wyniki badań potwierdzają koncepcję, że KiSS-10, NKB i Dyn A stanowią integralne elementy sieci neuroendokrynej kontrolującej dojrzewanie płciowe u owiec. Zapoczątkowanie tego procesu było związane ze wzrostem stężeń KiSS-10 i NKB w osoczu oraz spadkiem stężenia Dyn A *in vivo*, natomiast wyniki badań *in vitro* wskazują, że KiSS-10 i NKB bezpośrednio stymulują wydzielanie gonadotropin przez komórki przedniego płata przysadki, jak również NKB dodatkowo nasila wydzielanie KiSS-10 przez komórki przysadki gruczołowej. Pomimo, iż w przypadku Dyn A występowała odwrotna zależność między jej stężeniem w osoczu krwi a wiekiem, neuropeptyd ten może wywierać bezpośredni stymulujący wpływ na wydzielanie gonadotropin na poziomie przysadki gruczołowej w warunkach *in vitro*, prawdopodobnie niezależnie od KiSS-10. Uzyskane wyniki wskazują, że wzajemne oddziaływanie neuropeptydów KNDy na poziomie przysadki, podobnie jak na poziomie podwzgórza, istotnie wpływa na zapoczątkowanie aktywności rozrodczej owiec, a także może odgrywać ważną rolę w patomechanizmie opóźnionego dojrzewania płciowego.

## WNIOSKI

1. U owiec pochodzących z ciąży pojedynczej zapoczątkowanie aktywności jajników miało miejsce 8 tygodni wcześniej (8. miesiąc życia) niż w przypadku owiec pochodzących z ciąży mnogiej (10. miesiąc życia). Inicjacja aktywności rozrodczej związana była ze wzrostem stężenia KiSS-10 do wartości  $95.28 \pm 5,21$  ng/l u owiec pochodzących z ciąży pojedynczej oraz  $95.80 \pm 7,4$  ng/l u owiec pochodzących z ciąży mnogiej oraz ze wzrostem stężenia NKB do wartości  $384,19 \pm 38,36$  ng/l w grupie S oraz  $364,70 \pm 47,52$  ng/l w grupie T ( na 4 tygodnie przed rozpoczęciem aktywności rozrodczej), a także obniżeniem stężenia Dyn A w osoczu krwi owiec obu badanych grup ( $50,54 \pm 4,59$  ng/l oraz  $52,63 \pm 9,54$  ng/l, odpowiednio dla S i T).
2. U owiec pochodzących z ciąży pojedynczej i bliźniaczej wykazano dodatnią korelację pomiędzy zmianami stężenia KiSS-10 i NKB ( $r = 0.86$  oraz  $r = 0.89$ , odpowiednio dla S i T) w osoczu krwi wraz z wiekiem (od 4. do 10. miesiąca życia), natomiast ujemną korelację stwierdzono pomiędzy KiSS-10 i Dyn A ( $r = -0.55$  oraz  $r = -0.98$ , odpowiednio dla S i T) oraz między NKB i Dyn A ( $r = -0.89$  oraz  $r = -0.94$ , odpowiednio dla S i T) w tych samych warunkach.
3. Średnia masa ciała owiec pochodzących z ciąży pojedynczej w okresie od urodzenia do 10-go miesiąca życia była wyższa niż w grupie owiec pochodzących z ciąży bliźniaczej.
4. KiSS-10, NKB i Dyn A wykazują bezpośredni wpływ na wydzielanie gonadotropin przez komórki przysadki gruczołowej owiec w warunkach *in vitro*. KiSS-10 w stężeniach  $10^{-11}$ - $10^{-8}$  M oraz  $10^{-11}$ - $10^{-7}$  M powodują odpowiednio wzrost wydzielania LH i FSH po 4, 12, 24 godz. doświadczenia w porównaniu z grupą kontrolną. NKB i Dyn A we wszystkich zastosowanych stężeniach ( $10^{-11}$ - $10^{-7}$  M) pobudzają wydzielanie zarówno LH, jak i FSH.
5. W przypadku NKB, w przeciwieństwie do Dyn A, stwierdzono istotny statystycznie ( $P \leq 0,05$ ) pobudzający wpływ na wydzielanie KiSS-10 z komórek przysadki gruczołowej owiec ( w stężeniu  $10^{-8}$  M po 6, 12, 18, 24 godz. oraz w stężeniu  $10^{-7}$  M po 24 godz.).

## BIBLIOGRAFIA

1. Abadjieva D., Shumkov K., Kistanova E., Kacheva D., Georgiev B.: Opportunities for the improvement of the reproductive performances in female animals. *Bio Anim Husb* 2011, 27, 365–372, doi: 10.2298/BAH1103365A.
2. Aerts E.G., Griesgraber M.J., Shuping S.L., Bowdridge E.C., Hardy S.L., Goodman R.L., Nestor C.C., Hileman S.M.: The effect of NK3-Saporin injection within the arcuate nucleus on puberty, the LH surge, and the response to Senktide in female sheep. *Biol Reprod* 2024, 110, 275–287, doi: 10.1093/biolre/ioad147.
3. Aerts E.G., Harlow K., Griesgraber M.J., Bowdridge E.C., Hardy S.L., Nestor C.C., Hileman S.M.: Kisspeptin, Neurokinin B, and Dynorphin Expression during Pubertal Development in Female Sheep. *Biology* 2021, 10, 988, doi: 10.3390/biology10100988.
4. Ahima R.S.: No Kiss Ing by leptin during puberty? *J Clin Invest* 2011, 121, 34–36, doi: 10.1172/JCI45813.
5. Backholer K., Smith J.T., Rao A., Pereira A., Iqbal J., Ogawa S., Li Q., Clarke I.J.: Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology* 2010, 151, 2233–2243, doi: 10.1210/en.2009-1190.
6. Bedenbaugh M.N., Bowdridge E., Hileman S.M.: Role of neurokinin B in ovine puberty. *Domest Anim Endocrinol* 2020, 73, 106442, doi: 10.1016/j.domaniend.2020.106442.
7. Billings H.J., Connors J.M., Altman S.N., Hileman S.M., Holaskova I., Lehman M.N., McManus C.J., Nestor C.C., Jacobs B.H., Goodman R.L.: Neurokinin B acts via the neurokinin-3 receptor in the retrochiasmatic area to stimulate luteinizing hormone secretion in sheep. *Endocrinology* 2010, 151, 3836–3846, doi: 10.1210/en.2010-0174.
8. Castellano J.M., Navarro V.M., Fernández-Fernández R., Nogueiras R., Tovar S., Roa J., Vazquez M.J., Vigo E., Casanueva F.F., Aguilar E., Pinilla L., Dieguez C., Tena-Sempere M.: Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology* 2005, 146, 3917–3925, doi: 10.1210/en.2005-0337.
9. De Roux N., Genin E., Carel J.-C., Matsuda F., Chaussain J.-L., 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, 10972–10976, doi: 10.1073/pnas.1834399100.
10. Hausman G.J., Barb C.R., Lents C.A.: Leptin and reproductive function. *Biochimie* 2012, 94, 2075–2081, doi: 10.1016/j.biochi.2012.02.022.
11. Kant R., Meena M.K.: Role of Kisspeptin in Puberty in Humans. *J A MMR* 2020, 32, 92–97, doi: 10.9734/jammr/2020/v32i1230545.
12. Kosior-Korzecka U., Patkowski K., Bobowiec R., Wójcik M., Tusińska E.: Sustained opposite relationships between anabolic hormones in preweaning triplet lambs born to obese mothers. *Bull Vet Inst Pulawy* 2012, 56, 109–114, doi: 10.2478/v10213-012-0020-6.
13. Kosior-Korzecka U., Radwańska P., Witkowska K., Patkowski K., Wójcik M., Wessely-Szponder J., Bobowiec R.: Kisspeptin-10 and peptide 234 modulate GnRH-induced follicle-stimulating hormone secretion from anterior pituitary cells of prepubertal lambs in vitro. *Med Weter* 2014, 70, 599–603.
14. Li Q., Smith J.T., Henry B., Rao A., Pereira A., Clarke I.J.: Expression of genes for Kisspeptin (KISS1), Neurokinin B (TAC3), Prodynorphin (PDYN), and gonadotropin

- inhibitory hormone (RFRP) across natural puberty in ewes. *Physiol Rep* 2020, 8, e14399, doi: 10.14814/phy2.14399.
15. Lopez J.A., Bedenbaugh M.N., McCosh R.B., Weems P.W., Meadows L.J., Wisman B., Coolen L.M., Goodman R.L., Hileman S.M.: Does Dynorphin Play a Role in the Onset of Puberty in Female Sheep? *J. Neuroendocrinol* 2016, 28, doi: 10.1111/jne.12445.
  16. Luque R.M., Cordoba-Chacon J., Gahete M.D., Navarro V.M., Tena-Sempere M., Kineman R.D., Castano J.P.: Kisspeptin regulates gonadotroph and somatotroph function in nonhuman primate pituitary via common and distinct signaling mechanisms. *Endocrinology* 2011, 152, 957–966, doi: 10.1210/en.2010-1142.
  17. Merkley Ch.M., Porter K.L., Coolen L.M., Hileman S.M., Billings H.J., Drews S., Goodman R.L., Lehman M.N.: KNDy (kisspeptin/neurokinin B/dynorphin) neurons are activated during both pulsatile and surge secretion of LH in the ewe. *Endocrinology* 2012, 153, 5406–5414, doi: 10.1210/en.2012-1357.
  18. Messenger S., Chatzidaki E.E., Ma D., Hendrick A.G., Zahn D., Dixon J., Thresher R.R., Malinge I., Lomet D., Carlton M.B.L., Colledge W.H., Caraty A., Aparicio S.A.J.R.: Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *PNAS* 2005, 102, 1761–1766, doi: 10.1073/pnas.0409330102.
  19. Mijiddorj T., Kanasaki H., Purwana I.N., Oride A., Sukhbaatar U., Miyazaki K.: Role of Neurokinin B and Dynorphin A in pituitary gonadotroph and somatolactotroph cell lines. *Endocr J* 2012, 59, 631–640, doi: 10.1507/endocrj.ej11-0401.
  20. Mizrahi N., Gilon C., Atre I., Ogawa S., Parhar I.S., Levavi-Sivan, B.: Deciphering Direct and Indirect Effects of Neurokinin B and GnRH in the Brain-Pituitary Axis of Tilapia. *Front Endocrinol* 2019, 10, 469, doi: 10.3389/fendo.2019.00469.
  21. Mun S.H., Oh H.J., Kwon J.Y.: Response of Pituitary Cells and Tissues to Neurokinin B and F in the Nile tilapia. *Dev Reprod* 2022, 26, 13-21, doi: 10.12717/DR.2022.26.1.13.
  22. Nakahara T., Uenoyama Y., Iwase A., Oishi S., Nakamura S., Minabe S., Watanabe Y., Deura C., Noguchi T., Fujii N., Kikkawa F., Maeda K., Tsukamura H.: Chronic peripheral administration of kappa-opioid receptor antagonist advances puberty onset associated with acceleration of pulsatile luteinizing hormone secretion in female rats. *J Reprod Dev* 2013, 59, 479–484, doi: 10.1262/jrd.2013-046.
  23. Navarro V.M.: Interactions Between Kisspeptins and Neurokinin B. *Adv Exp Med Biol* 2013, 784, 325–347, doi: 10.1007/978-1-4614-6199-9\_15.
  24. Navarro V.M., Castellano J.M., McConkey S.M., Pineda R., Ruiz-Pino F., Pinilla L., Clifton D.K., Tena-Sempere M., Steiner R.A.: Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010, 300, E202–E210, doi: 10.1152/ajpendo.00517.2010.
  25. Navarro V.M., Fernández-Fernández R., Castellano J.M., Roa J., Mayen A., Barreiro M.L., Gaytan F., Aguilar E., Pinilla L., Dieguez C., Tena-Sempere M.: Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J Physiol* 2004, 561, 379–386, doi: 10.1113/jphysiol.2004.072298.
  26. Navarro V.M., Gottsch M.L., Chavkin C., Okamura H., Clifton D.K., Steiner R.A.: Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* 2009, 29, 11859–11866, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1569-09.2009.

27. Nestor C.C., Briscoe A.M.S., Davis S.M., Valent M., Goodman R.L., Hileman S.M.: Evidence of a role for kisspeptin and neurokinin B in puberty of female sheep. *Endocrinology* 2012, 153, 2756–2765, doi: 10.1210/en.2011-2009.
28. Pinilla L., Aguilar E., Dieguez C., Millar R.P., Tena-Sempere M.: Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 2012, 92, 1235–1316, doi: 10.1152/physrev.00037.2010.
29. Qiu J., Fang Y., Bosch M.A., Rønnekleiv O.K., Kelly M.J.: Guinea pig kisspeptin neurons are depolarized by leptin via activation of TRPC channels. *Endocrinology* 2011, 152, 1503–1514, doi: 10.1210/en.2010-1285.
30. Rance N.E., Krajewski S.J., Smith M.A., Cholanian M., Dacks P.A.: Neurokinin B and the hypothalamic regulation of reproduction. *Brain Res* 2010, 1364, 116–28, doi: 10.1016/j.brainres.2010.08.059.
31. Redmond J.S., Macedo G.G., Velez I.C., Caraty A., Williams G.L., Amstalden M.: Kisspeptin activates the hypothalamic-adenohypophyseal-gonadal axis in prepubertal ewe lambs. *Reproduction* 2011, 141, 541–548, doi: 10.1530/REP-10-0467.
32. Richard N., Corvaisier S., Camacho E., Kottler M.L.: KiSS-1 and GPR54 at the pituitary level: Overview and recent insights. *Peptides* 2009, 30, 123–129, doi: 10.1016/j.peptides.2008.09.015.
33. Rosales Nieto C.A., Ferguson M.B., Macleay C.A., Briegel J.R., Martin G.B., Thompson A.N.: Selection for superior growth advances the onset of puberty and increases reproductive performance in ewe lambs. *Animal* 2013, 7, 990–997, doi: 10.1017/S1751731113000074.
34. Rosales Nieto C.A., Thompson A.N., Macleay C.A., Briegel J.R., Hedger M.P., Ferguson M.B., Martin G.B.: Relationships among body composition, circulating concentrations of leptin and follistatin, and the onset of puberty and fertility in young female sheep. *Anim Reprod Sci* 2014, 151, 148–156, doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.10.008.
35. Seminara S.B., Messenger S., Chatzidaki E.E., Thresher R.R., Acierno J.S., Shagoury J.K., Bo-Abbas Y., Kuohung W., Schwinof K.M., Hendrick A.G., Zahn D., Dixon J., Kaiser U.B., Slaugenhaupt S.A., Gusella J.F., O’Rahilly S., Carlton M.B.L., Crowley W.F., Aparicio S.A.J.R., Colledge W.H.: The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003, 349, 1614–1627, doi: 10.1056/NEJMoa035322.
36. Smith J.T., Acohido B.V., Clifton D.K., Steiner R.A.: KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol* 2006, 18, 298–303, doi: 10.1111/j.1365-2826.2006.01417.x.
37. 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, 360–365, doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.05.016.
38. Terasawa E., James G.P., Seminara S.B., Keen K.L.: Role of kisspeptin and neurokinin B in puberty in female non-human primates. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018, 9, 148, doi: 10.3389/fendo.2018.00148.
39. Tolson K.P., Chappell P.E.: The changes they are a-timed: metabolism, endogenous clocks, and the timing of puberty. *Front Endocrinol* 2012, 3, 45, doi: 10.3389/fendo.2012.00045.
40. Topaloglu K., Reimann F., Guclu M., Yalin A.S., Kotan L.D., Porter K.M., Serin A., Mungan N.O., Cook J.R., Imamoğlu S., Akalin N.S., Yuksel B., O’Rahilly S., Semple R.K.: TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 2009, 41, 354–358, doi: 10.1038/ng.306.

41. Uenoyama Y., Nagae M., Tsuchida H., Inoue N., Tsukamura H.: Role of KNDy Neurons Expressing Kisspeptin, Neurokinin B, and Dynorphin A as a GnRH Pulse Generator Controlling Mammalian Reproduction. *Front Endocrinol* 2021, 12, 724632, doi: 10.3389/fendo.2021.724632.
42. Wang J., Sun L., Zhang T., Zhou H., Lou Y.: Effect of Peripheral Administration of Kisspeptin-10 on Dynamic LH Secretion in Prepubertal Ewes. *Asian-Australas J Anim Sci* 2012, 25, 785–788, doi: 10.5713/ajas.2011.11390.
43. Woller M., Tessmer S., Neff D., Nguema A.A., Roo B.V., Waechter-Brulla D.: Leptin stimulates gonadotropin releasing hormone release from cultured intact hemihypothalami and enzymatically dispersed neurons. *Exp Biol Med* 2001, 226, 591–596, doi: 10.1177/153537020122600613.
44. Weems P.W., Coolen L.M., Hileman S.M., Hardy S., McCosh R.B., Goodman R.L., Lehman M.N.: Evidence that dynorphin acts upon KNDy and GnRH neurons during GnRH pulse termination in the ewe. *Endocrinology* 2018, 159, 3187–3199, doi: 10.1210/en.2018-00435.
45. Yang Y., Xiong X.-Y., Yang L., Xie L., Huang H.: Testing of kisspeptin levels in girls with idiopathic central precocious puberty and its significance. *Exp Ther Med* 2015, 9, 2369–2373, doi: 10.3892/etm.2015.2398.
46. Young J., Bouligand J., Francou B., Raffin-Sanson M.L., Gaillez S., Jeanpierre M., Grynberg M., Kamenicky P., Chanson P., Brailly-Tabard S., Guiochon-Mantel A.: TAC3 and TACR3 defects cause hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2010, 95, 2287-95, doi: 10.1210/jc.2009-2600.

**PUBLIKACJE NAUKOWE WCHODZĄCE W SKŁAD  
CYKLU**

# Influence of neurokinin B, dynorphin A and kisspeptin-10 on *in vitro* gonadotropin secretion by anterior pituitary cells isolated from pubescent ewes

Natalia Szysiak<sup>1</sup>, Urszula Kosior-Korzecka<sup>1</sup>✉, Vincenzo Longo<sup>2</sup>,  
Krzysztof Patkowski<sup>3</sup>, Monika Greguła-Kania<sup>3</sup>, Aneta Nowakiewicz<sup>4</sup>,  
Mariola Bochniarz<sup>4</sup>, Andrzej Junkuszew<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Sub-Department of Pathophysiology, <sup>4</sup>Sub-Department of Veterinary Microbiology,  
Department of Preclinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine,

<sup>3</sup>Department of Animal Breeding and Agricultural Advisory, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy,  
University of Life Sciences in Lublin, 20-950 Lublin, Poland

<sup>2</sup>National Research Council, Institute of Agricultural Biology and Biotechnology, Research Unit of Pisa, 56124 Pisa, Italy  
urszula.korzecka@up.lublin.pl

Received: June 19, 2024

Accepted: January 23, 2025

## Abstract

**Introduction:** The hypothalamic neuropeptides kisspeptin-10 (KiSS-10), neurokinin B (NKB), and dynorphin A (Dyn A) play roles in the endocrine regulation of the hypothalamic–pituitary–ovarian (HPO) axis in puberty. Livestock’s timely attainment of sexual maturity increases reproductive efficiency and raises profitability. The pituitary relationship between these neuropeptides and gonadotropins in puberty in ewes being undercharacterised. The aim of the study was to analyse their direct effect on gonadotropin secretion by pituitary cells isolated from pubescent ewes. **Material and Methods:** Cells were incubated in McCoy’s 5A medium, either without neuropeptides (as the control) or with  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  and  $10^{-7}$  M of KiSS-10, NKB and Dyn A. After 4, 12 and 24 h, the luteinising hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) concentrations were analysed by ELISA using species-specific antibodies. **Results:** Greater LH and FSH secretion was observed after the 4–24 h exposure to respective  $10^{-11}$ – $10^{-8}$  M and  $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M concentrations of KiSS-10. Moreover, NKB and Dyn A applied in the concentration range elevated the secretion of both LH and FSH throughout the experiment. Dynorphin A had the most significant effect on gonadotropin secretion at all the concentrations used. In contrast, the most pronounced dose-dependent neuropeptide effect throughout the experiment on the FSH secretion was attributed to NKB. **Conclusion:** Kisspeptin-10, NKB and Dyn A had a direct impact on gonadotropin secretion by ovine pituitary cells. However, a detailed explanation of their role in gonadotropin secretion by the anterior pituitary gland in sheep and of their impact on the regulation of the HPO axis during sexual maturation or in the pathomechanism of delayed puberty require further studies.

**Keywords:** neurokinin B, dynorphin A, kisspeptin, gonadotropin, puberty.

## Introduction

Puberty is a multifactorial and complex process in animal development resulting in the attainment of the reproductive capacity needed for species survival. It is known that there are many internal and external factors controlling it, among others achievement of appropriate age and weight, metabolic state, photoperiod, susceptibility to stress, and nutrition (32). In the case of livestock, timely attainment of sexual maturity contributes to increased reproductive efficiency, which leads to higher profitability. Any deviation in the maturation process

has its negative consequences for proper development. The role of some neuronal factors as gatekeepers of puberty is not completely known and still under research. Many studies revealed that kisspeptin, neurokinin B and dynorphin neuropeptides, collectively referred to as KNDy neuropeptides and recognised as the key neuropeptides produced and secreted by the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARC), are involved in the endocrine regulation of the onset of puberty (11, 20, 24) (Fig. 1).

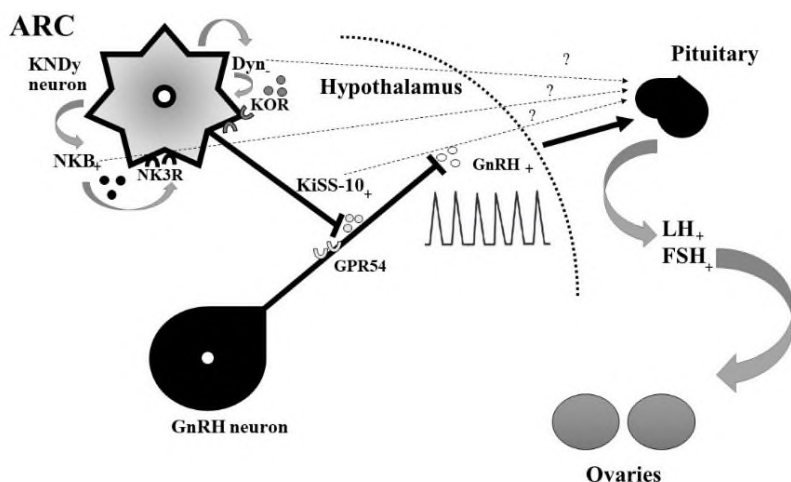
Kisspeptins (KiSS), encoded by the *kiss-1* gene, are a group of endogenous ligands of orphan G protein-related membrane receptors (GPR54) (10). The first

product of *kiss-1* gene expression is their common precursor, prepro-kisspeptin, and its proteolysis results in the formation of subsequent peptides, such as kisspeptin-54, kisspeptin-14, kisspeptin-13 and kisspeptin-10 (KiSS-10) belonging to the RF-amide peptide family (24). The KiSS/GPR54 system is a factor that controls the hypothalamic–pituitary–ovarian (HPO) axis. It is suggested that KiSS may play a crucial role in the emergence of reproductive function at puberty in both humans and animals. In sheep, the preoptic area kisspeptin population in the hypothalamus is thought to be involved in surge generation, and ARC kisspeptin neurons are engaged in the regulation of both surge and tonic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in response to 17-beta-oestradiol (E2) (15, 24). Redmond *et al.* (28) reported that intravenous administration of KiSS in prepubertal ewes enhanced pulse-like and surge-like secretion of LH. Aerts *et al.* (1) demonstrated that injections of neurokinin-3 (NK3)-saporin into the ARC caused ablation of KNDy neurons in ewes and, consequently, a delay in puberty. Any abnormalities in the KiSS/GPR54 system may cause various forms of reproductive disorders, *e.g.* delayed puberty or idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (5).

Neurokinin B (NKB), encoded by the *TAC3* gene in ewes (12), is a 10-amino-acid peptide belonging to the tachykinin family, which also includes neurokinin A, substance P and  $\gamma$  neuropeptides (24). Tachykinins have a common carboxy-terminal Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> amino-acid sequence, where X can be an aliphatic or aromatic amino acid (20). To date, three tachykinin receptors have been identified: for neurokinin-1 (NK1R), neurokinin-2 (NK2R) and neurokinin-3 (NK3R); the last one is a receptor for NKB (24). Neurokinin-3 receptor is principally found in the central nervous system, where it is co-expressed by practically all KNDy neurons in the ARC (22). The NKB/NK3R system is regulated by sex hormones and is suggested to be one of the main modulators of the hypothalamic–pituitary–gonadal axis (22). Acting locally on KNDy neurons, NKB stimulates

the release of KiSS, which binds to its receptor on GnRH neurons, thereby increasing the secretion of GnRH (2). Neurokinin B is an important component of the mechanism responsible for the initiation of the ovine sexual maturation process (3). Nestor *et al.* (23) reported that single intravenous administration of senktide (an NKB agonist) increased LH secretion in prepubertal female sheep.

Dynorphin A (Dyn A), encoded by the *Pdyn* gene, is a compound from the family of endogenous opioid peptides, which also includes  $\beta$ -endorphin and enkephalin, and is characterised by the presence of a common N-terminal Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (or Met) amino-acid sequence (34). The receptor for dynorphin is the kappa opioid receptor (KOR), which is highly expressed in the central nervous system, especially in KNDy and GnRH neurons (37). Some reports indicated that Dyn A inhibited LH secretion in rodents (6, 20). Moreover, Dyn A may also be involved in the regulation of reproductive processes in ruminants. Lopez *et al.* (13) demonstrated that intracerebroventricular infusion of the KOR antagonist norbinaltorphimine notably enhanced mean LH levels compared to the control group in ovariectomised ewes at a prepubertal age treated with an oestrogen implant. There are also single findings that receptors for NKB and Dyn A were present in anterior pituitary cells (17, 35) and, consequently, may be involved in the synthesis and secretion of gonadotropins. Mijiddorj *et al.* (17) reported the presence of NK3R and KOR in gonadotroph cells of the L $\beta$ T2 line; however, neither NKB nor Dyn activated the FSH $\beta$  and LH $\beta$  promoter. To the best of our knowledge, there is no information about the pituitary relationship between KNDy peptides and gonadotropins during puberty in ewes. The available reports on the influence of NKB and Dyn A on LH and FSH secretion by pituitary gland cells *in vitro* are ambiguous and do not relate to sheep. We have demonstrated for the first time the direct effect of KiSS-10, NKB and Dyn A on gonadotropin secretion from anterior pituitary cells isolated from pubescent ewes.



**Fig. 1.** Role of kisspeptin-10 (KiSS-10), neurokinin B (NKB) and dynorphin (Dyn) A in the endocrine regulation of puberty, based on Navarro (20) and Pinilla *et al.* (24) ARC – arcuate nucleus; KNDy – kisspeptin, neurokinin B and dynorphin; GPR54 – G protein-related membrane receptor 54; NK3R – neurokinin 3 receptor; KOR – kappa opioid receptor; GnRH – gonadotropin-releasing hormone; LH – luteinising hormone; FSH – follicle-stimulating hormone; + – positive action; – – negative action; ? – unknown action

## Material and Methods

The protocol of the experimental design and all procedures were approved by the Local Ethics Committee for Animal Experimentation in Lublin (No. 65/2023). The cell culture was prepared using pituitary glands isolated from 10-month-old ewe lambs of the Polish Lowland sheep Uhruska variety ( $n = 6$ ), housed at the Professor T. Efnier Small Ruminant Research Station in Bezek (Poland). The ewes were humanely euthanised by electric shock and exsanguinated at a local slaughterhouse in accordance with applicable regulations. The lambs' pituitary glands were dissected and transported within 1 h to the laboratory in cold Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (about 3–5°C) supplemented with 0.08% glucose, 0.59% 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 0.1% bovine serum albumin, and gentamicin (20 µg/mL). The anterior and posterior lobes of the pituitary were separated by blunt dissection. The anterior pituitary tissue was minced and repeatedly digested with 0.25% trypsin (10 min, 37°C). After each digestion run, the cells were washed three times in DMEM and centrifuged (1,200 rpm, 10 min). After the last centrifugation, the pituitary cells were passed through a 60-µm nylon filter and counted in a Bürker's chamber. Cell viability evaluated using the 0.4% trypan blue dye exclusion test was higher than 96%. The pituitary cells (250,000 cells/mL) were then resuspended in McCoy's 5A medium containing 2.5% foetal calf serum, 10% horse serum, 0.59% HEPES, a mixture of amino acids and vitamins, and gentamicin (20 µg/mL) (adjusted to pH 7.4), and seeded into 24-well culture plates (1 mL/well). The cells were allowed to attach for 96 h at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere (4, 7, 25, 26, 31) until the start of the experiments. During this period, the viability of both the cells suspended in the medium and those already attached to the bottom of the well was also assessed using the 0.4% trypan blue dye exclusion test. Cells that had adhered were detached from the bottom of selected wells using trypsin to determine their viability. The cell viability was estimated at 97% after 24 and 48 h and 96% after 72 and 96 h. After cells' attachment to the dishes and formation of a monolayer, they were incubated in McCoy's 5A medium without neuropeptides (which served as the control) or with 10<sup>-11</sup>, 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup> and 10<sup>-7</sup> M of KiSS-10, NKB or Dyn A. After 4, 12 and 24 h of the experiment, the media were collected and stored at -20°C to determine the cumulative concentration of LH and FSH by ELISA using species-specific antibodies (Sheep LH ELISA Kit or FSH ELISA Kit; Sunred Biological Technology, Shanghai, China). The intra- and inter-assay coefficients of variations of the assay for LH and FSH were <10% and <12%, respectively. The LH and FSH secretion levels were expressed as the concentration (mIU/mL) of the hormone released into the culture medium by 250,000 cells within 4–24 h.

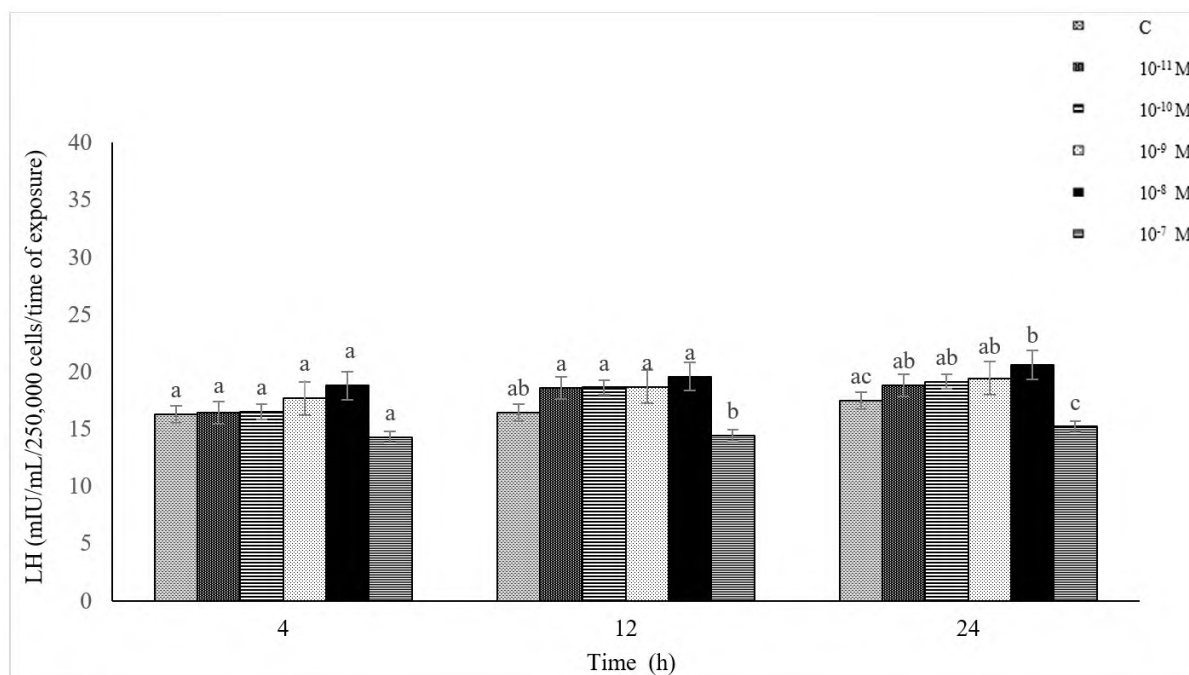
**Statistical analysis.** The results were calculated using Statistica 13.0 PL (TIBCO, Palo Alto, CA, USA)

and expressed as a mean and standard deviation ( $\bar{x} \pm SD$ ). Differences with a P-value  $\leq 0.05$  were considered significant. Pearson linear correlation coefficients were calculated to assess the relationships between the analysed variables, which were KiSS-10 concentration and LH or FSH secretion, NKB concentration and LH or FSH secretion and Dyn A concentration and LH or FSH secretion.

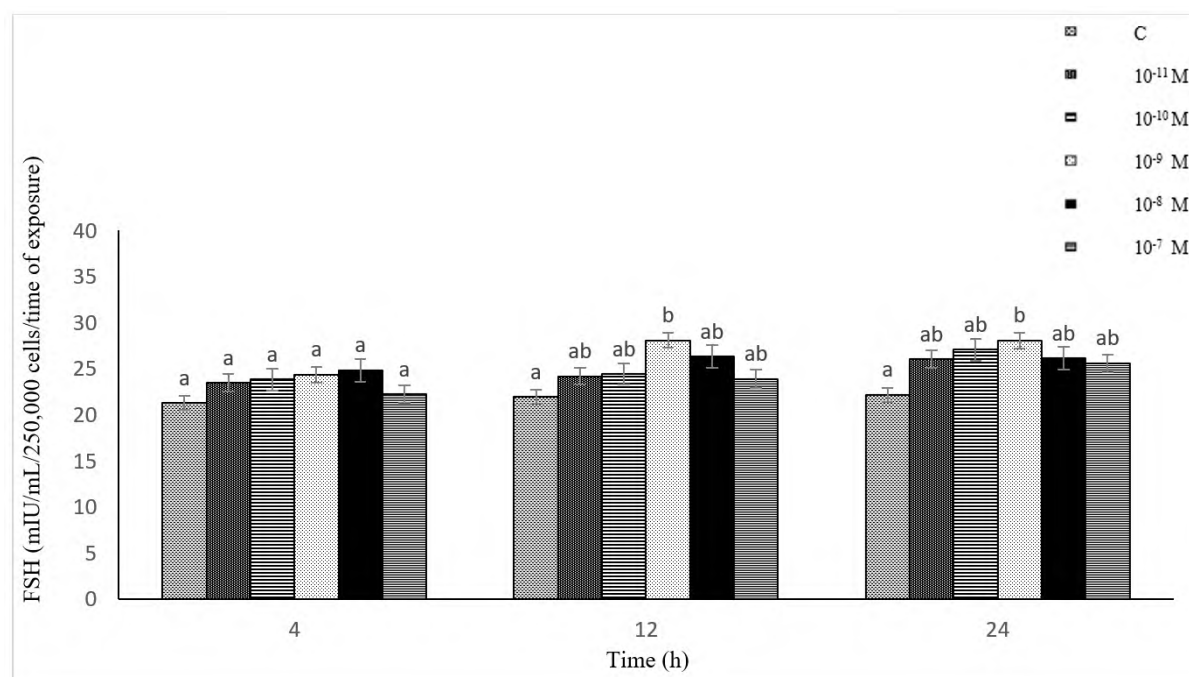
## Results

**Influence of KiSS-10 (10<sup>-11</sup>–10<sup>-7</sup> M) on LH secretion from ovine pituitary cells *in vitro*.** The effect of KiSS-10 on LH secretion was dependent on the time of exposure and its concentration in the culture medium (10<sup>-11</sup>–10<sup>-7</sup> M). Kisspeptin-10 at 10<sup>-11</sup>–10<sup>-8</sup> M caused an increase in the LH secretion compared to the control throughout the experiment. The highest LH secretion was recorded after the exposure of the cells to 10<sup>-8</sup> M of KiSS-10, with a maximum after 24 h. This value was statistically significantly higher (P-value  $\leq 0.05$ ) than in the control. However, at the highest concentration used (10<sup>-7</sup> M), KiSS-10 reduced gonadotropin release throughout the entire experiment compared to the control and cultures treated with it at the lower concentrations. Statistically significantly higher (P-value  $\leq 0.05$ ) secretion of LH was induced by KiSS-10 applied at the concentrations of 10<sup>-11</sup>–10<sup>-8</sup> M compared to 10<sup>-7</sup> M KiSS-10 after 12 and 24 h of incubation. The results revealed a high or very high negative correlation between the concentration of KiSS-10 (10<sup>-11</sup>–10<sup>-7</sup> M) and the LH secretion from the pituitary cells ( $r = -0.76$ ,  $r = -0.96$  and  $r = -0.91$  after 4, 12 and 24 h, respectively). However, a positive correlation was found between the KiSS-10 concentrations and the LH secretion only when the neuropeptide was in the concentration range of 10<sup>-11</sup>–10<sup>-8</sup> M ( $r = 0.90$ ,  $r = 0.99$  and  $r = 0.96$  after 4, 12 and 24 h, respectively) (Fig. 2).

**Influence of KiSS-10 (10<sup>-11</sup>–10<sup>-7</sup> M) on FSH secretion from ovine pituitary cells *in vitro*.** Kisspeptin used at all the concentrations caused an increase in FSH secretion compared to the control throughout the experiment. A statistically significant (P-value  $\leq 0.05$ ) increase in FSH secretion was observed after 12 and 24 h at the 10<sup>-9</sup> M concentration compared to the control. However, the exposure of the cells to 10<sup>-7</sup> M of kisspeptin in the culture medium caused a slight decrease in FSH secretion throughout the experiment compared to secretion in cultures with KiSS-10 applied at the lower concentrations. No statistically significant differences (P-value  $\geq 0.05$ ) were found between the FSH secretion levels under the influence of the different KiSS-10 concentrations (10<sup>-11</sup>–10<sup>-7</sup> M) at any specific incubation time. The results showed a negative correlation between the concentration of KiSS-10 (10<sup>-11</sup>–10<sup>-7</sup> M) and FSH secretion from the pituitary cells ( $r = -0.81$ ,  $r = -0.43$  and  $r = -0.59$  after 4, 12 and 24 h, respectively) (Fig. 3).



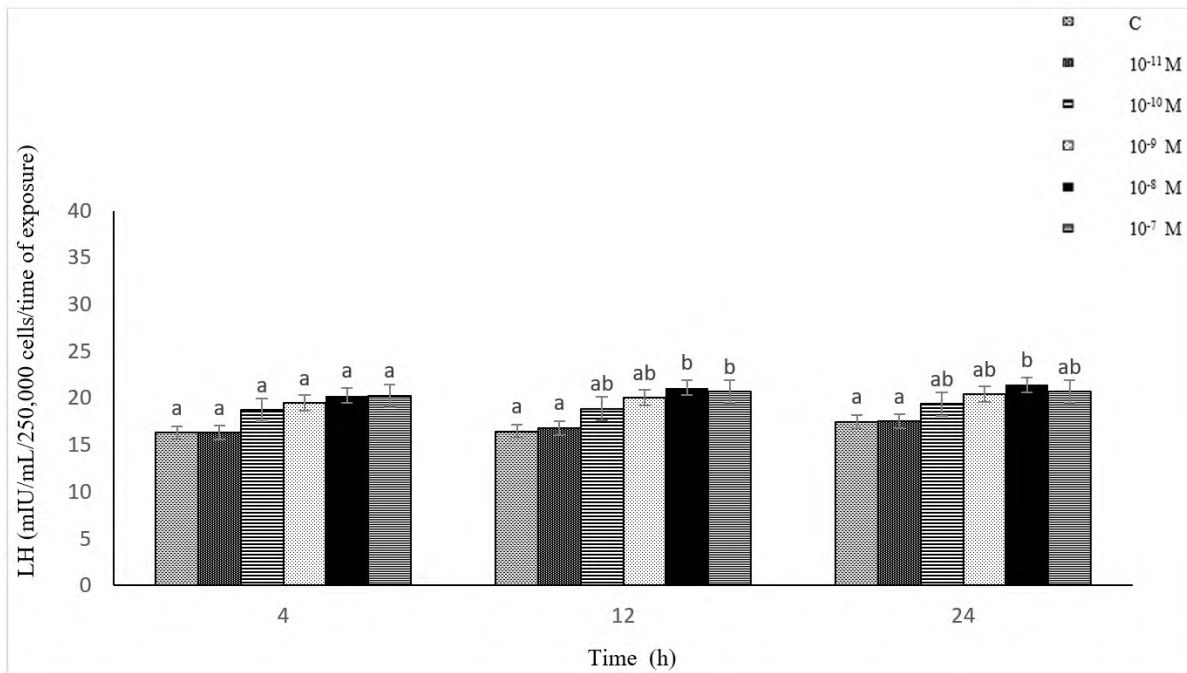
**Fig. 2.** Influence of kisspeptin-10 ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) on luteinising hormone (LH) secretion from ovine pituitary cells *in vitro*  
a, b, c – mean values obtained at a specific incubation time marked with different letters differ statistically significantly ( $P$ -value  $\leq 0.05$ )



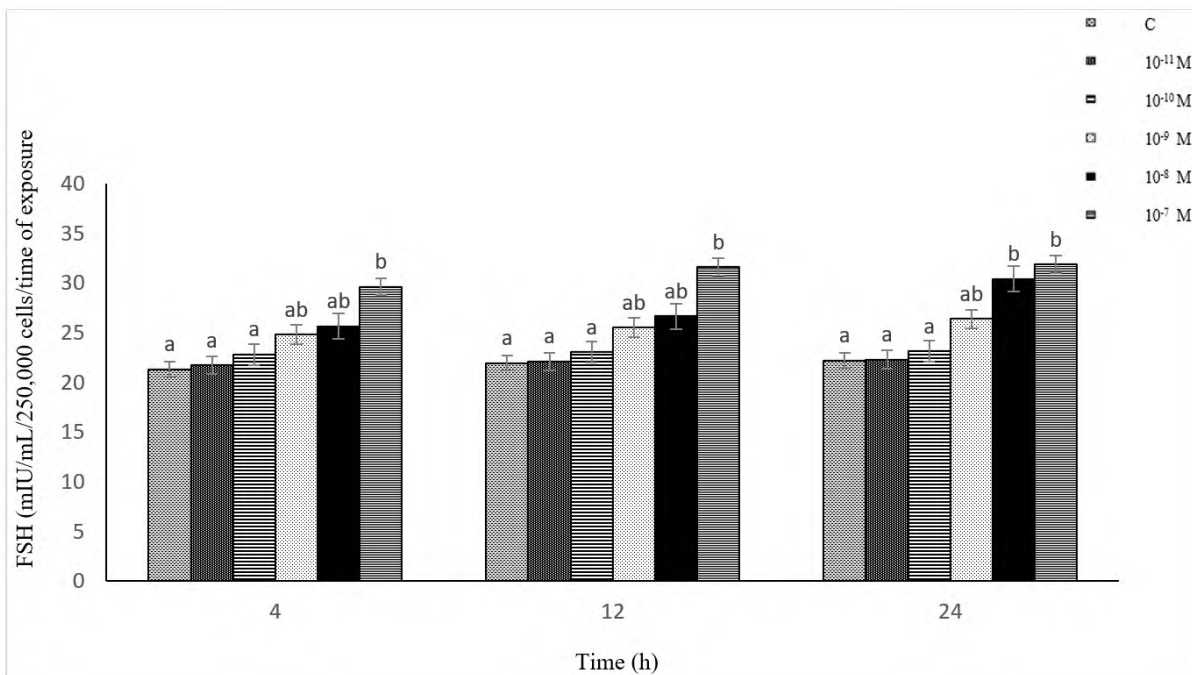
**Fig. 3.** Influence of kisspeptin-10 ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) on follicle-stimulating hormone (FSH) secretion from ovine pituitary cells *in vitro*  
a, b – mean values obtained at a specific incubation time marked with different letters differ statistically significantly ( $P$ -value  $\leq 0.05$ )

**Influence of NKB ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) on LH secretion from ovine pituitary cells *in vitro*.** The effect of NKB on LH secretion, similarly to the effect of kisspeptin, was dependent on its concentration in the culture medium and the duration of the experiment. The exposure of the cells to all the NKB doses used had a stimulating effect on LH secretion relative to the control. A marked increase in secretion was induced by  $10^{-10}$ – $10^{-7}$  M of NKB after 4–24 h. The strongest stimulatory action ( $P$ -value  $\leq 0.05$ ) was observed

after the 12- and 24-h treatments with  $10^{-8}$  M of NKB. Statistically significantly higher ( $P$ -value  $\leq 0.05$ ) secretion of LH under the influence of NKB was found at the concentration of  $10^{-8}$ – $10^{-7}$  M (after 12 h) and  $10^{-8}$  M (after 24 h), compared to the concentration of  $10^{-11}$  M. The results showed a low positive correlation between the concentration of NKB ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) and LH secretion from the pituitary cells ( $r = 0.48$ ,  $r = 0.45$ , and  $r = 0.37$  after 4, 12 and 24 h, respectively) (Fig. 4).



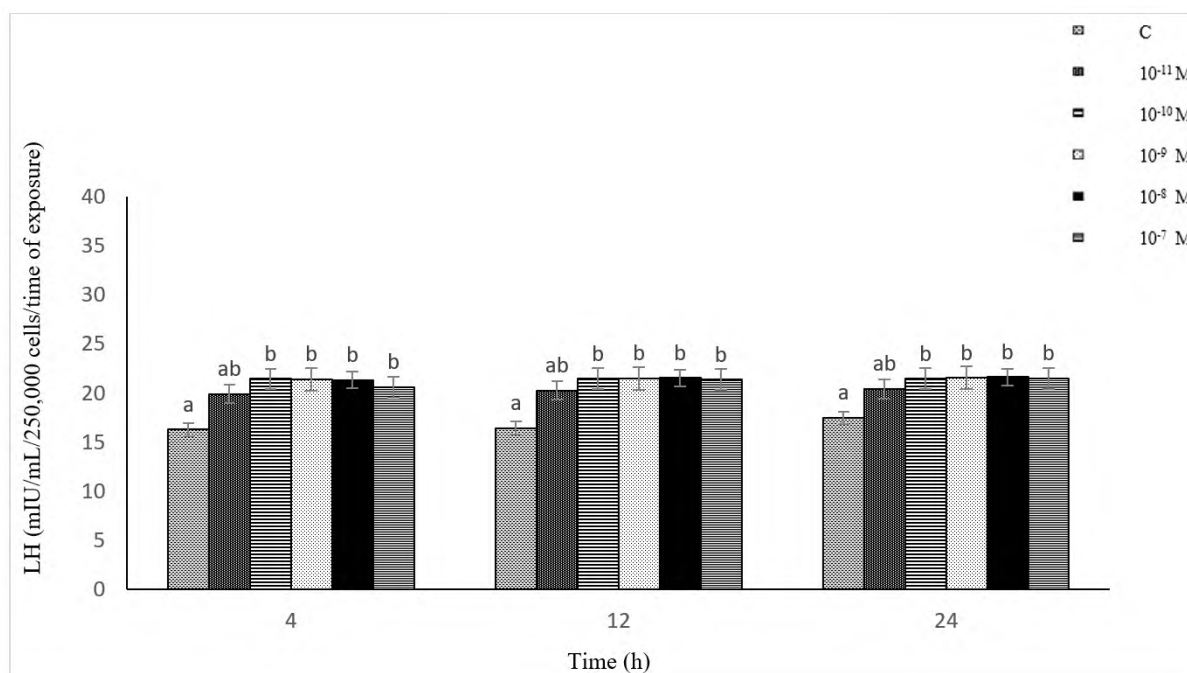
**Fig. 4.** Influence of neurokinin B ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) on luteinising hormone (LH) secretion from ovine pituitary cells *in vitro*  
a, b – mean values obtained at a specific incubation time marked with different letters differ statistically significantly ( $P$ -value  $\leq 0.05$ )



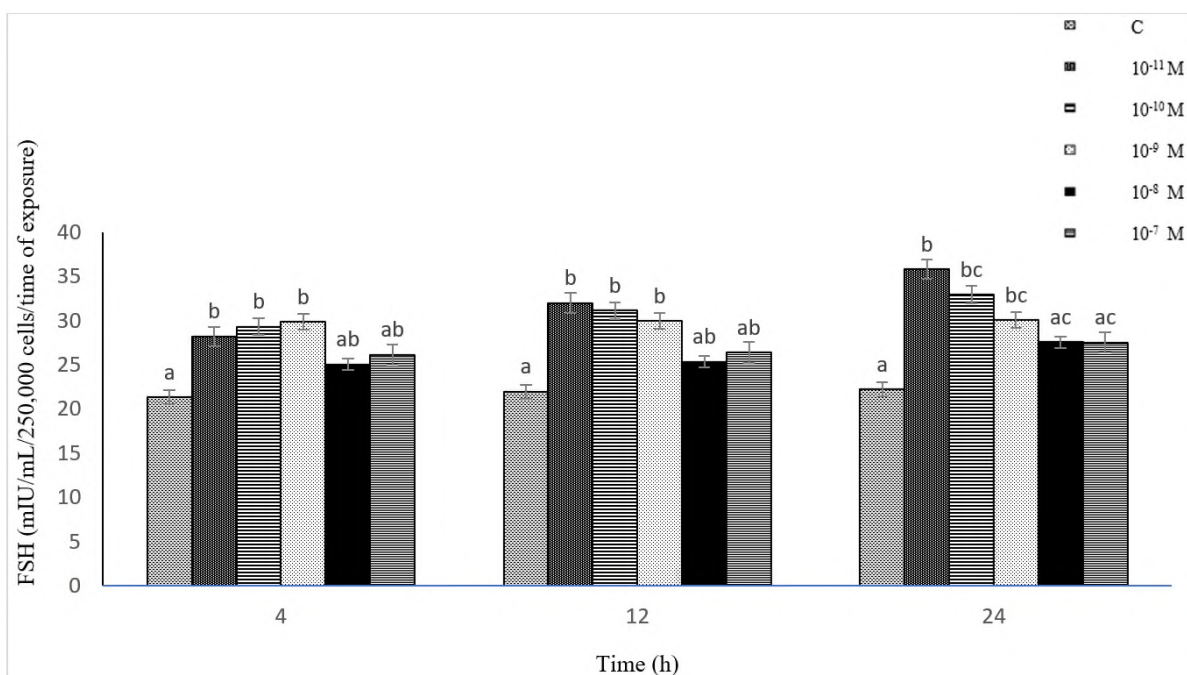
**Fig. 5.** Influence of neurokinin B ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) on follicle-stimulating hormone (FSH) secretion from ovine pituitary cells *in vitro*  
a, b – mean values obtained at a specific incubation time marked with different letters differ statistically significantly ( $P$ -value  $\leq 0.05$ )

**Influence of NKB ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) on FSH secretion from ovine pituitary cells *in vitro*.** The exposure of the cells to  $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M of NKB resulted in elevated FSH secretion throughout the experiment compared to the control. The most pronounced stimulating effect on FSH secretion was found after 4, 12 and 24 h at  $10^{-7}$  M of NKB. Follicle-stimulating hormone secretion reached a maximum after the 12- and 24-h exposure of the cells to the highest concentration used ( $10^{-7}$  M). This value was statistically significantly

higher ( $P$ -value  $\leq 0.05$ ) than in the control and cultures with NKB at the lower concentrations. Statistically significantly higher ( $P$ -value  $\leq 0.05$ ) secretion of FSH was induced by NKB at the concentration of  $10^{-7}$  M (after 4 and 12 h) and  $10^{-8}$ – $10^{-7}$  M (after 24 h) than by this neuropeptide at  $10^{-11}$ – $10^{-10}$  M. The results revealed a high positive correlation between the concentration of NKB ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) and FSH secretion from the pituitary cells ( $r = 0.89$ ,  $r = 0.90$  and  $r = 0.73$  after 4, 12 and 24 h, respectively) (Fig. 5).



**Fig. 6.** Influence of dynorphin A ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) on luteinising hormone (LH) secretion from ovine pituitary cells *in vitro*  
a, b – mean values obtained at a specific incubation time marked with different letters differ statistically significantly (P-value ≤ 0.05)



**Fig. 7.** Influence of dynorphin A ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) on follicle-stimulating hormone (FSH) secretion from ovine pituitary cells *in vitro*  
a, b, c – mean values obtained at a specific incubation time marked with different letters differ statistically significantly (P-value ≤ 0.05)

**Influence of Dyn A ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) on LH secretion from ovine pituitary cells *in vitro*.** The influence of Dyn A on LH secretion was dependent on the time of exposure and its concentration in the culture medium. The exposure of the cells to  $10^{-10}$ – $10^{-7}$  M of Dyn A caused a statistically significant (P-value ≤ 0.05) increase in LH secretion compared to the control. Luteinising hormone secretion reached its maximum level after 24 h in response to  $10^{-8}$  M of Dyn A. However, no statistically significant differences were found between the LH secretion levels under the influence of

the different Dyn A concentrations ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) at a specific incubation time. There was no statistically significant correlation between the Dyn A ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) concentration and LH secretion ( $r = -0.24$ ,  $r = 0.17$  and  $r = 0.26$  after 4, 12 and 24 h, respectively) (Fig. 6).

**Influence of Dyn A ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) on FSH secretion from ovine pituitary cells *in vitro*.** The exposure of the cells to Dyn A resulted in an increase in FSH secretion at all the doses used throughout the experiment compared to the control. A significant effect (P-value ≤ 0.05) was observed at the concentrations of

$10^{-11}$ – $10^{-9}$  M after 4–24 h. The strongest stimulatory action (P-value  $\leq 0.05$ ) was observed after 24 h at  $10^{-11}$  M of Dyn A.

Statistically significantly higher (P-value  $\leq 0.05$ ) secretion of FSH was induced by Dyn A at the concentration of  $10^{-11}$  M compared to its effect at  $10^{-8}$ – $10^{-7}$  M after 24 h. The results indicated a moderate negative relationship between the concentration of Dyn A ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M) and FSH secretion from the pituitary cells ( $r = -0.50$ ,  $r = -0.57$  and  $r = -0.57$  after 4, 12 and 24 h, respectively) (Fig. 7).

## Discussion

It is known that three neuropeptides (KiSS-10, NKB and Dyn A) produced by the KNDy subpopulation in the ARC region of the hypothalamus can regulate reproductive functions during sexual development. Detailed data of their characteristics will help to elucidate the pathomechanism of delayed puberty or other neuroendocrine disorders leading to infertility (2, 3, 11, 22, 24, 33). The evidence that KiSS-1 causes an increase in gonadotropin secretion in a GnRH-dependent manner was provided by Navarro *et al.* (21), who indicated that the central administration of KiSS-1 to immature female rats enhanced their plasma LH levels. Moreover, in studies conducted on sheep, Messenger *et al.* (16) reported that intraventricular administration of kisspeptin caused a rapid increase in LH secretion during the first 2 h of the experiment in 2- to 3-year-old Ile de France ewes during the anoestrous season. It was also shown that a single intravenous injection of 0.5, 1 or 2 mg of KiSS-10 notably increased LH secretion in three-month-old Small-tail Han female lambs within 15 min (36). In addition, an *in vitro* experiment conducted by Kosior-Korzecka *et al.* (8) indicated that KiSS-10 applied at  $10^{-11}$ – $10^{-9}$  M after 48 h caused a high increase in GnRH, which induced FSH secretion by anterior pituitary cells isolated from six-month-old Polish Lowland ram lambs. Furthermore, the expression of GPR54 was detected in the anterior pituitary gland (14, 29); therefore, KiSSs can act directly on pituitary cells (8, 26, 27). As reported by Radwańska and Kosior-Korzecka (26), after 2 h KiSS-10 at  $10^{-11}$ – $10^{-8}$  M increased thyroid-stimulating hormone (TSH) secretion *in vitro* from pituitary cells isolated from six-month-old ewe lambs of the SCP line (50% Suffolk + 25% Romanov + 25% Polish Lowland Sheep). These authors also demonstrated that TSH secretion reached a maximum level after 2 h of the action of KiSS-10 at the  $10^{-11}$  M concentration. In turn, our study shows that KiSS-10 also had an impact on gonadotropin secretion by anterior pituitary cells isolated from pubescent ewes. The ewes, predisposed to delayed puberty, were multiple offspring of high-body weight mothers and did not ovulate until their tenth month (27). Since there are no studies in this field carried out on sexually mature sheep and those predisposed to delayed puberty, the present *in vitro*

experiment was conducted on anterior pituitary cells isolated from such, and namely these 10-month-old ewes of the Polish Lowland sheep, Uhruska variety. In our research, we demonstrated an increase in the LH and FSH secretion after 4–24 h exposure to  $10^{-11}$ – $10^{-8}$  M and  $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M of KiSS-10, respectively, throughout the experiment. A statistically significant (P-value  $\leq 0.05$ ) increase in the LH secretion was recorded after the exposure of the cells to  $10^{-8}$  M of KiSS-10, with a maximum after 24 h of incubation; in turn, the highest FSH secretion was observed after 12 and 24 h at  $10^{-9}$  M of kisspeptin compared to the control. Drawing a comparison with the effect of KiSS-10 in other animal species, we can state that our findings are consistent with the report by Suzuki *et al.* (30), which indicated that KiSS-10 stimulated LH secretion from porcine anterior pituitary cells at the doses of  $10^{-7}$  M and  $10^{-6}$  M and from bovine anterior pituitary cells at  $10^{-6}$  M and  $10^{-5}$  M. Based on our previous findings (9), KiSS-10 also caused significant enhancement of LH secretion by porcine pituitary cells *in vitro* compared to the control, especially after 30-h exposure of the cells to  $10^{-8}$  M of kisspeptin. These data also confirm that KiSS-10 can directly affect gonadotropic cells.

Single reports indicated that NKB and Dyn A may also be directly involved in the synthesis and/or secretion of hormones at the anterior pituitary level. Mun *et al.* (19) observed that the expression of gonadotropic hormone in female Nile tilapia was increased after treatment of pituitary cell cultures with the NKB peptide, especially at concentrations of  $10^{-8}$  M and  $10^{-6}$  M. Based on data reported by Mizrahi *et al.* (18), the intraperitoneal injection of an NKB analogue caused an increase in FSH and LH secretion in sexually mature female Nile tilapia after 1 h of the procedure. Mizrahi *et al.* also demonstrated that neurokinin B and its analogue enhanced the mRNA expression of FSH $\beta$  and LH $\beta$  (18). In addition, Mijiddorj *et al.* (17) found a receptor of NKB and Dyn in gonadotroph L $\beta$ T2 cells (a mouse pituitary cell line) and the somatolactotroph GH3 line (rat pituitary cells). However, to the best of our knowledge, there are no such data on sheep. Therefore, in the present study, we investigated any effect of NKB or Dyn A on gonadotropin secretion from anterior pituitary cells isolated from pubescent ewes. Our results showed that the exposure to  $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M of NKB resulted in elevated LH and FSH secretion by ovine pituitary cells *in vitro* throughout the experiment. The LH secretion reached a maximum after the 24-h treatment with  $10^{-8}$  M of NKB. In turn, the highest level of FSH secretion was observed after the 24-h exposure of the cells to the concentration of  $10^{-7}$  M. We also observed that Dyn A applied at the  $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M concentration caused a statistically significant (P-value  $\leq 0.05$ ) increase in the LH secretion compared to the control. The LH secretion reached the highest level after 24 h in response to  $10^{-8}$  M. In addition, the Dyn A neuropeptide caused the highest increase in the LH secretion throughout the experiment. Furthermore, the exposure of the cells to Dyn A also

resulted in an increase in the FSH secretion at all the concentrations used throughout the experiment compared to the control, its secretion reaching its maximum level when acted on by  $10^{-11}$  M of Dyn A for 24 h. This value was significantly higher ( $P$ -value  $\leq 0.05$ ) than in the control. To summarise the effects of the three neuropeptides on gonadotropin secretion: the most significant stimulating effect on LH and FSH secretion by the pituitary cells of pubescent ewes compared to the control was exerted by Dyn A, and the most pronounced dose-dependent effect of the neuropeptides on FSH secretion was observed during the action of NKB throughout the experiment. Unfortunately, it is difficult to compare the present results, because to the best of our knowledge there have been no similar studies on higher vertebrates in this field.

## Conclusion

In this study, we characterised the ability of NKB, KiSS-10 and Dyn A to stimulate LH and FSH secretion from pituitary cells isolated from pubescent ewe lambs. The results of our study further document the novel role of NKB, KiSS-10 and Dyn A in the neuroendocrine regulation of gonadotropin secretion at the pituitary level. The function of these neuropeptides may consist in the initiation of reproductive activity, which leads to the occurrence of the first ovulation and achievement of sexual maturity. A detailed explanation of the role of KiSS-10, NKB and Dyn A in gonadotropin secretion by the anterior pituitary gland in sheep and the determination of their impact on the regulation of the HPO axis during sexual maturation or in the pathomechanism of delayed puberty require further research.

**Conflict of Interests Statement:** The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

**Financial Disclosure Statement:** The authors received no financial support for the research, authorship and publication of this article.

**Animal Rights Statement:** The protocol of the experimental design and all procedures were approved by the Local Ethics Committee for Animal Experimentation in Lublin (No. 65/2023).

**CRedit Authorship Contribution Statement:** **Natalia Szysiak:** research concept and design, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, writing the article, critical revision of the article, final approval of the article. **Urszula Kosior-Korzecka:** research concept and design, data analysis and interpretation, writing the article, critical revision of the article, final approval of the article. **Vincenzo Longo:** final approval of the article. **Krzysztof Patkowski:** collection and/or assembly of data. **Monika Gregula-**

**Kania:** collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation. **Aneta Nowakiewicz:** data analysis and interpretation. **Mariola Bochniarz:** critical revision of the article. **Andrzej Junkuszew:** critical revision of the article.

## References

1. Aerts E.G., Griesgraber M.J., Shuping S.L., Bowdridge E.C., Hardy S.L., Goodman R.L., Nestor C.C., Hileman S.M.: The effect of NK3-Saporin injection within the arcuate nucleus on puberty, the LH surge, and the response to Senktide in female sheep. *Biol Reprod* 2024, 110, 275–287, doi: 10.1093/biolre/ioad147.
2. Aerts E.G., Harlow K., Griesgraber M.J., Bowdridge E.C., Hardy S.L., Nestor C.C., Hileman S.M.: Kisspeptin, Neurokinin B, and Dynorphin Expression during Pubertal Development in Female Sheep. *Biology* 2021, 10, 988, doi: 10.3390/biology10100988.
3. Bedenbaugh M.N., Bowdridge E., Hileman S.M.: Role of neurokinin B in ovine puberty. *Domest Anim Endocrinol* 2020, 73, 106442, doi: 10.1016/j.domaniend.2020.106442.
4. Bogacka I., Siawrys G., Okrasa S., Kaminski T., Przala J.: The influence of GnRH, oxytocin and vasoactive intestinal peptide on the secretion of b-endorphin and production of cAMP and cGMP by porcine pituitary cells *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 2002, 69, 125–137, doi: 10.1016/s0378-4320(01)00176-2.
5. Kant R., Meena M.K.: Role of Kisspeptin in Puberty in Humans. *J A MMR* 2020, 32, 92–97, doi: 10.9734/jammr/2020/v32i1230545.
6. Kinoshita F., Nakai Y., Katakami H., Imura H.: Suppressive effect of dynorphin-(1–13) on luteinizing hormone release in conscious castrated rats. *Life Sci* 1982, 30, 1915–1919, doi: 10.1016/0024-3205(82)90472-6.
7. Kosior-Korzecka U., Bobowiec R.: Leptin effect on nitric oxide and GnRH-induced FSH secretion from ovine pituitary cells *in vitro*. *J Physiol Pharmacol* 2006, 57, 637–647.
8. Kosior-Korzecka U., Longo V., Della Croce C., Szysiak N., Furmańczyk-Gnyp A., Nowakiewicz A., Puzio I., Surówka B., Minakow N., Szymczak B.: KiSS-1/GPR54 mRNA expression and the relationship between KiSS-10 and luteinizing hormone secretion in pituitary gland of cyclic and PCOS-affected sows. Paper S11.L12, 28<sup>th</sup> Congress of the Polish Physiological Society, Gdańsk, Poland, 15–17 September 2021 *J Physiol Pharmacol Book of abstracts* 2021, 72, 126.
9. Kosior-Korzecka U., Radwańska P., Witkowska K., Patkowski K., Wójcik M., Wessely-Szponder J., Bobowiec R.: Kisspeptin-10 and peptide 234 modulate GnRH-induced follicle-stimulating hormone secretion from anterior pituitary cells of prepubertal lambs *in vitro*. *Med Weter* 2014, 70, 599–603.
10. Kotani M., Dethoux M., Vandenbogaerde A., Communi D., Vanderwinden J.M., Le Poul E., Brézillon S., Tyldesley R., Suarez-Huerta N., Vandeput F., Blanpain C., Schiffmann S.N., Vassart G., Parmentier M.: The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2021, 276, 34631–34636, doi: 10.1074/jbc.M104847200.
11. Lehman M.N., Coolen L.M., Goodman R.L.: Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 2010, 151, 3479–3489, doi: 10.1210/en.2010-0022.
12. Li Q., Smith J.T., Henry B., Rao A., Pereira A., Clarke I.J.: Expression of genes for Kisspeptin (KiSS1), Neurokinin B (TAC3), Prodynorphin (PDYN), and gonadotropin inhibitory hormone (RFRP) across natural puberty in ewes. *Physiol Rep* 2020, 8, e14399, doi: 10.14814/phy2.14399.
13. Lopez J.A., Bedenbaugh M.N., McCosh R.B., Weems P.W., Meadows L.J., Wisman B., Coolen L.M., Goodman R.L.,

- Hileman S.M.: Does Dynorphin Play a Role in the Onset of Puberty in Female Sheep? *J. Neuroendocrinol* 2016, 28, doi: 10.1111/jne.12445.
14. Luque R.M., Cordoba-Chacon J., Gahete M.D., Navarro V.M., Tena-Sempere M., Kineman R.D., Castano J.P.: Kisspeptin regulates gonadotroph and somatotroph function in nonhuman primate pituitary via common and distinct signaling mechanisms. *Endocrinology* 2011, 152, 957–966, doi: 10.1210/en.2010-1142.
  15. Merkley Ch.M., Porter K.L., Coolen L.M., Hileman S.M., Billings H.J., Drews S., Goodman R.L., Lehman M.N.: KNDy (kisspeptin/neurokinin B/dynorphin) neurons are activated during both pulsatile and surge secretion of LH in the ewe. *Endocrinology* 2012, 153, 5406–5414, doi: 10.1210/en.2012-1357.
  16. Messenger S., Chatzidaki E.E., Ma D., Hendrick A.G., Zahn D., Dixon J., Thresher R.R., Malinge I., Lomet D., Carlton M.B.L., Colledge W.H., Caraty A., Aparicio S.A.J.R.: Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *PNAS* 2005, 102, 1761–1766, doi: 10.1073/pnas.0409330102.
  17. Mijiddorj T., Kanasaki H., Purwana I.N., Oride A., Sukhbaatar U., Miyazaki K.: Role of Neurokinin B and Dynorphin A in pituitary gonadotroph and somatolactotroph cell lines. *Endocr J* 2012, 59, 631–640, doi: 10.1507/endocr.j.11-0401.
  18. Mizrahi N., Gilon C., Atre I., Ogawa S., Parhar I.S., Levavi-Sivan B.: Deciphering Direct and Indirect Effects of Neurokinin B and GnRH in the Brain-Pituitary Axis of Tilapia. *Front Endocrinol* 2019, 10, 469, doi: 10.3389/fendo.2019.00469.
  19. Mun S.H., Oh H.J., Kwon J.Y.: Response of Pituitary Cells and Tissues to Neurokinin B and F in the Nile tilapia. *Dev Reprod* 2022, 26, 13–21, doi: 10.12717/DR.2022.26.1.13.
  20. Navarro V.M.: Interactions Between Kisspeptins and Neurokinin B. *Adv Exp Med Biol* 2013, 784, 325–347, doi: 10.1007/978-1-4614-6199-9\_15.
  21. Navarro V.M., Fernández-Fernández R., Castellano J.M., Roa J., Mayen A., Barreiro M.L., Gaytan F., Aguilar E., Pinilla L., Dieguez C., Tena-Sempere M.: Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J Physiol* 2004, 561, 379–386, doi: 10.1113/jphysiol.2004.072298.
  22. Navarro V.M., Gottsch M.L., Chavkin C., Okamura H., Clifton D.K., Steiner R.A.: Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* 2009, 29, 11859–11866, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1569-09.2009.
  23. Nestor C.C., Briscoe A.M.S., Davis S.M., Valent M., Goodman R.L., Hileman S.M.: Evidence of a role for kisspeptin and neurokinin B in puberty of female sheep. *Endocrinology* 2012, 153, 2756–2765, doi: 10.1210/en.2011-2009.
  24. Pinilla L., Aguilar E., Dieguez C., Millar R.P., Tena-Sempere M.: Kisspeptins and Reproduction: Physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 2012, 92, 1235–1316, doi: 10.1152/physrev.00037.2010.
  25. Radwańska P., Kosior-Korzecka U.: Effect of leptin on thyroid-stimulating hormone secretion and nitric oxide release from pituitary cells of ewe lambs *in vitro*. *J Physiol Pharmacol* 2014, 65, 145–151.
  26. Radwańska P., Kosior-Korzecka U.: Relationships between leptin, KiSS-1/GPR54 expression and TSH secretion from pituitary cells of pubertal ewes *in vitro*. *Res Vet Sci* 2016, 105, 180–187, doi: 10.1016/j.rvsc.2016.02.014.
  27. Radwańska P., Kosior-Korzecka U.: Relationships between leptin, the KiSS-1/GPR54 system and thyrotropic axis activity in ewe lambs predisposed to the delayed puberty. *Small Rumin Res* 2016, 144, 6–16, doi: 10.1016/j.smallrumres.2016.07.019.
  28. Redmond J.S., Macedo G.G., Velez I.C., Caraty A., Williams G.L., Amstalden M.: Kisspeptin activates the hypothalamic-adenohypophyseal-gonadal axis in prepubertal ewe lambs. *Reproduction* 2011, 141, 541–548, doi: 10.1530/REP-10-0467.
  29. Richard N., Corvaisier S., Camacho E., Kottler M.L.: KiSS-1 and GPR54 at the pituitary level: Overview and recent insights. *Peptides* 2009, 30, 123–129, doi: 10.1016/j.peptides.2008.09.015.
  30. 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, 360–365, doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.05.016.
  31. Szysiak N., Kosior-Korzecka U., Longo V., Cavallero A., Szymczak B., Furmańczyk Gny p A., Nguyen Ngoc D., Nowakiewicz A., Puzio I., Surówka B., Minakow N.: Effect of saturated fatty acid on GnRH-induced gonadotropin secretion from anterior pituitary cells of pubescent ewe lambs. *Med Weter* 2023, 79, 633–636, doi: 10.21521/mw.6837.
  32. Tolson K.P., Chappell P.E.: The changes they are a-timed: metabolism, endogenous clocks, and the timing of puberty. *Front Endocrinol* 2012, 3, 45, doi: 10.3389/fendo.2012.00045.
  33. Topaloglu K., Reimann F., Guclu M., Yalin A.S., Kotan L.D., Porter K.M., Serin A., Mungan N.O., Cook J.R., Imamoğlu S., Akalin N.S., Yuksel B., O’Rahilly S., Semple R.K.: TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 2009, 41, 354–358, doi: 10.1038/ng.306.
  34. Uenoyama Y., Nagae M., Tsuchida H., Inoue N., Tsukamura H.: Role of KNDy Neurons Expressing Kisspeptin, Neurokinin B, and Dynorphin A as a GnRH Pulse Generator Controlling Mammalian Reproduction. *Front Endocrinol* 2021, 12, 724632, doi: 10.3389/fendo.2021.724632.
  35. Van Vugt D.A., Meites J.: Influence of endogenous opiates on anterior pituitary function. *Fed Proc* 1980, 39, 2533–2538.
  36. Wang J., Sun L., Zhang T., Zhou H., Lou Y.: Effect of Peripheral Administration of Kisspeptin-10 on Dynamic LH Secretion in Prepubertal Ewes. *Asian-Australas J Anim Sci* 2012, 25, 785–788, doi: 10.5713/ajas.2011.11390.
  37. Weems P.W., Coolen L.M., Hileman S.M., Hardy S., McCosh R.B., Goodman R.L., Lehman M.N.: Evidence that dynorphin acts upon KNDy and GnRH neurons during GnRH pulse termination in the ewe. *Endocrinology* 2018, 159, 3187–3199, doi: 10.1210/en.2018-00435.

# Effect of neurokinin B and dynorphin A on kisspeptin-10 secretion from the anterior pituitary cells of pubescent ewes *in vitro*

Natalia Szysiak<sup>1</sup>, Urszula Kosior-Korzecka<sup>1✉</sup>, Monika Greguła-Kania<sup>2</sup>,  
Krzysztof Patkowski<sup>2</sup>, Mateusz Fila<sup>1</sup>, Andrzej Junkuszew<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sub-Department of Pathophysiology, Department of Preclinical Veterinary Sciences,  
Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, 20-033 Lublin, Poland  
<sup>2</sup>Department of Animal Breeding and Agricultural Advisory, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy,  
University of Life Sciences in Lublin, 20-950 Lublin, Poland  
urszula.korzecka@up.lublin.pl

Received: November 27, 2024      Accepted: April 10, 2025

## Abstract

**Introduction:** Neurokinin B (NKB), dynorphin A (Dyn A) and kisspeptin (KiSS) are key agents that participate in the neuroendocrine regulation of the development and functioning of the reproductive system. While the role of KiSS is better understood, the functions of NKB and Dyn A at the pituitary level have not been elucidated. The objective of our study was to analyse their direct effect on kisspeptin-10 (KiSS-10) secretion by anterior pituitary cells isolated from pubescent ewes. **Material and Methods:** Pituitary cells from 10-month-old ewe lambs were incubated in McCoy's 5A medium without hormones (the control), or with  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  or  $10^{-7}$  M of NKB or Dyn A for 2, 4, 6, 12, 18 or 24 h. The concentration of KiSS-10 was analysed by ELISA using species-specific antibodies. **Results:** When applied at the concentrations of  $10^{-10}$ – $10^{-7}$  M, NKB increased KiSS-10 secretion throughout the entire experiment (2–24 h), compared to the control. Significantly higher ( $P$ -value  $\leq 0.05$ ) KiSS-10 release than in the control was observed after 6–24 h exposure of the cells to  $10^{-8}$  M of NKB. However, no effect of NKB on the secretion of KiSS-10 was shown when applied at the lowest concentration ( $10^{-11}$  M). In turn, there was no significant effect of Dyn A at any concentration on KiSS-10 secretion by pituitary cells at any time. **Conclusion:** In contrast to Dyn A, NKB can directly affect KiSS-10 secretion from the pituitary cells of pubescent ewes in a way dependent on the time of exposure to this neuropeptide and its concentration in the culture medium. This phenomenon may indicate a potential role of NKB in the initiation of reproductive activity, which leads to the achievement of sexual maturity in the optimal developmental window.

**Keywords:** neurokinin B, dynorphin A, kisspeptin, pituitary, puberty.

## Introduction

It is known that delayed puberty in livestock may have negative health effects, including an increase in the amount of subcutaneous and visceral fatty tissue and obesity, and may consequently have the negative economic effect of reduced productivity (1). Reaching sexual maturity depends on many factors, *e.g.* sufficient production of neuronal agents like kisspeptin-10 (KiSS-10), neurokinin B (NKB) and dynorphin A (Dyn A) by KNDy (kisspeptin, neurokinin B and dynorphin) neurons in the central nervous system. These three neuropeptides play a relevant role in the neuroendocrine regulation of the development and functioning of the reproductive system where they regulate ovulation and fertility (17). As a 10-amino-acid

peptide belonging to the tachykinin family, NKB directly stimulates hypothalamic KNDy neurons, leading to secretion of kisspeptins (13). These are a family of neuropeptides and endogenous ligands of G protein-coupled receptors (GPR54). Kisspeptins binding to their receptor on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the preoptic area (POA) and arcuate nucleus (ARC) in the hypothalamus enhance the pulsatile secretion of GnRH, which results in luteinising hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) secretion in the anterior pituitary gland, mediating the NKB effect (17). In turn, dynorphins, belonging to the family of endogenous opioid peptides produced in the ARC, inhibit prepubertal GnRH secretion and consequently gonadotropin secretion by the anterior pituitary gland (5). The KiSS-1/GPR54

and NKB/neurokinin B receptor (NK3R) systems are key factors in the hormonal regulation of puberty onset. It is known that mutations in the *TAC3* or *TACR3* genes, respectively coding for NKB or NK3R, cause hypogonadotropic hypogonadism in humans because of disturbances in the secretion of gonadotropic hormones from the anterior pituitary gland (21, 27, 30). As shown by Li *et al.* (9), KiSS-10 and senktide (an NK3R agonist) infused into the lateral ventricle during the luteal phase of the ovine oestrous cycle increased the LH pulse frequency and the mean LH levels (9). They also reported that in conditions of minimal GnRH/LH secretion, central NK3R agonist infusion induced LH release, similarly to the response to KiSS-10. Moreover, Goodman *et al.* (6) demonstrated that the ablation of over 90% of KNDy neurons in the ARC of the hypothalamus caused by application of MePhe7-NKB (a selective NK3 receptor agonist) conjugated to saporin resulted in a decrease in the LH pulse amplitude in ovariectomised adult Blackface ewes (6). In addition, the expression of GPR54 in the pituitary gland was found, which proves that a KiSS can act directly at this level, affecting the secretion of tropic hormones (19, 22, 23, 31). Single data indicate that NKB and Dyn A may also be involved in the synthesis and secretion of hormones in the pituitary gland (10, 11, 12, 28). However, to the best of our knowledge, there are no reports on the direct effect of NKB or Dyn A on KiSS secretion from the ovine pituitary gland. Therefore, the aim of this study was to analyse, for the first time, the influence of NKB and Dyn A on KiSS secretion by pituitary cells isolated from pubescent ewes.

## Material and Methods

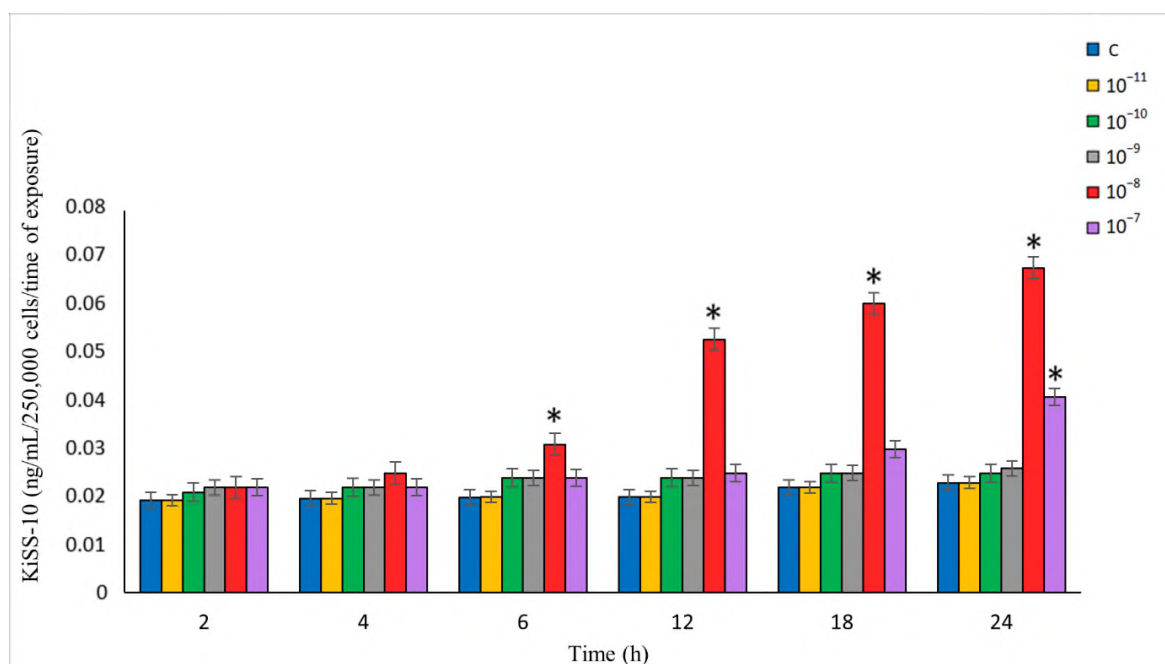
**Experiment design.** The protocol of the experimental design and all procedures were approved by the Local Ethics Committee for Animal Experimentation in Lublin (No. 65/2023). The cell culture was prepared using pituitary glands isolated from 10-month-old ewe lambs of the Polish Lowland sheep, Uhruska variety ( $n = 6$ ; mean body weight:  $39.52 \pm 3.25$  kg), housed at the Professor T. Efnier Small Ruminant Research Station in Bezek (Poland) in the autumn season. The ewes were humanely euthanised by electric shock and exsanguinated at a local slaughter house in accordance with applicable regulations. The pituitary glands were dissected and transported within 1 h to the laboratory at approximately 3–5°C in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 0.59% 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 0.08% glucose, 0.1% bovine serum albumin and gentamicin at 20 µg/mL. The anterior and posterior lobes of the pituitary were separated by blunt dissection. The anterior pituitary tissue was minced and repeatedly enzymatically digested with 0.25% trypsin for 10 min each time at 37°C. After each digestion round, the cells were

washed three times in DMEM and centrifuged at 1,200 rpm for 10 min. After the last centrifugation, the pituitary cells were passed through a 60-µm nylon filter and counted in a Bürker chamber. Cell viability evaluated by 0.4% trypan blue dye exclusion was higher than 96%. The pituitary cells at 250,000 cells/mL were then resuspended in McCoy's 5A medium containing 2.5% foetal calf serum, 10% horse serum, 0.59% HEPES, a mixture of amino acids and vitamins, and gentamicin at 20 µg/mL, and the solution was adjusted to pH 7.4 and seeded in 24-well culture plates in 1 mL aliquots per well. The cells were allowed to attach for 96 h at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere (8, 18, 19, 24) until the start of the experiments. After attachment to the dishes and formation of a monolayer, the pituitary cells were incubated in McCoy's 5A medium without hormones (the control), or with 10<sup>-11</sup>, 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup> or 10<sup>-7</sup> M of NKB or Dyn A. After 2, 4, 6, 12, 18 or 24 h of the experiment, the media were collected and stored at -20°C to determine the cumulative concentration of KiSS-10 by ELISA using species-specific antibodies (KiSS-1 (112–121) Amide/Kisspeptin-10/Metastatin 45–54) Amide EIA (enzyme immunoassay) Kit; Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, USA). The kisspeptin secretion was expressed as the concentration (ng/mL) of the hormone released into the culture medium by 250,000 cells during the particular incubation time.

**Statistical analysis.** The results were calculated using Statistica 13.0 PL (Dell, Round Rock, TX, USA) and expressed as a mean and standard deviation ( $x \pm SD$ ). Comparisons between the control and experimental cultures were performed using analysis of variance and paired *t*-tests. Differences with a P-value  $\leq 0.05$  were considered significant. Pearson linear correlation coefficients were calculated to assess the relationships between the analysed variables: NKB concentration or Dyn A concentration and KiSS-10 secretion.

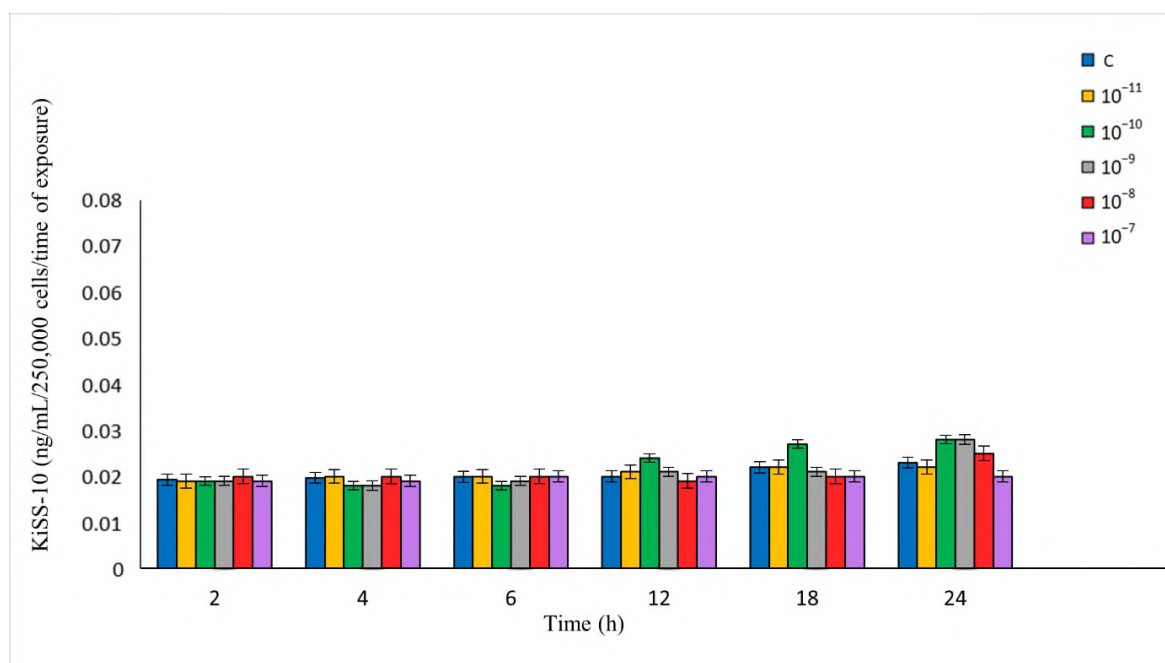
## Results

**Influence of NKB on KiSS-10 secretion by ovine pituitary cells *in vitro*.** The effect of NKB on KiSS-10 secretion was dependent on the time of exposure and the NKB concentration in the culture medium (which ranged over 10<sup>-11</sup>–10<sup>-7</sup> M). The treatment of the cells with 10<sup>-10</sup>–10<sup>-7</sup> M of NKB resulted in elevated KiSS-10 secretion throughout the entire experiment compared to the control. A significant effect of NKB (P-value  $\leq 0.05$ ) on KiSS-10 was found after 6–24 h at the dose of 10<sup>-8</sup> M and after 24 h at 10<sup>-7</sup> M of NKB. The KiSS-10 release reached a maximum after the 24-h exposure of the cells to NKB at the concentration of 10<sup>-8</sup> M. This value was significantly higher (P-value  $\leq 0.05$ ) than in the control and in the other cultures with NKB. However, no effect of NKB at the concentration of 10<sup>-11</sup> M was observed on the secretion of KiSS-10 (Fig. 1).



**Fig. 1.** Influence of neurokinin B on kisspeptin-10 (KiSS-10) secretion from ovine pituitary cells *in vitro*

\* – statistically significant difference (P-value ≤ 0.05) compared to the control



**Fig. 2.** Influence of dynorphin A on kisspeptin-10 (KiSS-10) secretion from ovine pituitary cells *in vitro*

There was no correlation between the concentration of NKB and KiSS-10 secretion from the ovine pituitary cells after 4, 6, 12, 18 or 24 h ( $r = 0.04$ ,  $r = 0.01$ ,  $r = -0.08$ ,  $r = 0.01$  and  $r = 0.23$ , respectively). However, a low positive correlation was found between the NKB concentration over the full range in the experiment and the KiSS-10 secretion after 2 h ( $r = 0.4$ ). In turn, there was a moderate positive correlation between NKB in the range of  $10^{-11}$ – $10^{-8}$  M and KiSS-10 secretion after 2 h ( $r = 0.55$ ), a high positive correlation after 4 h ( $r = 0.89$ ) and a very high positive correlation after 6, 12, 18 and 24 h ( $r = 0.93$ ,  $r = 0.99$ ,  $r = 1.0$  and  $r = 1.0$ , respectively).

**Influence of Dyn A on KiSS-10 secretion by ovine pituitary cells *in vitro*.** There was no significant effect of Dyn A applied in the full concentration range over the whole time of the experiment on the secretion of KiSS-10 by the ovine pituitary cells. However, Dyn A used at  $10^{-10}$  M caused a slight increase in KiSS-10 after 12 and 24 h, and used at  $10^{-9}$ – $10^{-8}$  M, it did so after 24 h, compared to the control and the other cultures with Dyn A (Fig. 2). There was no correlation between the concentration of Dyn A in the range of  $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M and KiSS-10 secretion from the ovine pituitary cells after 2 and 4 h ( $r = -0.16$  and  $r = 0.05$ , respectively). However,

the study showed a low positive correlation between the concentration of Dyn A over the full range in the experiment and KiSS-10 secretion after 6 h ( $r = 0.42$ ), a low negative correlation after 12 and 18 h ( $r = -0.37$  and  $r = -0.43$ , respectively), and a high negative correlation after 24 h ( $r = -0.72$ ).

## Discussion

*In vitro* studies conducted on cells isolated from the anterior pituitary gland extend our understanding of neuroendocrine phenomena in mammals. The endocrine regulation of the hypothalamic–pituitary–ovarian (HPO) axis during mammalian puberty depends in large part on neuronal agents like NKB, KiSS-10 and Dyn A (1, 3, 13, 17). Neurokinin B, KiSS and Dyn A were found in identical subpopulations of neurons located in the ARC of the hypothalamus in many animal species, *e.g.* goats (29), pigs (7), sheep (6) and mice (15). It is also known that through KiSS stimulation, NKB induces GnRH release in the hypothalamus, leading to gonadotropin secretion in sheep (1, 2, 3). The role of NKB on the hypothalamus–pituitary axis in females depends on the endocrine condition. Some studies indicate that senktide, an agonist of the NKB receptor, activates LH release in adult ewes (4, 16) and rats (14). Terasawa *et al.* (26) reported that NKB and KiSS independently activated GnRH release in female rhesus monkeys before puberty, but a collaborative mechanism between these two neuropeptides accelerated the increase in GnRH secretion in pubertal females (26). In turn, the function of Dyn A involves the inhibition of GnRH release, and consequently, of LH secretion (15, 17). While the role of KiSS is better understood, the function of NKB and Dyn A at the pituitary level and their mediation of KiSS secretion at this level have not been thoroughly explored. Studies conducted on fish (female Nile tilapia) showed the effect of NKB on pituitary cell cultures, where the expression of FSH $\beta$  and LH $\beta$  mRNA was notably elevated after treatment with NKB at 10 nM and 1,000 nM (12). In addition, Mizrahi *et al.* (11) proved that an NKB analogue increased LH and FSH mRNA levels in the tilapia pituitary (11). Mijiddorj *et al.* (10) demonstrated that the NKB receptor and the Dyn A receptor were present in the L $\beta$ T2 cell line (luteinising hormone subunit  $\beta$  T-antigen gonadotroph cells) (10). In our experiment, we demonstrated the direct *in vitro* effect of NKB and Dyn A on KiSS-10 secretion by anterior pituitary cells isolated from pubescent ewes. As shown in the present study, the effects of NKB or Dyn A on KiSS-10 secretion by ovine pituitary cells are heterogeneous and depend on the exposure time and NKB or Dyn A concentrations in the culture medium. When used at the concentrations of  $10^{-10}$ – $10^{-7}$  M, NKB increased KiSS-10 secretion throughout the entire experiment, compared to the control. The highest level of KiSS-10 release was recorded after the 24-h exposure of the cells to NKB at the concentration of  $10^{-8}$  M.

However, no effect of NKB on the secretion of KiSS-10 was observed when it was applied at the lowest concentration ( $10^{-11}$  M). These results prove that a higher concentration of NKB contributes to the regulation of KiSS-10 secretion by pituitary cells. In addition, as indicated by our previous findings (25), the exposure of ovine pituitary cells *in vitro* to NKB at the concentration of  $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M resulted in elevated gonadotropin secretion. The highest level of LH secretion was observed after 24-h exposure of the cells to the concentration of  $10^{-8}$  M, and the strongest FSH secretion came after 24-h exposure to  $10^{-7}$  M. To date, the reports on the involvement of NKB in sexual maturation have addressed regulatory mechanisms only at the hypothalamic level. The study conducted by Topaloğlu *et al.* (27) showed that mutations in the NKB coding gene (*TAC3*) and in its receptor coding gene (*TACR3*) cause hypogonadotropic hypogonadism and block pubertal initiation (27). Our new data suggest that by increasing the secretion of kisspeptins and gonadotropins by pituitary cells, NKB may be relevant in activation of the HPO axis during puberty also at the pituitary level. Moreover, our results indicating the positive effect of NKB on the secretion of KiSS-10 and gonadotropins by pituitary cells are the basis for further studies to determine whether, as in the hypothalamus, the effect of NKB on GnRH (and subsequently LH and FSH) secretion may be mediated by kisspeptins. Whether kisspeptins mediate the secretion of these gonadotropins is better known, however, when the effect of Dyn A is considered. In our previous study we observed that Dyn A caused an increase in gonadotropin secretion at all the concentrations used ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M). The LH secretion reached its maximum after 24 h in response to  $10^{-8}$  M, and the highest FSH secretion was recorded after 24-h exposure to the lowest concentration of Dyn A ( $10^{-11}$  M) (25). Our present experiment showed no significant effect of any concentration of Dyn A on KiSS-10 secretion by ovine pituitary cells. Therefore, the effect of Dyn A on gonadotropin secretion appears not to be mediated by kisspeptins.

Unfortunately, it is difficult to compare the present results because of the lack of similar data in the literature on the mutual interactions of NKB and Dyn A at the level of the pituitary gland. A full elucidation of the role of these neuropeptides in KiSS-10 secretion at the pituitary level and the establishment of their impact on neuroendocrine regulation during puberty require further studies.

## Conclusion

The present study provides new data for the novel role of NKB in the endocrine regulation of KiSS-10 secretion from ovine anterior pituitary cells. Neurokinin B, in contrast to Dyn A, can directly affect KiSS-10 secretion from pituitary cells of pubescent ewes in a way dependent on the time of exposure to this neuropeptide

and its concentration in the culture medium. Hence, our results may indicate the potential importance of NKB in the initiation of reproductive activity in ewes and, consequently, in their reaching sexual maturity in the optimal developmental window.

**Conflict of Interests Statement:** The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

**Financial Disclosure Statement:** The authors received no financial support for the research, authorship or publication of this article.

**Animal Rights Statement:** The protocol of the experimental design and all procedures were approved by the Local Ethics Committee for Animal Experimentation in Lublin (No. 65/2023).

**CRedit Authorship Contribution Statement:** **Natalia Szysiak:** research concept and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, writing the article, critical revision of the article, final approval of the article. **Urszula Kosior-Korzecka:** research concept and design, data analysis and interpretation, writing the article, critical revision of the article, final approval of the article. **Monika Greguła-Kania:** collection and assembly of data, data analysis and interpretation. **Krzysztof Patkowski:** collection and assembly of data. **Mateusz Fila:** writing the article, critical revision of the article. **Andrzej Junkuszew:** critical revision of the article.

## References

- Aerts E.G., Harlow K., Griesgraber M.J., Bowdridge E.C., Hardy S.L., Nestor C.C., Hileman S.M.: Kisspeptin, Neurokinin B, and Dynorphin Expression during Pubertal Development in Female Sheep. *Biology* 2021, 10, 988, doi: 10.3390/biology10100988.
- Backholer K., Smith J.T., Rao A., Pereira A., Iqbal J., Ogawa S., Li Q., Clarke I.J.: Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology* 2010, 151, 2233–2243, doi: 10.1210/en.2009-1190.
- Bedenbaugh M.N., Bowdridge E., Hileman S.M.: Role of neurokinin B in ovine puberty. *Domest Anim Endocrinol* 2020, 73, 106442, doi: 10.1016/j.domaniend.2020.106442.
- Billings H.J., Connors J.M., Altman S.N., Hileman S.M., Holaskova I., Lehman M.N., McManus C.J., Nestor C.C., Jacobs B.H., Goodman R.L.: Neurokinin B acts *via* the neurokinin-3 receptor in the retrochiasmatic area to stimulate luteinizing hormone secretion in sheep. *Endocrinology* 2010, 151, 3836–3846, doi: 10.1210/en.2010-0174.
- Dees W.L., Hiney J.K., Srivastava V.K.: Regulation of prepubertal dynorphin secretion in the medial basal hypothalamus of the female rat. *J Neuroendocrinol* 2019, 31, e12810, doi: 10.1111/jne.12810.
- Goodman R.L., Moore A.M., Onslow K., Hileman S.M., Hardy S.L., Bowdridge E.C., Walters B.A., Agus S., Griesgraber M.J., Aerts E.G., Lehman M.N., Coolen L.M.: Lesions of KNDy and Kiss1R Neurons in the Arcuate Nucleus Produce Different Effects on LH Pulse Patterns in Female Sheep. *Endocrinology* 2023, 164, bqad148, doi: 10.1210/endo/bqad148.
- Harlow K., Renwick A.N., Shuping S.L., Sommer J.R., Lents C.A., Knauer M.T., Nestor C.C.: Evidence that pubertal status impacts kisspeptin/neurokinin B/dynorphin neurons in the gilt. *Biol Reprod* 2021, 105, 1533–1544, doi: 10.1093/biolre/iaob189.
- Kosior-Korzecka U., Radwańska P., Witkowska K., Patkowski K., Wójcik M., Wessely-Szponder J., Bobowiec R.: Kisspeptin-10 and peptide 234 modulate GnRH-induced follicle-stimulating hormone secretion from anterior pituitary cells of prepubertal lambs *in vitro*. *Med Weter* 2014, 70, 599–603.
- Li Q., Millar R.P., Clarke I.J., Smith J.T.: Evidence that Neurokinin B Controls Basal Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion but Is Not Critical for Estrogen-Positive Feedback in Sheep. *Neuroendocrinology* 2015, 101, 161–174, doi: 10.1159/000377702.
- Mijiddorj T., Kanasaki H., Purwana I.N., Oride A., Sukhbaatar U., Miyazaki K.: Role of Neurokinin B and Dynorphin A in pituitary gonadotroph and somatolactotroph cell lines. *Endocrine J* 2012, 59, 631–640, doi: 10.1507/endocrj.ej11-0401.
- Mizrahi N., Gilon C., Atre I., Ogawa S., Parhar I.S., Levavi-Sivan B.: Deciphering Direct and Indirect Effects of Neurokinin B and GnRH in the Brain-Pituitary Axis of Tilapia. *Front Endocrinol* 2019, 10, 469, doi: 10.3389/fendo.2019.00469.
- Mun S.H., Oh H.J., Kwon J.Y.: Response of Pituitary Cells and Tissues to Neurokinin B and F in the Nile tilapia. *Dev Reprod* 2022, 26, 13–21, doi: 10.12717/DR.2022.26.1.13.
- Navarro V.M.: Interactions Between Kisspeptins and Neurokinin B. *Adv Exp Med Biol* 2013, 784, 325–347, doi: 10.1007/978-1-4614-6199-9\_15.
- Navarro V.M., Castellano J.M., McConkey S.M., Pineda R., Ruiz-Pino F., Pinilla L., Clifton D.K., Tena-Sempere M., Steiner R.A.: Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010, 300, E202–E210, doi: 10.1152/ajpendo.00517.2010.
- Navarro V.M., Gottsch M.L., Chavkin C., Okamura H., Clifton D.K., Steiner R.A.: Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* 2009, 29, 11859–11866, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1569-09.2009.
- Nestor C.C., Briscoe A.M.S., Davis S.M., Valent M., Goodman R.L., Hileman S.M.: Evidence of a role for kisspeptin and neurokinin B in puberty of female sheep. *Endocrinology* 2012, 153, 2756–2765, doi: 10.1210/en.2011-2009.
- Pinilla L., Aguilar E., Dieguez C., Millar R.P., Tena-Sempere M.: Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 2012, 92, 1235–1316, doi: 10.1152/physrev.00037.2010.
- Radwańska P., Kosior-Korzecka U.: Effect of leptin on thyroid-stimulating hormone secretion and nitric oxide release from pituitary cells of ewe lambs *in vitro*. *J Physiol Pharmacol* 2014, 65, 145–151.
- Radwańska P., Kosior-Korzecka U.: Relationships between leptin, KiSS-1/GPR54 expression and TSH secretion from pituitary cells of pubertal ewes *in vitro*. *Res Vet Sci* 2016, 105, 180–187, doi: 10.1016/j.rvsc.2016.02.014.
- Radwańska P., Kosior-Korzecka U.: Relationships between leptin, the KiSS-1/GPR54 system and thyrotropic axis activity in ewe lambs predisposed to the delayed puberty. *Small Rumin Res* 2016, 144, 6–16, doi: 10.1016/j.smallrumres.2016.07.019.
- Rance N.E., Krajewski S.J., Smith M.A., Cholanian M., Dacks P.A.: Neurokinin B and the hypothalamic regulation of reproduction. *Brain Res* 2010, 1364, 116–128, doi: 10.1016/j.brainres.2010.08.059.
- Richard N., Corvaisier S., Camacho E., Kottler M.L.: KiSS-1 and GPR54 at the pituitary level: Overview and recent insights. *Peptides* 2009, 30, 123–129, doi: 10.1016/j.peptides.2008.09.015.
- 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, 360–365, doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.05.016.
- Szysiak N., Kosior-Korzecka U., Longo V., Cavallero A., Szymczak B., Furmańczyk-Gnyń A., Nguyen Ngoc D.,

- Nowakiewicz A., Puzio I., Surówka B., Minakow N.: Effect of saturated fatty acid on GnRH-induced gonadotropin secretion from anterior pituitary cells of pubescent ewe lambs. *Med Weter* 2023, 79, 633–636, doi: 10.21521/mw.6837.
25. Szysiak N., Kosior-Korzecka U., Longo V., Patkowski K., Greguła-Kania M., Nowakiewicz A., Bochniarz M., Junkuszew A.: Influence of neurokinin B, dynorphin A and kisspeptin-10 on *in vitro* gonadotropin secretion by anterior pituitary cells isolated from pubescent ewes. *J Vet Res* 2025, 69, 121–129, doi: 10.2478/jvetres-2025-0003.
26. Terasawa E., James G.P., Seminara S.B., Keen K.L.: Role of kisspeptin and neurokinin B in puberty in female non-human primates. *Front Endocrinol* 2018, 9, 148, doi: 10.3389/fendo.2018.00148.
27. Topaloğlu K., Reimann F., Guclu M., Yalin A.S., Kotan L.D., Porter K.M., Serin A., Mungan N.O., Cook J.R., Imamoğlu S., Akalin N.S., Yuksel B., O’Rahilly S., Semple R.K.: *TAC3* and *TACR3* mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 2009, 41, 354–358, doi: 10.1038/ng.306.
28. Van Vugt D.A., Meites J.: Influence of endogenous opiates on anterior pituitary function. *Fed Proc* 1980, 39, 2533–2538.
29. Wakabayashi Y., Nakada T., Murata K., Ohkura S., Mogi K., Navarro V.M., Clifton D.K., Mori Y., Tsukamura H., Maeda K.I., Steiner R.A., Okamura H.: Neurokinin B and Dynorphin A in Kisspeptin Neurons of the Arcuate Nucleus Participate in Generation of Periodic Oscillation of Neural Activity Driving Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion in the Goat. *J Neurosci* 2010, 30, 3124–3132, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5848-09.2010.
30. Young J., Bouligand J., Francou B., Raffin-Sanson M.L., Gaillez S., Jeanpierre M., Grynberg M., Kamenicky P., Chanson P., Brailly-Tabard S., Guiochon-Mantel A.: *TAC3* and *TACR3* defects cause hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2010, 95, 2287–2295, doi: 10.1210/jc.2009-2600.
31. Żmijewska A., Czelejewska W., Drzewiecka E.M., Franczak A.: Effect of kisspeptin (KISS) and RFamide-related peptide-3 (RFRP-3) on the synthesis and secretion of FSH *in vitro* by pituitary cells in pigs. *Theriogenology* 2021, 171, 72–84, doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.05.010.

# Relationship between kisspeptin-10, neurokinin B and dynorphin A in the course of normal and delayed puberty in ewes

Natalia Szysiak<sup>1</sup>, Urszula Kosior-Korzecka<sup>1</sup>✉, Monika Greguła-Kania<sup>2</sup>, Krzysztof Patkowski<sup>2</sup>, Mateusz Fila<sup>1</sup>, Andrzej Junkuszew<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sub-Department of Pathophysiology, Department of Preclinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, 20-033, Lublin, Poland

<sup>2</sup>Department of Animal Breeding and Agricultural Consulting, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, 20-950, Lublin, Poland  
urszula.korzecka@up.edu.pl

Received: November 4, 2025

Accepted: February 23, 2026

## Abstract

**Introduction:** Kisspeptin (KiSS), neurokinin B (NKB) and dynorphin A (Dyn A) participate in the neuroendocrine regulation of reproductive system development and functioning; however, their roles in the onset of sexual maturity and pathomechanism of delayed puberty have not yet been fully elucidated. The aim of the study was to determine changes in the kisspeptin-10 (KiSS-10), NKB and Dyn A concentration in blood plasma collected from ewe lambs during puberty in relation to the first ovulation time, and to examine the relationship between these neuropeptides. **Material and Methods:** Twenty-four ewe lambs were divided into two groups: from single (S) pregnancies and from twin (T) pregnancies. To determine the KiSS-10, NKB and Dyn A concentration with ELISA, blood was collected from all sheep at 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 months of age. Singletons and twins had their first ovulations at 8 and 10 months of age, respectively. **Results:** Changes in the KiSS-10 and NKB concentrations were positively correlated with age in both S ( $r = 0.86$ ) and T ewes ( $r = 0.89$ ). A negative correlation was found between KiSS-10 and Dyn A ( $r = -0.55$  and  $-0.98$ , for S and T, respectively) and between NKB and Dyn A ( $r = -0.89$  and  $-0.94$ , for S and T, respectively). **Conclusion:** The initiation of ovarian activity is associated with concurrent increases in plasma KiSS-10 and NKB concentrations with age and reduced Dyn A concentrations in both groups. Our results show that these neuropeptides may regulate the timing of reproductive activity onset in sheep.

**Keywords:** dynorphin A, ewe, kisspeptin, longitudinal study, neurokinin B, puberty disorders.

## Introduction

The pathomechanism of delayed puberty due to various aetiological factors has not been definitively elucidated. A delay in ewe puberty, which normally occurs in the first year of life, prevents reproductive activity at the right time and thus reduces reproductive performance. Evidence from other mammalian species point to associations with hormonal and metabolic disorders (1, 5, 24, 28). One of the causes of delayed puberty in lambs is low birth weight. It is observed in ewes from twin pregnancies and the offspring of mothers with a high body weight (9, 22, 23). Furthermore, achieving sexual maturity *via* activation of the hypothalamic–pituitary–ovarian (HPO) axis depends on the adequacy of fat reserves contained in subcutaneous

and visceral adipose tissue as well as on key metabolic signals, *e.g.* an adequate plasma leptin concentration (34). Leptin, a peptide released from white adipose tissue and binding to the long-form (OB-Rb) and short-form (OB-Ra) obesity receptors in the hypothalamus, mediates the activation of GnRH neurons. The activation of these neurons induces gonadoliberein release, leading to increased LH and FSH secretion by the anterior pituitary gland (25, 34). In the hypothalamus, this effect of leptin is mediated by neuronal agents, such as kisspeptins (KiSSs) (2, 8, 17).

KiSSs, belonging to the arginine-phenylalanine amide (RF-amide) peptide family, along with other neuropeptides such as neurokinin B (NKB) from the tachykinin family, and dynorphin (Dyn), representing the family of endogenous opioid peptides, are produced

by KNDy (kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin) neurons in the arcuate nucleus (ARC) of the hypothalamus (15). A key role is played by KiSSs, NKB and Dyns in the endocrine regulation of the reproductive system during puberty. The function of NKB in puberty in sheep is not direct stimulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons, because these neurons lack the neurokinin 3 receptor for NKB (NK3R) which ARC KNDy neurons have. It is believed that stimulation of GnRH/LH secretion by NKB occurs indirectly *via* activation of the ARC KNDy neurons, which leads to increased KiSS production (3, 14, 20). A kisspeptin interacts with its receptor on GnRH neurons located in the preoptic area (POA) and the ARC of the hypothalamus. This interaction enables the pulsatile release of GnRH, which subsequently induces the anterior pituitary to secrete gonadotropins (15). It is known that the lack of NKB and NK3R causes hypogonadotropic hypogonadism and failure to mature sexually in humans (29). As reported by Billings *et al.* (4), intraventricular application of an NKB analogue (senktide) in mature ewes caused surge-like secretion of LH. Additionally, intravenous application of KiSS-10 in concentrations of 0.5, 1 and 2 mg increased LH secretion in prepubertal female Small-tail Han Sheep (31). The role of Dyns, in turn, in puberty is much less well explained than the role of KiSS or NKB. It is known that the receptor for Dyns, *i.e.* the  $\kappa$  opioid receptor (KOR), is located in KNDy and GnRH neurons in many animal species, including sheep (33). In studies conducted by Lopez *et al.* (12), it was shown that a Dyn plays an important role in inhibiting the release of GnRH, which results in the inhibition of pulsatile LH secretion in prepubertal ewe lambs. However, previous research demonstrated that Dyn A as well as KiSS-10 and NKB can directly stimulate gonadotropin secretion from ovine anterior pituitary cells *in vitro* (26). The aim of the present study was to determine the changes in the concentration of KiSS-10, NKB and Dyn A in blood plasma collected from ewe lambs during puberty in relation to the time of the first ovulation. The experiment included sheep coming from single and twin pregnancies, the latter being predisposed to delayed puberty.

## Material and Methods

**Experimental design.** The protocol of the experimental design and all procedures were approved by the Local Ethics Committee for Animal Experimentation in Lublin (Licence No. 65/2023). Twenty-four female ewe lambs of the Polish Uhruska breed housed at the Didactic-Experimental Station of Sheep and Goat Breeding in Bezek were used in the study. The first group consisted of lambs from single pregnancies ( $n = 13$ ), and the second group consisted of lambs from twin pregnancies and thus predisposed to delayed puberty ( $n = 11$ ). Weight gain was monitored in

all sheep from birth to the age of 10 months. The study was carried out from May to November under natural light and in normal temperature. The animals were kept in the indoor system from January to mid-May and from September to December, and in the indoor-outdoor system from mid-May to early September in conditions that ensured freedom of movement. After weaning, the sheep were fed once a day with complete age-appropriate farm feed for sheep comprised of hay, haylage and concentrate and had unlimited access to water. The animals were kept in identical nutritional and environmental conditions to those in a commercial herd and their nutritional needs were met according to the French Institut National de la Recherche Agronomique feeding system (according to their physiological status). The lambs lived in a common sheepfold with their mothers from birth to weaning and were only selected for the experiment when they reached the age of 4 months. After being divided into the two experimental groups, they were transferred to another flock 10 days before blood collection began in order to adapt to the new environment. The sheep were weighed using an electronic scale every two weeks from birth to 10 months of age, and weight gain was recorded. From 6 to 10 months, the activity of the ewes' ovaries was monitored laparoscopically for the presence, number and diameter of follicles or the presence of corpora lutea. To determine the concentration of NKB, Dyn A and KiSS-10 after the ewes had reached 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 months of age, 8 mL of blood was collected from the external jugular vein with the use of intravenous cannulas every 15 min for 2 h. After the procedure, the samples were centrifuged for 20 min at 1,000 rpm and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until testing. Plasma NKB, Dyn A and KiSS-10 concentrations were analysed by ELISA using species-specific antibodies in a Sheep NKB ELISA Kit and Sheep Dyn ELISA Kit (both from Sunred Biological Technology, Shanghai, China) and a KiSS-1 (112–121) Amide/Kisspeptin10/Metastin (45–54) Amide EIA (enzyme immunoassay) Kit (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, USA) (18).

**Statistical analysis.** The results were calculated using Statistica 13.3 PL (TIBCO, Palo Alto, CA, USA) and expressed as a mean and standard deviation ( $\bar{x} \pm \text{S.D.}$ ). Comparisons between the parameters of ewe lambs coming from single pregnancies and those from twin pregnancies were performed using the analysis of variance and paired *t*-tests. Differences with a probability of  $P \leq 0.05$  were considered significant. Pearson linear correlation coefficients were calculated to assess the relationships between the analysed variables, namely NKB, KiSS-10 and Dyn A secretion.

## Results

**Activity of ovaries.** The singleton ewes ovulated for the first time at 8 months of age. This was about 7–8 weeks earlier than the twin ewes, in which the first

ovulations were observed at 10 months of age. The first ovulation was ascertained from the formation of the first corpora lutea.

**Changes in body weight of singleton and twin ewes.** The mean body weight of ewes coming from single pregnancies was higher than the weight of ewes from twin pregnancies during the whole experimental period (Table 1). In both singletons and twins, it reached the highest value in the 10<sup>th</sup> month. The highest percentage difference in the mean body weight between the groups was observed at birth, and this difference decreased from birth to the ninth month, when it was the lowest.

**Concentration of kisspeptin-10 in blood plasma.** The KiSS-10 concentration in blood plasma was dependent on the month of life of the ewes (Fig. 1). In S ewes, the KiSS-10 levels increased until the eighth month, with a significant ( $P$ -value  $\leq 0.05$ ) rise from the seventh month. This maximal value was significantly higher ( $P$ -value  $\leq 0.05$ ) than those in the period from the fourth to seventh month. This was related to the onset of ovarian activity in this group. In T ewes, a continuous increase in the KiSS-10 levels was observed throughout the experimental period. The highest mean plasma concentration of KiSS-10 in multiple-birth ewes was confirmed after the end of the 10<sup>th</sup> month, but this concentration (95.8 ng/L) barely exceeded the concentration in the singletons at the end of the 8<sup>th</sup> month (95.28 ng/L). This correlated with the initiation of ovarian activity, as it did for the singletons. A positive relationship was shown between the KiSS-10 concentration and the age ( $r = 0.84$  and  $r = 0.99$  for S and T, respectively) of the ewes. There was a significant ( $P$ -value  $\leq 0.05$ ) difference in plasma KiSS-10 concentrations between the groups after the 8<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> months of life, associated with the negative correlation noted between concentration and age for S animals in this period (Fig. 1).

**Concentration of neurokinin B in blood plasma.** As it was in the case of KiSS-10, the plasma NKB concentration also generally trended upwards with the month of life (Fig. 2). In the singletons, the concentrations of this neuropeptide increased from the fourth to eighth months. The month-eight value for this group was significantly higher ( $P$ -value  $\leq 0.05$ ) than the values for the other months and was 384.19 ng/L. In the twins, increases in the plasma level of NKB were also observed from the fourth to ninth months, with the maximum of 364.70 ng/L coming in the ninth month of life. Up to the end of month eight, the NKB level was

higher in S ewe lambs than in T animals. Only in the 9<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> months was an inverse relationship observed. The times of the highest NKB concentrations in blood plasma correlated with the initiation of ovarian activity in both groups. A positive correlation was shown between the changes in the plasma NKB concentration and age for all ewes (between the fourth and eighth months of life) ( $r = 0.79$ ,  $P \leq 0.05$ ). There was a positive relationship between the NKB concentration and the age ( $r = 0.60$  and  $r = 0.87$  for S and T, respectively) of the ewes. There was a significant ( $P \leq 0.05$ ) difference in plasma NKB between the groups after the completion of the eighth month of life.

**Concentration of dynorphin A in blood plasma.** There was an opposite relationship between the Dyn A concentration and ewe lamb age to that noted for KiSS-10 and NKB (Fig. 3). The highest Dyn A concentrations were observed in the fourth and fifth months in both the singletons and the twins. In S group animals, a significant decrease ( $P \leq 0.05$ ) was observed between the fifth and sixth month, and the lowest levels were recorded in the seventh and eighth months of life. In T ewes, the mean Dyn A concentration decreased much more slowly, reaching the lowest value in the ninth month. Contrary to the KiSS-10 and NKB concentrations, those of Dyn A were lower in group S than in group T between the fourth and eighth months. Only in the 9<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> months were the S Dyn A concentrations higher than the T ones, and in the 10<sup>th</sup> month they regained their 4<sup>th</sup>- and 5<sup>th</sup>-month levels. There was an inverse relationship between the Dyn A concentration and the age ( $r = -0.26$  and  $r = -0.97$  for S and T, respectively) of the ewes. No statistically significant differences were found between S and T concentrations in particular months of life. There was also no significant relationship between the changes in the plasma Dyn A concentration in S and T with age ( $r = 0.30$ ).

**Relationship between KiSS-10, NKB and Dyn A concentrations in ewes coming from single and twin pregnancies.** An overall positive correlation was found between the changes in the KiSS-10 and NKB plasma concentrations with age (between the 4<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> months of life) in both S and T (Table 2). However, an overall negative correlation was shown between KiSS-10 and Dyn A and between NKB and Dyn A over the seven studied months in all ewes.

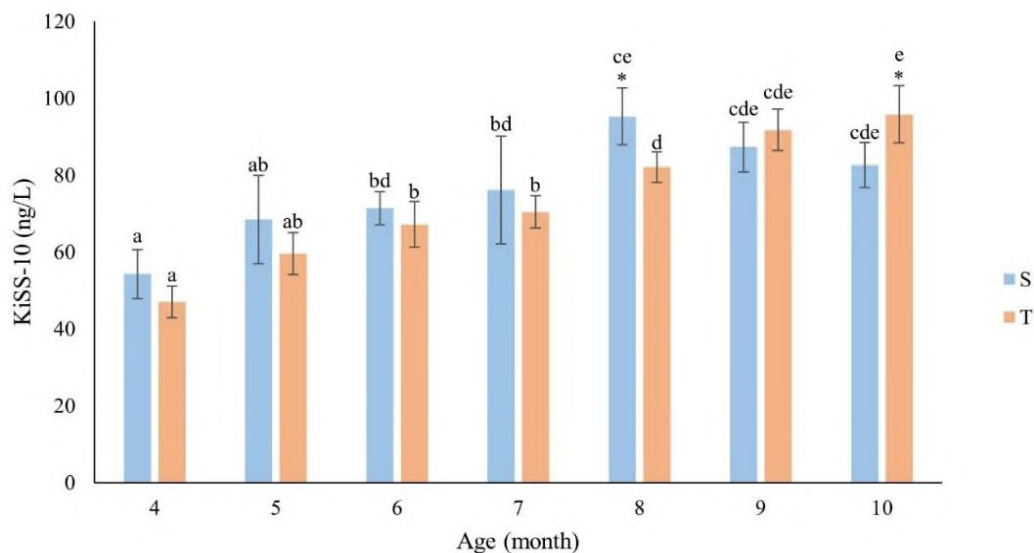
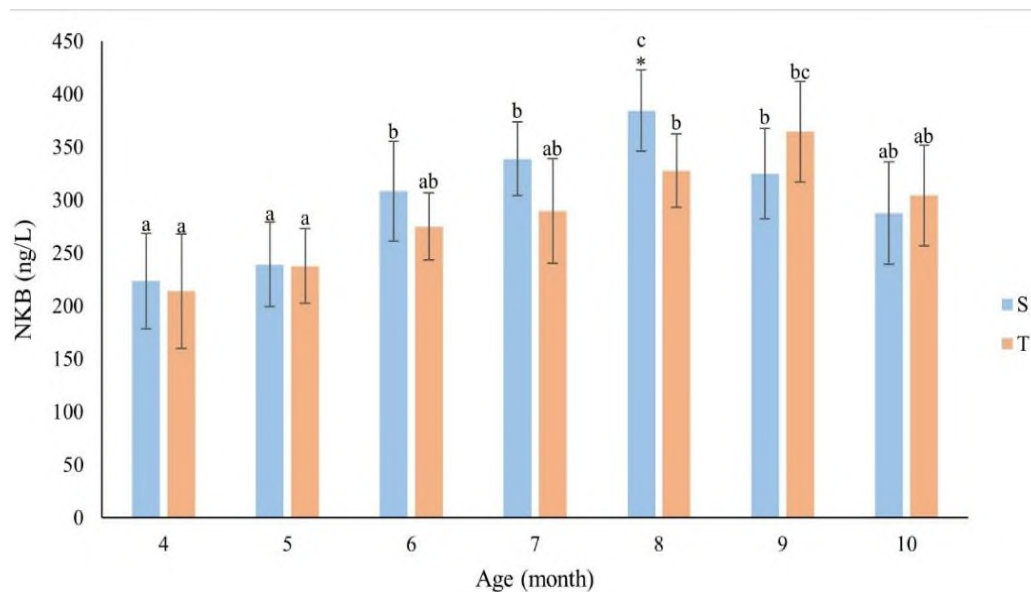
A graphical summary of changes in the blood plasma concentrations of individual neuropeptides in the singletons and the twins is presented in Figs 4 and 5.

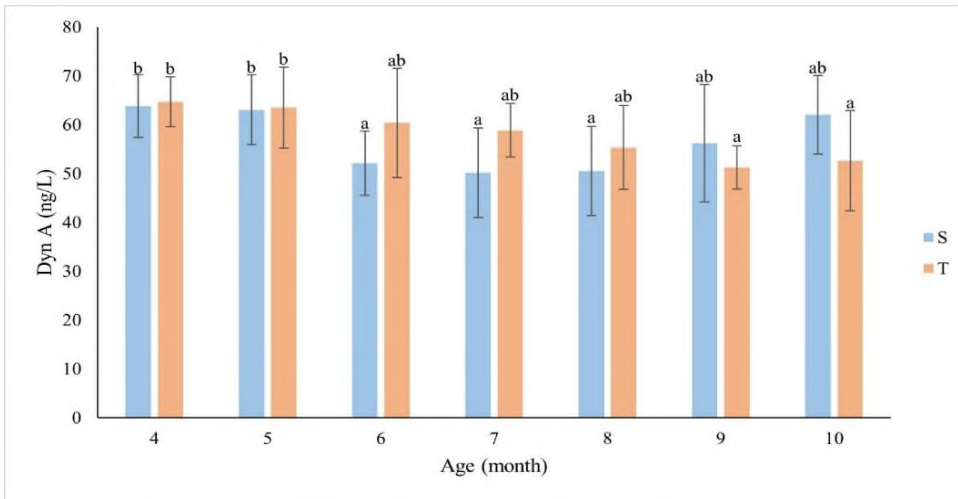
**Table 1.** Mean body weight of singleton and twin Polish Uhruska ewes and differences in that weight at age points up to the 10<sup>th</sup> month

|                                    |            | Age (months)   |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
|------------------------------------|------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                                    |            | 0              | 4               | 5               | 6               | 7               | 8               | 9               | 10              |
| Mean body weight $\pm$ SD (kg)     | Singletons | 5.60 $\pm$ 0.6 | 32.16 $\pm$ 4.6 | 34.69 $\pm$ 4.1 | 35.26 $\pm$ 4.2 | 37.57 $\pm$ 4.2 | 37.96 $\pm$ 3.9 | 39.27 $\pm$ 3.8 | 40.96 $\pm$ 3.9 |
|                                    | Twins      | 4.70 $\pm$ 0.5 | 29.51 $\pm$ 5.1 | 31.86 $\pm$ 3.2 | 33.11 $\pm$ 2.9 | 35.97 $\pm$ 2.9 | 36.68 $\pm$ 3.1 | 38.23 $\pm$ 2.7 | 39.15 $\pm$ 2.6 |
| Difference in mean body weight (%) |            | 16.07          | 8.24            | 8.16            | 6.10            | 4.26            | 3.37            | 2.65            | 4.42            |

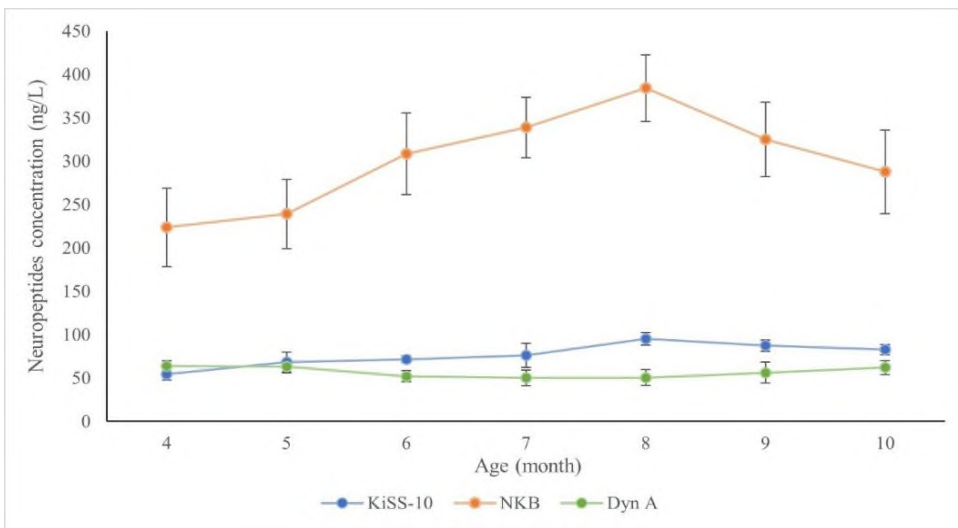
**Table 2.** Pearson correlation coefficients ( $r$ ) ( $P \leq 0.05$ ) between plasma concentrations of KiSS-10, NKB and Dyn A in singleton and twin Polish Uhruska ewes between their 4<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> months of life

|            |         | KiSS-10 | NKB   | Dyn A |
|------------|---------|---------|-------|-------|
| Singletons | KiSS-10 | –       | 0.86  | –0.55 |
|            | NKB     | 0.86    | –     | –0.89 |
|            | DynA    | –0.55   | –0.89 | –     |
| Twins      | KiSS-10 | –       | 0.89  | –0.98 |
|            | NKB     | 0.89    | –     | –0.94 |
|            | DynA    | –0.98   | –0.94 | –     |

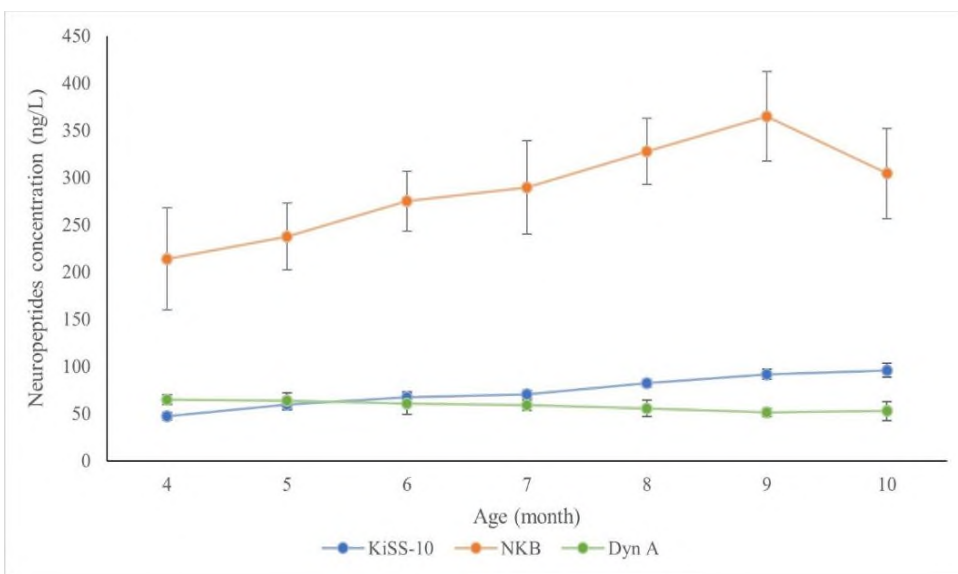
**Fig. 1.** Concentration of kisspeptin-10 (KiSS-10) (ng/L) by month of life of singleton (S – n = 13) and twin (T – n = 11) ewes. The values presented in the figure are mean ( $\pm$ SD) concentrations in the plasma collected monthly every 15 min for 2 h. \* – statistically significant difference between S and T ( $P$ -value  $\leq 0.05$ ); a, b, c, d and e – mean values in a particular month marked with different letters differ significantly ( $P$ -value  $\leq 0.05$ )**Fig. 2.** Concentration of neurokinin B (NKB) (ng/L) by month of life of singleton (S – n = 13) and twin (T – n = 11) ewes. The values presented in the figure are mean ( $\pm$ SD) concentrations in plasma collected monthly every 15 min for 2 h. \* – statistically significant difference between S and T ( $P$ -value  $\leq 0.05$ ); a, b, c – mean values in a particular month marked with different letters differ significantly ( $P$ -value  $\leq 0.05$ )



**Fig. 3.** Concentration of dynorphin A (Dyn A) (ng/L) by month of life of singleton (S – n = 13) and twin (T – n = 11) ewes. The values presented in the figure are mean ( $\pm$ SD) concentrations in the plasma collected monthly every 15 min for 2 h. a, b – mean values obtained in a particular month marked with different letters differ significantly (P-value  $\leq$  0.05)



**Fig. 4.** Changes in plasma kisspeptin-10 (KiSS-10), neurokinin B (NKB) and dynorphin A (Dyn A) concentrations in singleton Polish Uhruska ewes from the 4<sup>th</sup> to 10<sup>th</sup> month of life



**Fig. 5.** Changes in plasma kisspeptin-10 (KiSS-10), neurokinin B (NKB) and dynorphin A (Dyn A) concentrations in twin Polish Uhruska ewes from the 4<sup>th</sup> to 10<sup>th</sup> month of life

## Discussion

Puberty is a major multifactorial phenomenon that involves neuroendocrinological changes leading to the onset of sexual maturity in animals and humans. A key step in initiating this process is an increase in pulsatile secretion of GnRH and gonadotropins that promotes the maturation of ovarian follicles, leading to elevated oestrogen levels that initiate the GnRH and LH surge resulting in the occurrence of the first ovulation. The onset of puberty in sheep can be delayed by genetic and nutritional factors, environmental conditions and hormonal and metabolic regulation (1, 5, 24, 28). A low birth weight is one of the factors contributing to delayed puberty in lambs, particularly in those born from twin pregnancies or to ewes with a high body weight (9, 22, 23). In general, ewes reach puberty once they attain a critical body weight and a metabolic condition that enables the hypothalamic–pituitary–gonadal (HPG) axis to become fully functional. Any disturbance in these processes can interfere with the normal timing of sexual maturation and delay the onset of reproductive function. The specific neural processes responsible for the rise in GnRH and secretion of gonadotropins at the onset of puberty are not fully elucidated. However, it is known that three neuropeptides seem to play a key role in this process: KiSS, NKB and Dyn produced by KNDy neurons in the ARC of the hypothalamus (30) and the anterior pituitary (27).

The study of anterior pituitary cells collected from pubescent ewes noted their LH and FSH secretion to be potentiated by KiSS-10 *in vitro* (27). This suggests the potential role of KiSS in gonadotropin secretion not only *via* mechanisms in the hypothalamus but also directly at the pituitary level. The hypothalamic contribution has been extensively documented. In sheep, the *KISS1* gene's expression in the ARC has been shown to increase significantly in the period preceding the first ovulation (21). In addition, intravenous administration of kisspeptin to prepubertal ewe lambs increased the LH pulse frequency, indicating its ability to activate the reproductive axis despite the immaturity of the neuroendocrine system (21). The importance of kisspeptin has also been clearly confirmed in studies in other species. Mice with knocked out *KISS1* or *GPR54* (the gene encoding the orphan G protein-related membrane receptors for KiSS) did not enter puberty and developed permanent hypogonadism (10). In humans, mutations in the *GPR54* gene cause congenital hypogonadotropic hypogonadism, leading to delayed or completely suppressed puberty (6). In primates such as *Macaca mulatta*, KiSS-10 administration also activated pulsatile GnRH and LH secretion, indicating that the mechanism of action of this neuropeptide is conserved among mammals (16). Studies conducted in juvenile monkeys showed that repeated intravenous administration of KiSS-10 led to premature GnRH secretion, which in turn initiated sexual maturation. All these observations support the idea that KiSS-10 plays

a primary role in the regulation of the HPG axis, and its deficiency or any disruption of the *KISS1/GPR54* signalling pathway may be one of the key pathogenic links in cases of delayed puberty (16, 19). In the present study, we have shown that the plasma KiSS-10 levels in ewes coming from single pregnancies increased progressively from the fourth to the eighth months of life, reaching the highest level in the study period in the eighth month. In contrast, the KiSS-10 concentrations rose in the ewes from multiple pregnancies throughout the study. The highest plasma KiSS-10 concentration in this group was recorded after the 10<sup>th</sup> month. These results correlated with the initiation of ovarian activity, which was monitored laparoscopically in both groups. The later peak of the KiSS-10 level in the ewes coming from twin pregnancies could be related to delayed puberty; however, precise determination of the time and mechanism of ovine achievement of sexual maturity will require investigation of GnRH/LH pulses in further research studies. As reported by Yang *et al.* (35), higher average plasma kisspeptin levels were observed in a group of girls with idiopathic central precocious puberty than in a group with simple premature thelarche and the control group. In summary, plasma KiSS levels increase at the onset of puberty, which suggests that this neuropeptide may serve as a marker to assess the effectiveness of treatment for precocious puberty.

Neurokinin B can stimulate GnRH secretion *via* the NK3R receptor. Studies using the NK3R agonist senktide in prepubertal lambs have shown an increase in LH release, confirming the functional role of NKB in modulating GnRH activity even before sexual maturity (14). Also, studies in adult female sheep have shown that activation of the NK3R receptor by this agonist stimulates LH secretion, indicating that NKB plays an important role in the proper functioning of the HPG axis (4). Importantly, NK3R receptors are not present on GnRH neurons themselves but are abundantly expressed in hypothalamic regions, such as the ARC, POA and particularly the retrochiasmatic area. The stimulatory effect of NKB on GnRH secretion is thus mediated indirectly, most likely through KNDy neurons located in the ARC. These neurons co-express KiSS and NKB, which are essential for the generation of pulsatile GnRH release (4). In our current study, we have demonstrated that the plasma concentration of NKB, similarly to that of KiSS-10, was dependent on the month of age. In the singletons, the NKB levels gradually increased between the fourth and eighth months of life, with the highest concentration in the whole study period observed in the last of these months. In the twins, comparable rises in plasma NKB levels were noted from the fourth to the ninth months, reaching the mean highest level during the entire observed period in the ninth month of life. The later highest secretion of NKB by the twins may be associated with the delayed puberty in this group. In addition to these hypothalamic mechanisms, NKB also exerts direct effects at the pituitary level. In our previous *in vitro* study, NKB caused an increase in KiSS-10

secretion by anterior pituitary cells collected from pubescent ewes (26). This suggests a potential direct role of NKB in the secretion of KiSS-10 at the pituitary level. We have also shown that the *in vitro* exposure of ovine pituitary cells to NKB led to an increase in gonadotropin secretion (27). Therefore, the increase in NKB observed at the onset of puberty may be due not only to regulatory mechanisms in the hypothalamus but also to mechanisms related to the pituitary gland.

Available data indicate that Dyn A acts as an inhibitor on KNDy neurons *via* the KOR, reducing the frequency of GnRH pulses and, consequently, decreasing gonadotropin secretion (15). Weems *et al.* (32) provided functional evidence for the involvement of dynorphin in the termination of the GnRH pulse in sheep. In addition, studies conducted in prepubertal Suffolk sheep indicated the potential role of Dyn A in delaying puberty by inhibiting the pulsatile secretion of LH. Central administration of norbinaltorphimine (a KOR antagonist) increased LH secretion in ovariectomised prepubertal Suffolk ewe lambs treated with 17 $\beta$ -oestradiol, but not in the same sheep after reaching puberty (12). Studies conducted in other animal species showed that dynorphin inhibited pulsatile LH secretion: in prepubertal female Wistar-Imamichi rats, the neuropeptide delayed puberty, and chronic intraperitoneal administration of norbinaltorphimine resulted in an increased LH pulse frequency *via* attenuation of KOR signalling in KNDy neurons in the ARC (13). As shown by Harlow *et al.* (7), the number of ARC cells expressing dynorphin mRNA was lower in postpubertal gilts than in the prepubertal period. However, studies conducted on Corriedale ewes showed that the quantity of ARC cells expressing dynorphin mRNA was higher during the postpubertal luteal phase (11). The results of our current study showed that the level of Dyn A in blood plasma reached the lowest value in the seventh month of life in ewes coming from single pregnancies and in the ninth month of life in the case of sheep coming from twin pregnancies and thereby predisposed to delayed puberty. Considering the inhibitory effect of Dyn A on the pulsatile secretion of GnRH, which postpones the onset of puberty, the decrease in the level in the months in which the highest levels of KiSS-10 and NKB were observed seems to be correlated with the onset of ovarian activity in both groups. The highest plasma Dyn A concentrations in the singletons and the twins was observed in the fourth and fifth months, before the animals reached sexual maturity. Therefore, in the present study, we observed an inverse relationship between the Dyn A concentration and the age of ewes, compared to KiSS-10 and NKB. Moreover, in our previous *in vitro* research Szysiak *et al.* (27), we demonstrated that Dyn A increased LH and FSH secretion by anterior pituitary cells from pubescent ewe lambs. As reported in the earlier study Szysiak *et al.* (26), Dyn A had no significant effect on KiSS-10 secretion by ovine pituitary cells *in vitro*. This may

suggest that Dyn A stimulates gonadotropin secretion directly at the pituitary level.

In the present study, a positive correlation was shown between the changes in the KiSS-10 plasma concentrations and those in the NKB concentrations persisting from the 4<sup>th</sup> to the 10<sup>th</sup> month of life in ewes coming from both single and twin pregnancies. However, a negative correlation was found between the KiSS-10 and the Dyn A concentrations and between those of NKB and of Dyn A in the same frame of reference. It appears that the initiation of ovarian activity through the occurrence of the first ovulation is associated in ewes of both birth circumstances with concurrent positively correlated increases in KiSS-10 and NKB concentrations with age in the blood plasma, and decreases in the Dyn A concentration. In our previous *in vitro* study, a high positive correlation was observed between the secretion of NKB and that of KiSS-10 by anterior pituitary cells isolated from pubescent ewes (26). Therefore, NKB modulates KiSS-10 secretion at the pituitary level, with its impact depending on the time of exposure and its concentration in the culture medium (26). Although the direct effect of NKB on *in vitro* KiSS-10 secretion by ovine pituitary cells does not directly correspond to KiSS-10 levels in blood plasma, a comparable interaction might take place in other locations where these neuropeptides are produced. Our previous study's results point to Dyn A having no significant effect on the secretion of KiSS-10 by pituitary cells in pubescent ewes (26). Therefore, the observed inverse relationship between changes in KiSS-10 and Dyn A plasma concentrations may have been caused by other factors. The elucidation of the relationship between KiSS-10, NKB and Dyn A, especially the inverse correlation between KiSS-10 and Dyn A and between NKB and Dyn A, requires further research.

## Conclusion

In the present study, we characterised the relationship between KiSS-10, NKB and Dyn A in the course of normal and delayed puberty in pubescent ewes from the 4<sup>th</sup> to the 10<sup>th</sup> month of life. Our findings suggest that these neuropeptides may regulate the timing of reproductive activity onset in sheep. Further studies are needed to elucidate the specific roles of KiSS-10, NKB and Dyn A in regulating the HPO axis during sexual maturation or in the mechanisms underlying delayed puberty in ewes.

**Conflict of Interests Statement:** The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

**Financial Disclosure Statement:** The authors received no financial support for the research, authorship or publication of this article.

**Animal Rights Statement:** The protocol of the experimental design and all procedures were approved by the Local Ethics Committee for Animal Experimentation in Lublin (No. 65/2023).

**CRedit Authorship Contribution Statement:** **Natalia Szysiak:** research concept and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, writing the article, critical revision of the article, final approval of the article. **Urszula Kosior-Korzecka:** research concept and design, data analysis and interpretation, writing the article, critical revision of the article, final approval of the article. **Monika Gregula-Kania:** collection and assembly of data, data analysis and interpretation. **Krzysztof Patkowski:** collection and assembly of data. **Mateusz Fila:** data analysis and interpretation, writing the article. **Andrzej Junkuszew:** critical revision of the article.

## References

1. Abadjieva D., Shumkov K., Kistanova E., Kacheva D., Georgiev B.: Opportunities for the improvement of the reproductive performances in female animals. *Bio Anim Husb* 2011, 27, 365–372, doi: 10.2298/BAH1103365A.
2. Ahima R.S.: No KissIng by leptin during puberty? *J Clin Invest* 2011, 121, 34–36, doi: 10.1172/JCI45813.
3. Amstalden M., Coolen L.M., Hemmerle A.M., Billings H.J., Connors J.M., Goodman R.L., Lehman M.N.: Neurokinin 3 receptor immunoreactivity in the septal region, preoptic area and hypothalamus of the female sheep: colocalisation in neurokinin B cells of the arcuate nucleus but not in gonadotrophin-releasing hormone neurones. *J Neuroendocrinol* 2010, 22, 1–12, doi: 10.1111/j.1365-2826.2009.01930.x.
4. Billings H.J., Connors J.M., Altman S.N., Hileman S.M., Holaskova I., Lehman M.N., McManus C.J., Nestor C.C., Jacobs B.H., Goodman R.L.: Neurokinin B acts via the neurokinin-3 receptor in the retrochiasmatic area to stimulate luteinizing hormone secretion in sheep. *Endocrinology* 2010, 151, 3836–3846, doi: 10.1210/en.2010-0174.
5. Castellano J.M., Navarro V.M., Fernández-Fernández R., Nogueiras R., Tovar S., Roa J., Vazquez M.J., Vigo E., Casanueva F.F., Aguilar E., Pinilla L., Dieguez C., Tena-Sempere M.: Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology* 2005, 146, 3917–3925, doi: 10.1210/en.2005-0337.
6. De Roux N., Genin E., Carel J.-C., Matsuda F., Chaussain J.-L., 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, 10972–10976, doi: 10.1073/pnas.1834399100.
7. Harlow K., Renwick A.N., Shuping S.L., Sommer J.R., Lents C.A., Knauer M.T., Nestor C.C.: Evidence that pubertal status impacts kisspeptin/neurokinin B/dynorphin neurons in the gilt. *Biol Reprod* 2021, 105, 1533–1544, doi: 10.1093/biolre/iaab189.
8. Hausman G.J., Barb C.R., Lents C.A.: Leptin and reproductive function. *Biochimie* 2012, 94, 2075–2081, doi: 10.1016/j.biochi.2012.02.022.
9. Kosior-Korzecka U., Patkowski K., Bobowiec R., Wójcik M., Tusińska E.: Sustained opposite relationships between anabolic hormones in preweaning triplet lambs born to obese mothers. *Bull Vet Inst Pulawy* 2012, 56, 109–114, doi: 10.2478/v10213-012-0020-6.
10. Lapatto R., Pallais J.C., Zhang D., Chan Y.-M., Mahan A., Cerrato F., Le W.W., Hoffman G.E., Seminara S.B.: Kiss1  $-/-$  mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54  $-/-$  mice. *Endocrinology* 2007, 148, 4927–4936, doi: 10.1210/en.2007-0078.
11. Li Q., Smith J.T., Henry B., Rao A., Pereira A., Clarke I.J.: Expression of genes for kisspeptin (KISS1), neurokinin B (TAC3), prodynorphin (PDYN), and gonadotropin inhibitory hormone (RFRP) across natural puberty in ewes. *Physiol Rep* 2020, 8, e14399, doi: 10.14814/phy2.14399.
12. Lopez J.A., Bedenbaugh M.N., McCosh R.B., Weems P.W., Meadows L.J., Wisman B., Coolen L.M., Goodman R.L., Hileman S.M.: Does dynorphin play a role in the onset of puberty in female sheep? *J Neuroendocrinol* 2016, 28, e12445, doi: 10.1111/jne.12445.
13. Nakahara T., Uenoyama Y., Iwase A., Oishi S., Nakamura S., Minabe S., Watanabe Y., Deura C., Noguchi T., Fujii N., Kikkawa F., Maeda K., Tsukamura H.: Chronic peripheral administration of kappa-opioid receptor antagonist advances puberty onset associated with acceleration of pulsatile luteinizing hormone secretion in female rats. *J Reprod Dev* 2013, 59, 479–484, doi: 10.1262/jrd.2013-046.
14. Nestor C.C., Briscoe A.M.S., Davis S.M., Valent M., Goodman R.L., Hileman S.M.: Evidence of a role for kisspeptin and neurokinin B in puberty of female sheep. *Endocrinology* 2012, 153, 2756–2765, doi: 10.1210/en.2011-2009.
15. Pinilla L., Aguilar E., Dieguez C., Millar R.P., Tena-Sempere M.: Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 2012, 92, 1235–1316, doi: 10.1152/physrev.00037.2010.
16. Plant T.M., Ramaswamy S., DiPietro M.J.: Repetitive activation of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (*Macaca mulatta*) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges. *Endocrinology* 2006, 147, 1007–1013, doi: 10.1210/en.2005-1261.
17. Qiu J., Fang Y., Bosch M.A., Rønnekleiv O.K., Kelly M.J.: Guinea pig kisspeptin neurons are depolarized by leptin via activation of TRPC channels. *Endocrinology* 2011, 152, 1503–1514, doi: 10.1210/en.2010-1285.
18. Radwańska P., Kosior-Korzecka U.: Relationships between leptin, the KiSS-1/GPR54 system and thyrotropic axis activity in ewe lambs predisposed to the delayed puberty. *Small Rumin Res* 2016, 144, 6–16, doi: 10.1016/j.smallrumres.2016.07.019.
19. Ramaswamy S., Seminara S.B., Ali B., Ciofi P., Amin N.A., Plant T.M.: Neurokinin B stimulates GnRH release in the male monkey (*Macaca mulatta*) and is colocalized with kisspeptin in the arcuate nucleus. *Endocrinology* 2010, 151, 4494–4503, doi: 10.1210/en.2010-0223.
20. Ramaswamy S., Seminara S.B., Plant T.M.: Evidence from the agonadal juvenile male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) for the view that the action of neurokinin B to trigger gonadotropin-releasing hormone release is upstream from the kisspeptin receptor. *Neuroendocrinology* 2011, 94, 237–245, doi: 10.1159/000329045.
21. Redmond J.S., Macedo G.G., Velez I.C., Caraty A., Williams G.L., Amstalden M.: Kisspeptin activates the hypothalamic–adenohypophyseal–gonadal axis in prepubertal ewe lambs. *Reproduction* 2011, 141, 541–548, doi: 10.1530/REP-10-0467.
22. Rosales Nieto C.A., Ferguson M.B., Macleay C.A., Briegel J.R., Martin G.B., Thompson A.N.: Selection for superior growth advances the onset of puberty and increases reproductive performance in ewe lambs. *Animal* 2013, 7, 990–997, doi: 10.1017/S1751731113000074.
23. Rosales Nieto C.A., Thompson A.N., Macleay C.A., Briegel J.R., Hedger M.P., Ferguson M.B., Martin G.B.: Relationships among body composition, circulating concentrations of leptin and follistatin, and the onset of puberty and fertility in young female sheep. *Anim Reprod Sci* 2014, 151, 148–156, doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.10.008.

24. Seminara S.B., Messenger S., Chatzidaki E.E., Thresher R.R., Acierno J.S., Shagoury J.K., Bo-Abbas Y., Kuohung W., Schwino K.M., Hendrick A.G., Zahn D., Dixon J., Kaiser U.B., Slaugenhaupt S.A., Gusella J.F., O'Rahilly S., Carlton M.B.L., Crowley W.F., Aparicio S.A.J.R., Colledge W.H.: The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003, 349, 1614–1627, doi: 10.1056/NEJMoa035322.
25. Smith J.T., Acohido B.V., Clifton D.K., Steiner R.A.: Kiss-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol* 2006, 18, 298–303, doi: 10.1111/j.1365-2826.2006.01417.x.
26. Szysiak N., Kosior-Korzecka U., Greguła-Kania M., Patkowski K., Fila M., Junkuszew A.: Effect of neurokinin B and dynorphin A on kisspeptin-10 secretion from the anterior pituitary cells of pubescent ewes *in vitro*. *J Vet Res* 2025, 69, 299–304, doi: 10.2478/jvetres-2025-0026.
27. Szysiak N., Kosior-Korzecka U., Longo V., Patkowski K., Greguła-Kania M., Nowakiewicz A., Bochniarz M., Junkuszew A.: Influence of neurokinin B, dynorphin A and kisspeptin-10 on *in vitro* gonadotropin secretion by anterior pituitary cells isolated from pubescent ewes. *J Vet Res* 2025, 69, 121–129, doi: 10.2478/jvetres-2025-0003.
28. Tolson K.P., Chappell P.E.: The changes they are a-timed: metabolism, endogenous clocks, and the timing of puberty. *Front Endocrinol* 2012, 3, 45, doi: 10.3389/fendo.2012.00045.
29. Topaloglu A.K., Reimann F., Guclu M., Yalin A.S., Kotan L.D., Porter K.M., Serin A., Mungan N.O., Cook J.R., Ozbek M.N., Imamoglu S., Akalin N.S., Yuksel B., O'Rahilly S., Semple R.K.: TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 2009, 41, 354–358, doi: 10.1038/ng.306.
30. Uenoyama Y., Nagae M., Tsuchida H., Inoue N., Tsukamura H.: Role of KNDy neurons expressing kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin A as a GnRH pulse generator controlling mammalian reproduction. *Front Endocrinol* 2021, 12, 724632, doi: 10.3389/fendo.2021.724632.
31. Wang J., Sun L., Zhang T., Zhou H., Lou Y.: Effect of peripheral administration of kisspeptin-10 on dynamic LH secretion in prepubertal ewes. *Asian Australas J Anim Sci* 2012, 25, 785–788, doi: 10.5713/ajas.2011.11390.
32. Weems P.W., Coolen L.M., Hileman S.M., Hardy S., McCosh R.B., Goodman R.L., Lehman M.N.: Evidence that dynorphin acts upon KNDy and GnRH neurons during GnRH pulse termination in the ewe. *Endocrinology* 2018, 159, 3187–3199, doi: 10.1210/en.2018-00435.
33. Weems P.W., Witty C.F., Amstalden M., Coolen L.M., Goodman R.L., Lehman M.N.:  $\kappa$ -opioid receptor is colocalized in GnRH and KNDy cells in the female ovine and rat brain. *Endocrinology* 2016, 157, 2367–2379, doi: 10.1210/en.2015-1763.
34. Woller M., Tessmer S., Neff D., Nguema A.A., Roo B.V., Waechter-Brulla D.: Leptin stimulates gonadotropin releasing hormone release from cultured intact hemihypothalamic and enzymatically dispersed neurons. *Exp Biol Med* 2001, 226, 591–596, doi: 10.1177/153537020122600613.
35. Yang Y., Xiong X.-Y., Yang L., Xie L., Huang H.: Testing of kisspeptin levels in girls with idiopathic central precocious puberty and its significance. *Exp Ther Med* 2015, 9, 2369–2373, doi: 10.3892/etm.2015.2398.

## Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 21.05.2026

lek. wet. Natalia Szysiak  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych,  
Zakład Patofizjologii,  
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin  
Nr telefonu: 814456882  
E-mail: natalia.szysiak@up.edu.pl

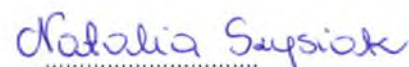
**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

## Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Szysiak Natalia, Kosior-Korzecka Urszula, Longo Vincenzo, Patkowski Krzysztof, Greguła-Kania Monika, Nowakiewicz Aneta, Bochniarz Mariola, Junkuszew Andrzej, 2025, pt. „*Influence of neurokinin B, dynorphin A and kisspeptin-10 on in vitro gonadotropin secretion by anterior pituitary cells isolated from pubescent ewes*” *Journal of Veterinary Research*; 69(1):121-129. doi: 10.2478/jvetres-2025-0003, mój udział polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, realizacji badań, zestawianiu, analizie i interpretacji danych, napisaniu pierwszej wersji manuskryptu, dokonaniu korekty po recenzjach, krytycznej ocenie artykułu oraz ostatecznej akceptacji artykułu.

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Szysiak Natalia, Kosior-Korzecka Urszula, Greguła-Kania Monika, Patkowski Krzysztof, Fila Mateusz, Junkuszew Andrzej, 2025, pt. „*Effect of neurokinin B and dynorphin A on kisspeptin-10 secretion from the anterior pituitary cells of pubescent ewes in vitro*” *Journal of Veterinary Research*; 69(2):299-304. doi: 10.2478/jvetres-2025-0026, mój udział polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, realizacji badań, zestawianiu, analizie i interpretacji danych, napisaniu pierwszej wersji manuskryptu, dokonaniu korekty po recenzjach, krytycznej ocenie artykułu oraz ostatecznej akceptacji artykułu.

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Szysiak Natalia, Kosior-Korzecka Urszula, Greguła-Kania Monika, Patkowski Krzysztof, Fila Mateusz, Junkuszew Andrzej, 2026, „*Relationship between Kisspeptin-10, Neurokinin B, and Dynorphin A in the course of normal and delayed puberty in ewes*” *Journal of Veterinary Research*; 70(1), 139-147, doi: 10.2478/jvetres-2026-0010, mój udział polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, realizacji badań, zestawianiu, analizie i interpretacji danych, napisaniu pierwszej wersji manuskryptu, dokonaniu korekty po recenzjach, krytycznej ocenie artykułu oraz ostatecznej akceptacji artykułu.



Podpis

## Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 21.05.2026

**dr hab. Urszula Kosior-Korzecka,**  
**prof. Uczelni**  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych,  
Zakład Patofizjologii,  
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin  
Nr telefonu: 814456665  
E-mail: urszula.korzecka@up.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria**  
**Uniwersytetu Przyrodniczego**  
**w Lublinie**

## Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Szysiak Natalia, Kosior-Korzecka Urszula, Longo Vincenzo, Patkowski Krzysztof, Greguła-Kania Monika, Nowakiewicz Aneta, Bochniarz Mariola, Junkuszew Andrzej, 2025, pt. „*Influence of neurokinin B, dynorphin A and kisspeptin-10 on in vitro gonadotropin secretion by anterior pituitary cells isolated from pubescent ewes*” Journal of Veterinary Research; 69(1):121-129. doi: 10.2478/jvetres-2025-0003, mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, analizie i interpretacji danych, napisaniu pierwszej wersji manuskryptu, dokonaniu korekty po recenzjach, krytycznej ocenie artykułu oraz ostatecznej akceptacji artykułu.

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Szysiak Natalia, Kosior-Korzecka Urszula, Greguła-Kania Monika, Patkowski Krzysztof, Fila Mateusz, Junkuszew Andrzej, 2025, pt. „*Effect of neurokinin B and dynorphin A on kisspeptin-10 secretion from the anterior pituitary cells of pubescent ewes in vitro*” Journal of Veterinary Research; 69(2):299-304. doi: 10.2478/jvetres-2025-0026, mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, analizie i interpretacji danych, napisaniu pierwszej wersji manuskryptu, dokonaniu korekty po recenzjach, krytycznej ocenie artykułu oraz ostatecznej akceptacji artykułu.

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Szysiak Natalia, Kosior-Korzecka Urszula, Greguła-Kania Monika, Patkowski Krzysztof, Fila Mateusz, Junkuszew Andrzej, 2026, „*Relationship between Kisspeptin-10, Neurokinin B, and Dynorphin A in the course of normal and delayed puberty in ewes*” Journal of Veterinary Research; 70(1), 139-147, doi: 10.2478/jvetres-2026-0010, mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, analizie i interpretacji danych, napisaniu pierwszej wersji manuskryptu, dokonaniu korekty po recenzjach, krytycznej ocenie artykułu oraz ostatecznej akceptacji artykułu.

  
.....  
Podpis

## Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 21.05.2026

**dr hab. inż. Monika Greguła-Kania**

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,  
Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki,  
Katedra Hodowli Zwierząt i Doradztwa Rolniczego,  
Zakład Hodowli Małych Przeżuwaczy i Doradztwa Rolniczego  
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin  
Nr telefonu: 814456826  
E-mail: monika.gregulakania@up.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

## Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Szysiak Natalia, Kosior-Korzecka Urszula, Longo Vincenzo, Patkowski Krzysztof, Greguła-Kania Monika, Nowakiewicz Aneta, Bochniarz Mariola, Junkuszew Andrzej, 2025, pt. „, *Influence of neurokinin B, dynorphin A and kisspeptin-10 on in vitro gonadotropin secretion by anterior pituitary cells isolated from pubescent ewes*” Journal of Veterinary Research; 69(1):121-129. doi: 10.2478/jvetres-2025-0003, mój udział polegał na: zestawieniu, analizie i interpretacji danych.

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Szysiak Natalia, Kosior-Korzecka Urszula, Greguła-Kania Monika, Patkowski Krzysztof, Fila Mateusz, Junkuszew Andrzej, 2025, pt. „, *Effect of neurokinin B and dynorphin A on kisspeptin-10 secretion from the anterior pituitary cells of pubescent ewes in vitro*” Journal of Veterinary Research; 69(2):299-304. doi: 10.2478/jvetres-2025-0026, mój udział polegał na: zestawieniu, analizie i interpretacji danych.

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Szysiak Natalia, Kosior-Korzecka Urszula, Greguła-Kania Monika, Patkowski Krzysztof, Fila Mateusz, Junkuszew Andrzej, 2026, „, *Relationship between Kisspeptin-10, Neurokinin B, and Dynorphin A in the course of normal and delayed puberty in ewes*” Journal of Veterinary Research; 70(1), 139-147, doi: 10.2478/jvetres-2026-0010, mój udział polegał na: zestawieniu, analizie i interpretacji danych.



.....  
Podpis

## Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 21.05.2026

**dr inż. Krzysztof Patkowski**  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,  
Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki,  
Katedra Hodowli Zwierząt i Doradztwa Rolniczego,  
Zakład Hodowli Małych Przeżuwaczy i Doradztwa Rolniczego  
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin  
Nr telefonu: 814456690  
E-mail: krzysztof.patkowski@up.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

## Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Szysiak Natalia, Kosior-Korzecka Urszula, Longo Vincenzo, Patkowski Krzysztof, Greguła-Kania Monika, Nowakiewicz Aneta, Bochniarz Mariola, Junkuszew Andrzej, 2025, pt. „, *Influence of neurokinin B, dynorphin A and kisspeptin-10 on in vitro gonadotropin secretion by anterior pituitary cells isolated from pubescent ewes*” Journal of Veterinary Research; 69(1):121-129. doi: 10.2478/jvetres-2025-0003, mój udział polegał na: zestawieniu danych.

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Szysiak Natalia, Kosior-Korzecka Urszula, Greguła-Kania Monika, Patkowski Krzysztof, Fila Mateusz, Junkuszew Andrzej, 2025, pt. „, *Effect of neurokinin B and dynorphin A on kisspeptin-10 secretion from the anterior pituitary cells of pubescent ewes in vitro*” Journal of Veterinary Research; 69(2):299-304. doi: 10.2478/jvetres-2025-0026, mój udział polegał na: zestawieniu danych.

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Szysiak Natalia, Kosior-Korzecka Urszula, Greguła-Kania Monika, Patkowski Krzysztof, Fila Mateusz, Junkuszew Andrzej, 2026, „, *Relationship between Kisspeptin-10, Neurokinin B, and Dynorphin A in the course of normal and delayed puberty in ewes*” Journal of Veterinary Research; 70(1), 139-147, doi: 10.2478/jvetres-2026-0010, mój udział polegał na: zestawieniu danych.

  
.....  
Podpis

## Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 21.05.2026

**prof. dr hab. Andrzej Junkuszew**  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,  
Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki,  
Katedra Hodowli Zwierząt i Doradztwa Rolniczego,  
Zakład Hodowli Małych Przeżuwaczy i Doradztwa Rolniczego  
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin  
Nr telefonu: 814456712  
E-mail: andrzej.junkuszew@up.edu.pl


**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

## Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Szysiak Natalia, Kosior-Korzecka Urszula, Longo Vincenzo, Patkowski Krzysztof, Greguła-Kania Monika, Nowakiewicz Aneta, Bochniarz Mariola, Junkuszew Andrzej, 2025, pt. „*Influence of neurokinin B, dynorphin A and kisspeptin-10 on in vitro gonadotropin secretion by anterior pituitary cells isolated from pubescent ewes*” Journal of Veterinary Research; 69(1):121-129. doi: 10.2478/jvetres-2025-0003, mój udział polegał na: krytycznej ocenie artykułu oraz ostatecznej akceptacji artykułu.

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Szysiak Natalia, Kosior-Korzecka Urszula, Greguła-Kania Monika, Patkowski Krzysztof, Fila Mateusz, Junkuszew Andrzej, 2025, pt. „*Effect of neurokinin B and dynorphin A on kisspeptin-10 secretion from the anterior pituitary cells of pubescent ewes in vitro*” Journal of Veterinary Research; 69(2):299-304. doi: 10.2478/jvetres-2025-0026, mój udział polegał na: krytycznej ocenie artykułu oraz ostatecznej akceptacji artykułu.

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Szysiak Natalia, Kosior-Korzecka Urszula, Greguła-Kania Monika, Patkowski Krzysztof, Fila Mateusz, Junkuszew Andrzej, 2026, „*Relationship between Kisspeptin-10, Neurokinin B, and Dynorphin A in the course of normal and delayed puberty in ewes*” Journal of Veterinary Research; 70(1), 139-147, doi: 10.2478/jvetres-2026-0010, mój udział polegał na: krytycznej ocenie artykułu oraz ostatecznej akceptacji artykułu.



.....  
Podpis

## Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 21.05.2026

**mgr Mateusz Fila**

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych,  
Zakład Patofizjologii,  
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin  
Nr telefonu: 814456882  
E-mail: mateusz.fila@up.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

## Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Szysiak Natalia, Kosior-Korzecka Urszula, Greguła-Kania Monika, Patkowski Krzysztof, Fila Mateusz, Junkuszew Andrzej, 2025, pt. „*Effect of neurokinin B and dynorphin A on kisspeptin-10 secretion from the anterior pituitary cells of pubescent ewes in vitro*” *Journal of Veterinary Research*; 69(2):299-304. doi: 10.2478/jvetres-2025-0026, mój udział polegał na: współudziale w napisaniu artykułu, krytycznej ocenie artykułu.

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Szysiak Natalia, Kosior-Korzecka Urszula, Greguła-Kania Monika, Patkowski Krzysztof, Fila Mateusz, Junkuszew Andrzej, 2026, „*Relationship between Kisspeptin-10, Neurokinin B, and Dynorphin A in the course of normal and delayed puberty in ewes*” *Journal of Veterinary Research*; 70(1), 139-147, doi: 10.2478/jvetres-2026-0010, mój udział polegał na: analizie i interpretacji wyników, współudziale w napisaniu artykułu.



Podpis

## Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 21.05.2026

**prof. dr hab. Aneta Nowakiewicz**  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych,  
Zakład Mikrobiologii,  
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin  
Nr telefonu: 814456008  
E-mail: aneta.nowakiewicz@up.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weternaria  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

## Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Szysiak Natalia, Kosior-Korzecka Urszula, Longo Vincenzo, Patkowski Krzysztof, Greguła-Kania Monika, Nowakiewicz Aneta, Bochniarz Mariola, Junkuszew Andrzej, 2025, pt. „, *Influence of neurokinin B, dynorphin A and kisspeptin-10 on in vitro gonadotropin secretion by anterior pituitary cells isolated from pubescent ewes*” Journal of Veterinary Research; 69(1):121-129. doi: 10.2478/jvetres-2025-0003, mój udział polegał na: analizie i interpretacji danych.



Podpis

## Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 21.05.2026

**dr hab. Mariola Bochniarz,**  
**prof. Uczelni**  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych,  
Zakład Mikrobiologii,  
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin  
Nr telefonu: 814456008  
E-mail: aneta.nowakiewicz@up.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria**  
**Uniwersytetu Przyrodniczego**  
**w Lublinie**

## Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Szysiak Natalia, Kosior-Korzecka Urszula, Longo Vincenzo, Patkowski Krzysztof, Greguła-Kania Monika, Nowakiewicz Aneta, Bochniarz Mariola, Junkuszew Andrzej, 2025, pt. „*Influence of neurokinin B, dynorphin A and kisspeptin-10 on in vitro gonadotropin secretion by anterior pituitary cells isolated from pubescent ewes*” Journal of Veterinary Research; 69(1):121-129. doi: 10.2478/jvetres-2025-0003, mój udział polegał na: krytycznej ocenie artykułu.

*Mariola Bochniarz*

Podpis

## Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 21.05.2026

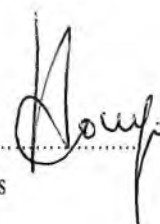
**Vincenzo Longo, PhD**  
National Research Council,  
Institute of Agricultural Biology  
and Biotechnology,  
Research Unit of Pisa,  
Via Giuseppe Moruzzi 1,  
56124 Pisa, Italy  
E-mail: v.longo@ibba.cnr.it

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

## Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy autorstwa: Szysiak Natalia, Kosior-Korzecka Urszula, Longo Vincenzo, Patkowski Krzysztof, Greguła-Kania Monika, Nowakiewicz Aneta, Bochniarz Mariola, Junkuszew Andrzej, 2025, „*Influence of neurokinin B, dynorphin A and kisspeptin-10 on in vitro gonadotropin secretion by anterior pituitary cells isolated from pubescent ewes*” Journal of Veterinary Research; 69(1):121-129. doi: 10.2478/jvetres-2025-0003, mój udział polegał na: ostatecznej akceptacji artykułu.

.....  
Podpis



## Declaration of co-authorship

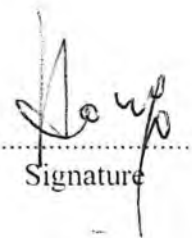
Lublin, 21.05.2026

**Vincenzo Longo, PhD**  
National Research Council,  
Institute of Agricultural Biology  
and Biotechnology,  
Research Unit of Pisa,  
Via Giuseppe Moruzzi 1,  
56124 Pisa, Italy  
E-mail: v.longo@ibba.cnr.it

## Discipline Council Veterinary Medicine of the University of Life Sciences in Lublin

### Declaration of co-authorship

I hereby declare that in the paper: Szysiak Natalia, Kosior-Korzecka Urszula, Longo Vincenzo, Patkowski Krzysztof, Greguła-Kania Monika, Nowakiewicz Aneta, Bochniarz Mariola, Junkuszew Andrzej, 2025, „*Influence of neurokinin B, dynorphin A and kisspeptin-10 on in vitro gonadotropin secretion by anterior pituitary cells isolated from pubescent ewes*” *Journal of Veterinary Research*; 69(1):121-129. doi: 10.2478/jvetres-2025-0003, my contribution was: final approval of the article.



Signature