

TC
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI SIÇAN DOKULARINDA FİZYOLOJİK STRES KOŞULLARININ
ADRENOMEDULLİN DÜZEYLERİ VE TİROZİN HİDROKSİLİZ ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

131181

NURAN ÇIKCIKOĞLU

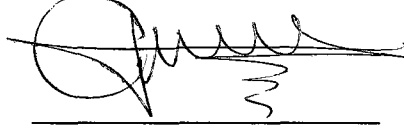
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALATYA
2003

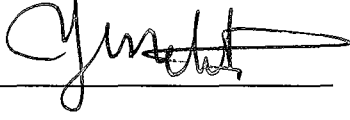
131181

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir



Doç. Dr. İsmet YILMAZ



Doç. Dr. Muhittin YÜREKLİ



Yrd. Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL



Onay

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

28.8.1.2003

Doç. Dr. Ali SAHİN
Enstitü Müdürü



1.00 YÜREKLİ YILMAZ GEÇKİL SAHİN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI SIÇAN DOKULARINDA FİZYOLOJİK STRES KOŞULLARININ ADRENOMEDULLİN DÜZEYLERİ VE TİROZİN HİDROKSİLİZ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nuran CIKCIKOĞLU

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

38 + vii sayfa

2003

Danışman: Doç. Dr. Muhittin YÜREKLİ

Bu çalışmada soğuk stresine bağlı olarak tirozin hidroksilaz (TH) aktivitesindeki değişiklikler ile hipotansif bir peptid olan adrenomedullin (AdM) düzeylerindeki değişiklikler bazı sıçan dokularında araştırılmıştır.

Katekolaminler (dopamin, noradrenalin ve adrenalin); stresörlere ilk cevap veren moleküller arasındadırlar ve stres tepkisinin harekete geçmesinde önemlidirler. Tirozin hidroksilaz katekolaminlerin sentezlenmesinde hız sınırlayıcı enzimdir.

Adrenomedullin (AdM), son zamanlarda insan feokromositomasından izole edilen yeni etkin bir damar genişletici ve hipotansif bir peptittir. AdM, adrenal medulla, kalp, akciğer ve böbrekte ayrıca plazma ve idrarda da bulunmaktadır.

Bu çalışmada soğuk stresine bağlı olarak TH enzim aktivitesindeki değişiklikler sıçanların adrenal medulla, kalp ve hipotalamus dokularında araştırılmıştır. Ayrıca soğuk stresine bağlı olarak adrenomedullin düzeyindeki değişiklikler sıçanların kalp, hipotalamus, adrenal medulla, böbrek, çizgili kas ve düz kas dokularında araştırılmıştır.

Sonuçlara göre, soğuk stresine bağlı olarak sıçanların adrenomedullin miktarlarının kalp, hipotalamus, adrenal medulla, böbrek, çizgili kas ve düz kasta azaldığı saptanmıştır. Ayrıca sonuçlar soğuk stresine maruz kalma sonucu TH aktivitesinin kalp, hipotalamus ve adrenal medullada arttığını göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Adrenomedullin, Tirozin hidroksilaz, Soğuk stresi, Adrenal Medulla, Hipotalamus, Kalp

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF PHYSIOLOGICAL STRESS CONDITIONS ON TYROSINE HYDROXYLASE ENZYME ACTIVITY AND ADRENOMEDULLIN LEVELS IN SOME RATS TISSUES

Nuran CIKCIKOGLU

Inonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

38 + vii pages

2003

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ

In this study, the effect of cold stress on tyrosine hydroxylase (TH) activity was investigated in adrenal medulla, hypothalamus and heart. Adrenomedullin levels were also investigated in adrenal medulla, hypothalamus, heart, kidney, smooth muscle and striated muscle with under cold stress.

Catecholamines, (dopamin, noradrenalin and adrenalin) are among the first molecules to show a response to stressors and are crucial in stimulating action in response to a perceived threat. Tyrosine hydroxylase (TH) is the rate-limiting enzyme in the synthesis of dopamin, noradrenalin and adrenalin.

Adrenomedullin, is a novel potent vasorelaxing and hypotensive peptide recently isolated from human pheochromocytoma. It has been detected in adrenal medulla, heart, lung and kidney as well as in plasma and urine.

The results indicated that adrenomedullin levels decreased depend on cold stress in hypothalamus, adrenal medulla, heart, kidney, striated muscle and smooth muscle. The results also demonstrated that TH activity increased in adrenal medulla, heart, hypothalamus with cold stress.

KEYWORDS: Adrenomedullin (AdM), Tyrosine hydroxylase (TH), Cold Stress, Adrenal Medulla, Heart, Hypothalamus

TEŞEKKÜR

Bu çalıőmanın planlanması ve yapılmasında her türlü yardımını esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Muhittin YÜREKLİ' ye teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Tezin yürütülmesinde proje desteğinden dolayı İnönü Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi' ne (Proje No: 2003/57) ve laboratuvar imkanlarından dolayı Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na teşekkür ederim. Çalıőmalarımın her aşamasında maddi, manevi desteklerini eksik etmeyen Arş. Gör. M. İlker DOĞRU ve Arş. Gör. Arzu DOĞRU' ya en içten dileklerle teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca yardımlarından dolayı Arş. Gör. Z. Banu PORGALI' ya, yüksek lisans öğrencileri Numan YILDIRIM ve Serpil UKA' a teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans eğitimim boyunca manevi desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Füsun YÜREKLİ' ye teşekkürlerimi sunuyorum.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi yüksek lisans eğitimim boyunca da bana güvenen ve destek olan değerli aileme ve arkadaşlarıma çok teşekkür ediyorum.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Katekolamin ve katekol kökleri	6
Şekil 1.2. Katekol-O-metil transferaz (KOMT) ve monoamino oksidaz (MAO) tarafından katekolaminlerin metabolizması	7
Şekil 1.3. Katekolamin biyosentezinin şematik olarak gösterilmesi	8
Şekil 1.4. Katekolaminlerin sentez mekanizması	10
Şekil 1.5. İnsan adrenomedullin'in aminoasit dizilimi	14
Şekil 1.6. İnsan proadrenomedullin gen ürününün translasyon sonrası işlemi	15
Şekil 1.7. Adrenomedullin (AdM) sentezi, AdM genomik DNA, AdM mRNA, PreproAdM, AdM ve PAMP	16
Şekil 4.1. Bir hafta soğuk stresine maruz bırakılan sıçanlarda toplam protein miktarları (mg/ mL)	28
Şekil 4.2. Bir hafta soğuk stresine maruz bırakılan sıçanların dokularında tirozin hidroksilaz (TH) enzim aktivitesindeki değişiklikler	29
Şekil 4.3. Bir hafta soğuk stresine maruz bırakılan sıçan dokularında adrenomedullin düzeylerindeki değişiklikler	30

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Adrenomedullin (AdM) benzeri immünoreaktivitenin doku lokalizasyonu ..	13
Çizelge 3.1. TH aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan çözelti miktarları.....	25
Çizelge 4.1. Bir hafta soğuk stresine maruz bırakılan sıçanlarda toplam protein miktarları (mg/ mL)	27
Çizelge 4.2. Bir hafta soğuk stresine maruz kalan sıçanlarda tirozin hidroksilaz (TH) enzim aktivitesindeki değişiklikler (nmol/mg P/saat)	28
Çizelge 4.3. Bir hafta soğuk stresine bırakılan sıçanlar dokularında adrenomedullin düzeylerindeki değişiklikler (pmol/mL)	29

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	1
1.2. Katekolaminler	6
1.3. Tirozin Hidroksilaz	9
1.4. Adrenomedullin	12
1.5. Adrenomedullin'in Yapısal Özellikleri	14
1.6. Adrenomedullin'in Biyolojik Etkileri.....	16
2. KAYNAK ÖZETLERİ	20
3. MATERYAL VE METOD	22
3.1. Çalışmada Kullanılan Sıçanlar	22
3.2. Soğuk Stresi Uygulaması	22
3.3. Diseksiyon İşlemi	22
3.4. Adrenal Bezlerin Alınması ve Homojenizasyonu	22
3.5. Kalbin Alınması ve Homojenizasyonu	23
3.6. Hipotalamusun Alınması ve Homojenizasyonu	23
3.7. Böbreklerin Alınması ve Homojenizasyonu.....	23
3.8. Çizgili Kasın Alınması ve Homojenizasyonu	23
3.9. Düz Kasın Alınması ve Homojenizasyonu	24
3.10. Toplam Protein Ölçümü	24
3.11. Standart Tüplerin Hazırlanması	24
3.12. Örnek İçeren Tüplerin Hazırlanması	24
3.13. Tirozin Hidroksilaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	25
3.14. Adrenomedullin Düzeylerinin Ölçülmesi	26
3.15. İstatistiksel Yöntem	26
4. Araştırma Bulguları	27
4.1. Bir Hafta Soğuk Stresine Maruz Bırakılan Sıçan Dokularında Toplam Protein Miktarında Gözlenen Değişiklikler	27
4.2. Bir Hafta Soğuk Stresine Maruz Bırakılan Sıçan Dokularında TH Enzim Aktivitesinde Gözlenen Değişiklikler	28
4.3. Bir Hafta Soğuk Stresine Maruz Bırakılan Sıçan Dokularında Adrenomedullin Düzeylerinde Gözlenen Değişiklikler	29
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	31
6. KAYNAKLAR	35

SİMGELER VE KISALTMALAR

AdM	Adrenomedullin
AADC	Aromatik aminoasit dekarboksilaz
ACTH	Adrenokortikotropik Hormon
BSA	Bovin Serum Albumin
Ca ²⁺	Kalsiyum İyonu
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
CGRP	Kalsitonin Geni İle İlgili Bir Peptit
DBH	Dopamin β Hidroksilaz
DOPA	Dihidroksi fenil alanin
DTT	Dithiothreitol
KOMT	Katekol-O-Metil Transferaz
LC	Lokus Korelus
L-Tyr	L-Tirozin
MAO	Monoamin Oksidaz
6 MPH ₄	6-Metil Tetrahidro Pterin
NO	Nitrik Oksit
PAMP	Proadrenomedullin N- Terminal 20 Peptit
PIPES	Piperazinebis (ethanesulfanic acid)
PNMT	Fenil Etanolamin N-Metil Transferaz
TH	Tirozin Hidroksilaz

1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Stres, genel olarak organizmanın değişen çevre koşullarıyla başa çıkabilmek için geliştirdiği adaptasyon olarak bilinir [1]. Pek çok stres yaratan uyarıcı, lokus korelutan köken alan noradrenerjik nöronların yer aldığı sistemde hem elektrofiziksel hem de biyokimyasal olayların artmasında etkilidirler. Pek çok çalışma kronik stresin bu sistemin görevini değiştirebileceğini göstermektedir [2].

Stresörlere maruz kalma adrenal bezler, kardiyovasküler ve solunum sistemleri, metabolizma gibi periferel organları ve beyin bölgelerini içeren nörofizyolojik ve somatik reaksiyonları beraberinde getirir [1].

Farklı stresörler, simpatik sinir sisteminin farklı bileşenlerini aktive ederler. Karşılaşılan akut hipotansiyon ve hiperglisemiye adrenal medulladan salınan epinefrinin aracılık ettiği bilinirken; akut soğuk strese simpatik sinirlerden salınan norepinefrin aracılık etmektedir [3].

Stresörlere cevapta katekolaminlerin sentezi ilk anahtar olaydır ve bunu da katekolamin sentezleyen enzimleri şifreleyen genlerin ifadesindeki artış izler [4].

Katekolaminler bitkilerde ve hayvanlarda geniş bir dağılıma sahiptir. Yüksek omurgalılarda katekolaminler özellikle simpatik nöronlara, adrenal medullaya ve merkezi sinir sistemine yerleşmiştir [5].

Katekolaminler sinir ve endokrin sistemde nörotransmitter ve hormon olarak çok önemli rol oynarlar [4]. Dopamin, norepinefrin ve epinefrin hepsi birer katekol halkası ve amin grubu içerir ve böylece “katekolaminler” olarak adlandırılırlar. Katekolaminler tirozin aminoasitinden şekillenirler [6].

Memelilerde epinefrin, özellikle adrenal medullanın kromaffin hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda yerleşmiştir. Beyin ve simpatik ganglionlardaki epinefrin miktarı düşüktür. Bunun yanı sıra norepinefrin, adrenal medullaya ek olarak periferel simpatik sinirlerde, merkezi sinir sisteminde ve çok küçük miktarlarda ekstra adrenal kromaffin hücrelerinde bulunur [5].

Merkezi sinir sistemi dışındaki dopamin özellikle de simpatik gangliyonlardaki internöronlarda, karotit cisimcikte ve enterokromaffin hücrelerde bulunur. Daha düşük dozlarda ise dopamin; hayvanların pek çok periferel dokuların sinirlerinde bulunur [5].

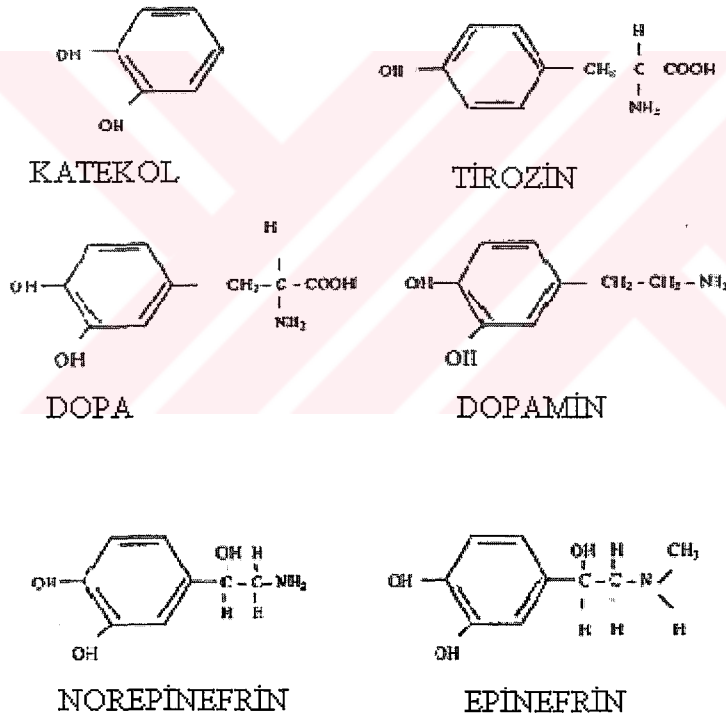
1.2. Katekolaminler

Katekolaminler (dopamin, noradrenalin ve adrenalin) nörotransmitter ve hormon olarak, sinir ve endokrin sistemde pek çok önemli rol oynarlar.

Katekolaminlerin biyosentezi; tirozin hidroksilaz (TH), aromatik aminoasit dekarboksilaz (AADC), dopamin β hidroksilaz (DBH) ve feniletanolamin N-terminal transferaz (PNMT) denilen dört enzimin işbirliği ile olmaktadır [20].

Dopamin, norepinefrin ve epinefrin gibi katekolaminler beyinde, kromaffin hücrelerinde, sempatik sinirlerde ve sempatik gangliyada oluşurlar ve stres ve duygusal davranışlarda önemli rol oynarlar [21].

Katekolaminler 2 hidroksil grubu taşıyan bir benzen halkasına yapışık aminlerden oluşan bileşiklerdir [22].



Şekil 1.1 Katekolamin ve katekol kökleri [26].

Katekolaminler kalp, karaciğer, böbrek, cinsiyet bezleri, postganglionik sempatik sinirlerin adrenerjik nöronları ve santral sinir sisteminde bulunurlar [23].

Sıçan adrenomedullini, insan adrenomedullininden sadece 6. pozisyonda ayrılır ve 50 aminoasit uzunluğundadır. İnsan ve sıçan PAMP'ı ise 20 aminoasit uzunluğundadır ve sadece 3. pozisyonda birbirinden ayrılır [14].

Adrenomedullin, endotelial hücrelerde nitrik oksit (NO) üretimini uyarırken, PAMP, kan basıncını arttıran adrenerjik sinirleri inhibe eder. Her iki peptid de ön hipofizde ACTH salınımını inhibe eder. Adrenal bezlerde hem AdM hemde PAMP, potasyum ve angiotensin II ile uyarılan aldosteron sekresyonunu inhibe eder [14]. Adrenomedullinin böbreğin görevleri üzerine natri üretik ve diüretik etkisi ile sıvı elektrolit dengesini düzenler ve homeostasiyi sağlar. Beyinde adrenomedullin su alımını ve tuz isteğini inhibe etmektedir [14].

Adrenomedullin spesifik olarak muhtemelen Ca^{++} akışını bozduğuna, sıçanlarda zona glomerulosa hücrelerinde potasyum-angiotensin II'nin uyardığı aldosteron salınımını inhibe ettiğine dair deliller vardır [17].

Vazodilasyonun (damar genişlemesinin) intraselüler mekanizması adrenomedullin tarafından uyarılmaktadır. Adrenomedullinin vasodilasyonla kan basıncını azalttığı önerilmektedir ve bu yeni peptid hormon gibi davrandığı için kardiyovasküler düzenlemede önemli rol oynadığı düşünülmektedir [18].

Fizyolojik stresin bir formu olan soğuk stresinin adrenomedullin salınımını teşvik ettiği rapor edilmektedir [19].

Literatürde, adrenomedullinin etkilerinden birisi olan hipotermiya'ya soğukun indüklediği hipotansif cevaba katılan fizyolojik bazı moleküllerin olduğuna işaret edilmektedir. Soğuk stresine bağlı olarak adrenomedullin salınımına başka dolaylı bir kanıt da astım hastalarında plazma adrenomedullini ile yapılan çalışmalardan çıkmaktadır ve soğukun astımın yeniden nüksetmesini indüklediği gösterilmiştir [19].

Yapılan bir çalışmada; kararlı sitrat sentez aktivitesi ile soğuğa maruz kalma boyunca tamamen okside karbonhidrata azalan kapasite önerilmektedir [19].

Yapılan bir başka çalışmada ise; akut soğuk stresin karaciğer glikogenez ve ketogenez konsantrasyonunda artışa yol açarak plazma glukagon konsantrasyonunda hızlı bir artışa neden olduğu gösterilmiştir [19].

Katekolaminler tarafından düzenlenen fizyolojik olaylara hem simpatik sinirler hem de adrenal medulla aracılık eder [5].

Katekolamin nörotransmitterleri, monoaminooksidaz enzimi ve katekol-O-metiltransferaz tarafından yıkılır ve bu olay hem ekstraselüler sıvıda hem de akson ucunda olur. Intraselüler enzimler katekolaminlerin yıkılmasında daha önemli rol oynarlar [6].

Katekolamin salan nöronların hücre gövdeleri beyin kökü olarak adlandırılan beyin bölgesinde yer alır. Oldukça az sayıda olmasına rağmen aksonlar oldukça dallanır ve aslında beyin ve spinal kordun bütün parçalarına giderler. Katekolaminler muhtemelen post sinaptik nöronlar üzerine nöromodülatör benzeri etkilerinden dolayı merkezi sinir sisteminde birçok nörondan daha fazla etki gösterirler ve bunların G proteini aracılığı ile reseptör hareketi; ikincil mesajcı cAMP'ye, fosfotidilinozitol metabolitlerine ve iyon kanallarına bağlıdır [6].

Çeşitli stresörlere devamlı ve tekrar eden bir şekilde maruz kalınca, katekolamin biyosentezinde artış görülür. Merkezi ve periferik katekolaminerjik nöronlarda katekolamin sentezleyen enzimlerin aktivitesi artar [4].

Kronik soğuk stresin ve kimyasal simpatektominin adrenal medullada katekolaminlerin sentezini ve salınımını artırdığı bilinmektedir. Kromaffin hücreler değişen fonksiyonel ihtiyaçlara katekolamin sentezinde hız sınırlayıcı enzim olan TH'ın sentezini artırarak adapte olurlar. Hipoglisemi, hipotansiyon ve soğuğa maruz kalma gibi fizyolojik stresörler homeostasinin sürdürülmesini sağlayan katekolaminlerin salınımını artırır [7].

Katekolaminerjik hücrelerin aktivitelerindeki uzun süreli artış, artan katekolamin salınımını desteklediği bildirilmiştir. Bu mekanizmanın altında salınım ve sentez arasında etkin bir bağlantının varlığına inanılmaktadır. Katekolaminlerin salınımını artıran uyarı onların biyosentezinde hız-sınırlayıcı adım olan tirozinin hidroksilasyonunu artırmaktadır [7].

Yaşlanmaya bağlı olarak insan ve laboratuvar hayvanlarındaki dolaşım katekolamin düzeylerinin dinlenme sırasında arttığı görülmüştür. Dolaşım katekolaminlerindeki bu artışlar, simpatik ganglia ve adrenallerden katekolamin salınımının artması ile ilgili olabilir [12].

Tirozin hidroksilaz, katekolaminlerin (adrenalin, noradrenalin, dopamin) biyosentezinde hız sınırlayıcı enzimdir [8].

Tirozin hidroksilaz katekolaminlerin sentezinde hız sınırlayıcı reaksiyon olan L-Tyr'nin L-DOPA'ne hidroksilasyonunu katalizler [9].

Aktivite için redükte pteridin kofaktörü ve moleküler oksijene ihtiyaç duyulur. Enzim hem insan adrenal medulla hücrelerinin sitozolünde, hem de simpatik sinir uçlarında görülür. Bu enzim sadece katekolamin sentezleyen dokularda bulunmuştur. Enzim tirozin için spesifik görünmektedir [5].

Redükte pteridin kofaktörünün aktivasyona engel olduğu düşünülen katekoller tarafından (dopa, norepinerfin, dopamin) tirozin hidroksilaz inhibe edilir [5].

Hipotansiyon, hipoglisemi ve soğuğa maruz kalma gibi homeostatik değişikliklerin simpato adrenal aktivitenin uyarıcısı olduğu bilinmektedir [3].

Simpato adrenal sistemin sürekli uyarımı adrenal medulla ve simpatik sinirlerdeki tirozin hidroksilazın miktarını artırır [5].

Simpato adrenal sistemden katekolamin salınımını artıran uyarı, katekolamin sentezinde tirozinin hidroksilasyonunu da artırır. Katekolaminlerin sentez ve salınım mekanizmaları arasında, TH'daki iki tip değişiklik özellikle önemlidir: Katekolamin salınımındaki uzun süren artışlar, TH'ın katalizlediği reaksiyonun maksimum hızında dereceli artışa neden olur. Bu etki insülinin indüklediği hipoglisemi, fenoksibenzamin'in indüklediği hipotansiyon ve soğuğa maruz bırakma gibi kronik fizyolojik strese cevapta gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, katekolamin salınımındaki kısa dönemli artışlar TH'nın hızlı bir aktivasyonuna neden olur ve bu TH'nın pteridin kofaktörü için affinitenin artması olarak kendini gösterir [3].

Çalışmalar TH'nın pteridin kofaktörüne affinitesinin hızlı bir artışı yoluyla maksimum TH aktivitesinde dereceli bir artışın meydana geldiğini ifade etmektedir [3].

Tirozin hidroksilazın indüklenmesinde; artan fizyolojik isteğe cevapta simpatik nöronlar veya kromaffin hücrelerin katekolamin sentezleme kapasitesinin arttığı görülür [5].

Katekolamin salınımının nöral olarak uyarılmasının artmasından hemen sonra, tirozin hidroksilasyonunda hızlı bir artış olduğu kanıtlanmıştır [5]. Değişik stres vericilerinin tirozin hidroksilaz aktivitesinde artış sağladığı görülmüştür. Sürekli soğuğa maruz kalma, hipertansiyon, nörokimyasal değişiklikler, yaşlanma, antihipertansif ilaç tedavilerinin adrenal medulla ve simpatik nöronlardaki tirozin hidroksilaz aktivitesini arttırdığı bilinmektedir [10].

Pek çok çalışma, katekolamin biyosentezinde TH enzim düzeylerinin rezepin gibi katekolamin yıkıcı ilaçlarla müdahale veya uzun süreli stres sonrası beyin

noradrenerjik nöronlarında, periferel sinir sisteminin sempatik gangliyonlarında, adrenal medullada arttığını göstermiştir.

Enzim aktivitesindeki bu artışın katekolaminerjik hücrelerin uzun süre uyarımı nedeniyle olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca hem periferel hem de merkezi sinir sisteminde TH aktivitesindeki bu artışın, enzimin intraselüler konsantrasyonundaki bir artış sonucu olduğu gösterilmiştir [11].

Soğuğa maruz bırakılan sıçanların beyin, adrenal medulla, kalp ve merkezi sinir sistemi gibi sistemlerde perifereldeki katekolaminlerin salınımını ve sentezini arttırdığı gösterilmiştir [10]. Kronik soğuğa maruz bırakma sonucunda katekolamin biyosentezinde anahtar enzim olan tirozin hidroksilaz aktivitesinde kademeli artış olmaktadır. Bunu da TH mRNA'nın hücreden bağımsız translasyon aktivitesi ve göreceli dağılımındaki değişiklikler izlemektedir [29].

Sıçanların kronik soğuğa maruz bırakılması tirozin hidroksilaz sentezi ve kandaki norepinefrin konsantrasyonunu, kalp atışını, sistolik, diastolik kan basınçları ile kardiyak hipertrofiyi arttırmaktadır [10]. Soğuğa maruz kalma, TH gen ifadesi ile birlikte TH immunoreaktivitesinde ve genç sıçanların adrenal medullasında TH aktivitesinde artışa neden olur. Bu yaşlı sıçanlarda görülmemektedir. Bu bilgi soğuk uygulamasını takiben yaşlı sıçanlarda TH aktivitesinin indüklenmesinin bozulduğunu ve yaşlanma boyunca TH gen ifadesi konusunda plastisite kaybının varlığını akla getirmektedir [12].

Adrenomedullin, insan feokromositoma hücrelerinden orjinal olarak izole edilen etkin bir hipotansif peptittir [13]. Feokromasitomalar adrenal medullanın tümörleridir [23]. Orjinal olarak feokromasitoma ve normal adrenal medullada tanımlanan adrenomedullin gen ürünleri, adrenal korteks, böbrekler, akciğer, kalp, dalak, ince bağırsak, tükrük bezleri ve beyini de içeren birçok dokuda saptanmıştır. En çok transkripsiyon ise, endotelial hücrelerde gözlenmiştir [14].

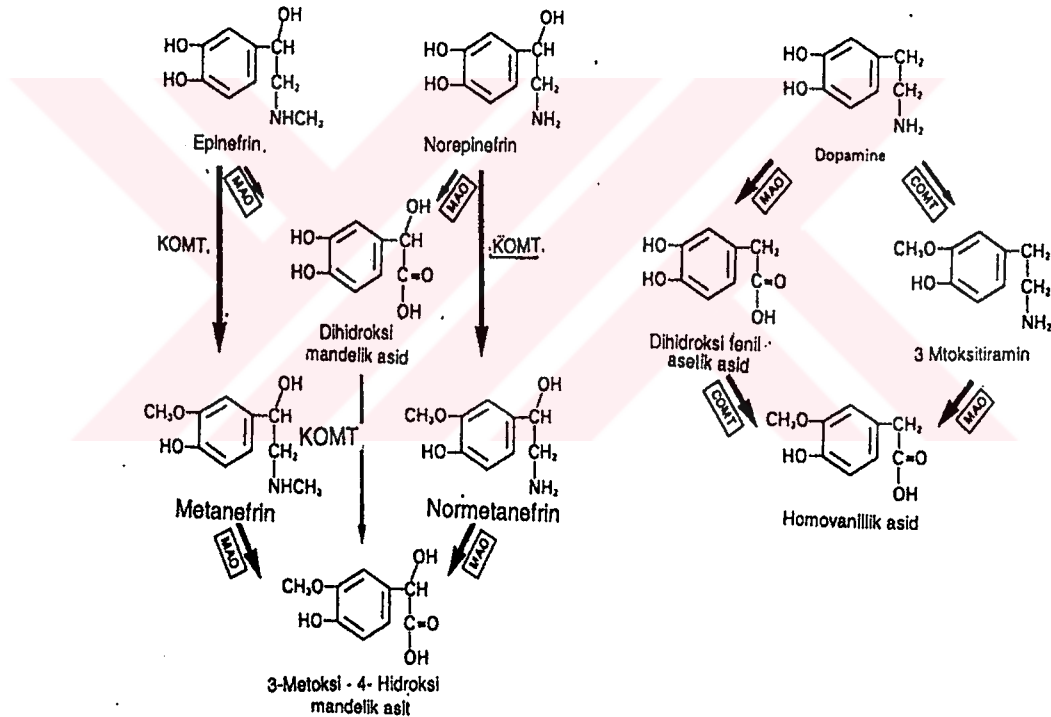
Adrenomedullinin farmakolojik etkilerine CGRP (kalsitonin geni ile ilgili bir peptit) reseptörünce aracılık edildiği bilinmektedir. Çünkü her iki peptit de önemli yapısal homoloji göstermektedir [14].

İnsan adrenomedullini 52 aminoasitten oluşan ve molekül içi bir disülfid bağı içeren halkasal bir yapıya sahiptir. Karboksi terminal Tyr ucu amidlenmiştir [30].

Adrenomedullin geni 4 ekson ve 3 introndan oluşmuş ve 11. kromozomda tek bir lokus içerisine yerleşmiştir [15]. Adrenomedullin, 185 aminoasitlik bir prohormon olan preproadrenomedullin'in translasyon sonrası işlemi ile üretilir [16].

Katekolaminler, reseptörlerin iki temel sınıfı aracılığı ile etki ederler. Bu sınıflar α adrenerjik ve β adrenerjik olarak adlandırılmışlardır ve her biri iki alt sınıftan oluşmaktadır (α_1 , α_2 , β_1 , β_2) [23]. Bu sınıflama çeşitli agonist ve antagonistlerin bağlanmalarındaki göreceli düzene dayalıdır. Epinefrin α_1 ve α_2 reseptörlerine bağlanır ve bunları aktive eder, öyle ki her ikisini içeren bir dokuda epinefrin etkinliği bu reseptörlerin hormon için olan göreceli ilgilerine bağlıdır. Fizyolojik konsantrasyonlarda norepinefrin primer olarak α reseptöre bağlanır [23].

Katekolaminler katekol-O-metil transferaz (KOMT) ve monoamin oksidaz (MAO) ile inaktif-O-metile ve deamine metabolitleri oluşturmak üzere süratle metabolize olurlar (Şekil 1.2.) [23].

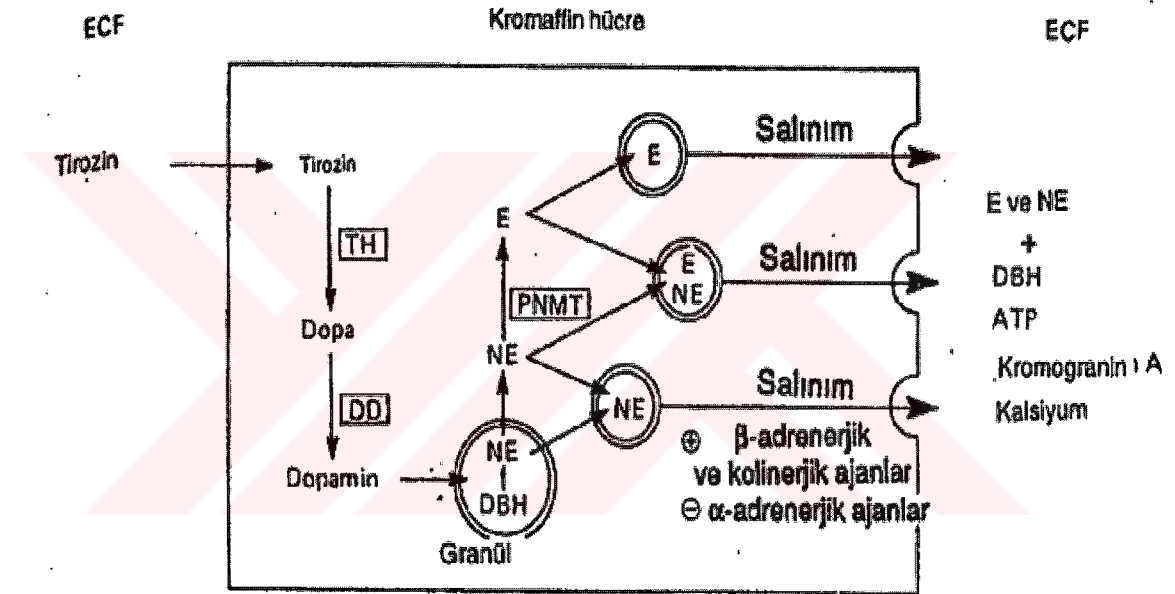


Şekil 1.2. Katekol- O- Metil Transferaz (KOMT) ve monoamin oksidaz (MAO) tarafından katekolaminlerin metabolizması [23].

Katekolamin kromaffin granüllerinde depolanır ve salınım kalsiyuma bağlıdır. Adrenal medullada biyosentez, alınımla, depolanma ve katekolamin sekresyonunu başarabilen organeller olan kromaffin granüller yer alır. Bu granüller katekolaminlere ilave olarak $ATP-Mg^{2+}$, Ca^{2+} , dopamin β hidroksilaz ve kromogranin A proteini dahil bazı maddeleri içerirler. Bir katekolamin ATP 'ye bağımlı transport mekanizması ile

granüle dahil olur ve bu nükleotidi 4:1 oranında (hormon: ATP) bağlar. Norepinefrin de bu granüllerde depolanmıştır fakat N-metilasyona uğramak üzere granülü terk edebilir ve ondan sonra gelen epinefrin yeni bir granül topluluğuna dahil olur [23].

Adrenal medullanın nöral uyarılması depolanma granüllerine ait membranların plazma membranı ile birleşmesine yol açar ki bu olay bu da norepinefrin ve epinefrin'nin ekzositoz yoluyla salınımına neden olur. Bu kalsiyuma bağımlı bir olaydır ve pekçok ekzositoz olayında olduğu gibi kolinerjik ve β adrenerjik ajanlar ile uyarılır; α adrenerjik ajanlar ile kısıtlanır (Şekil 1.3.). Dopamin β hidroksilaz, kalsiyum ve kromogranin dahil tüm içerik gibi katekolaminler ve ATP de intragranüler oranları ile uyumlu salgılanır [23].



Şekil 1.3. Katekolamin Biyosentezinin Şematik Olarak Gösterilmesi. TH; Tirozin Hidroksilaz, DP dopa dekarboksilaz; PNMT fenil etanolamin N-Metiltransferaz; DBH dopamin β hidroksilaz; ATP Adenozin trifosfat.

Katekolamin biyosentezi stoplazmada ve adreno medullar hücrelerin muhtelif granüllerinde olur. Bazı granüller epinefrin (E), diğerleri norepinefrin (NE), bazıları da her ikisini birden içerirler. Stimulasyon ile granül içeriği ekstra selüler sıvıya (ECF) boşalır [23].

Katekolaminlerin nöronal salınımı, bu hormonların muhafazası ve hormonal ve nörotransmitter aktivitesinin süratli sonlandırılması için önemli bir mekanizmadır. Sempatik sinirlerden farklı olarak adrenal medulla, salınmış katekolaminlerin depolanma ve alınımı ile ilgili bir mekanizmaya sahip değildir. Adrenalden salınan

epinefrin, karaciğer ve iskelet kasına gider, fakat ondan sonra süratle metabolize olur. Adrenal norepinefrinin ancak çok az miktarı distal dokulara erişir. Katekolaminler plazmada albumin ile gevşek bir bağlantı içinde dolaşıma katılır. Katekolaminleri biyolojik örneklerde ölçmek; feokromasitoma, nöroblastostoma, parkinson hastalığının klinik teşhisinde ve sinir sisteminin araştırılmasında yararlıdır [24].

Katekolaminler kan beyin engelini aşamadıklarından beyinde yerel olarak sentez edilmelidirler. Bazı santral sinir sistemi hastalıklarında örneğin; Parkinson hastalığında dopamin sentezinin lokal bir yetmezliği söz konusudur. Dopamin prekürsörü olan L-Dopa, kolayca kan beyin engelini aştığından parkinson hastalığının tedavisinde önemli bir ajandır [23]. Temel iç kaynaklı katekolaminler (epinefrin, norepinefrin, ve dopamin)'in vücut sıvısında ölçülmesine merkezi ve periferik adrenerjik fonksiyonlardaki anormalliklerin teşhis edilmesi için ihtiyaç duyulur [25].

Genel olarak katekolaminlerin görevleri ise 6 grupta toplanır.

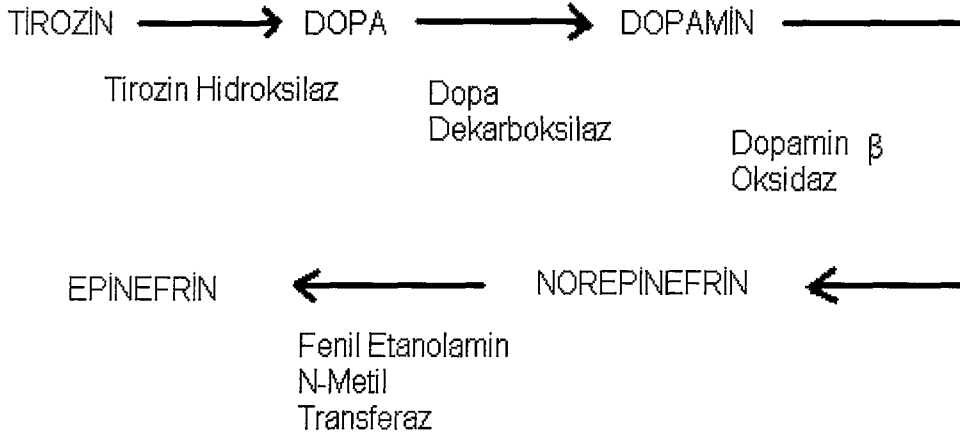
1. Periferik uyarma işlevi (örn: Kan damarlarının büzülmesi),
2. Periferik inhibe edici işlev (örn: bronşiyal genişleme),
3. Kalp uyarma işlevi (örn: kasılmada artış),
4. Metabolik işlevler (örn: Glikogenolizis),
5. Endokrin işlevler,
6. Merkezi sinir sistemi işlevleri;

Bu işlevlerin yanı sıra katekolaminlerin ekzokrin bezler, iskelet kası, uterus kası, hipotalamus gibi değişik yapıların üzerinde de etkileri vardır [27].

Kronik soğuk stresi ve kimyasal simpatetomi, adrenal medullada katekolaminlerin sentezi ve salınımını artırmaktadır [10].

1.3. Tirozin Hidroksilaz

Tirozin hidroksilaz, triptofan hidroksilaz ve fenilalanin hidroksilaz gibi aromatik aminoasit hidroksilazlar olarak bilinen enzimler grubunda yer alır. Tirozin hidroksilaz enzimi katekolaminlerin hormonal işlevinde ve nörotransmisyonunda önemli rol oynar. Bu enzim ile katalizlenen yolda dopa, dopamin, norepinefrin, epinefrin sentezlenmektedir [30].



Şekil 1.4. Katekolaminlerin sentez mekanizması [5].

Tirozin hidroksilaz katekolaminlerin biyosentezinde hız sınırlayıcı reaksiyon olan L-Tyr'nin L-DOPA'ne hidroksilasyonunu katalizler [9]. Tirozin hidroksilaz sadece katekolaminleri sentez eden dokularda hem solubl hem de partiküle bağımlı formda bulunur. Kofaktör olarak tetra hidropterin varlığında L- tirozini, L-dihidroksi fenil alanine (L-DOPA) dönüştüren bir oksidoredüktaz olarak fonksiyon gösterir [23].

Hız sınırlayıcı bir enzim olarak genelde tirozin hidroksilaz genel olarak beyindeki dopaminerjik ve noradrenerjik nöronlarda, periferik sempatik sinir sisteminde ve adrenal medulladaki kromaffin hücrelerde ifade edilir [9].

Tirozin hidroksilaz aktivitesi çeşitli şekillerde düzenlenir. En önemli mekanizma, pteridin kofaktörü ile bir schiff bazı oluşturarak bu kofaktör için enzim ile yarışan katekolaminlerin “geri bildirimli” inhibisyonunu kapsamaktadır.

Tirozin hidroksilaz aktivitesi, α metil tirozin dahil bir seri tirozin türeviden tarafından da rekabete bağımlı olarak kısıtlanmaktadır. Bu bileşik ara sıra feokromasitomada katekolamin fazlalığını tedavi etmek için kullanılmaktadır. Fakat diğer ajanlar daha etkili oldukları gibi yan tesirleri de daha azdır. Üçüncü bir grup bileşik demir şelatlıyarak tirozin hidroksilazı kısıtlayarak, böylelikle mevcut kofaktörü uzaklaştırır [23].

İnsanda tirozin hidroksilaz kodlayan gen 11p15 kromozomuna yerleşmiştir ve 14 eksondan düzenlenir [8].

TH' nın beyindeki ifadesi ilaçlar, büyüme faktörleri ve stresi içeren psikolojik ve farmakolojik faktörlerce düzenlenir. TH ifadesindeki değişiklikler LC (lokus korelus)'un noradrenerjik nöronlarının aktivitesindeki değişiklikleri yansıtır. Bu nöronların tetikleyici aktivitesini artıran faktörler, LC'de TH konsantrasyonunun artışı da indükler. Bu nöronların tetikleyici aktivitesini azaltan trisiklik antidepresanlar gibi faktörler de LC'deki TH 'ı düşürür [28].

Sıçanların kullanıldığı pek çok çalışmada katekolaminlerin biyosentezinde hız sınırlayıcı adımı katalizleyen TH enziminin, uzun süreli stres sonrası ve katekolamin yıkıcı rezepin gibi ilaçlarla müdahale sonucu beyin noradrenerjik nöronlarında ve periferel sinir sisteminin sempatik gangliyonlarında, adrenal medullada arttığı gözlenmiştir [11].

Kronik soğuk stresine maruz bırakılma yoluyla indüklenen TH katalizleme reaksiyonunun maksimum hızındaki değişiklikler enzim miktarı ve sentez oranındaki artıştan kaynaklanır [29].

Son zamanlarda yapılan çalışmalar katekolamin salınımına artan ihtiyaca cevap olarak TH'nın kofaktörüne affinitesinde hızlı bir artış ve büyük ihtimalle enzim indüklenmesi nedeniyle maksimum TH aktivitesinde dereceli bir artışın görüldüğünü kanıtlar [3].

Kronik soğuğa maruz bırakılma adrenal TH aktivitesinde dereceli bir artışla sonuçlanmıştır. Bu sonuçlar insülinin veya fenoksibenzaminin tekrarlı bir şekilde enjeksiyonundan sonra TH'da bir artış olduğu ve soğuk stres sonrası adrenal TH'da bir artışa işaret eden çalışmalarla birbirine uygunluk göstermektedir. Ayrıca maksimum TH aktivitesindeki artış, enzimin kofaktörünün artmasına yol açtığı görüşüyle de uyuşmaktadır [3].

Soğuğa maruz bırakılma beyin sapı ve adrenal medullada TH mRNA seviyesinde ve TH aktivitesinde artışa neden olmuştur. Soğuğa cevapta sempatik aktivitedeki bu artış vücut sıcaklığının sürdürülmesi için önemli bir faktördür. Ancak daha yaşlı sıçanlar, soğuğa maruz bırakıldıklarında vücut sıcaklıklarını gençler kadar iyi koruyamazlar. Bu da muhtemelen katekolamin sentezine yetersiz cevap nedeniyle olmaktadır [12].

Yapılan bir çalışma artan yaşa bağlı olarak TH enzim aktivitesinde istatistiksel olarak bir azalma olduğu yönündedir [26].

Soğuga maruz bırakmanın adrenal TH aktivitesinde dereceli bir artışı indüklediği ve bunu da TH mRNA'nın hücreden bağımsız translasyon aktivitesi ve dağılımındaki değişikliklerin eşlik ettiği rapor edilmiştir [29].

Soğuga maruz kalmanın beyin, adrenal medulla ve kalbi içeren merkezi sinir sisteminde olduğu gibi periferde de katekolaminlerin sentezini ve salınımını artırdığı bilinmektedir. Bunun yanı sıra, beyin kökünde ve adrenal medullada soğuga maruz kalma sonucu artan TH mRNA seviyelerinin soğuga maruz kalma yolu ile indüklenen TH aktivitesindeki artışlara aracılık ettiği ifade edilmiştir. Soğuga cevapta simpatik aktivitedeki bu değişiklikler vücut sıcaklığının sürdürülmesi açısından önemli bir faktör olabilir [12].

Soğuga maruz bırakma LC'de TH aktivitesinde, proteininde, mRNA'sında önemli bir artışı uyardığı bildirilmiştir [30].

Rezerpin verilmesi veya soğuk stresi nedeniyle periferal adrenerjik dokulardaki TH aktivitesindeki uzun süreli artışlar TH mRNA seviyesindeki artıştan kaynaklanır ve bu TH genindeki değişiklikleri veya TH mRNA türlerinin stabilitesindeki değişiklikleri yansıtabilir [30].

Yeni sentezlenen TH molekülleri katalitik olarak inaktiftir. Bundan dolayı TH mRNA profillerinin, proteinin ve enzim aktivitesinin indüklenmesi, soğuga cevapta adrenal TH aktivitesinin düzeylerinin düzenlenmesinde hem translasyon öncesi hem de translasyon sonrası mekanizmalar rol oynayabilmektedir [29].

TH aktivitesinin soğuk stres etkilerine göre değişmesinde translasyon sonrası mekanizmalar gibi translasyon öncesi mekanizmalar da aracılık edebilmektedir. Bunun yanısıra; adrenomedullaya ait biyopterin içeriğindeki artışı, zaman zaman katekolamin sentez oranındaki artışların kolaylaştırabileceği düşünülmektedir [29].

1.4. Adrenomedullin

Adrenomedullin, insan feokromasitoma hücrelerinden orijinal olarak izole edilen etkin bir hipotansif peptiddir [13].

Proadrenomedullin N-terminal 20 peptit (PAMP) adrenal medullada katekolaminlerin sentezini inhibe eden ve etkin vasküler etkilere sahip olduğu bilinen son zamanlarda tanımlanan preadrenomedullinin bir ayrılama ürünüdür. PAMP çeşitli dokularda üretilir ama en yüksek konsantrasyonda farklı canlıların adrenal bezlerinde bulunmuştur [31].

Sıçan dokularında PAMP için bağlanma yerleri tarif edilmiştir. Mevcut bilgiler adrenal bezlerin hem içinde hem de dışında PAMP için spesifik bağlanma yerlerinin varlığını kanıtlar [31].

Orjinal olarak feokromasitoma ve adrenalmedullada tanımlanan adrenomedullin gen ürünleri, adrenal korteksi, böbrekleri, akciğer, kalp, dalak, ince barsak tükrük bezleri ve beyinide içeren birçok dokuda ortaya çıkarıldı. En çok transkripsiyon ise; endotelial hücrelerde gözlemlendi [14]. Radioimmunosay ve immuno histokimyasal çalışmalarda adrenomedullinin benzeri immunoreaktivite'nin insan, sıçan, domuz ve köpek dokularında dağılımı incelenmiş ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir (çizelge 1.1.)

Çizelge 1.1. Adrenomedullin (AdM) benzeri immünoreaktivitenin doku lokalizasyonu [14].

Organ-doku	İnsan	Sıçan	Domuz	Köpek
Adrenal medulla	+	+	+	-
Kan Damarları	+	+	-	+
Böbrek	+	+	-	+
Ön Hipofiz	+	+	+	-
Hipotalamus	+	+	-	-
Kalp	+	+	-	-
Akciğer	+	+	-	+
Trioid	+	+	-	-
Çene altı bezleri	-	+	-	-
Karaciğer	+	+	-	-
Pankreas	+	+	+	-
Mide	+	+	+	-
Barsak	+	+	+	-
Testis	-	+	-	-
Kroid pleksus	+	+	+	-

Aşırı hacim artışı ve hızlı ventriküler gelişim gibi fiziksel faktörler adrenomedullin gen transkripsiyonunu aktive edebilir. Ama en iyi karakterize edilmiş aktivatörler sitokinler ve büyüme hormonlarıdır. Kültürü yapılan vasküler düz kas hücreleri, lipopolisakkaritler, interlökin-1 ve tümör nekrozis faktör α , adrenomedullin gen transkripsiyonunu uyarır [14].

Sıçanlara lipopolisakkarit verilmesi aortta, akciğerlerde, adrenal bezlerde, iskelet ve kalp kasında, beyinde böbrekte, çenealtı bezinde ve ince bağırsağın alt ve üst yarısında adrenomedullin gen ifadesini arttırmıştır [14].

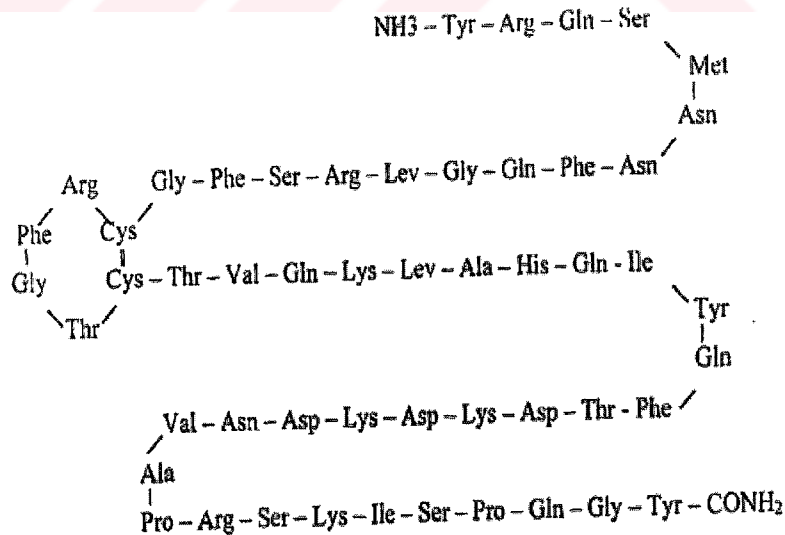
AdM gen uyarıcıları arasında ayrıca retionik asit, minerelokortikoid, glukokortikoid ve tiroid hormonu sayılabilir [14]. AdM'nin farmakolojik etkilerine CGRP (kalsitonin geni ile ilgili bir peptit) reseptörünce aracılık edildiği bilinmektedir. Çünkü her iki peptit de önemli yapısal homolojiyi paylaşmaktadırlar ve CGRP antogonistiği (CGRP₈₋₃₇)'in adrenomedullinin bazı görevlerini bloke ettiği gösterilmiştir [14].

İmmunohistokimyasal çalışmalar, adrenomedullin nöronlarının sıçanlarda ve insanlarda paraventriküler ve supraoptik nükleuslarda bulunduğunu gösterir [13].

Adrenomedullin memeli adrenal medullasında yüksek miktarda bulunmuştur. Sıçanların hem adrenal medullalarında hem de adrenal kortekslerinde adrenomedullin için spesifik bağlanma yerlerinin varlığı kanıtlanmıştır. Bunların kanıtlanmasında biyokimyasal tekniklerle insan adrenal bezlerindeki otoradyografi çalışmalarından faydalanılmıştır [16].

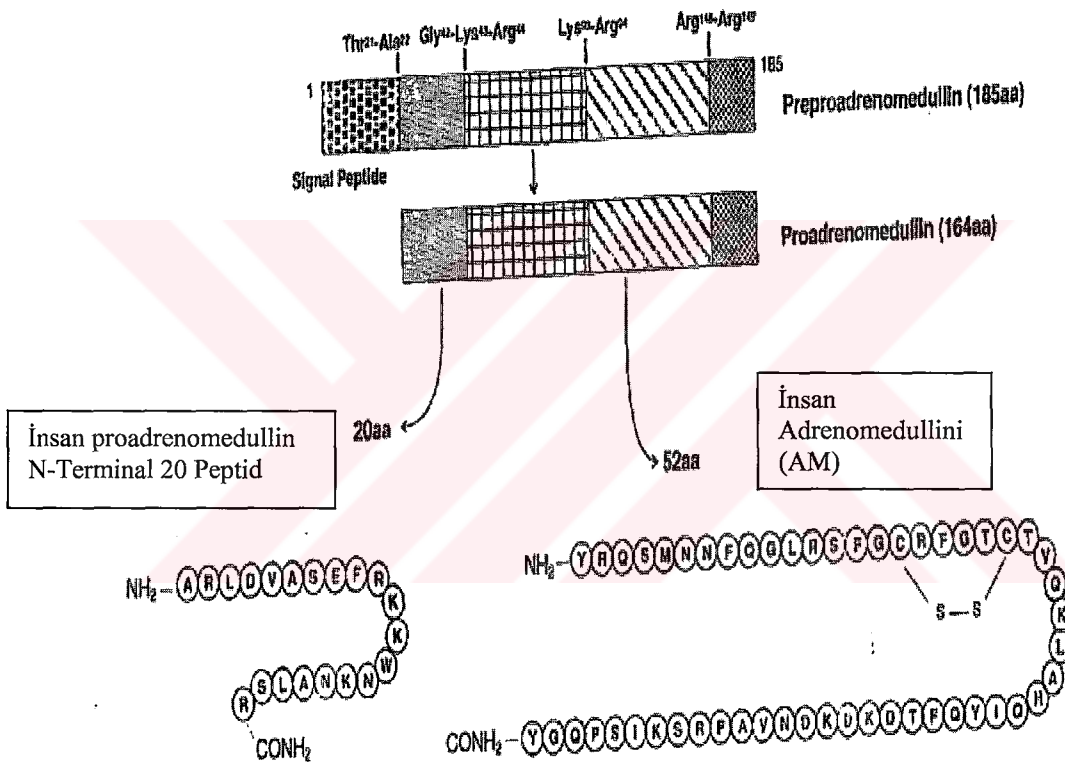
1.5. Adrenomedullinin Yapısal Özellikleri

İnsan adrenomedullini 52 amino asitten oluşan bir molekül içi disülfid bağı ve C-terminal amid yapısı tarafından kurulan halkasal bir yapıdır [15].



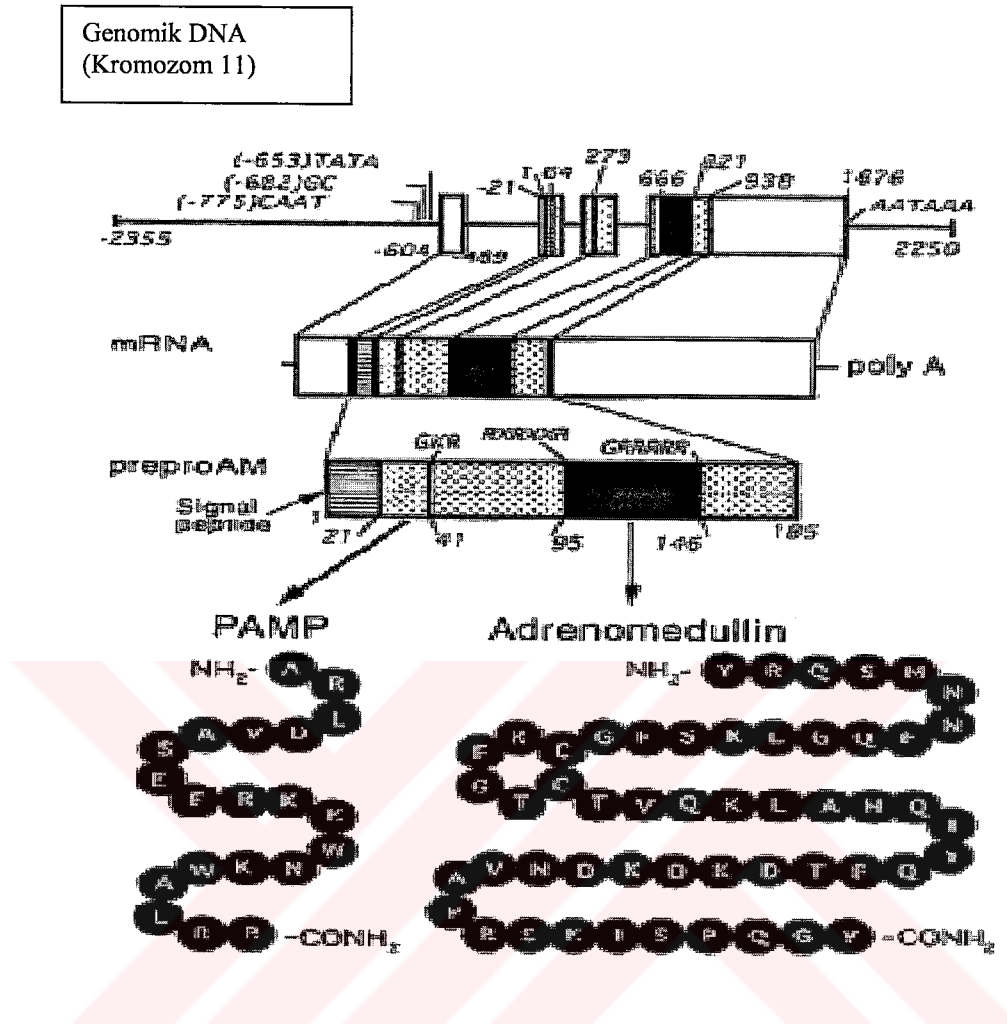
Şekil 1.5. İnsan Adrenomedullinin'nin aminoasit dizilimi [26].

Adrenomedullin, preadrenomedullin olarak adlandırılan 185 aa'lık bir prohormonun translasyon sonrası işlemleri ile oluşturulur [16]. İnsan adrenomedullini tek bir iç disülfid bağı içeren 52 aa'lık bir peptiddir. 185 aa'lık hormon öncüsü preadrenomedullin, biyolojik olarak aktif peptitler olan adrenomedullin ve proadrenomedullin N-terminal 20 peptidi içerir [13].(şekil 1.6)



Şekil 1.6. İnsan proadrenomedullin gen ürününün translasyon sonrası işlemleri [14].

Adrenomedullin geni 4 ekson ve 3 introndan oluşmuş ve 11. kromozomda tek bir lokus içerisinde yerleşmiştir. Adrenomedullinin olgun formu 4. eksonda kodlanır. Genin 5' ucunda TATA, CATT ve GC kutuları ve aynı zamanda aktivatör protein – 2(AP2) ve cAMP ile düzenlenen indükleyici regülasyon proteinleri için birçok bağlanma yeri vardır [15].



Şekil 1.7. Adrenomedullin sentezi, AM genomik DNA, AM mRNA, preproAM, AM ve PAMP [15].

Preproadrenomedullinden çıkan peptidlerin kalsitonin geni ile ilgili peptit (kalsitonin ve amilin'i) içeren CGRP süper familyasının üyeleri olduğu düşünülmektedir. 185 aminoasitlik adrenomedullin prekürsörünün adrenomedullin dizisini taşımakta ve diğer bir biyoaktif peptit proadrenomedullin N-terminal 20 peptit bu prekürsörde tanımlanmıştır [13].

1.6. Adrenomedullinin Biyolojik Etkileri

AdM (adrenomedullin), endotelial hücrelerde nitrik oksit (NO) üretimini uyarırken, PAMP (proadrenomedullin N-Terminal 20 peptid) kan basıncını arttıran

adrenerjik sinirleri inhibe eder. Her iki peptit de ön hipofizde ACTH (adrenokortikotropin) salınımını inhibe eder [14].

Adrenal bezlerde hem AdM hem de PAMP, potasyum ve angiotensin II ile uyarılan aldosteron salınımını inhibe eder [14]. AdM'nin Ca^{2+} kanallarının aracılık ettiği Ca^{2+} akışını bozarak muhtemel bir mekanizma yolu ile aldosteron salınımını inhibe ettiği tespit edilmiştir [16].

Adrenomedullinin böbreğin görevleri üzerine natriüretik ve diüretik etkisi ile, sıvı ve elektrolit dengesini düzenler ve homeostazisi sağlar. Beyinde adrenomedullin su alımını ve tuz isteğini inhibe eder [14].

Yapılan bazı çalışmalarda AdM'in renal kan akışı üzerine etkilerine NO tarafından aracılık edildiği bulunmuştur. Anestezi yapılan sıçanlara böbrek içi AdM verilmesi renal kan akışını, arteriyal iletkenliği, glomerular filtrasyonu, idrar ve sodyum boşaltımını artırır. AdM, anestezi yapılan sıçanlarda periferal verildiğinde ortalama kan basıncındaki düşüş, renal kan basıncı ve idrardaki artış sürdürülür. Bu değişikliklerin böbrekte artan NO salınımı ile ilgili olduğu düşünülmektedir [14].

Distal tübülün kıvrımlı olan kısmı daima afferent arteriyole yakın bulunur. Tübülün bu kısmında macula densa adı verilen bir yapı, afferent arteriyol ile temas halindedir ve bu bölgede afferent arteriyolün düz kasları değişerek, juxtaglomerular hücreleri meydana getirirler. Bu hücrelerin endokrin bir görev yaptığı ve renin salgıladığı kabul edilmektedir. Juxtaglomerular aparat böbrekten kan akımının ayarlanması (otoregülayon ile) ilgilidir.

Angiotensin II'in, arteriyollerin düz kaslarında ve adrenal korteksteki özel reseptörlere etkisi ile arteriyal kan basıncının normal tutulmasında önemli rolü vardır. Ayrıca, vücutta sodyum azlığı mevcut ise, Angiotensin II böbrek kan akımının homeostatik regülasyonunda görevlidir [51]. (şekil1.8.)

Adrenomedullin intravenöz olarak verildiğinde kan basıncını düşürür [14]. Intravenöz olarak AdM verilmesi total periferal rezistanstaki artışla ilgili ortalama kan basıncında hızlı ve önemli bir azalmaya neden olmuştur. Böylece AdM'nin etkin bir vasodilatör olduğu ve kan basıncının düzenlenmesinde rol oynadığı tespit edilmiştir [18].

AdM ve PAMP her iki peptit de belli durumlarda dolaşım hormonları olarak görev yaparlar [14].

İmmunohistokimyasal lokalizasyon çalışmaları pankreasta adrenomedullin varlığını kanıtlamıştır. Lokal olarak üretilen yada dolaşımdaki adrenomedullin'in insülin sekresyonunu düzenleyebildiği gösterilmiştir [14].

Akciğer vasodilasyonunun yanı sıra adrenomedullin, asetilkolin ve histamine cevapta bronşların tıkanmasını inhibe ederek, akut astım ataklarında peptitlerin plazma seviyesini artırarak fizyolojik bir rol oynar. Adrenomedullinin vasodilatör etkisi, akciğer döngüsünü korumada da rol oynayabilir. Sonuç olarak içsel adrenomedullin akciğerde yangı önleyici rolünü de üstlenir [14].

Son zamanlarda tanımlanan proadrenomedullin N- terminal 20 peptit'in, etkin vasküler etkilerinin olduğu ve adrenal medullada katekolamin sentezini inhibe ettiği bulunmuştur [31]. Yapılan bir çalışmada yine PAMP'nin sıçan zona glomerulosa hücrelerinde aldosteron üretimi üzerine inhibitör etkisinin adrenomedullinden daha fazla olduğu bulunmuştur [14].

Beyindeki nöronlara yerleşen adrenomedullin gen ürünlerinin kardiyovasküler fonksiyonun regülasyonunda önemli olduğu bilinmektedir [32].

Adrenomedullin periferal olarak verildiğinde etkin vasodilatör etkisi, natriüretik ve diüretik etkisi görülür. Buna ek olarak kalp ve böbrek hastalıklarında ve yüksek tansiyon gibi patolojik durumlarda plazmada ve dokulardaki adrenomedullin konsantrasyonu artırılır. Bundan dolayı adrenomedullinin dolaşımın regülasyonunda ve vücut su dengesinde rol oynadığı önerilir [33].

Adrenomedullin, vasodilasyonun intraselüler mekanizmasını uyarmaktadır. AdM'nin vasodilasyonla kan basıncını azalttığı önerilmektedir [18]. Adrenomedullin'in damar genişlemesini düz kas hücrelerinde cAMP düzeyini arttıran adenilat siklaz aktivitesini uyarak yapar [49].

Adrenomedullinin vasodilatör etkisine ek olarak, hücre çoğalması ve farklılaşması, beyindeki ve hipofizdeki biyolojik aktiviteler üzerine düzenleyici etkisi vardır. Intra-serebro ventriküler olarak adrenomedullin enjeksiyonu kan basıncını artırır, su içmeyi ve beslenmeyi inhibe eder [34].

Adrenomedullin trombosit cAMP üretimi üzerine uyarıcı etkisiyle de bilinir [34].

PAMP'nin sıçan adrenalinde cAMP düzeyini arttıran spesifik bir reseptör olarak rol oynadığı önerilmektedir [31].

Katekolaminler strese tepkide, beyin, adrenal medulla, kalp ve simpatik sinir uçlarından salınmaktadır. TH enzimi de katekolaminlerin sentezinde ilk basamağı katalizlemektedir. Bu nedenle TH enzimi bu yolda anahtar rol oynamaktadır. Adrenomedullin ise; organizmadaki rolü dikkate alındığında onun da strese adaptasyonda rol oynadığı görülmektedir.

Bu çalışmada bir hafta soğuk stresi uygulamasının kalp, adrenal medulla ve hipotalamus dokularında TH enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması ile strese adaptasyonda muhtemel rol oynadığı düşünülen adrenomedullin düzeylerinin kalp, adrenal medulla, hipotalamus, böbrek, çizgili ve düz kas dokularında değişiminin araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Yapılan bir çalışmada, soğuk stresinin sıçan adrenal tirozin hidroksilaz'ı üzerine etkileri araştırılmıştır. RNA, protein, enzim aktivitesi ve kofaktör seviyeleri analiz edilmiştir. Bu çalışma TH aktivitesinde soğğun indüklediği değişikliklere, translasyon öncesi ve translasyon sonrası regulasyonları da içerebilen pek çok hücresel kontrol mekanizmalarınca aracılık edildiği saptanmıştır. Ayrıca TH kofaktörü seviyesinde soğğun indüklediği artışlar simpato adrenal sistemin soğğa cevabında başka bir anahtar olaya işaret ettiği tespit edilmiştir [29].

Yapılan başka bir çalışmada egzersizin sıçan hipotalamusunda yaşa bağlı olarak TH ifadesinde azalmaya neden olup olmadığı araştırılmış ve araştırma sonuçlarına göre egzersiz uygulamasının yaşlı hayvanların hipotalamusunda TH mRNA'ında, TH immünoreaktivitesi ve TH aktivitesinde önemli bir artışa neden olduğu ama genç hayvanlarda bu parametrelerin hiç birinde önemli bir değişikliğin olmadığı bulunmuştur [36].

Yapılan diğer bir çalışmada ise; insan glial hücre tümörlerinde ve kültürlenmiş glioblastoma hücre soyunda T986 ve A172 adrenomedullin ve onun mRNA ifadesi çalışılmıştır. Adrenomedullin'in glial hücre tümörlerinden salındığı ve bu tümörlerin patofizyolojisiyle ilgili olduğu bulunmuştur [34].

Bir başka çalışmada, proadrenomedullin N-Terminal 20 peptit (PAMP) reseptörleri ve sıçan adrenal bezlerinde sinyal üretimi üzerine bir çalışılmış ve PAMP'nin sıçan adrenalinde cAMP düzeyini artıran spesifik bir reseptör olarak rol oynadığı önerilmiştir [31].

Yapılan bir çalışmada ise; sıçan adrenal bezlerinde adrenomedullin (AdM) reseptörlerinin dağılımı, fonksiyonel rolü ve sinyal mekanizması araştırılmış ve;

1. AdM'nin, korteks ve medullada farklı sinyal mekanizmalarını harekete geçiren AdM (22-52) –duyarlı CGRP₁ reseptörlerini harekete geçirerek sıçan adrenal sekresyonunu ayarladığı,
2. AdM'nin Ca²⁺ kanallarının aracılık ettiği Ca²⁺ akışının blokasyonunu içeren muhtemel bir mekanizma yolu ile antogonistiğin uyardığı aldesteron salınımını inhibe ettiği,
3. AdM'nin adenilat siklazı PKA sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla katekolamin salınımını arttırdığı, bulunmuştur [16].

Yapılan bir çalışmada adrenomedullin'in hipotalamik oksitosin salınımını aktive ederek oksitosin salınımını uyardığı ve sıçanlarda tuz alınımları ve sıvı dengesinde önemli bir rolü olduğu saptanmıştır [13].

Adrenomedullin damar genişlemesini düz kas hücrelerinde cAMP düzeyini artıran adenilat siklaz aktivitesini uyararak yapar. Son zamanlarda insan adrenomedullin cDNA'sı ve mRNA ifadesi adrenal bezlerde, akciğerde, böbrek ve kalpte klonlanmıştır [49].

Adrenomedullin'in bir çok hastalığın patogenezinde de rol oynadığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada, Behçet sendromu aktif ve inaktif olan hastalarda üriner adrenomedullin seviyeleri ölçülmüştür. Behçet hastalarında üriner adrenomedullin'nin kontrollere göre yüksek olduğu saptanmıştır [40].

Yapılan bir başka çalışmada ise; şizofrenide, plazma nitrik oksit (NO) ve adrenomedullin'nin muhtemel patofizyolojik rolü araştırılmış, şizofrenili grupta plazma nitrit ve adrenomedullin seviyelerinin ortalama değerlerinin kontrol değerlerine göre oldukça yüksek olduğu ve hem adrenomedullinin hem de NO'in şizofrenide, klinik simpatolojide ve şizofreninin teşhisinde önemli olduğu bulunmuştur [41].

Yapılan diğer bir çalışmada, bipolar efektif bozukluklar (BPAD)'da NO ve adrenomedullin (AdM)'nin muhtemel rolü incelenmiş ve BPAD'li hastalarda AdM ve NO seviyelerinin kontrollere göre oldukça yüksek olduğu bulunmuş ve hem adrenomedullinin hem de NO'in BPAD'de, klinik simpatolojide ve BPAD'nin teşhisinde önemli olduğu saptanmıştır [42].

Yapılan bir başka çalışmada, çocuklarda geceleri idrar kaçırma hastalığında adrenomedullin (AdM) ve nitrit seviyeleri ölçülmüş ve plazma AdM ve total nitrit seviyelerinin kontrollere göre önemli derecede düşük olduğu bulunmuştur [43].

Yapılan bir çalışmada ise, kardiyomyopati çocuklarda adrenomedullin (AdM) ve nitrit düzeyleri araştırılmış ve plazma ve üriner nitrit seviyeleri hasta ve kontrollerde değişmezken, plazma ve üriner AdM seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir [44].

Yapılan başka bir çalışmada, otistik hastalarda ortalama plazma total nitrit ve adrenomedullin (AdM) düzeyleri kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek olduğu bulunmuştur [39].

3.MATERYAL VE METOD

3.1. Çalışmada kullanılan sıçanlar

Çalışmada İnönü üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinde üretilen 200-250 g ağırlığında Sprague-Dawley sıçanı (*Rattus rattus*) kullanıldı (n=6). İki aylık sıçanlar belli şartlarda (12 saat aydınlık-karanlık, havalandırılmalı, sabit ısılı odalarda) özel kafeslerde barındırıldı. Hayvanlar standart sıçan yemi ile beslendi ve içebildikleri kadar su verildi.

Çalışmada 6 adet sıçan diğerlerinden ayrı normal şartlarda tutularak kontrol grubu olarak değerlendirildi.

3.2. Soğuk Stresi Uygulaması

Soğuk stres uygulaması için ağırlıkları 200-250 g arasında değişen 6 adet sıçan bir hafta süre ile +8 °C 'de soğuğa maruz bırakıldı. Her kafeste bir hayvan olacak şekilde, sıçanlar 20 dakika aralıklar ile soğuk stresi uygulamasına alındı. Kontrol grubunu oluşturan altı adet sıçan ise oda sıcaklığında muhafaza edildi. Hayvanlara yeteri kadar yem ve su verildi. Bir hafta sonra 20 dakika aralıklar ile sıçanların dokuları alındı.

3.3. Diseksiyon İşlemi

Bütün kontrol ve uygulama grubuna ait sıçanlar uygulamalardan sonra disekte edildi. Sıçanları bayıltmak için anestezik madde olan ürethan kullanıldı. Sıçanlara ürethan 1mg/kg dozda abdominal bölgeye enjeksiyon ile verilerek bayılma işlemi 3-5 dakika içinde tamamlandı. Tüm uygulama ve kontrol grubundaki hayvanlar bayılma işleminden sonra abdomenlerine bir kesik yapılarak vücudun iç kısmı yukarıya doğru göğüs kafesine kadar açıldı. Daha sonra vena-kava kesilip kalbe 40ml %0,9 luk NaCl enjekte edilerek perfüzyon işlemi tamamlandı.

3.4. Adrenal Bezlerin Alınması ve Homojenizasyonu

Adrenal bezler etrafındaki yağlardan arındırılarak çıkartıldı. Darası alınan mikro santrifüj tüplere bir parça alınarak ağırlıkları kaydedildi. Tartım işleminden sonra 150µl

2mM fosfat tamponu (pH 7,2'de %0.2 triton) ilave edildi. 5-10 saniye ultrasonifikatörde homojenize edildi. Doku homejenatları kullanılıncaya kadar – 40 °C de derin dondurucuda saklandı.

3.5. Kalbin Alınması ve Homojenizasyonu

Adrenal bezleri alınan sıçanın daha sonra kalbi çıkartıldı. Darası alınan mikro santrifüj tüplere bir parça alınarak ağırlıkları kaydedildi. Tartım işleminden sonra 150µl 2mM fosfat tamponu (pH 7,2'de %0.2 triton) ilave edildi. 5-10 saniye ultrasonifikatörde homojenize edildi. Doku homejenatları kullanılıncaya kadar – 40 °C de derin dondurucuda saklandı.

3.6. Hipotalamusun Alınması ve Homojenizasyonu

Sıçanın hipotalamusu alınmak için kafatası açılarak beyin tüm olarak çıkarıldı ve hipotalamus bölgesi dikkatlice alındı. Alınan hipotalamus darası bilinen mikrosantrifüj tüplere koyularak ağırlığı kaydedildi. Tartım işleminden sonra tüpe 150µl 2mM fosfat tamponu (pH 7,2'de %0.2 triton) ilave edildi. 5-10 saniye ultrasonifikatörde homojenize edildi. Doku homejenatları kullanılıncaya kadar – 40 °C de derin dondurucuda saklandı.

3.7. Böbreklerin Alınması ve Homojenizasyonu

Sıçanın böbreğinden bir parça alınarak darası bilinen mikro santrifüj tüplere konuldu ve ağırlıkları kaydedildi. Tartım işleminden sonra 150µl 2mM fosfat tamponu (pH 7,2'de %0.2 triton) ilave edildi. 5-10 saniye ultrasonifikatörde homojenize edildi. Doku homejenatları kullanılıncaya kadar – 40 °C de derin dondurucuda saklandı.

3.8. Çizgili kasın Alınması ve Homojenizasyonu

Sıçanın bacak bölgesinden çizgili kas alındı. Alınan çizgili kasın bir parçası darası bilinen mikrosantrifüj tüpe konuldu ve ağırlıkları kaydedildi. Tartım işleminden sonra 150µ/2mM fosfat tamponu (pH 7,2'de %0.2 triton) ilave edildi. 5-10 saniye

ultrasonifikatörde homojenize edildi. Doku homejenatları kullanılıncaya kadar – 40 °C de derin dondurucuda saklandı.

3.9. Düz Kasın Alınması ve Homojenizasyonu

Düz kas sıçanın bağırsağından alındı ve doku örnekleri darası bilinen mikrosantrifüjtüplere konularak ağırlıkları kaydedildi. Tartım işleminden sonra 150µl 2mM fosfat tamponu (pH 7,2'de %0.2 triton) ilave edildi. 5-10 saniye ultrasonifikatörde homojenize edildi. Doku homejenatları kullanılıncaya kadar – 40 °C de derin dondurucuda saklandı.

3.10. Toplam Protein Ölçümü

Toplam protein miktarını saptamak için Bradford yöntemi (1976) kullanıldı [35]. Bu yöntemde standart protein olarak Bovin Serum Albumin (BSA) kullanıldı. Standart grafiğe göre örneklerin toplam protein miktarları mikroplate okuyucuda saptandı.

3.11. Standart Tüplerin Hazırlanması

Standartlar 2µg-20µg BSA içerecek şekilde iki tekrarlı olarak hazırlandı. 1.standarta 158µl, 2.standarta 156µl, 3.standarta 154µl, 4.standarta 150µl, 5.standarta 145µl ve 6. Standarta 140µl su konuldu ve her bir standarta 40µl Bradford boya çözeltisi (sigma B-6916) ilave edilerek son edilerek son hacim 200µl'ye tamamlandı.

3.12. Örnek İçeren Tüplerin Hazırlanması

Doku homejenatları 50 kez sulandırıldı. Daha sonra her bir örnekten 20µl alınıp, 140µl su ilave edildi. Son olarak da her bir örneğe 40µl Bradford boya çözeltisi ilave edilerek hacim 200µl'ye tamamlandı.

Bütün tüpler hazırlandıktan sonra 5-60 dakika içerisinde 595 nm' de mikroplaka Okuyucuda (Molecular Devices Corp, Versamax®) absorbans okundu.

3.13. Tirozin Hidroksilaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Enzim aktivitesi Reinhard vd (1986)'den modifiye edilerek ölçülmüştür [50]. Enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan bileşikler Çizelge 3.1'de verilmiştir. Enzim aktivitesinin ölçülmesinde oluşan DOPA'nın absorbans değerleri kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Tirozin hidroksilaz enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları

Ölçüm Sayısı	20	30	40	50	60
0,5 M PIPES	100	150	200	250	300
1mg/ml Katalaz	40	60	80	100	120
2Mm tirozin	50	75	100	125	150
1Mm DTT	5	7.5	10	12.5	15
D H ₂ O	245	367.5	490	612.5	735
1Mm Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	10	15	20	25	30
30 mM 6MPH ₄	50	75	100	125	150
Son Hacim (µl)	500	750	1000	1250	1500

1. Tabloda verilen çözelti miktarları ölçüm sayısına göre tüplere ilave edildi. Tüpe her çözelti ilavesinden sonra tüp vorteksten geçirildi. Reaksiyonu başlatmak için gerekli kofaktör 6MPH₄ reaksiyon başlatılmadan hemen önce eklendi. Reaksiyon başlatılıncaya kadar reaksiyon karışımı içeren tüpler buz banyosu içine korundu.
2. Enzim örnekleri total protein sonuçlarına göre 25 mM PIPES tamponunda 20µg/25µl olacak şekilde iki tekrarlı hazırlandı.
2. Enzim içeren tüplere 25µl reaksiyon karışımından eklenerek hacim 50µl'ye tamamlandı ve reaksiyon 37°C'lik su banyosunda başlatıldı. Reaksiyonun tam 20 dakika sürmesi sağlandı.
3. Reaksiyon 20 dakika sonra 1 M HCl'den 750µl ilave edilerek durduruldu. Daha sonra tüpler vorteks'ten geçirilerek 330 nm'de spektrometrik ölçüm yapıldı.
4. Bir adet tüp kör olarak kullanıldı ve tüpe enzim yerine 25µl, 25 mM PIPES tamponu ile 25µl reaktif konuldu.
5. İki standart hazırlandı. Standartlara 252µl, 25 mM PIPES ve 25µl reaktif konuldu ve 750µl 1M HCl ile reaksiyon durduruldu.

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{Spesifik aktivite} = \frac{(\text{OD-örnek}) - (\text{OD kör})}{(\text{OD-std}) \cdot (0,33 \text{ saat}) \cdot 0,02 \text{ mg protein}} = \text{nmol / mg Protein/ saat}$$

3.14. Adrenomedullin Düzeylerinin Ölçülmesi

Adrenomedullin düzeyleri C.Evereklioğlu vd (2002)'den modifiye edilerek aşağıdaki gibi ölçülmüştür.

1. Homojenatlar mikro santrifüj tüplere alınarak +4°C 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
2. 20µl süpernatandan alınarak yeni mikro santrifüj tüplere aktarıldı.
3. Her tüp asetonitril ve trifloroasetik asit içeren tampon ile 1.5 mL/dakika akış hızlı çift pompalı ters-faz sistemli, C18 kolonundan geçirilerek HPLC (High Pressure Liquid Chromotography) (Cecil 1100)'de 220 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı [40].

3.15. İstatistiksel Yöntem

Bir hafta soğuk stresine maruz bırakılan sıçanların kalp, hipotalamus, adrenal medulla dokularındaki toplam protein miktarı ile TH enzim aktivitesindeki değişikliklerle kalp, hipotalamus, adrenal medulla, böbrek, düz kas, çizgili kas dokularındaki adrenomedullin düzeylerindeki değişikliklerin değerlendirilmesinde SPSS Windows programı kullanılmıştır. İstatistiksel analizler, her bir dokuda ölçülen parametrelerdeki farkın önemlilik derecesi ANOVA ve Least Significant Differences Testi (LSD) ile yapılmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart hata ile birlikte belirtilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Soğuk stres uygulamasına bağlı olarak sıçanların kalp, adrenal medulla ve hipotalamus dokularında toplam protein miktarı ve TH enzim aktivitesi araştırılırken, kalp, adrenal medulla, hipotalamus, böbrek, düz kas ve çizgili kas dokularında adrenomedullin düzeylerine saptandı. Sıçanlar kontrol ve 1 hafta soğuk stres olmak üzere iki gruba ayrıldı.

Sonuçlar, soğuk stresine bağlı olarak toplam protein miktarındaki değişiklikler, TH enzim aktivitesindeki değişiklikler, adrenomedullin düzeylerindeki değişiklikler olmak üzere üç ana başlık altında verilmiştir.

4.1. Bir Hafta Soğuk Stresine Maruz Bırakılan Sıçan Dokularında Toplam Protein Miktarında Gözlenen Değişiklikler

Bir hafta boyunca 8°C'de soğuğa maruz bırakılan sıçanların kalp, adrenal medulla ve hipotalamus dokularında toplam protein miktarındaki değişiklikler kontrol grubu ile karşılaştırılarak incelendi. Sonuçlar çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

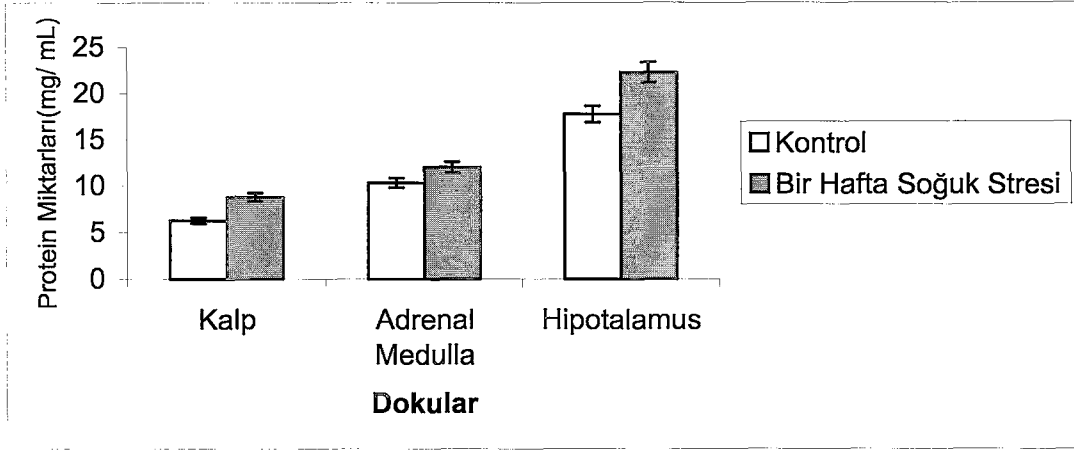
Sonuçlardaki istatistiksel farklılıklar kontrol grubu ile bir hafta soğuk stres uygulama grubu arasında belirlenmiştir.

Kontrol grubu ile bir hafta soğuk stres uygulama grubu arasında yaptığımız istatistiksel değerlendirmede, sıçanların kalp ve hipotalamus dokularında toplam protein miktarlarındaki fark önemli bulunmuştur. ($P < 0.05$), (çizelge 4.1.)

Kontrol grubu ile bir hafta soğuk stres uygulama grubu arasında yaptığımız istatistiksel değerlendirmede, sıçanların adrenal medulla dokularındaki toplam protein miktarındaki fark önemsiz bulunmuştur. ($P > 0.05$), (çizelge 4.1.)

Çizelge 4.1. Bir hafta soğuk stresine bırakılan sıçanlarda toplam protein miktarları (mg/mL)

	Kalp	Adrenal Medulla	Hipotalamus
Kontrol	6.26±0.32	10.31±0.45	17.33±0.37
Bir Hafta Soğuk Stresi	8.77±0.40	12.01±0.55	22.24±0.79



Şekil 4.1. Bir hafta soğuk stresine maruz bırakılan sıçan dokularında toplam protein miktarındaki değişiklikler.

4.2. Bir Hafta Soğuk Stresine Maruz Bırakılan Sıçan Dokularında TH Enzim Aktivitesinde Gözlenen Değişiklikler

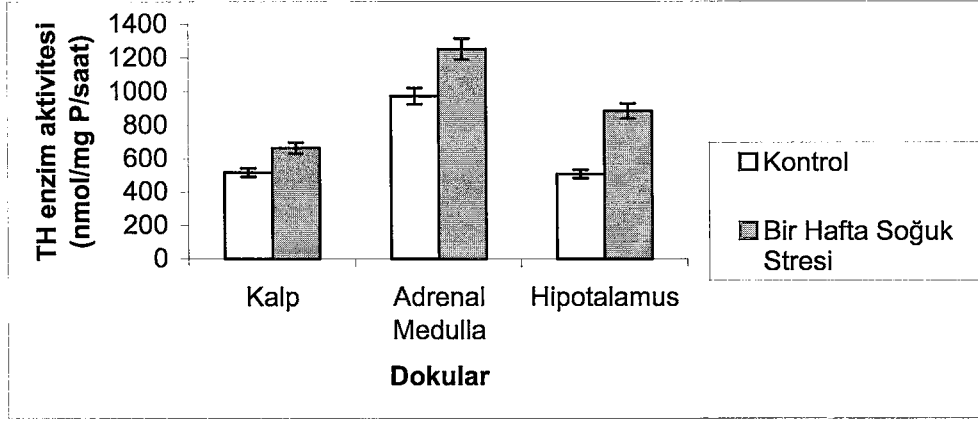
Bir hafta boyunca 8°C'de soğuğa maruz bırakılan sıçanların kalp, adrenal medulla, hipotalamus dokularında TH enzim aktivitesindeki değişiklikler kontrol grubu ile karşılaştırılarak incelendi. Sonuçlar çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Sonuçlardaki istatistiksel farklılıklar kontrol grubu ile bir hafta soğuk stresi uygulama grubu arasında belirlenmiştir.

Kontrol grubu ile bir hafta soğuk stres uygulama grubu arasında yaptığımız istatistiksel değerlendirmede sıçanların kalp, hipotalamus ve adrenal medulla dokularındaki TH enzim aktivitesindeki farklılıklar önemli bulunmuştur. ($P < 0.05$), (çizelge 4.2.)

Çizelge 4.2. Bir hafta soğuk stresine maruz kalan sıçanlarda tirozin hidroksilaz (TH) enzim aktivitesindeki değişiklikler (nmol/mg P/saat)

	Kalp	Adrenal Medulla	Hipotalamus
Kontrol	517 ± 2.17	973 ± 0.99	506 ± 2.12
Bir Hafta Soğuk Stresi	664 ± 3.21	1251 ± 4.11	884 ± 4.21



Şekil 4.2. Bir hafta soğuk stresine maruz kalan sıçanların dokularında tirozin hidroksilaz (TH) enzim aktivitesindeki değişiklikler

4.3. Bir Hafta Soğuk Stresine Maruz Bırakılan Sıçan Dokularında Adrenomedullin Düzeylerinde Gözlenen Değişiklikler

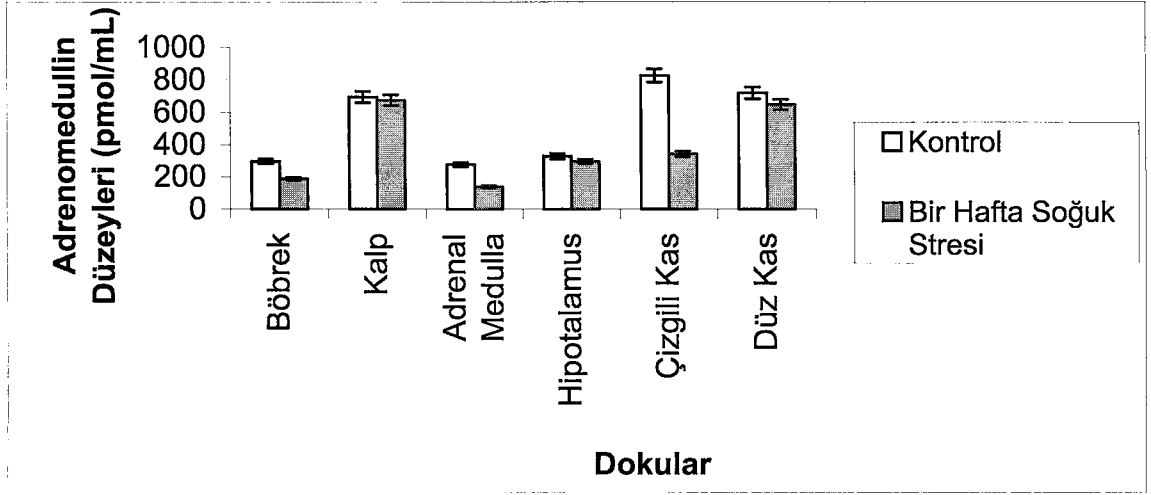
Bir hafta boyunca 8°C'de soğuğa maruz bırakılan sıçanların kalp, adrenal medulla, hipotalamus, düz kas, çizgili kas ve böbrek dokularında adrenomedullin düzeylerinde gözlenen değişiklikler kontrol grubu ile karşılaştırılarak incelendi. Sonuçlar çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Sonuçlardaki istatistiksel farklılıklar kontrol grubu ile bir hafta soğuk stresi uygulama grubu arasında belirlenmiştir.

Kontrol grubu ile bir hafta soğuk stresi uygulama grubu arasında yaptığımız istatistiksel değerlendirmede, sıçanların kalp, adrenal medulla, hipotalamus, düz kas, çizgili kas ve böbrek dokularında adrenomedullin düzeylerindeki fark önemli bulunmuştur. ($P < 0.05$), (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. Bir hafta soğuk stresine bırakılan sıçanlar dokularında adrenomedullin düzeylerindeki değişiklikler (pmol/mL)

	Kalp	Adrenal Medulla	Hipotalamus	Çizgili Kas	Düz Kas	Böbrek
Kontrol	296±3.92	694±1.9	276±1.72	329±1.12	825±3.62	719±1.81
Bir Hafta Soğuk Stresi	187±2.11	673±1.63	138±1.79	296±0.94	343±0.93	647±0.53



Şekil 4.3. Bir hafta soğuk stresine maruz kalan sıçan dokularında adrenomedullin düzeylerindeki değişiklikler

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Katekolaminler organizmada, nörotransmitter, nöromodülatör gibi rolleri ile korku, heyecan, stres ve hayati tehlikelerde homeostazisin sürdürülmesindeki rolleri ile birlikte; kalp atım oranının hızlanması, kan damarlarının büzülmesi, gastro intestinal yolda tonus, hareket ve salgının azalması, iskelet ve karaciğerde glikojenolizin artması, lipolizisin artması, renin salgısının artması ve insülinün azalması gibi etkiler de göstermektedirler [38].

Tirozin hidroksilaz (TH) katekolaminlerin, sinirsel transmisyonunda, hormonal hareketlerinde merkezi rol oynamaktadır. Tirozin hidroksilaz, fenil alanin hidroksilaz ve triptofan hidroksilaz enzimleri aromatik aminoasit hidroksilazlar olarak bilinen enzim grubunda yer alır. Bu üç memeli enzimi demir içeren pteridin kofatörüne ve moleküler oksijene gereksinin duyan karışık fonksiyonlu oksidazlardır [38].

Sıçanların kronik bir şekilde soğuğa maruz bırakılmaları sistolik, diastolik ve ortalama kan basıncını, kardiyak hipertrofiyi, dinlenme anındaki kalp atım oranını, kandaki norepinefrin konsantrasyonunu ve tirozin hidroksilaz (TH) ifadesini artırmaktadır [37].

Yapılan bir çalışmada soğuğa maruz bırakmanın beyinde ve adrenal bezlerde TH ifadesini nasıl etkileyeceğini araştırılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre; soğuğun lokus korelus (LC)'ta TH aktivitesinde, proteininde ve mRNA 'ında önemli bir artışa neden olduğu bulunmuş, adrenal bezlerde bu üç parametrede görülen değişikliklerin nitel olarak lokus korelus'dakine benzediği saptanmıştır [30].

Yapılan diğer bir çalışmada sıçanlara kronik bir şekilde besinle birlikte α -adrenerejik antogonistiği prazosin ve L-arjinin aminoasiti verilmiş ve bunların bunların soğuğa maruz kalma süresi boyunca kan basıncının artışı üzerine ve sıçan adrenal bezlerinde TH aktivitesi ve TH mRNA ifadesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Her üç soğuk uygulama grubunda da (kontrol, L-arjinin, Prazosin) TH mRNA ve TH aktivitesinin arttığı gözlenmiştir [37].

Yaşlanmaya bağlı olarak fischer-344 sıçanlarında adrenal medulla TH enzim aktivitesi araştırılmış ve artan yaşa bağlı olarak enzim aktivitesinde artış olduğu saptanmıştır [38].

Fizyolojik uyarımların adrenal tirozin hidroksilaz enzim üzerindeki etkileri test edilerek aşırı fizyolojik uyarımın önemli derecede enzim aktivitesinde artışa neden olduğu gösterilmiştir [27].

Soğuk stresine maruz bırakılan sıçanlarda tirozin hidroksilaz enzim antikorları ile yapılan çalışmalarda enzim molekülünün sayısı artarak TH enzim aktivitesinde ve medullar cAMP konsantrasyonunun da artışa neden olduğu gösterilmiştir [27].

Başka bir çalışmada sıçanlara 4°C'de rezepin uygulaması ve adrenal bezlerde TH kodlayan spesifik RNA oranının arttığı gözlenmiştir. Ayrıca bu geçici artışın, bu uygulamalar sonucu TH aktivitesinde meydana gelen değişikliklerle nitel olarak eşit olduğu ve RNA artışının önce meydana geldiği önerilmektedir [11].

Bir çalışmada ise; sıçan adrenal medullasında yaşlanma ve soğuğa bağlı olarak TH ifadesi araştırılmış ve 48 saatlik soğuk stresi uygulamasından sonra genç sıçanlarda TH aktivitesinin, TH immünoreaktivitesi ve TH mRNA adrenal medullanın her birinde arttığını bulunmuştur. Aksine yaşlı sıçanlarda önemli bir değişiklik gözlememişlerdir [12].

Kronik soğuk stresin etkileri RNA-DNA hibridizasyon tekniği kullanılarak araştırılmış ve TH mRNA seviyelerinin dört, beş kat arttığı saptanmıştır [27].

Başka bir çalışmada ise; hipofiz bezi çıkarıldıktan sonra uygulanan stresin TH enzim aktivitesinde artışa neden olduğu rapor edilmiştir. Artan TH enzim aktivitesi splanik sinirlerin (iç organ sinirleri) kesilmesiyle durmuştur. Böylece streste artan TH enzim aktivitesi adrenal medullanın sinirsel uyarımı sonucunda arttığı gözlenmiştir [27].

Yaptığımız bu çalışmada strese tepkide adrenerjik sistemde yer alan tirozin hidroksilaz (TH) enzim aktivitesi araştırılmış ve bir hafta soğuk stresi uygulamasına bağlı olarak TH enzim aktivitesinin kontrollere göre önemli bir derecede arttığı gözlenmiştir. Yaptığımız literatür çalışmalarından elde ettiğimiz bilgiler TH enzim aktivitesinin stres koşullarında arttığına işaret etmektedir. Yaptığımız çalışma ile literatür bilgilerimiz uyusmaktadır.

Adrenomedullin, orijinal olarak insan feokromasitomasından saflaştırılan etkin bir damar gevşetici ve natriüretik peptiddir. Adrenomedullin, adrenal medulla, kalp, akciğer ve böbrekte ayrıca plazma ve idrarda bulunmaktadır. Adrenomedullin özellikle vasküler endotelial hücreler ile düz kas hücrelerinde ifade edilmektedir. Adrenomedullin kardiyovasküler sistemin, kan basıncının ve böbrek fonksiyonunun düzenlenmesinde otokrin-parakrin aracı ve dolaşım hormonu olarak görev yapabilir [47].

Adrenomedullin endotelial hücreler yoluyla nitrik oksit (NO) üretimini uyarır ve adrenal bezlerde aldosteron salınımını uyarıcı potasyum ve Angiotensin II'yi inhibe eder. Adrenomedullin'nin natriüretik ve diüretik hareketleri böbrek kan akışı ve tübüler

fonksiyon üzerine peptidin tek bir hareketini yansıtır. Dolaşım adrenomedullini böbrek tarafından temizlenir [46].

Çeşitli türlerden kültürlenmiş endotelial hücrelerin ve vasküler düz kas hücrelerinin, kültür ortamına immunoreaktif adrenomedullin üretilip salgılandığını ve adrenomedullin mRNA'nın kültürlenmiş sıçan endotelial hücrelerinde ve vasküler düz kas hücrelerinde esas olarak ifade edildiğini rapor edilmiştir [49].

Preproadrenomedullin'in mRNA'ın sıçan merkezi sistemindeki dağılımını ve bunun fizyolojik stresörlerle değişimini incelenmiş, sonuçlara göre; adrenomedullin'in nörohipofiziksel sistem, hipotalamo-hipofiz-adrenal eksen ve merkezi otonomik görevlere katılabileceğini önerilmiştir [33].

Yeni bir hipotansif peptid olan insan adrenomedullin'in hemodinamik etkilerini anestezi yapılan winstar sıçanlarında araştırılmıştır. İntrovenöz olarak adrenomedullin verilmesinin total periferel rezistansdaki artışla ilgili, ortalama kan basıncında hızlı ve önemli bir azalmaya neden olduğunu saptanmıştır. Böylece adrenomedullinin etkin bir vasodilatör olduğu ve kan basıncının düzenlenmesinde rol aldığı tespit edilmiştir [18].

Adrenomedullin ve proadrenomedullin N-Terminal 20 peptid (PAMP)'in sıçan zona glomerulosa hücreleri üzerine etkilerini araştırılmış ve adrenomedullin ve PAMP'nin ayrılan zona glomerulosa hücrelerinde ne bazal ne de ACTH'in uyardığı aldosteron üretimini etkilemediği ancak her iki peptid'in de Angiotensin-II 'nin uyardığı aldosteron üretimini baskıladığı ve PAMP'nin adrenomedullinden daha baskın olduğu saptanmıştır [17].

Yapılan bir çalışmada Behçet hastalığı olanlarda plazma adrenomedullin düzeyinin daha yüksek olduğunu ve adrenomedullin'in Behçet hastalığında otokrin ve parakrin modülatör rolü oynadığını saptanmıştır [48].

Son zamanlarda yapılan çalışmalar adrenomedullin'in normal insan idrarındaki konsantrasyonunun normal insan plazmasına göre altı kat daha fazla olduğunu göstermiştir. Ancak plazma ve idrar adrenomedullini arasında açık bir ilişki bulunamamıştır [45].

Yapılan bir çalışmada sıçanlarda soğuk strese homeostatik cevapta adrenomedullinin katkısını araştırılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre; soğuk stresin yanı sıra adrenomedullin uygulamasının farklı son organlardaki reseptörler yoluyla rol oynayabileceğini, adrenomedullin reseptörlerinin kısmen yada tamamen yer alması ile değişik metabolik düzenlemelerin olabileceğini, soğuğa cevapta farmakolojik

adrenomedullin uygulamasından önce fizyolojik AdM salınımının indüklenmesinin uyarılabileceği önerilmektedirler [19].

Tarafımızdan yapılan çalışmada bir hafta soğuk stresi uygulaması sonucu sıçanların adrenal medulla, kalp, hipotalamus, böbrek, düz kas ve çizgili kas dokularında adrenomedullin seviyelerinin önemli derecede azaldığı saptanmıştır. Literatür taramalarımızda yaptığımız bu çalışmaya benzer bir çalışma bulunamamıştır. Bu açıdan çalışmamız oldukça yeni bir konu olup, literatür bilgileriyle karşılaştırılma olanağı bulunamamıştır.

Stres uzun süreli olduğu zaman simpatik sinir sisteminin sürekli olarak aktif kalmasına neden olmaktadır. Bu durumda organizma homeostazisin sağlanması için gerekli düzenlemeyi otomatik olarak yapmaktadır. Bu düzenlemede adrenomedullin'nin de birçok etkisi vardır. Yaptığımız bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar da strese adaptasyonda adrenomedullin'in rol oynadığını göstermektedir.

Adrenal medulla içindeki PAMP simpatik harekete cavapta katekolaminlerin salınımını azaltarak periferel vaskülatör gibi rol oynar [14]. Yaptığımız literatür taramasında PAMP varlığında TH aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Bu da bize PAMP'nin katekolaminlerin sentez ve salınımını değiştirdiğini göstermektedir.

Yaptığımız çalışmalardan elde ettiğimiz sonuçlara göre soğuk stresin katekolamin biyosentezini uyardığı dolayısıyla katekolaminlerin biyosentezinde anahtar rolü oynayan TH aktivitesinde de bir artışa neden olduğu saptanmıştır. Adrenomedullin düzeylerinin ise; soğuk stresine bağlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç bize adrenomedullinin strese adaptasyonda rol oynadığını göstermektedir. Fakat soğuk stresi ile adrenomedullin arasındaki ilişkinin tam olarak açıklanabilmesi için daha ayrıntılı bir çalışma yapılması düşüncesindeyiz.

6. KAYNAKLAR

1. S. Mercier, Frederic, Canini, A. Buguet, R. Cespuglio, S. Martin and L. Bourdon, Behavioural changes after an acute stress: stressor and test types influences, Behavioural Brain Research (article in press), S0166-4328(02)00265-6, 2002.
2. L.K.Nisenbaum and E.D.Abercrombie, Enhanced Tyrosine Hydroxylation Of Chronically Stressed Rats Upon Exposure To A Novel Stressor, J.Neurochem.Vol.58, No.1, 1992.
3. S. J. Fluharty, G.L.Snyder, M.J. Zigmond and E.M.Stricker, Tyrosine Hydroxylase Activity and Catecholamine Biosynthesis in the Adrenal Medulla of Rats during Stress, the journal of pharmacology and experimental therapeutics, 0022-3565/85/2331.
4. E. L. Saban and R. Kvetnansky, Stress-Triggered Activation of Gene Expression in Catecholaminergic System: dynamics of transcriptional events, TRENDS in Neurosciences Vol.24 No.2 February 2001
5. J.D. Wilson, D.W. Foster, WILLIAMS Textbook of endocrinology, seventh edition, 1985, 891-936.
6. A.J. Vander, J. H. Sherman, D.S. Luciano, Human Physiology, The Mechanism of Body Function, sixth edition, 1994, 207-211.
7. M.K. Stachowiak, S.J. Fluharty, E.M.Stricker, M.J.Zigmond, and B.B.Kaplan, Molecular Adaptation in Catecholamines Biosynthesis Induced by Cold Stress and Sympathectomy, Journal of Neuroscience Research 16:13-24 (1986)
8. M.Persson, D.Wasserman, E.G. Jönsson, H.Bergman, L.Terenius, A.Gyllander, J.Neiman and T.Geijer, Search For Influences Of The Tyrosine Hydroxylase (TCAAT)_N Repeat Polymorphism On Personality Traits, Psychiatry Research, Volume95, Issue1, 24 July 2000, Pages 1-8.
9. M.Thorolfsson, A.p.Doskeland, A.Muga and A.Marnitez, The Binding Of Tyrosine Hydroxylase To Negatively Charged Lipid Bilayers Involves The N-Terminal Region Of The Enzyme, FEBS Letters, Volume 519, Issues 1-3, 22 May 2002, Pages 221-226.
10. Z. Selamoğlu "Soğuk Stresi Ve Bir Hipotansif İlaç Olan Enalapril Maleate'ın Trozin Hidroksilaz(TH) Enzim Aktivitesi ve Bazı Kan Parametreleri Üzerine Etkileri", Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Türkiye, (1999).
11. A.W.Tank, E.J. Lewis, D.M.Chikaraishi, and N.Weiner, Elevation of RNA Coding for Tyrosine Hydroxylase in Rat Adrenal Gland by Reserpine Treatment And Exposure to Cold, Journal of Neurochemistry.45,1030-1033 (1985).
12. N.Tümer and J.S.Larochelle, Tyrosine Hydroxylase Expression in Rat Adrenal Medulla: Influence of Age and Cold, Pharmacology Biochemistry Behavior, Vol 51, No.4,pp775-780,1995.
13. Y.Ueta, R.Serino, I.Shibuya, K.Kitimura, K.Kangawa, J.A.Russell and H.Yamashita, A Physiological Role For Adrenomedullin In Rats; A potent Hypotensive Peptide In The Hypothalamo-Neurophysial System, Experimental Physiology(2000) 85S, 163S-169S.
14. Willis K.Samson, Adrenomedullin and the Control of Fluid and Electrolyte Homeostasis, Annu. Rev. Physiol.1999.61:363-89.
15. T.Eto, K.Kitimura and J.Kato, Biological and Clinical Control and Cardiovascular Diseases, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology (1999) 26, 371-380.
16. G.Mazzocchi, G.Albertin, P.G.Adreis, G.Neri, L.K.Malendowicz, H.C.Champion, M.Bahçelioğlu, P.J.Kadowitz, G.G.Nussdorfer, Distribution, Functional Role, And Signaling Mechanism Of Adrenomedullin Receptors In The Rat Adrenal Gland, Peptides 20 (1999) 1479-1487.

17. P.G.Andreis, G.Mazzochi, P.Rebuffat and G.G.Nussdorfer, Effects Of Adrenomedullin And A Proadrenomedullin N-Terminal 20 Peptide On Rat Zona Glomerulosa Cells, *Life Sciences*, Vol.60, No.19, pp.1693-1697,1997.
18. Y.Ishiyama, K. Ktimura, Y.Ichiki, S.Nakamura, O.Kida, K.Kangawa and T.Eto, Hemodynamics Effects Of A Novel Hypotensive Peptide, Human Adrenomedullin, In Rats, *European Journal Of Pharmacology*, 241(1993) 271-27.
19. Ş.Yüksel, A.Akbay, M.Yürekli, Contribution Of Adrenomedullin To Homeostatic Respond To Cold Stress In Rat Model, *Pathophysiology* 8 (2002)9 243-247.
20. Y.Hiwatashia, Y.Kurahashib, R.Hatadab, S.Uenod, T.Honmac, N.Yanagiharad, H.Yanasee, T.Iwanagae, Y.Ohizumia and T.Yamakuni, Glucocorticoid Inhibits Expression Of V-1, A Catecholamine Biosynthesis Regulatory Protein, In Cultured Adrenal Medullary Cells, *FEBS Letters*, Volume 528, Issues 1-3, 25 September 2002, Pages 166-170.
21. T.Parka, Y.Parka, T.Leeb, H.Hac and K.Kim, Inhibition Of Acetylcholine-Mediated Effects By Borneol, *Biochemical Pharmacology*, Volume 65, Issue1, 1 January 2003, Pages 83-90.
22. B.Li, Z.Zhang, and Y.Jin, Plant Tissue-Based Chemiluminescence Flow Biosensor For Determination Of Unbound Dopamine In Rabbit Blood With On-Line Microdialysis Sampling, *Biosensors And Bioelectronics*, Volume 17, Issues 6-7, 26 June 2002, Pages 585-589.
23. RK Murray, PA.Mayes, DK.Granner, VW Radwell, Haper'in Biyokimyası, (1993), 641-647.
24. K.Vuorensolaa, and H.Siren, Determination Of Urinary Catecholamines With Capillary Electrophoresis After Solid-Phase Extraction, *Jornal of Chromatography*, Volume 895, Issues, 1-2, 20 October 2000, Pages 317-327.
25. N.Uncetaa, E.Rodriguez, Z.Gomez de Balagerab, C.Sampedroa, M.A.Goicoleaa, S.Barrondoc, J.Sallese and R.J.Barrio, Determination Of Catecholamines And Their Metabolits In Human Plasma Using Liquid Chromotography With Coulometric Multi-Electrode Cell-Design Detection, *Analytica Chimica Acta* , Volume 444, 18 october 2001, Pages 211-221.
26. M.Turgut, "Ovariectomi, Östrojeni L- Arjinin Ve Soğuk Stresi Uygulamasının Bazı Sıçan Dokularında Adrenomedullin Seviyeleri Ve Tirozin Hidroksilaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri", Yüksek Lisans Tezi, Malatya, 2000.
27. M.Yürekli, "Yaşlanma, eksersiz, Soğuk Stresi ve Bir Hipotansif İlaç Olan Prazosin'in Trozin Hidroksilaz (TH) Enzimi Ve TH Gen İfadesi Üzerindeki Etkileri", Doktora Tezi, MALATYA, 1993.
28. M.Zhua, V.Klimek, J.W.Haycock and G.A.Ordway, Quantitation Of Tyrosine Hydroxylase Protein In The Locus Coeruleus From Postmortem Human Brain, *Journal of Neurosciences Methods*, Volume 99, Issues 1-2, 30 June 2000, Pages 37-44
29. A.Baruchin, E.P.Weisberg, L.L.Miner, D.Ennis, L.K.Nesenbaum, E.Naylor, E.M.Sticker, M.J.Zigmond, and Barry B.Kaplan, Effects of Cold Exposure on Rat Adrenal Tyrosine Hydroxylase: An Analysis of RNA, Protein, Enzym Activity, and Cofactor Levels, *Journal of Neurochemistry*, **54**, 1769-1775 (1990).
30. F.Richard, N.Faucon-Biguet, R.Labatut, D.Rollet, J.Mallet, and M.Buda, Modulation of tyrosine Hydroxylase Gene Expression In rats Brain and Adrenals by Exposure to Cold, *Journal of Neuroscience Research* 20:32-37 (1988)
31. J.P.Hinson, E.Hagi-Pavli, L.M.Thomson and S.Kapas, Proadrenomedullin N-Terminal 20 Peptide (PAMP) Receptors and Signals Transduction In Rat Adrenal Gland, *Life Sciences*, Vol.62, No.5, pp.439-443,1998.

32. M.M.Taylor, W.K.Samson, Adrenomedullin And Central Cardiovascular Regulation, *Peptides* 22 (2001) 1803-1807.
33. J.Shan and T.L. Krukoff, Distribution Of Preproadrenomedullin Mrna In Rat Central Nervous System And Its Modulation By Physiological Stressors, *The Journal Of Comparative Neurology* 432:88-100 (2001).
34. K.Takahashi, F.Satoh, E.Hara, M.Sone, O.Murakami, T.Kayama, T.Yoshimoto, and S.Shibahara, Production And Secretion Of Adrenomedullin From Glial Cell Tumors And Its Effects On Camp Production, *PEPTIDES*, Vol.18.No.8.pp.1117-1124, 1997.
35. S.Tekin and P.J.Hansen, Use of Bradford Assay in a Protein Assay in a Micro Plate Format, Dep.of Animal Sciences, University of Florida, <http://www.dps.ufl.edu/hansen:/protocols/minibradford.htm>.
36. N.Tümer, J.S.LaRochelle and M.Yürekli, Exercise Training Reverse The Age-Related Decline In Tyrosine Hydroxylase Expression In Rat Hypothalamus, *Journal of Gerontology: BIOLOGICAL SCIENCES*, 1997, Vol.52A.No.5,B255-B256.
37. M.J.Fregly, F.Rossi, Z.Sun, N.Tümer, J.R.Cade, D.Hegland, M.Yürekli, Effects Of Chronic Treatment With Prazosin And L-Arjnin On The Elevation Of Blood Pressure During Cold Exposure, *Pharmacology* 1994; 49:351-362.
38. M.Yürekli, Yaşlanmanın Sıçan Adrenal Medullası Tirozin Hidroksilaz (TH) Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri, *Tr.J.of Biology*, 20 (1996) 207-212.
39. S.S.Zoroğlu, M.Yürekli, İ.Meram, S.Söğüt, H.Tutkun, Ö.Yetkin, E.Sivaslı, H.A.Savaş, M.Yanık, H.Herken and Ö.Akyol, Pathophysiological Role Of Nitric Oxide And Adrenomedullin In Autism, *Cell biochemistry and function*2003, 21: 55-60.
40. C.Evereklioğlu, E. Özbek, H.Er, M.Çekmen and M.Yürekli, Urinary Adrenomedullin Levels Are Increased And Correlated With Plasma Concentration In Patients With Behçet's Syndrome, *International Journal of Urology* (2002) 9 , 296-303.
41. S.S.Zoroğlu, H.Herken, M.Yürekli, E.Uz, H.Tutkun, H.A.Savaş, C.Bağcı, M.E.Özen, B.Cengiz, E.A.Çakmak, M.I.Doğru, Ö.Akyol, The Possible Pathophysiological Role Of Plasma Nitric Oxide And Adrenomedullin In Schizophrenia, *Journal of Psychiatric Research* 36 (2002) 309-315.
42. H.A.Savaş, H.Herken, M.Yürekli, E.Uz, H.Tutkun, S.S.Zoroğlu, M.E.Özen, B.Cengiz, Ö.Akyol, Possible Role Of Nitric Oxide And Adrenomedullin In Bipolar Affective Disorder, *Neuropsychobiology* 2002; 45:57-61.
43. A.Balat, M.Çekmen, M.Yürekli, A.K.Gül, E.Özbek, M.Korkut, M.Tarakçıoğlu, S.Şahinöz, A.Anarat, Adrenomedullin And Nitrite Levels In Childeren With Primary Noctural Enuresis, *Pediatr Nephrol* (2002) 17:620-624.
44. M.Kılınç, A.Balat, M.Çekmen, M.Yürekli, K.Yılmaz, and S.Şahinöz, Adrenomedullin And Nitrit Levels In Childeren With Dilated Cardiomyopathy, *Pediatric Cardiology*, 2003 <http://link.springer-ny.com/link/service/journals/00246:/contents/02/0352/paper:/body.html>
45. A.Balat, M.Çekmen, M.Yürekli, O.Kutlu, İ.İslek, E.Sönmezgöz, M.Çakır, Y.Türköz, S.Yoloğlu, Adrenomedullin And Nitrite Levels In Childeren With Bartter Syndrome, *Pediatr Nephrol* (2000) 15:266-270.
46. A.Balat, M.Çekmen, M.Yürekli, H.Gülcan, O.Kutlu, Y.Türköz, S.Yoloğlu, Adrenomedulin And Nitrite Levels In Childeren With Minimal Change Neprotic Syndrome, *Pediatr Nephrol* (2000) 15:70-73.
47. A.Balat, K.Sarıca, M.Çekmen, M.Yürekli, F.Yağcı and A. Erbağcı, Adrenomedullin And Nitric Oxide In Childeren With Detrusor İnstability, *Pediatric Nephrology*, 2003, <http://link.spinger.de/link/service/journals/00467:/contents/03/01125/paper/s00467-003-1125-1ch110.html>.

- 48.C.Evereklioğlu, M.Yürekli, H.Er, E.Özbek, E.Hazneci, M.Çekmen, H.S.Inaloz, Increased Plasma Adrenomedullin Levels İn Patients With Behçet's Disease, *Dermatology* 2000; 201:312-315.
49. E.Özbek, M.Yürekli, A.Soylu, M.Davarcı, and M.D.Balbay, The Role Of Adrenomedullin İn Varicocele And İmpotence, *BJU International* (2000) 86, 694-698.
50. J.F. Reinhard, G.K. Smith, C.A. Nichol, A Rapid And Sensitive Assay For Tyrosine –3-Monooxygenase Based Upon Release Of 3H₂O And Adsorbtion Of 3H-Tyrosine By Charcoal, *Life Sci.* 1986; 39:2185-2189.
51. A.Noyan, *Fizyoloji Ders Kitabı*, Anadolu Üniversitesi yayınları No:2, Meteksan, Ankara (1980).



ÖZGEÇMİŞ

14.01.1980 tarihinde Gaziantep’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Gaziantep’de tamamladı. 1997 yılında İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazanarak kayıt yaptırdı. Üniversite eğitimini 2001 yılında tamamlayarak aynı yıl İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı. Halen İnönü Üniversitesinde eğitimine devam etmektedir.

