

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

28200

YAŞLANMA, EKŞERSİZ, SOĞUK STRESİ VE BİR HİPOTANSİF İLAÇ
OLAN PRAZOSİN'İN TİROZİN HİDROKSİLİZ (TH) ENZİMİ VE TH
GEN İFADESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Muhittin YÜREKLİ

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Eşim FUSUN ve Oğlum MERT'e

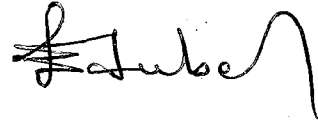
"Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne"

İş bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim dalında
DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr. A. Nihat Bozcuk



Üye Prof. Dr. Esref Yüksel



Üye Doç. Dr. Kayahan Fışkın



Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

21. / 12. / 1993

Prof. Dr. Esref YÜKSEL
Enstitü Müdürü



ÖZET

Yaşlanma ve eksersiz tirozin hidroksilaz (TH) enzim aktivitesi üzerindeki etkileri erkek Fischer-344 (F-344) ratları hipotalamusunda araştırıldı. Aynı zamanda TH enzim aktivitesi ve TH mRNA seviyeleri, 48 saat soğuk stresi ve 3 hafta soğuk stresi ve soğuk stresi+prazosine maruz kalan Sprague Dawley (SD) ratlarında adrenal medullada araştırıldı.

TH enzim aktivitesi L-[³H]-tirozin'den, L-[³H]-dopa oluşurken L-[³H]-tirozin'in hidroksilasyon ürünü olan ³H₂O oluşumunun takip edilmesiyle ölçüldü.

Total adrenal RNA izole edildi ve naylon membrana bağlandı. Immobilize olan RNA daha sonra cDNA probu ile hibritleştirildi. Sonuçta işaretli RNA-DNA hibritleri Kodak X-Omat XAR-5 filmi kullanılarak otoradyografi ile saptandı. TH mRNA'sı otoradyogramlarının densitometrik taramasıyla densitometre kullanılarak ölçüldü.

İstatistiksel önem testi, kontrol ve uygulama yapılan gruplar arasında t-testi ile saptandı.

TH enzim aktivitesinin eksersiz yaptırılan yaşlı F-344 ratları hipotalamusunda önemli ölçüde arttığı bulundu. Aynı zamanda TH enzim aktivitesi ve TH mRNA' sının 48 saat soğuk stresine ve 3 hafta soğuk stresi ve soğuk stresi+prazosin'e maruz kalan SD ratları adrenal medullasında önemli ölçüde arttığı bulunmuştur.

SUMMARY

The effects of aging and exercise on tyrosine hydroxylase (TH) activity were investigated in hypothalamus of Fischer-344 (F-344) rats. Also TH activity and TH mRNA levels were investigated in adrenal medulla of Sprague Dawley (SD) rats which were exposed to cold stress for 48 hours and cold and cold stress+prazosin for 3 weeks separately.

TH activity was measured by monitoring the formation of $^3\text{H}_2\text{O}$ as a by product of L- ^3H -tyrosine hydroxylation, the formation of L- ^3H -dopa from L- ^3H tyrosine.

Total adrenal RNA was isolated and blotted to gene screen nylon membrane, the immobilized RNA was then hybridized to cDNA probe. The resulting labeled RNA-DNA hybrids were detected by autoradiographic method, using Kodak X-Omat XAR-5 film. The TH mRNA was assayed by densitometric scanning of the autoradiograms using a densitometer.

Statistical significance between the control and treatment group was determined by student's t-test.

TH activity was significantly found to be increased in hypothalamus of trained old F-344 rats. TH activity and TH mRNA levels were significantly found to be increased in adrenal medulla of SD rats which exposed to cold stress for 48 hours and cold stress+prazosin for 3 weeks separately.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Doç.Dr. Kayahan Fışkın'a teşekkürlerimi sunarım.

Florida Üniversitesi ve Geriatric Research Education Clinical Center'daki çalışma grubuna dahil eden ve doktora tez çalışmalarımın deneysel aşamasının tamamlanmasını sağlayan Asst. Prof Dr. Nihal Tümer'e teşekkürlerimi sunarım. Deneysel çalışmalar sırasında yardımlarını gördüğüm Jeff LaRoche'e teşekkür ederim.

Ayrıca Florida Üniversitesi'nde Asst. Prof. Dr. Nihal Tümer'in çalışma grubuna alınmamı sağlayan sayın hocam Prof.Dr. Engin M. Gözükara'ya teşekkür ederim.

Bu çalışmanın yapılabilmesi için bir yıl, A.B.D Florida Üniversitesi ve Geriatric Research Education and Clinical Center'da görevlendirilmemi sağlayan İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi ve İnönü Üniversitesi Yönetim Kurullarına teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım sırasında beni yalnız bırakmayan ve büyük manevi desteği ile bana yardımcı olan eşime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>sayfa</u>
ÖZET	i
SUMMARY	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Genel Bilgiler	1
1.2 Sinaptik Transmisyon ve Norepinefrin Mekanizması	5
1.3 Reseptörlerin Yapısı, α ve β Adrenerjik Resep- törler	6
1.4 Prazosin	8
1.5 Tirozin Hidroksilaz (tirozin 3-monooksijenaz EC 1.14.16.2	9
2. MATERYAL VE METOD	15
2.1 Deneyleerde Kullanılan Ratlar	15
2.2 Eksersiz Uygulaması	15
2.3 Soğuk Stresi Uygulaması	16
2.4 Soğuk Stresi + Prazosin Uygulaması	16
2.5 Diseksiyon İşlemi	17
2.6 Adrenal Bezlerin Alınması ve Homojenizasyon ...	17
2.7 Hipotalamusun Alınması ve Homojenizasyon	18

2.8 Total Protein Saptanması	19
2.9 TH Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	19
2.10 Total RNA Eldesi	22
2.10.1 Ekstraksiyon	22
2.10.2 Presipitasyon	23
2.10.3 Yıkama ve yeniden çözme	23
2.11 Total RNA Miktarının Saptanması	24
2.12 RNA Jel Elektroforezi	25
2.12.1 Jelin hazırlanması	25
2.12.2 Örneklerin jele yüklenmesi	25
2.13 Slot Blot işlemi	26
2.14 Prehibridizasyon	27
2.15 TH Probenun İşaretlenmesi	28
2.16 Hibridizasyon	30
2.17 Membranların Yıkanması	30
2.18 İstatistiksel Yöntem	31
3. SONUÇLAR	33
3.1 Yaşlanma ve Eksersiz F-344 Ratlarında Hipotalamusta TH Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkileri	34
3.2 Kontrol ve Soğuk Stresine 48 Saat Maruz Kalan SD Ratlarında Adrenal Medullada TH Enzim Aktivitelerinin ve TH mRNA Seviyelerinin Değişimi	36

3.3 Kontrol ve 3 Hafta Soğuk Stresi ve Soğuk Stresi + Prazosin'e Maruz Kalan SD Ratlarında Adrenal Medullada TH Enzim Aktivitelerinin ve TH mRNA Seviyelerinin Değişimi	41
4. TARTIŞMA	49
EK-1	56
EK-2	57
ÖZGEÇMİŞ	60
KAYNAKLAR	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>sayfa</u>
Şekil 1.1 Katekolaminler ve katekol kökü	2
Şekil 1.2 Sinaptik transmisyon ve norepinefrin mekanizması	6
Şekil 1.3 Hormon-reseptör ilişkisinin şematik olarak gösterilmesi	7
Şekil 1.4 Katekolaminlerin metabolizmasının şematik olarak gösterilmesi	8
Şekil 1.5 Prazosin'in yapısı	9
Şekil 1.6 Katekolaminlerin tirozinden başlayan sentezi	10
Şekil 3.1 Yaşlanma ve eksersiz F-344 ratlarında hipotalamusta TH aktivitesi üzerindeki etkilerini gösteren grafik	35
Şekil 3.2 Kontrol ve soğuk stresine 48 saat maruz kalan SD ratlarında adrenal medullada TH enzim aktivitesini gösteren grafik ...	37
Şekil 3.3 Kontrol ve 48 saat soğuk stresine maruz kalan SD ratlarında adrenal medullada TH mRNA seviyelerinin değişimini gösteren grafik	38
Şekil 3.4 Kontrol ve 48 saat soğuk stresi uygulamasına ait RNA elektroforezi	39
Şekil 3.5a Kontrol ve 48 saat soğuk stresi uygulamasına ait slot blot şeması	40
Şekil 3.5b Kontrol ve 48 saat soğuk stresi uygulamasına ait otoradyografik bantlar	40
Şekil 3.6 Kontrol, soğuk stresi ve soğuk stresi + prazosin uygulamasından sonra SD ratlarında adrenal medullada TH enzim akti-	

vitesindeki değişimleri gösteren grafik ..	43
Şekil 3.7 Kontrol, soğuk stresi ve soğuk stresi + prazosin'e maruz kalan SD ratlarında adrenal medullada TH mRNA seviyeleri	44
Şekil 3.8 Kontrol, soğuk stresi ve soğuk stresi + prazosin uygulamasına ait RNA elektroforezi	45
Şekil 3.9a Standart ve kontrol grubu ratlarda total RNA uygulamasına ait slot blot şeması	46
Şekil 3.9b Standart ve kontrol grubu ratlarda total RNA uygulamasına ait slot blot şeması	46
Şekil 3.9c Standart ve kontrol grubu ratlarına ait otoradyografik bantlar.....	47
Şekil 3.9d Standart ve kontrol grubu ratlarına ait otoradyografik bantlar	47
Şekil 3.9e Standart, soğuk stresi ve soğuk stresi + prazosin uygulamasına ait slot blot şeması	48
Şekil 3.9f Standart, soğuk stresi ve soğuk stresi + prazosin uygulamasına ait otoradyografik bantlar	48

TABLOLAR DİZİNİ

	<u>sayfa</u>
Tablo 2.1. Tirozin hidroksilaz aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları	20
Tablo 2.2 Slot blot işleminde kullanılan çözeltiler..	26
Tablo 2.3 TH prob'unun işaretlenmesinde kullanılan çözeltiler	28
Tablo 3.1. Yaşlanma ve eksersizinin F-344 ratlarında hipotalamusta TH enzim aktivitesi üzerindeki etkisi	34
Tablo 3.2. Kontrol ve 48 saat soğuk stresine maruz kalan SD ratlarında adrenal medullada TH enzim aktiviteleri	37
Tablo 3.3. Kontrol ve 48 saat soğuk stresine maruz kalan SD ratlarında adrenal medullada TH mRNA seviyeleri	38
Tablo 3.4. Kontrol, 3 hafta soğuk stresi ve soğuk stresi + prazosin uygulaması yapılan SD ratlarında TH enzim aktivitesi üzerindeki etkileri	42
Tablo 3.5. Kontrol, 3 hafta soğuk stresi ve soğuk stresi + prazosin uygulaması yapılan SD ratlarında TH mRNA seviyeleri üzereindeki etkileri	44

KISALTMALAR

BSA	: Bovin Serum Albumin
COMT	: Katkol-O-Metil Transferaz
DA	: Dopamine
DDC	: Dopadekarboksilaz
DEPC	: Dietil pirokarbonat
DOPA	: Dihidroksifenilalanin
DTT	: Dithiothreitol
EPI	: Epinefrin
F-344	: Fischer-344
MAO	: Monoamin Oksidaz
6 MPH ₄	: 6-Metil Tetrahidropteridin
NE	: Norepinefrin
PIPES	: Piperazinebis(ethanesulfonic acid)
SD	: Sprague Dawley
SDS	: Sodyum Dodesil Sulfat
SSC	: Sodyum Salin Sitrat
TBE	: Tris Borat EDTA (etilendiamintetraasetik asit)
TE	: Tris EDTA
TH	: Tirozin Hidroksilaz

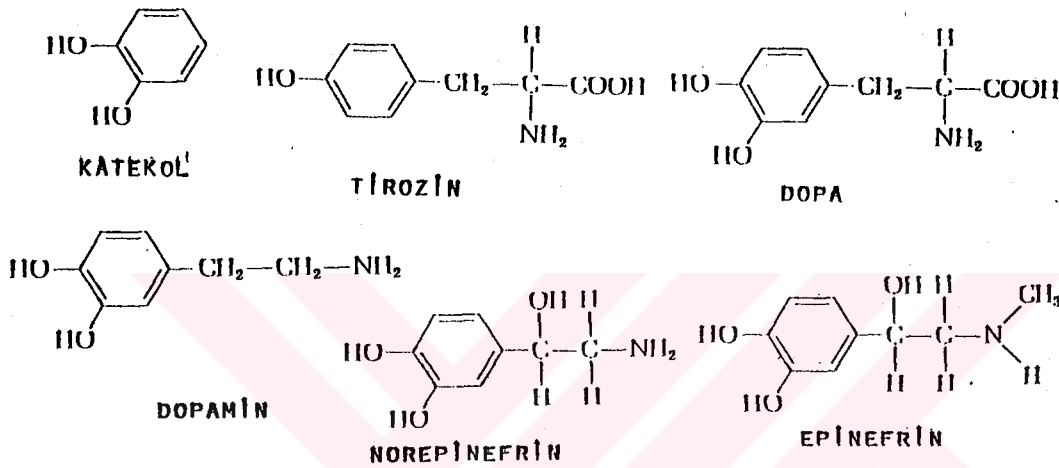
1. GİRİŞ

1.1 Genel Bilgiler

Katekolaminler, tirozin aminoasitinden oluşturulur ve katekol yada 1,2 dihidroksi benzenden köken alır (1), (Şekil 1.1). Katekolaminler homeostazisin sürdürülmesinde periferde otonomik fonksiyonları nedeniyle önemli yer tutarlar. Katekolaminler adrenal medulladan salınmaları ile endokrin, sinir terminallerinden salınmaları ile nöroendokrin role sahiptirler (2,3,4). Katekolamin grubunda yer alan dopamin, norepinefrin ve epinefrin merkezi sinirsel işlevlerde nörotransmitter ve modülatör olarak görev yapar. Norepinefrin yada epinefrin'in yer aldığı simpatetik sinir sistemi aynı zamanda adrenerjik sinir sistemi olarak da bilinmektedir. Adrenerjik sinir sistemi, doğrudan kalp atımının homeostatik regülasyonunda, kalp kasılma gücünde, vazomotor tonusda, kan basıncında, bronşiyal hava yolu tonusda karbohidrat ve yağ asit metabolizmasıyla ilgilidir (2).

Fiziksel aktivite, fizyolojik stres ve genel alerjik reaksiyonlar organizmada adrenerjik sinir sisteminin uyarılmasını sağlar. Genel olarak katekolaminlerin görevleri 6 grupta toplanabilir; 1)-Periferal uyartı işlevi (örn: kan damarlarının büzülmesi), 2)-Periferal inhibe edici işlev (örn: bronşiyal genişleme), 3)-Kalp uyartı işlevi

(örn: kasılmada artış) 4)-Metabolik işlevler (örn: gliko-
genolizis), 5)-Endokrin işlevler ve 6)- Merkezi sinir sis-
temi işlevleri. Bu işlevlerin yanı sıra katekolaminlerin
ekzokrin bezler, iskelet kası, uterus kası, hipotalamus
gibi değişik yapıların üzerinde de etkileri vardır.



Şekil 1.1 Katekolaminler ve katekol kökü (1).

Epinefrin, kalp atımını ve kan basıncını arttırarak
kardiyovasküler sistemi acil durum için hazırlar. Normalde
epinefrinin kandaki seviyesi 0.06 µg/lt civarındadır. Fakat
uyarıma ile kandaki konsantrasyonu saniyeler yada
dakikalar içinde bin katına ulaşır. Epinefrin karaciğer
glikojeninin yıkılmasını uyarıp kana glikoz vererek anaer-
obik kas çalışması için gereken yakıtı sağlar ve bu işi
adenilat siklazı uyararak yapar. Bu özellikleri nedeniyle
epinefrin bazı hastalıkların tedavisinde önem kazanır.
Özellikle, kardiyovasküler sistem kollaps olduğunda ortaya

çıkan hayati tehlikeyi atlattırır. Epinefrin aynı zamanda akciğerde bronşiyolleri çevreleyen düz kasların gevşemesini sağlar ve akut astma semptomlarının tedavisinde de kullanılır (2,). Epinefrin aynı zamanda karbohidrat metabolizmasını ve genel metabolizmayı hızlandırarak oksijen tüketimini artırır ve hiperglisemiye neden olur (5). Epinefrin'in diğer fonksiyonları arasında karaciğer ve kasta glikojenin glukoz'a kadar yıkılması da yer alır (2).

Adrenal medulladaki kromaffin hücreleri katekolaminleri salgılar. Yukarıda da bahsedildiği gibi, homeostazisin sürdürülmesi, organizmayı acil durumlara hazırlama ve hayati tehlikelerde rolleri önemli olan katekolaminlerin biyosentezi tirozin aminoasitinden başlar. Bu ilk kademe Tirozin hidroksilaz enzimi tarafından katalizlenmektedir.

Katekolaminlerin biyosentezi beyin hipotalamus, substantia nigra, locus cereleus, putamen, striatum ve korteks serebri'de olmaktadır. Beyinde tirozin aminoasitinden oluşan dopa'nın dekarboksilasyonu ile dopamin meydana gelir ve nörotransmitter olarak görev yapar. Dopamin üretiminde çeşitli nedenlerle meydana gelen azalma parkinson hastalığına neden olur. Parkinson hastalığı genellikle 60 yaşın üzerinde, nadiren gençlerde, görülür ve el titremesi şeklinde ortaya çıkar. Beyinde dopamin sentezinin yapıldığı substantia nigra ve locus cereleus da hücrelerde dejenerasyon söz konusudur. Dopamin, norepinefrinin

öncülüdür ve norepinefrin kromaffin hücrelerinde, hormonla uyarılınca kadar depo edilirler. Norepinefrin daha sonra metile edilerek epinefrin'e dönüşmektedir (6).

Epinefrin'in hedef dokuları kalb, vasküler sistem karaciğer ve iskelet kasıdır. Epinefrin ve norepinefrin suda çözümlülürler ve adrenerjik reseptörlerle, dopamin de dopaminerjik reseptörlerle etkileşir (2,7).

Dolaşımda bulunan epinefrin adrenal medullada sentezlenir ve adrenal medullar aktiviteyi karakterize eder. Adrenal medullanın önemli miktarda norepinefrin içerdiği de bilinmektedir, bununla birlikte dolaşımda bulunan norepinefrin sinir teminallerinde yapılır ve adrenerjik nöronal aktiviteyi gösterir (2). Bazı araştırmacılar kalp regülasyonunda adrenal medullanın rolünün, kalpte adrenerjik nöral etki azaldığı anda daha önemli olduğunu rapor etmişlerdir (8,9). Bu konuda yapılan çalışmalarda, kardiyak postganglionik sinir ucu reseptörlerinin seçici nörotoksin 6-hidroksidopamin ile bozulmasından sonra, rat adrenal medullasında tirozin hidroksilaz enzim aktivitesinde artış olduğu gösterilmiştir. Bu artan aktivite adrenal aktivitedeki artışı karakterize etmektedir (9).

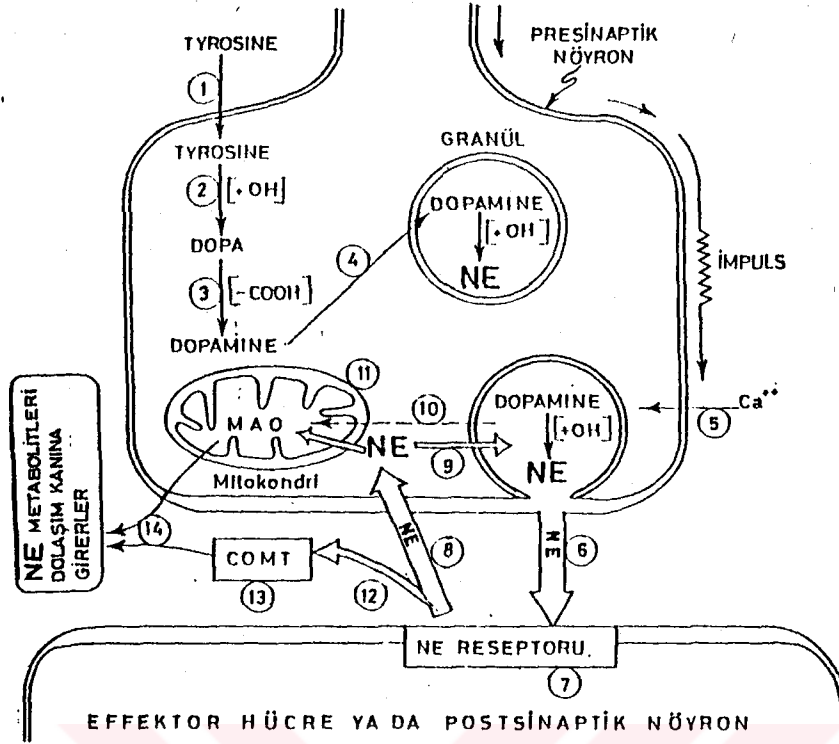
İnsanlardaki norepinefrin seviyesinin yaşlanma ile arttığı iyice anlaşılmıştır. Ratlarda yaşlanma ile ortaya çıkan değişiklikler insanlarda ortaya çıkan değişikliklere benzemektedir. Soğuğa maruz kalma, oral glukoz verilmesi, izometrik eksersize ve mental hastalıklara karşı, plazma norepinefrin tepkileri sağlıklı yaşlı insanlarda, sağlıklı

genç bireylere göre daha yüksektir (2).

Eksersiz, hipertansiyon ve heyecana bağlı stresin kontrol edilmesine yardımcı olduğu ve koroner arter hastalıklarının risk faktörlerinin azalmasına da katkıda bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca eksersiz sağlıklı yaşlı erkek ve kadınlarda kolesterol seviyelerini de düşürdüğü ifade edilmektedir (10).

1.2 Sinaptik Transmisyon ve Norepinefrin Mekanizması

Sinapslarda, presinaptik nöronun ucundan salınan madde postsinaptik nöron veya efektör hücrenin yüzeyinde bulunan bir reseptör tarafından tanınır, tutulur ve hücreyi uyarır yada inhibe eder. Katekolaminler grubunda yer alan norepinefrin, epinefrin ve dopamin'in sentezi için gerekli enzimler presinaptik yumruda bulunur. Kan dolaşımında bulunan tirozin, tirozin hidroksilaz enzimi ile dopa'ya, daha sonra da dekarboksile edilerek dopamin'e çevrilir. Dopamin hücre içindeki salgı veziküllerine girerek norepinefrin'e çevrilir. Granül dışında sitoplazmada kalan norepinefrin monoaminoksidaz tarafından mitokondride parçalanır (11), (Şekil 1.2).



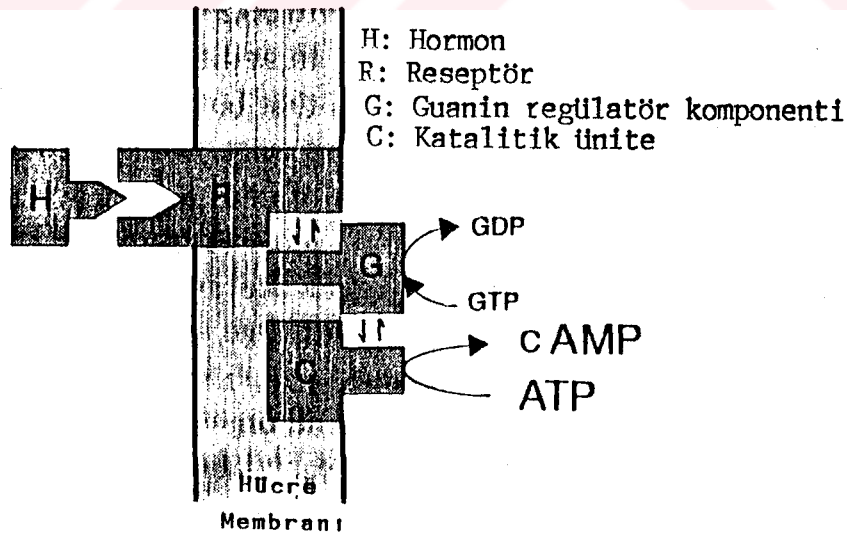
Sekil 1.2 Sinaptik transmisyon ve Norepinefrin Mekanizması (11).

impuls presnaptik yumruya gelince Norepinefrin salınır ve bu salınma işinde Ca^{++} iyonu gereklidir. Norepinefrin salındıktan sonra postsinaptik hücre membranındaki reseptörü ile birleşir ve etkisini membrana bağımlı adenilat siklaz enzimini uyararak gösterir. Norepinefrin görevini yaptıktan sonra presinaptik hücreye geri alınır. Dolayımdan geri alınamayan norepinefrin katekol-O-metiltransferaz tarafından inaktif hale getirilir (11, 12).

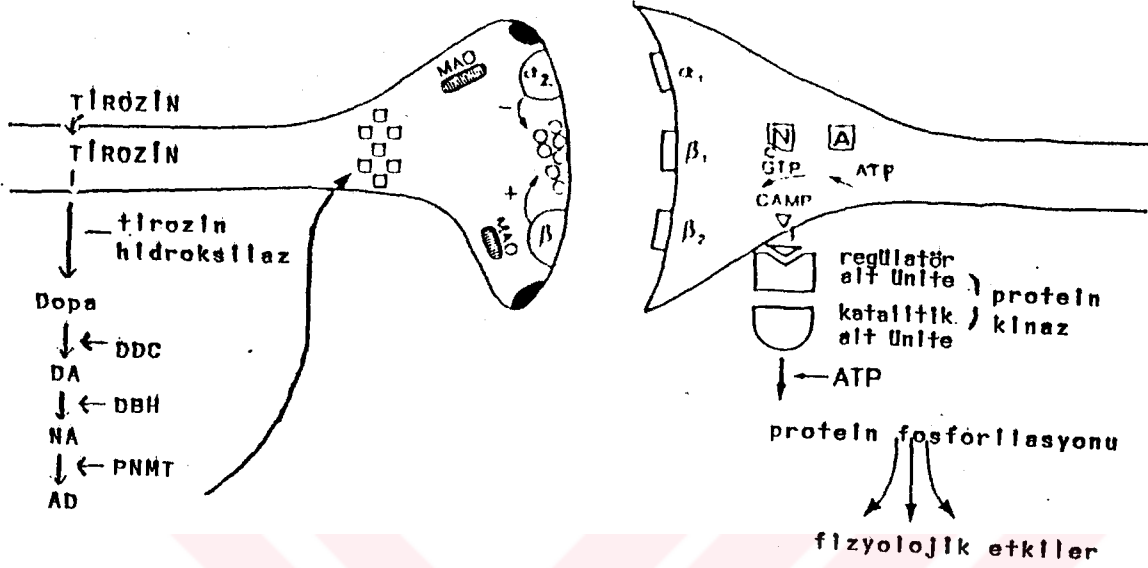
1.3 Reseptörlerin Yapısı, α ve β Adrenerjik Reseptörler

Adrenerjik sinyal iletim sistemi uç büyük bileşene sahiptir (Şekil 1.3). Birincisi hücrenin dış yüzeyine doğru

yerleşmiş spesifik tanıma bölgesidir ve epinefrin, norepinefrin ve β -adrenerjik ilaçları bağlar. İkinci bileşen guanin nükleotidi bağlayan regülatör proteindir. Üçüncü bileşen katalitik alt ünite ve ATP'nin cAMP'ye çevrildiği bölgedir (13,14). α ve β reseptörlerin yanı sıra dopaminerjik reseptörlerde vardır. Bu reseptörlerde α_1 , α_2 , β_1 , D_1 ve D_2 olmak üzere iki alt birime ayrılmışlardır. β_1 - β_2 ve D_1 reseptörlerinin aktivasyonu adenilat siklaz enzimini uyarırken α reseptörler ve D_2 reseptörlerin aktivasyonu enzimin inhibisyonunu sağlar. α_2 reseptörü transmitter salınımının presinaptik oto inhibisyonu ile ilgilidir. α_1 reseptörler daha çok postsinaptik tepkilerle ilgilidir (2, 7,13). Şekil 1.4'de noradrenerjik sinapsta katekolaminlerin sentezi metabolizması, reseptörleri ve ikinci mesajları görülmektedir (12).



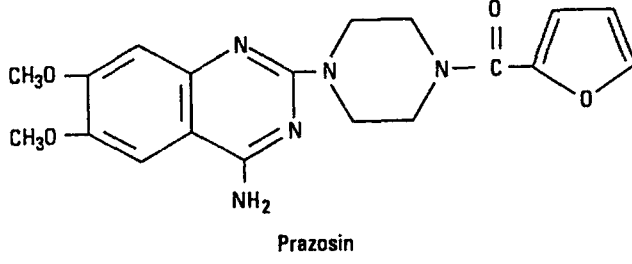
Şekil 1.3 Hormon-reseptör ilişkisinin şematik olarak gösterilmesi (13).



Şekil 1.4 Katekolaminlerin şematik olarak metabolizması (12).

1.4 Prazosin

Prazosin etkin bir α_1 -reseptör antagonistidir ve α_1 reseptörleri için oldukça seçicidir (Şekil 1.5). Prazosin arteriyol ve venöz düz kaslarının gevşemesini sağlar. İnsanlarda yaygın olarak metabolize olur ve parçalanması karaciğerde olmaktadır. Tansiyon düşürücü prazosin ilacının yarı ömrü üç saattir. Prazosin α_1 reseptörlerini bloke ederek antihipertansif etki gösterir ve büzülme ve kasılma gibi postsinaptik tepkilerin azalmasıyla bu etki sağlanır (2,15).

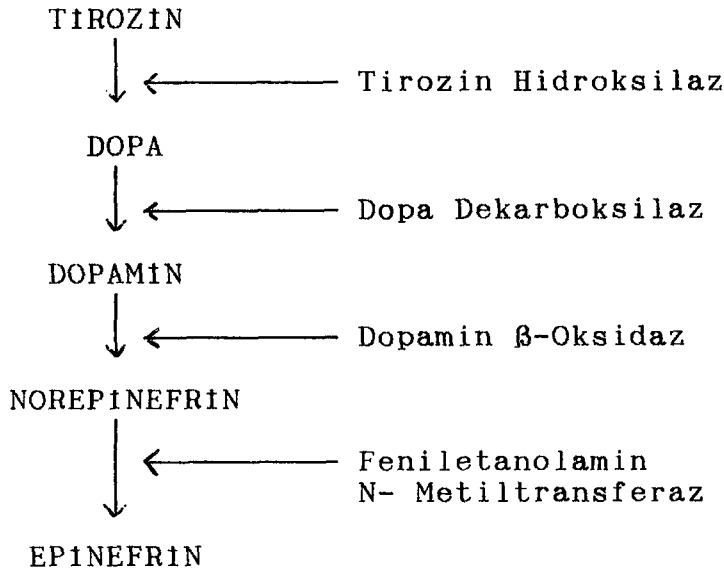


Şekil 1.5 Prazosin'in yapısı.

1.5 Tirozin Hidroksilaz (tirozin 3-monooksijenaz E C 1.14.16.2)

Tirozin hidroksilaz, triptofan hidroksilaz ve fenil alanin hidroksilaz, aromatik aminoasit hidroksilazlar olarak bilinen enzim grubunda yer alır. Bu üç memeli enzimi demir içeren oksidazlar olup pterin kofaktörüne ve moleküler oksijene ihtiyaç duyarlar (16). Tirozin hidroksilaz enzimi (tirozin 3-monooksijenaz; E C 1.14.16.2) L-tirozinden, L-dihidroksifenil alanin oluşumunu katalizler (7,17-25).

Tirozin aminoasiti katekolaminlerin öncülü olarak değerlendirilmekte ve ilk basamak tirozin hidroksilaz enzimi tarafından katalizlenmektedir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6 Katekolaminlerin tirozinden başlayan sentezi

Tirozin hidroksilaz enzimi katekolaminlerin hormonal işlevinde ve nörotransmisyonunda merkezi rol oynamaktadır. Hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıkların yanı sıra, parkinson hastalığı gibi katekolaminerjik nöronların bazı hastalıkların patojenitesi tirozin hidroksilaz enzimideki değişikliklerle ilgilidir (26).

Tirozin hidroksilaz enziminin işlevinin düzenlenmesi iki temel mekanizmaya dayanmaktadır; aktivasyon ve indüksiyon. Aktivasyon değişik dokularda sinirsel uyarım (21, 27-32) kısa süreli stres (33-35) yada ilaç uygulamaları ile olabilmektedir. Yapılan bir çalışmada da enzimin aktivasyon esnasında fosforillendiği (24) ve bu fosforillenmenin pteridin için Km değerini düşürdüğü ve son ürün inhibitörlerine ilgiyi azalttığı gösterilmiştir (25). Enzi-

min indüksiyonu, aktivasyonundan farklıdır ve ortaya çıkması için saatlerce süreye ihtiyaç vardır. İndüksiyonun enzim proteininde artışla birlikte olduğu düşünülmektedir (36,37). İndüksiyonda cAMP-bağımlı protein kinazların aracılık ettiği gösterilmiştir (27,28).

Tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi, stres, eksersiz ve yaşlanma gibi etkenlere bağlı olarak adrenal medulla ve beyinde değişiklikler göstermektedir. Soğuk stresi, eksersiz ve yaşlanmaya bağlı olarak tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi ve tirozin hidroksilaz mRNA seviyelerinde artış gözlemlendiği çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (12,38-51). Buna karşılık, eksersiz ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaçların (prazosin ve phenoxybenzamine gibi) tirozin hidroksilaz enzim aktivitesini ve tirozin hidroksilaz mRNA seviyelerini düşürdüğü bildirilmiştir (3,10,15,52-55). Ayrıca yaşlanma ile kardiyovasküler hastalıklar, nörokimyasal değişimler ve depresyon gibi rahatsızlıklar nedeniyle plazmada tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi ve tirozin hidroksilaz mRNA seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (12,43,44). Beyinde ise stres ve yaşlanmaya bağlı olarak tirozin hidroksilaz enzim aktivitesinin azaldığı buna karşılık düzenli eksersiz tirozin hidroksilaz enzim aktivitesini arttırdığı rapor edilmiştir (21,56,57).

Kronik soğuk stresi ve simpatetomi adrenal medullada katekolaminlerin sentezini ve salınmasını arttırır. Kromaffin hücreleri değişen fonksiyonel gereksinimlere

adapte olmak için tirozin hidroksilaz enziminin sentezini arttırır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda tirozin hidroksilaz mRNA'sına komplementer cDNA probu kullanılmıştır. Böyle bir probu kullanmakla, stresle uyarılan tirozin hidroksilaz enzim aktivitesindeki değişikliklerin altında yatan genetik mekanizmaların araştırılması mümkün olmuştur (3,58-60). Soğuk stresine maruz kalma ile artan katekolamin biyosentezi aynı zamanda hipotalamik uyarımın sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Hipotalamusun uyarılması ile katekolaminler, adrenal medulladan ve periferel sinir uçlarından salınırlar (39,45). Norepinefrin ve epinefrin'nin sentez oranı tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi ile kontrol edilir (61). Tirozin aminoasiti normal olarak kan dolaşımında bulunur ve dolaşımdan simpatetik nörona aktif transport mekanizmasıyla alınır. Nöronun yada adrenal medullanın kromaffin hücreleri içinde tirozin, sitoplazmadan mitokondriye girer ve burada tirozin hidroksilaz enzimi ile hidroksillenir ve dopa meydana gelir. Dopa daha sonra sitoplazmaya geçer ve dopamine çevrilir (62).

Soğuk stresine maruz kalan sıçanlarda tirozin hidroksilaz enzim antibadileri ile yapılan çalışmada enzim moleküllerinin sayısının artarak tirozin hidroksilaz enzim aktivitesinde artışa, aynı zamanda medullar cAMP konsantrasyonunda artışa neden olduğu gösterilmiştir (56).

Fizyolojik uyarımların adrenal tirozin hidroksilaz enzim üzerindeki etkileri test edilerek aşırı fizyolojik

uyarımın önemli derecede enzim aktivitesinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (63). Hipofiz bezi çıkarıldıktan sonra uygulanan stresin de tirozin hidroksilaz enzim aktivitesinde artışa neden olduğu rapor edilmiştir. Artan tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi splanik sinirlerin (iç organ sinirleri) (64) kesilmesiyle durmuştur. Böylece, stresde artan tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi adrenal medullanın sinirsel uyarımı sonucunda arttığı gösterilmiştir (65,66). Aynı zamanda soğuk stresi beyinde tirozin hidroksilaz enzim aktivitesinin artışına neden olmaktadır (21). Tirozin hidroksilaz enzim aktivitesindeki artışın soğuk stresi yada reserpine verilmesinden sonra, tirozin hidroksilaz mRNA seviyesindeki artıştan dolayı olduğu saptanmıştır (3). Soğuğa maruz kalma ile katekolaminlerin simpatoadrenal sistemde sentezi ve salınmasının artmasına transsinaptik aktivasyon aracılık etmektedir (67,68). Kronik soğuk stresinin etkileri RNA-DNA hibridizasyon tekniği kullanılarak araştırılmış ve tirozin hidroksilaz mRNA seviyesinin 4-5 kat arttığı saptanmıştır (69,70). Aynı konuda yapılan diğer araştırmalarda ise tirozin hidroksilaz mRNA seviyesinde 2 kat artış olduğu rapor edilmiştir. Kronik soğuk stresi ile adrenal medullada katekolaminlerin biyosentezinin artması, katekolamin biyosentezinde yer alan enzimlerin aktivitesinin artmasının sonucudur. Bu enzimlerden en çok ifade edileni tirozin hidroksilaz enzimidir (36,56-63, 65-71).

Dopa, norepinefrin ve epinefrin gibi katekolaminlerin,

adrenal medulladan salınmalarıyla endokrin ve sinir terminallerinden salınmalarıyla nöroendokrin görevleri, merkezi sinirsel işlevleri ve buna bağlı olarak homeostazisin sürdürülmesindeki rolleri çok önemlidir. Tirozin hidroksilaz enzimi ise katekolaminlerin sentezinde ilk basamağı katalizlemektedir. Dış ve iç uyarımlarında katekolaminlerin sentezini etkileyeceği şüphesizdir. Bu nedenle dış ve iç değişimlerin sentezde hangi safhayı etkilediği test edildiğinde, tirozin hidroksilaz enziminin katalizlediği ilk aşamanın önemli ölçüde etkilendiği bulunmuştur. Daha önce yapılan çalışmalarda tirozin hidroksilaz enzimi bu amaçla seçilmiştir.

Tarafımızdan yapılan çalışma ile soğuk stresi ve soğuk stresi+prazosin'in adrenal medullada tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi ve tirozin hidroksilaz mRNA seviyeleri üzerinde etkileri ile yaşlanma ve eksersizinin beyinde hipotalamusta tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi üzerindeki etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Deneyleerde Kullanılan Ratlar

Deneyleerde, erkek Fischer-344 ve Sprague Dawley sıçanları (*Rattus rattus*) kullanılmıştır. Eksersiz deneyleerde 4 ve 24 aylık Fischer-344, soğuk stresi ve soğuk stresi+prazosin uygulamasında 3 aylık Sprague Dawley sıçanları kullanılmıştır. Eksersiz deneyleerde kontrol olarak kullanılan genç ve yaşlı sıçanlar aynı zamanda yaşlanmaya bağılı olarak tirozin hidroksilaz aktivitesi araştırılmasında kullanılmıştır. Böylece aynı grupta yer alan genç ve yaşlı sıçanlarda hem eksersiz hem de yaşlanmaya bağılı olarak hipotalamusta tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi çalışılması mümkün olmuştur.

Sıçanlar deneyleerden önce oda sıcaklığında ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$) ve 12 saat aydınlık/karanlık periyodunda tutulmuştur. Hayvanlar rat yemi ile beslenmiş ve içebildikleri kadar su verilmiştir. Ratların ömür uzunlukları 27 aydır.

2.2 Eksersiz Uygulaması

Genç ve yaşlı gruplara, koşu bandı ile haftada 5 gün olmak üzere 9 hafta eksersiz yaptırıldı. Sıçanlar 5 dk. ısınma ile eksersize hazırlandı. Birinci hafta, birinci günde genç hayvanlara 25 m/dk. ve 0 derece eğimde, yaşlı hayvanlara 15 m/dk. ve 0 derece eğimde 12 dakika eksersiz

yaptırıldı. Eksersiz süresi 5. hafta sonunda 1 saate, hız genç hayvanlar için 30 m/dak. a yaşlı hayvanlar için 20 m/dak. a ve egimde %12.5 a yükseltilmiştir. Eksersiz hızı, eğimi ve süresi ile ilgili veriler EK 1'de verilmiştir. Eksersiz yaptırılmayan kontrol grubu ve aynı zamanda yaşlanmaya bağlı olarak tirozin hidroksilaz aktivitesinin araştırıldığı gruplar da kafeslerde tutulmuştur. Eksersiz sonunda 7 yaşlı ve 13 genç sıçanın, kontrol olarak da 8 yaşlı ve 13 genç sıçanın dokuları alınmıştır.

2.3 Soguk Stresi Uygulaması

Soguk stresi uygulamasında, 10 adet SD sıçanı 48 saat süre ile +4 C°de soguga maruz bırakıldı, 10 adet sıçan ise oda sıcaklığında muhafaza edildi. Sıçanlar, her kafeste bir adet olacak şekilde 30 dakika ara ile buzdolabına yerleştirildi ve yeteri kadar yiyecek ve su verildi. Soguk stresi uygulaması sonrasında, her iki grupta 5'er sıçandan dokular alındı.

2.4 Soguk Stresi + Prazosin Uygulaması

Soguk stresi+prazosin uygulamasında, 5 sıçan oda sıcaklığında kontrol olarak tutulurken 5 sıçan rat +4°C de, soguk stresine ve diger 5 sıçan da soguk stresi+ prazosin'e 4 hafta süre ile maruz bırakılmıştır. Pra-

zosin, 8 mg/kg olacak şekilde yiyeceklerle birlikte verilmiştir.

2.5 Diseksiyon İşlemi

Ratları bayıltmak için, sodyumpentobarbitol 75 mg/kg olacak şekilde abdominal bölgeye enjeksiyon ile verildi. Bayılmanın tam olup olmadığını anlamak için ratların ayakları doku pensiyelle sıkılarak reaksiyonları kontrol edildi ve genellikle bayıltma işlemi 2-3 dakika içinde tamamlandı. Abdomene bir kesik yapılarak vücudun iç kısmı iyice görülecek şekilde yukarıya doğru göğüs kafesine kadar açıldı. Bu esnada organlara temas edilmemesine dikkat edildi. Daha sonra göğüs kafesi açılarak vena cava kesildi, kalbe 30 ml %0.9'luk NaCl enjekte edildi ve kan vücuttan uzaklaştırıldı.

2.6 Adrenal Bezlerin Alınması ve Homojenizasyonu

Adipoz doku içerisindeki adrenal bezler çıkarıldı ve darası bilinen 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine konularak ağırlıkları kaydedildi. Tartım işleminden sonra 20 µl, 2 mM fosfat tamponu (pH 7.4 % 0.2 triton) ilave edilerek tüp buz küveti içine yerleştirildi ve 5-10 saniye içinde ultrasonifikatörde homojenize edildi. Daha sonra homojenata 80 µl tampon ilave edilerek homojenizasyon iş-

lemi tamamlandı. Homojenata enzimi koruyucu olarak 10 μ M, 20 μ l leupeptin ilave edildi.

Homojenatın 75 μ l'si RNA çalışmaları için, kalan miktar da total protein ve tirozin hidroksilaz aktivitesinin saptanması için ayrıldı. Homojenatlar vorteks işleminden sonra kullanılıncaya kadar -80°C 'de derin dondurucuda saklandı.

2.7 Hipotalamusun Alınması ve Homojenizasyonu

Daha önce, adrenal bezin alınması için bayıltılan ratın kafatası açılarak önce beyin tümü olarak çıkarıldı ve hipotalamus bölgesi dikkatlice alındı. Adrenal bezlerin alınmasında olduğu gibi önce ağırlıklar kaydedildi ve 10 hacim 2 mM fosfat tamponu (pH;7.4 % 0.2 triton) ilave edildi (W/V). Hipotalamus cam-cam homojenizatörde 5-6 vuruş ile homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra dokular 13.500 g'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant alınarak üzerine 10 μ M, 20 μ l leupeptin ilave edildi. Elde edilen süpernatanın 25 μ l'si total protein ve tirozin hidroksilaz enzim aktivitesinin saptanması için ayrıldı ve kullanılıncaya kadar -80°C 'de derin dondurucuda saklandı.

2.8 Total Protein Saptanması

Total protein saptanmasında standart eğri hazırlanmasında Bradford yöntemi kullanıldı. Standart protein olarak

BSA ve kör olarak 0.0744 N NaOH kullanıldı (72). Standart eğri hazırlandıktan sonra total protein ölçülmesi aşağıdaki sıra gözetilerek yapıldı.

1- 5 µl homojenat bir test tüpüne konuldu, 1 µl 7.44 N NaOH ilave edildi ve 20-25 dak. beklendi.

2- 94 µl H₂O ilave edilerek hacim 100 µl'ye tamamlandı ve 7 µl, 10.5 µl ve 14 µl'lik miktarlar ayrı ayrı tüplere iki tekrarlı paralel olarak konuldu ve bu tüplerde hacim 0.0744 N NaOH kullanılarak 800 µl'ye tamamlandı.

3- Standart eğri için kullanılan tüpler hazırlandı.

4- Bütün tüplere 200 µl boya çözeltisi (Biorad) ilave edilerek hacim 1 ml'ye tamamlandı ve en az 5 dak. beklendi, 595 nm'de absorban değerleri kaydedildi TH aktivitesinin ölçülmesinde, total proteinin 20 µg'nı içinde bulunduran miktar, 25 mM PIPES tamponu (pH 6, % 0.2 triton) ile 25 µl'ye tamamlandı.

2.9 TH Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Enzim aktivitesinin ölçülmesi, ³H₂O'nun ³H-[3,5]-L-tirozin'den salınması esasına dayanır. Bu reaksiyonda aktif kömür, reaksiyon sonucu oluşan izotopik substratları adsorbe eder (73). Aktivite ölçülmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları, Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Tirozin hidroksilaz aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

ölçüm sayısı	20	30	40	50	60	son kons.
0.5 M PIPES	100	150	200	250	300	50 mM
1 mg/ml katalaz	40	60	80	100	120	40 µg/ml
2 mM tirozin	50	75	100	125	150	100 µM
1 mM DTT	5	7.5	10	12.5	15	5 µM
d H ₂ O	245	367.5	490	612.5	735	-
1 mM Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	10	15	20	25	30	10 µM
30 mM 6 MPH ₄	50	75	100	125	150	1.5 mM
Son Hacim (µl)	500	750	1000	1250	1500	-

Her ölçüm için, 0.5 µl ³H-tirozin, azot gazı altında vakumlu mikrosantrifüjde kurutulmuş olarak kullanıldı. Örneğin 20 ölçüm için 10 µl radyoaktif tirozin kullanıldı. Tirozin hidroksilaz enzim aktivitesinin ölçülmesi aşağıda belirtildiği gibi yapıldı.

1- Tablo 2.1'de verilen çözeltiler ölçüm sayısına uygun miktarlarda izotop içeren tüpe ilave edildi. Reaksiyonu başlatmak için gerekli olan kofaktör 6 MPH₄, reaksiyon başlatılmadan hemen önce eklendi. Reaksiyon başlatılıncaya kadar reaksiyon karışımını içeren tüpler buz banyosu içinde korundu.

2- Enzim örnekleri, total protein sonuçlarına göre 25 mM PIPES (pH 6, % 0.2 triton) tamponunda 20 µg/25 µl olacak şekilde iki tekrarlı olarak hazırlandı.

3- Enzim içeren tüplere 25 µl reaksiyon karışımı ilave edilerek hacim 50 µl'ye tamamlandı ve reaksiyon 37°C'lik su banyosunda başlatıldı. Reaksiyonun tam olarak 15 dakika sürmesi sağlandı.

4- Reaksiyon, 15 dakika sonra % 7.5 aktif kömür içeren 1 M HCl'den 500 µl ilave edilerek durduruldu. Aktif kömür reaksiyon sonrası kullanılmayan ³H-tirozin ve ³H-dopa ürünlerini ortadan kaldırır. Aktif kömür ilavesinden sonra her tüp vorteks edildi.

5- Bütün tüplerde reaksiyonlar durdurulduktan sonra her tüp yeniden 5 saniye vorteks edildi.

6- Reaksiyon tamamen durduktan sonra tüpler 10.000 rpm'de 2 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi.

7- 350 µl süpernatant alınarak yeni, kapaklı 1.5 ml lik santrifüj tüplerine transfer edildi ve ikinci santrifüj 10.000 rpm'de 2 dakika'da yapıldı.

8- İkinci santrifüjden sonra 200 µl süpernatant dikkatlice alınarak sayım vial'ine transfer edildi ve üzerine 5 ml aquasol sayım çözültisi konuldu.

9- Dört tüp kör olarak kullanıldı ve bu tüplere enzim yerine 25 µl, 25 mM PIPES tamponu konuldu ve bu kör tüplerde 37°C'lik su banyosunda 15 dakika inkübe edildi.

10- İki adet standart tüpe, 25 µl, 25 mM PIPES tamponu ve 25 µl reaksiyon karışımı konuldu. Tampon ve reaksiyon karışımı tüpe konulduktan sonra enzim aktivitesi 1 M HCl ilavesi ile durduruldu. Bu karışımdan da 200 µl standart

radyoaktivite sayımı için alınmış ve 5 ml aquasol ilave edilmiştir. Standart ölçüm ile tüplerdeki ³H-tirozin'in radyoaktiflik oranı belirlendi. Formülde belirlenen bu değer kullanıldı. Aktivitenin hesaplanması ise aşağıda verilen formüle göre yapıldı.

$$\text{Aktivite} = \frac{[\bar{X}_{\text{cpm}}(\text{örnek})] - [\bar{X}_{\text{cpm}}(\text{kör})] \times (550/200)}{[\bar{X}_{\text{cpm}}(\text{std})] \times (0.25 \text{ saat}) \times 0.02 \text{ mg protein}}$$

$$= \text{nmol/mg.p.h (mg.protein.saat)}$$

2.10 Total RNA Eldesi

Total RNA eldesi, a) ekstraksiyon, b) presipitasyon ve c) yıkama ve yeniden çözme olmak üzere üç aşamada gerçekleştirildi (74).

2.10.1 Ekstraksiyon

Total RNA eldesi, ekstraksiyon aşamasında aşağıda açıklanan basamaklar izlendi:

1- Adrenal medullanın homojenizasyonundan sonra saklanan 75 µl'lik homojenata 800 µl RNAzol ilave edildi.

2- RNAzol ilavesinden sonra 80 µl kloroform konularak tüp sıkıca kapatılmış ve elde şiddetlice 15 saniye sallandı. Daha sonra 5 dakika buz küvetinde bekletildi.

3- Homojenat 12.000 g'de 4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi.

2.10.2 Presipitasyon

1- Total RNA eldesi, ekstraksiyon aşamasında gerçekleştirilen santrifüj işleminden sonra, elde edilen renksiz üst tabaka dikkatlice steril bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi.

2- 400 µl isopropanol ilave edilerek vortekslenen tüp 4°C'de 15 dakika bekletildi.

3- 12.000 g'de 4 °C'de 15 dakika santrifüj yapıldı.

2.10.3 Yıkama ve yeniden çözme

1- Presipitasyon safhasında elde edilen süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan RNA peleti 800 µl % 75'lik etanol ile vortekslenerek yıkandı ve sonraki santrifüj işlemi 10500 rpm'de 8 dakika tekrar çevrildi.

2- Santrifüj işleminden sonra, RNA peleti, azot gazı altında vakumlu santrifüjde kurutuldu.

3- RNA peleti, % 0.1 DEPC içeren 15 µl steril suda yeniden çözüldü. DEPC, RNA'yı koruyucu özelliğe sahip olduğundan çalışma boyunca kullanıldı.

2.11 Total RNA Miktarının Saptanması

TH enzimi gen ifadesi araştırılmasında kullanılacak olan total RNA miktarı aşağıda belirtilen aşamalara göre

saptandı.

1- Spektrofotometrenin (Shimadzu) okuma yapılmadan 5-10 dakika önce açılarak ısınması sağlandı.

2- Dalga boyu 260 nm ve 280 nm'ye ayarlandı.

3- RNA miktarı saptanmadan önce, RNA'yı içeren tüp 10 dakika 65°C'de ısıtıldı ve hemen buz küvetine konuldu.

4- Kör olarak %0.1 DEPC içeren steril distile su kullanıldı.

5- RNA örnekleri, %0.1 DEPC içeren steril distile suda 100 µl içinde 0.5 µl ve 1 µl olacak şekilde hazırlandı.

6- Absorbans değerleri 260 nm ve 280 nm'de alındı. Bu işlemlerden sonra total RNA miktarının hesaplanması için aşağıdaki formül kullanıldı.

$[(40 / (1 \times V))] \times A = \mu\text{g}/\mu\text{l RNA}$; bu formülde;

40 : sabit sayı; 1 : 1000 µl'lik küvet hacmi (bu çalışmada 100 µl'lik küvet kullanıldığı için değer 0.1 şeklinde değiştirilerek kullanılmıştır). V : uygulanan RNA örnek hacimi (0.5 µl yada 1 µl). 0.5 µl'lik ve 1 µl'lik RNA uygulamasından sonra elde edilen değerlerin ortalaması alınarak ortalama RNA miktarı µg/µl olarak saptandı.

2.12 RNA Jel Elektroforezi

Ekstraksiyon ve presipitasyon safhalarından sonra elde edilen RNA'nın bozulup bozulmadığını ve tam olarak elde

edilip edilmediğini test etmek ve bu nedenle hibridizasyon işleminde kullanılıp kullanılmayacağını gözlemek için jel elektroforezi yapıldı (76).

2.12.1 Jelin hazırlanması

RNA elektroforezi için 1XTBE (pH;8) tamponu kullanıldı. Çalışmada 40 ml, %1 agaroz kullanıldı. Bunun için 0.4 g agaroz 40 ml, 1XTBE'de tamamen eritildi. Sıcaklık 60-70°C'ye düşünce bantların görünebilmesi için etidium bromid çözeltisinden 20 µl ilave edildi. Etidium bromid ise ml'de 0.25 µg/ml olacak şekilde hazırlandı.

2.12.2 Örneklerin jele yüklenmesi

RNA içeren tüplerden, 1 µg RNA'yı veren miktar alınarak elektroforez için kullanıldı. RNA'nın yüklenmesi ve elektroforez aşağıdaki gibi yapılmıştır. Boya çözeltisinden 9 µl, 1 µg RNA'yı veren X µl RNA örneği ve Y µl H₂O , 15 µl'ye tamamlandı. Örnekler bu şekilde 600 µl'lik mikrosant-rifüj tüplerinin içinde hazırlandıktan sonra jele yüklendi ve 50 mA akım, 45 dakika oda sıcaklığında , uygulandı. Oluşan bantlar U.V altında incelenerek M4-P polaroid kamera ile filmi çekildi.

2.13 Slot Blot işlemi

Total RNA eldesinden sonra prehibridizasyon ve

hibridizasyon işlemi için slot blot işlemi aşağıdaki gibi yapıldı (75).

1- Slot blot cihazı önce 0.1 N NaOH ile sonra distile su ile yıkandı.

2- Üç adet 3 mm'lik whatmann filtre kağıdı ve slot blot cihazı boyutlarında naylon membran (gene screen) kesildi. Membran ve filtre kağıtları önce steril suda tamamen ıslatıldı ve daha sonra 2xSSC'de 10 dakika bekletildi.

3- Slot blot için, steril 600 µl'lik kapaklı santrifüj tüpüne konulan RNA'yı denatüre halde ve doğrusal şekilde elde etmek için Tablo 2.2'deki çözeltiler ilave edildi.

Tablo 2.2 Slot blot işleminde kullanılan çözeltiler

Deiyonize formaldehit (% 37)	20 µl
Steril 20 x SSC	30 µl
RNA (3 µg RNA'yı veren hacim)	X µl
H ₂ O	50-X µl

Toplam hacim bu şekilde 100 µl'ye tamamlandı. 100 µl'lik bu örnekleri içeren tüpler 65°C'de 15 dakika ısıtıldı ve daha sonra 5 dakika buzda bekletildi. Tüpün üzerine 300 µl, 10 x SSC ilave edilerek hacim 400 µl'ye tamamlandı. Slot blot cihazına 3 adet filtre kağıdı vakum sırasında naylon membranın parçalanmaması için membranın altına yerleştirildi ve üzerine naylon membran konularak vakuma bağlandı. Slot blot cihazı kanallarına çok yavaş vakum altında sırayla 150 µl, 100 µl, 70 µl ve 50 µl denatüre edilen RNA örnekleri

yüklendi. Bütün örnekler kanallara uygulandıktan sonra her kanal 400 µl, 10XSSC ile yıkandı. Böylece RNA'nın membrana doğrusal şekilde bağlanması sağlandı. Yıkama işlemi bittikten sonra filtre kağıtları atıldı ve membran önce havada kurutuldu. RNA'nın membrana bağlanmasını iyice sabitleştirmek ve daha önce uygulanan sıvıları uçurmak için membran daha sonra 80°C'lik vakumlu fırında 3 saat bekletildi. Bu süre sonunda vakumlu fırından çıkarılan membran kullanılıncaya kadar -20°C'de bekletildi.

2.14 Prehibridizasyon

Prehibridizasyon işlemi aşağıdaki gibi yapıldı (77).

- 1- Slot blot fırını 42 °C'ye ayarlandı.
- 2- Membrana uygun büyüklükte, membranların arasına konularak yapışmalarını engelleyen ağ kesildi.
- 3- Membran ve ağ uygun bir kap içerisinde 2XSSC ile önceden ıslatıldı.
- 4- Birden fazla membran olduğu durumlarda membranlar birbirinden ağ ile ayrılmaları sağlandı. Membran ve ağ üst üste tamamen kapatılarak rulo yapıldı.
- 5- Rulo prehibridizasyon işlemi için, vidalı kapaklı özel şişeye 10 ml 2XSSC konuldu ve rulo şişeye yerleştirildi. Yerleştirme esnasında şişe ve membranlar arasında hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi.
- 6- Rulo şişeye konulduktan sonra şişe içindeki 2xSSC döküldü ve 1-2 membran için 10 ml, 3-5 membran için 20 ml

prehibridizasyon solüsyonu ilave edildi. Şişenin kapağı sıkıca kapatıldı ve prehibridizasyon işlemi için fırına yerleştirilerek bir gece 42°C'de inkübe edildi.

2.15 TH Prob'unun İşaretlenmesi

TH prob'unun işaretlenmesinde NEG-012H Deoksiadenosine 5'-Triphosphate, tetra(trietilamonyum)salt, [α - 32 P] kullanılmıştır. Probun işaretlenmesinde kullanılan diğer maddeler Tablo 2.3'de ve yöntem aşağıda verilmiştir (77).

Tablo 2.3 TH Prob'unun işaretlenmesinde kullanılan çözeltiler

Bileşikler	Hacim
5X Random primer tamponu	10 μ l
4 mg/ml BSA	5 μ l
dNTP karışımı (dCTP, dGTP, dTTP)	3 μ l
[α - 32 P]-dATP	5 μ l
TH probu	3 μ l

Toplam hacim steril distile su ile 50 μ l'ye tamamlandı. Probun işaretlenmesi ve DNA sentezini başlatmak için DNA klenow (DNA polimeraz)'u ilave etmeden önce 1 μ l total radyoaktivite sayımı için alındı. 1 μ l DNA polimeraz ilave edildikten sonra reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 3 saat inkübe edildi. inkübasyondan sonra DNA sentezi, 10 μ l, 100 mM TE ilave edilerek durduruldu. İşaretli prob hibridizas-

yonda kullanılması için kolon kromatografisi ile bulunduğu çözeltiden ayrıldı. Kolon kromatografisi ile radyoaktif işaretli probun ayrılma işlemi sırasıyla;

1- Kolon içindeki sıvı dökülerek 3 ml TE tamponu ile yıkandı.

2- Kolon 3 ml TE tamponu ile tekrar yüklendikten sonra alt tıpa açıldı ve kolonun boşalması sağlandı.

3- İşaretli prob kolona yüklendi ve daha sonra 400 µl TE tamponu ilave edildi. Böylece işaretlenmemiş prob ile nonspesifik fragmentlerin uzaklaştırılması sağlandı.

4- Probun kolona bağlanması sağlandıktan sonra tekrar 400 µl TE tamponu ilave edilerek kolondan saf olarak işaretli prob alındı.

Kolondan saf olarak alınan probda radyoaktif işaretlenme oranını saptamak için 1 µl örnek alındı. Daha öncede total sayım için ayrılan örneğe ve saf örneğe 5 ml toluen eklenerek β sayıcıda 2 dakika sayıldı. Probun işaretlenmesinden önce [α -³²P]’deki radyoaktivite ile, işaretleme işlemi sonucu TH cDNAsı’nın yapısına giren [α -³²P]’daki radyoaktivite ölçülerek yeni sentezlenen DNA da radyoaktivite saptandı. Ölçüm sonucunda %60 ve üzerinde işaretlenmiş prob hibridizasyon işleminde kullanıldı.

2.16 Hibridizasyon

TH cDNA’sı işaretlendikten sonra denatüre edilerek hibritleşmenin olabilmesi için tek kollu hale gelmesi ve bu

şekilde kalması sağlandı. Hibridizasyon işlemi aşağıdaki gibi yapıldı. (77)

1- Önceden hazırlanarak -20°C 'de saklanan hibridizasyon çözeltisi ısıtılarak 42°C 'ye gelmesi sağlandı.

2- İşaretli prob 95°C 'de 10 dakika ısıtılarak denatüre edildi.

3- Şişe fırından çıkarılarak içindeki prehibridizasyon sıvısı döküldü.

4- İşaretli probu içeren hibridizasyon çözeltisinden 1-2 membran için 10 ml, 3-5 membran için 20 ml kullanıldı. Şişe tekrar fırına yerleştirilerek 42°C 'de bir gece inkübe edildi.

2.17 Membranların Yıkınması

Yıkama işlemi, membrana bağlanmamış cDNA ve membran üzerinde bağlanma olmayan bölgelerdeki radyoaktif artıkların membrandan uzaklaştırılması için yapıldı. Membranların yıkınmasında aşağıdaki basamaklar takip edildi (77).

1- Membranlar şışeden alındı ve radyoaktif sıvı döküldü.

2- Membranların bulunduğu şışeye 20 ml, 1XSSC ve %1 SDS ilave edildi ve 10 dakika inkübe edildi.

3- İlk inkübasyondan sonra bu sıvı döküldü ve ikinci aşama 4 kez tekrarlandı.

4- Fırının sıcaklığı 65°C 'ye ayarlandı ve 20 ml, 0.25XSSC ve %1 SDS ilave edilerek 10 dak.inkübe edildi.

5- Sıvı dökülerek 4. basamaktaki işlem 3 kez tekrarlandı.

6- Son yıkama işleminden sonra membranların herbiri 2 adet 3 mm'lik filtre kağıdı arasında kurutuldu.

7- Membran daha sonra Saran Wrap ile sarıldı ve karanlık odada örneklerin uygulandığı taraf filme (Kodak,X-OMAT) gelecek şekilde film kasetine yerleştirildi. Kaset -70°C'de 3 gün bekletildi.

8- Üç gün sonunda kaset derin dondurucudan alındı, 30-60 dak.içerisinde oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Daha sonra kaset karanlık odada açılarak banyo edildi.

Banyo işleminden sonra elde edilen bantlar, standart'a karşılık optik densitometrede okundu ve TH mRNA miktarları OD ünitesi $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ RNA olarak saptandı.

2.18 İstatistiksel Yöntem

Yaşlanma ve eksersizin F-344 ratlarında, hipotalamusta tirozin hidroksilaz aktivitesi üzerindeki etkileri ile soğuk stresi ve soğuk stresi + prazosin'in Sprague Dawley ratlarında adrenal medullada tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi ve tirozin hidroksilaz mRNA seviyeleri üzerindeki etkileri, istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Fischer-344 ratlarında, genç-yaşlı, kontrol-eksersiz ve Sprague Dawley ratlarında kontrol-soğuk stresi ve kontrol-soğuk stresi+prazosin grupları arasındaki farkın önem kontrolü "t" testi ile hazır paket program

kullanılarak yapılmıştır. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir.



3. SONUÇLAR

Yaşlanma ve eksersiz, hipotalamusta tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi üzerindeki etkileri ile, 48 saat soğuk stresine maruz kalan ratlarda ve 3 hafta soğuk stresi+prazosine maruz kalan ratların adrenal medullasında tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi ve TH mRNA seviyeleri araştırıldı.

Yapılan çalışmada, yaşlanma ve eksersiz F-344 sıçanlarında hipotalamusta tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi üzerindeki etkileri, kontrol grubu ve 48 saat soğuk stresine maruz kalan Sprague Dawley sıçanlarında adrenal medullada tirozin hidroksilaz enzim aktivitelerinin değişimi ve tirozin hidroksilaz mRNA seviyelerinin değişimi ve kontrol grubu ve 3 hafta soğuk stresi ve soğuk stresi+prazosine maruz kalan Sprague Dawley sıçanlarında adrenal medullada tirozin hidroksilaz enzim aktivitelerinin tirozin hidroksilaz mRNA seviyelerinin değişimi araştırıldı.

Sonuçlar yaşlanma ve eksersiz hipotalamusta tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi üzerindeki etkileri ile, 48 saat soğuk stresine maruz kalan ratlarda ve 3 hafta soğuk stresi+prazosin'e maruz kalan ratların adrenal medullasında tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi ve tirozin hidroksilaz mRNA seviyeleri üzerindeki etkileri olmak üzere üç ana başlık altında toplanmıştır.

3.1 Yaşlanma ve Eksersiz F-344 Ratlarında Hipotalamusta TH Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkileri

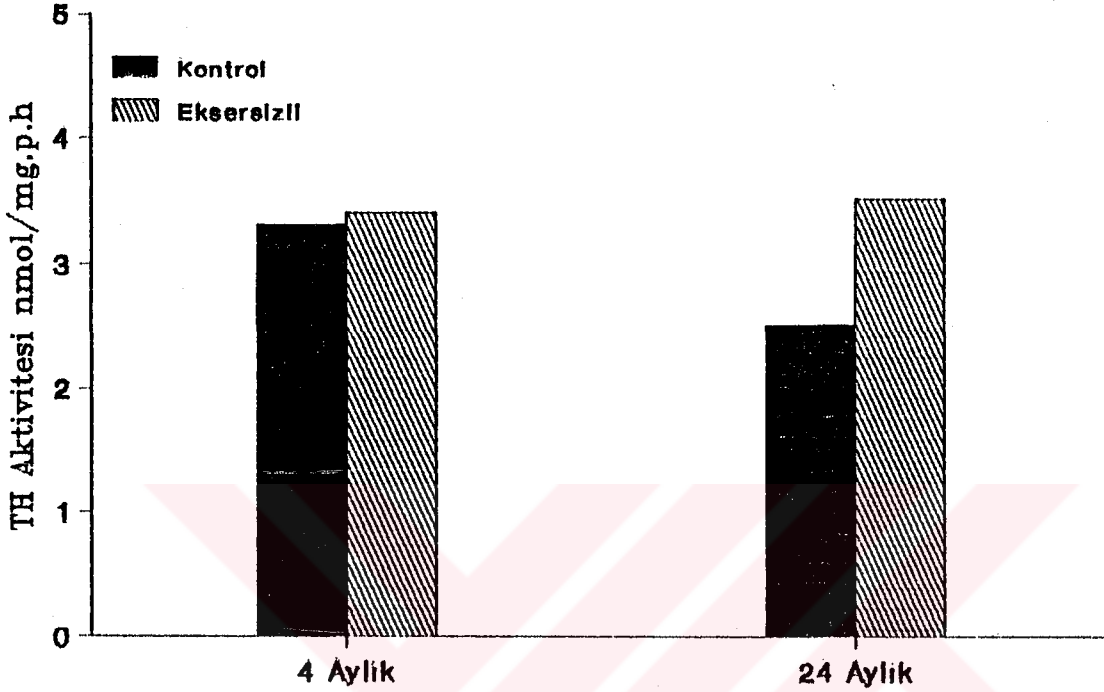
Yaşlanmaya bağlı olarak Fischer-344 ratlarında hipotalamusta tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi araştırılmış ve artan yaşa bağlı olarak tirozin hidroksilaz enzim aktivitesinde istatistiksel olarak azalma bulunmuştur ($P < 0.05$). Çalışmada 4 aylık ratlar genç, 24 aylık ratlar yaşlı grup olarak seçilmiştir. Genç ratlarda tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi 3.3 ± 0.1 nmol/mg.P.h olarak bulunurken yaşlı ratlarda bu değer 2.5 ± 0.6 nmol/mg.P.h olarak bulunmuştur (Tablo 3.1, Şekil 3.1). Tablo 3.1'de genç ve yaşlı ratlarda yaşlanma ve eksersiz uygulamasından sonra hipotalamusta TH enzim aktivitesine ait veriler görülmektedir.

Tablo 3.1 Yaşlanma ve eksersiz F-344 ratlarında hipotalamusta TH enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.

	TH Enzim Aktivitesi (nmol/mg.P.h)	
	4 aylık	24 aylık
Kontrol	3.3 ± 0.1	2.5 ± 0.6
Eksersizli	3.4 ± 0.2	3.5 ± 0.3

Bazı araştırmacılar beyinde tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi olmadığını söylerken (39,78) bazıları da beyindeki katekolaminlerin biyosentezinde görevli enzimlerde ortaya çıkan değişikliklerin türe, hatta soya özgü olduğunu rapor etmişlerdir. Bu konuda yapılan diğer çalışmalarda ise kate-

kolaminlerin metabolizmasında azalma olduğu belirtilmiştir (79,80).



Şekil 3.1 Yaşlanma ve eksersizinin F-344 ratlarında hipotalamusta TH aktivitesi üzerine etkilerini gösteren grafik.

Eksersizinin tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi üzerindeki etkileri hipotalamusta araştırılmıştır. Eksersiz yaptırılan genç ve yaşlı ratlarda tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi sırasıyla 3.4 ± 0.2 nmol/mg.p.h ve 3.5 ± 0.3 nmol/mg.p.h olup aradaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Aynı zamanda eksersiz yaptırılan genç ratlar ile eksersiz yaptırılmayan ratlarda da hipotalamusta TH enzim aktiviteleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Tablo 3.1'den görüleceği üzere eksersiz yaptırılmayan ve eksersiz yaptırılan yaşlı ratlarda TH enzim aktiviteleri sırasıyla 2.5 ± 0.6

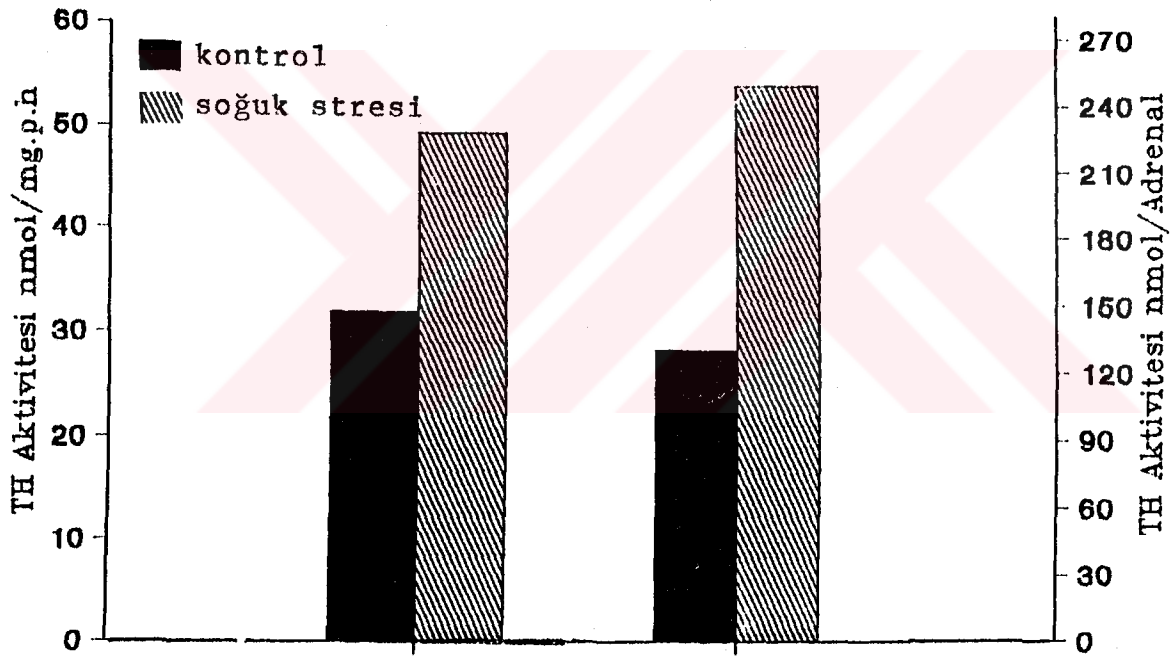
nmol/mgPh ve 3.5 ± 0.3 nmol/mgPh olup istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Genç ratlarda tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi incelendiğinde eksersiz uygulaması yaptırılan ve yaptırılmayan ratlarda bu değerler sırasıyla 3.3 ± 0.1 nmol/mgPh ve 3.4 ± 0.3 nmol/mgPh olup istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

3.2 Kontrol ve Soğuk Stresine 48 Saat Maruz Kalan SD Ratlarında, Adrenal Medullada TH Enzim Aktivitelerinin ve TH mRNA Seviyelerinin Değişimi.

Tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi ve tirozin hidroksilaz mRNA seviyeleri üzerinde 48 saat süreli soğuk stresinin etkileri araştırılmış ve istatistiksel olarak önemli artışlar kaydedilmiştir. Tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi nmol/mg.p.h ve nmol/adrenal olarak ölçülmüştür. Yapılan çalışmada kontrol grubunda tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi, 31.98 ± 0.79 nmol/mgPh ve 131.31 ± 9.82 nmol/adrenal iken, soğuk stresine maruz kalan ratlarda bu değerler 49.32 ± 3.66 nmol/mg.p.h ve 250.50 ± 23.90 nmol/adrenal olarak bulunmuştur (Tablo 3.2, Şekil 3.2). Soğuk stresine 48 saat maruz kalan ratlar ile kontrol ratlarında tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi incelendiğinde (Tablo 3.2), soğuk stresinin enzim aktivitesini arttırdığı ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmektedir ($P < 0.05$). Soğuk stresine bağlı olarak doku ağırlığı ve total protein miktarı incelendiğinde bir artış kaydedilmiş ancak bu artış istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

Tablo 3.2 Kontrol ve Soğuk stresine 48 saat maruz kalan SD ratlarında adrenal medullada TH enzim aktiviteleri.

	Doku Ağr. (mg)	Tot.Prot. µg/µl	TH Akt mol/mg.P.h	TH Akt. nmol/adr.
Kontrol	26.16	41.32	31.98±0.79	131.31±9.82
Soğuk St	30.98	50.53	49.32±3.66	250.50±23.90

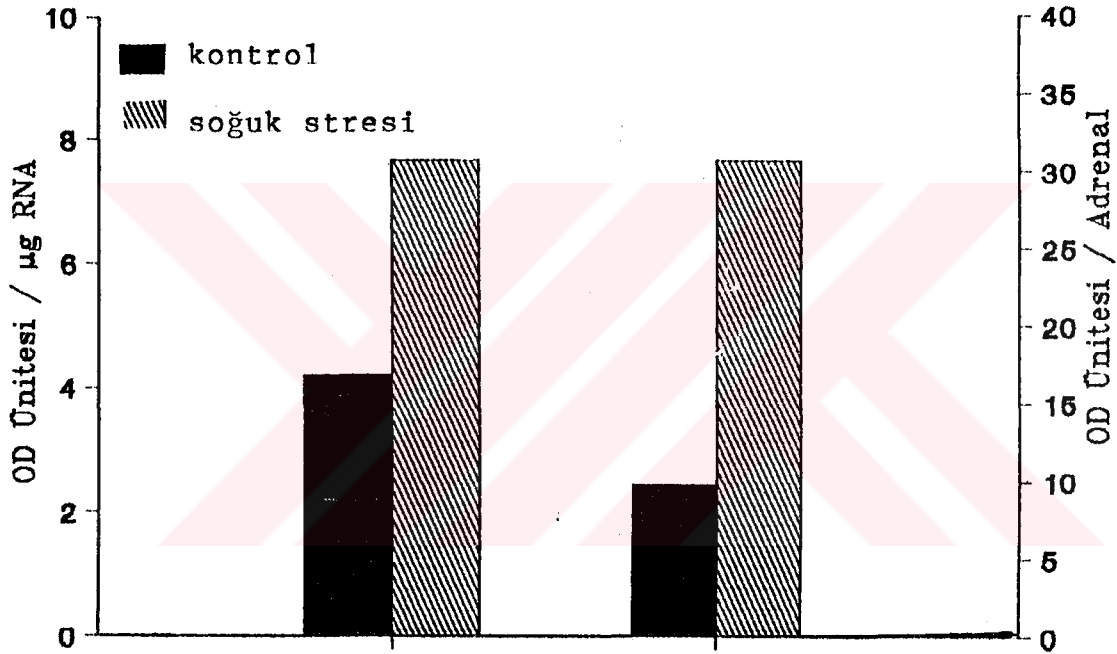


Şekil 3.2 Kontrol ve Soğuk stresine 48 saat maruz kalan SD ratlarında adrenal medullada TH enzim aktivitesini gösteren grafik.

Tirozin hidroksilaz mRNA seviyeleri de OD ünit/µg RNA ve OD ünit/adrenal olarak verilmiş ve kontrol ratlarında bu değerler Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.3 Kontrol ve soğuk stresine 48 saat maruz kalan SD ratlarında, adrenal medullada TH mRNA seviyeleri.

	Total RNA µg/µl	OD Unit /µg RNA	OD Unit /adrenal
Kontrol	2.167	4.22±0.93	9.74±2.70
Soğuk Str.	4.024	7.68±0.29	30.68±3.25

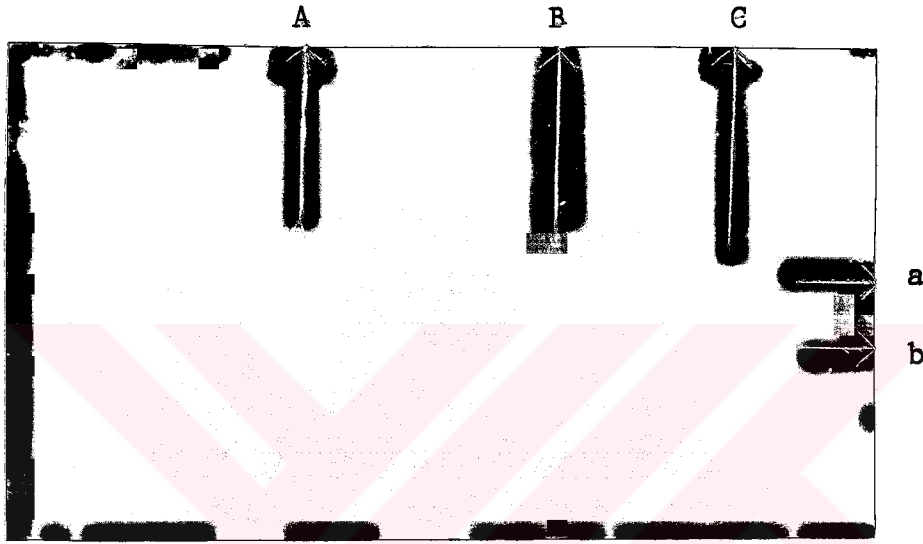


Şekil 3.3 Kontrol ve 48 saat soğuk stresi uygulaması yapılan SD ratlarında, adrenal medullada TH mRNA seviyelerinin değişimini gösteren grafik.

Kontrol ve soğuk stresine maruz kalan ratlarda adrenal medullada tirozin hidroksilaz mRNA seviyelerinde görülen bu değerler istatistiksel olarak önemlidir. Tablo 3.3 incelendiğinde total RNA miktarındaki artış görülmüş ve bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$).

Çalışmamızda total RNA'nın, homojenizasyon ve ekst-

raksiyon işlemlerinin doğru yapılabildiği ve intakt halde elde edilip edilmediği elektroforez ile test edilmiştir. Şekil 3.4'de ise elektroforez sonucu elde edilen bantlar görülmektedir.



Şekil 3.4 Kontrol ve 48 saat soğuk stresi uygulamasına ait RNA elektroforezi, A- standart B- 48 saat soğuk stresi uygulaması C- kontrol' a ait bantlar. a) 28S RNA, b) 18S RNA.

Kontrol ve 48 saat, 4°C'de soğuk stresine maruz kalan ratlarda adrenal medullada tirozin hidroksilaz mRNA slot blot şeması Şekil 3.5a'da ve ³²P ile gerçekleştirilen otoradyografileri Şekil 3.5b'de görülmektedir. Şekil 3.5a da slot blot şemasında standart RNA ile kontrol ve soğuk stresi uygulanan gruplardan elde edilen RNA'nın uygulama bölgeleri, Şekil 3.5b'de ise uygulama sonucu elde edilen TH mRNA-TH cDNA hibrit otoradyografileri görülmektedir.

	1	2	3	4	5	6
A	S	48 saat soğuk stresi	kontrol	48 saat soğuk stresi	kontrol	48 saat soğuk stresi
B	T					
C	A					
D	N					
E	D					
F	A					
G	R					
H	T	kontrol	48 saat soğuk stresi	kontrol	48 saat soğuk stresi	kontrol

Şekil 3.5a Kontrol ve 48 saat soğuk stresi uygulamasına ait slot blot şeması



Şekil 3.5b Kontrol ve 48 saat soğuk stresi uygulamasına ait otoradyografik bantlar.

3.3. Kontrol, 3 Hafta Soğuk Stresi ve Soğuk Stresi + Prazosin'e Maruz Kalan SD Ratlarında Adrenal Medullada TH Enzim Aktitivitesi ve TH mRNA Seviyelerindeki Değişimler.

Çalışmamızın bu aşamasında ratların bir grubu kontrol olarak oda sıcaklığında bekletilmiş, bir grup soğuk stresine diğer bir grup da soğuk stres+prazosin'e maruz bırakılmıştır. Yapılan bu çalışma ile soğuk stresinin neden olabileceği tirozin hidroksilaz enzim aktivitesindeki artış, dolayısıyla katekolaminlerin biyosentezindeki artışın, ve soğuk stresi ile beraber uygulanan prazosin'in hipotansif etkisi araştırıldı. Kontrol, soğuk stresi ve soğuk stres+prazosin uygulamasının adrenal medullada TH enzim aktivitesine ait veriler Tablo 3.4 ve Şekil 3.6'da görülmektedir.

Soğuk stresi ve soğuk stres+prazosin uygulaması ile adrenal medullada tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi ve tirozin hidroksilaz mRNA seviyelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli artış bulundu ($P < 0.02$).

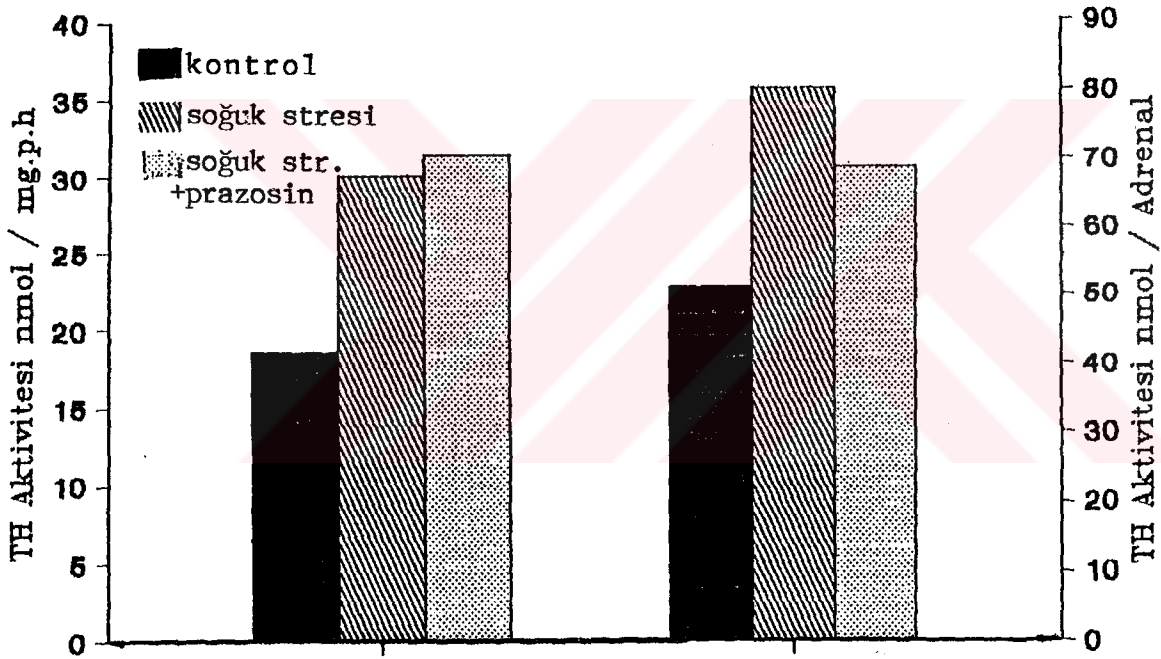
Bu çalışmada hipertansiyon tedavisinde kullanılan prazosin, yiyeceklerle birlikte ratlara verilmiş ve ratlar üç hafta boyunca soğuk stresine maruz bırakılmıştır. Soğuk stresi ve soğuk stres+prazosin'in tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi ve tirozin hidroksilaz mRNA seviyeleri üzerindeki etkileri istatistiksel yönden önemsiz bulunmuştur.

Tablo 3.4 Kontrol ve 3 hafta soğuk stresi ve soğuk stresi + prazosin uygulaması yapılan SD ratlarında TH enzim aktivitesi üzerindeki etkileri.

	Doku Ağ. (mg)	Tot.Pr. µg/µl	TH Akt. nmol/mg.P.h	TH Akt. nmol/adr.
Kontrol	23.90	27.45	18.63±2.20	51.27±6.61
Soğuk St.	25.00	26.44	30.09±1.23	80.41±6.69
Soğuk St+ Prazosin	23.40	22.10	31.47±4.45	68.93±12.48

Kontrol grubu ratlarda, adrenal medullada tirozin hidroksilaz aktivitesi 18.63 ± 2.20 nmol/mgPh, 51.27 ± 6.61 nmol/adrenal iken üç hafta soğuk ştresine maruz kalanlarda 30.09 ± 1.23 nmol/mgPh, 80.41 ± 6.69 nmol/adrenal ve soğuk stresi+prazosin'e maruz kalanlarda tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi 31.47 ± 4.45 nmol/mgPh, 68.93 ± 12.48 nmol/adrenal olarak bulunmuştur (Tablo 3.4 ve Şekil 3.6). Soğuk stresi ve soğuk stresi+prazosin'in tirozin hidroksilaz mRNA seviyelerini kontrol grubuna göre önemli derecede arttırdığı ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur. Ancak, soğuk stresi ve soğuk stresi+prazosin'in etkileri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Tablo 3.5, Şekil 3.7). Her üç grupta total RNA miktarları incelendiğinde sırasıyla 1.13 µg/µl, 1.21 µg/µl ve 0.77 µg/µl olup gruplar arasındaki değişiklikler istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Tirozin hidroksilaz mRNA seviyesi ise kontrol grubunda 0.37 ± 0.03 OD ünitesi/µg RNA, 0.46 ± 0.15 OD ünitesi/adrenal,

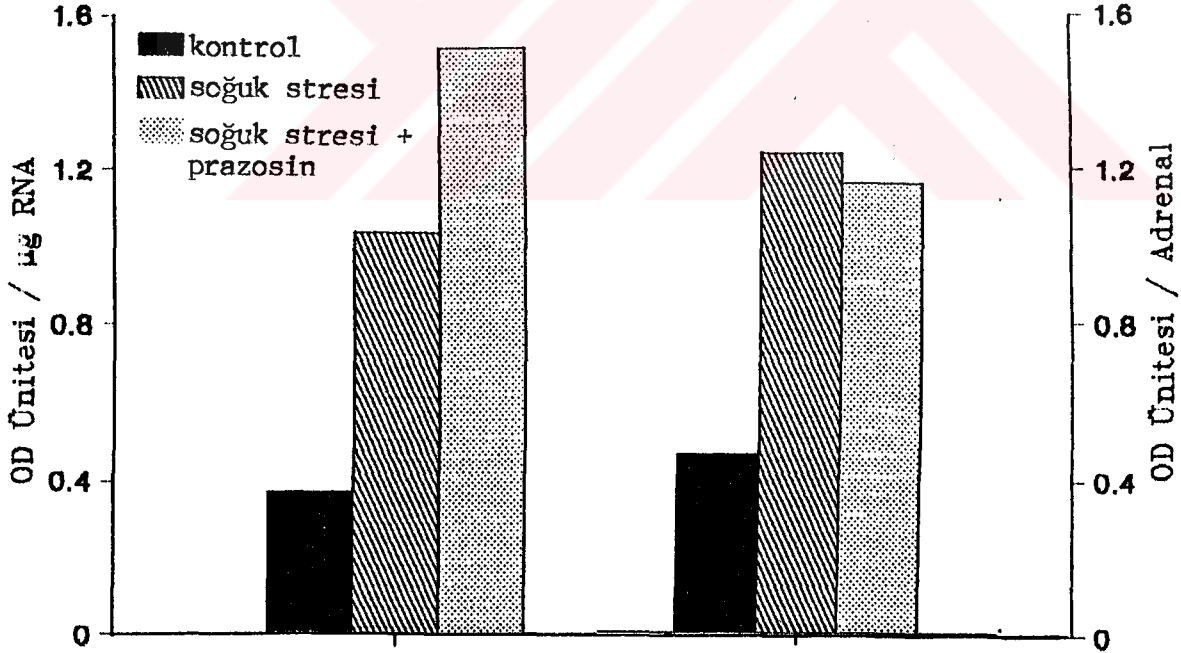
soğuk stresine maruz kalanlarda 1.03 ± 0.22 OD ünitesi/ μg RNA, 1.23 ± 0.26 OD ünitesi/adrenal ve soğuk stresi+prazosin'e maruz kalanlarda ise 1.51 ± 0.18 OD ünitesi/ μg RNA, 1.15 ± 0.12 OD ünitesi/adrenal'dir. Şekil 3.8'de ise üç hafta soğuk stresi ve soğuk stresi+prazosin'e maruz kalan ratlarda adrenal medulladan elde edilen RNA ların jel elektroforezi görülmektedir.



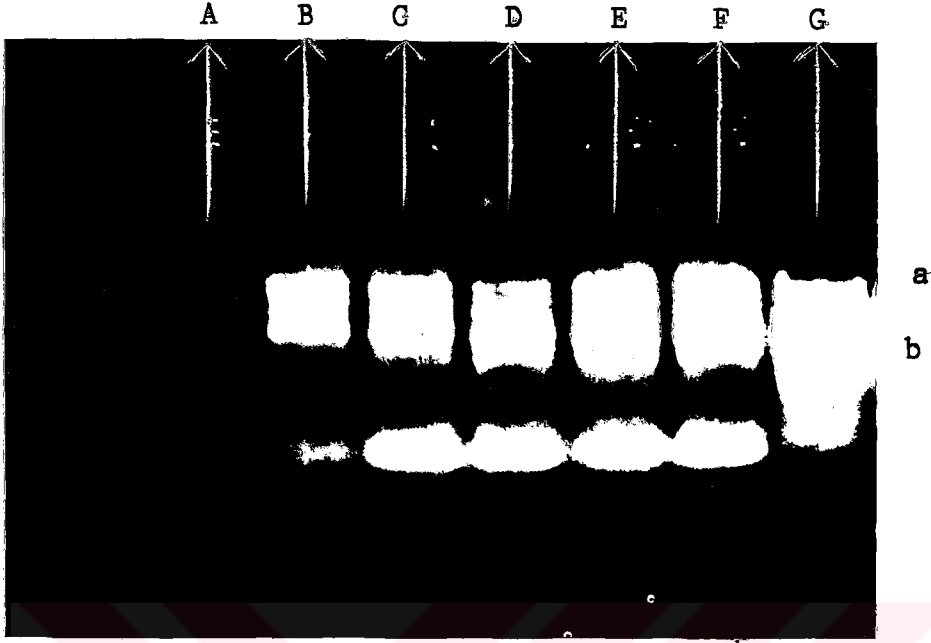
Şekil 3.6 Kontrol, soğuk stresi ve soğuk stresi + prazosin uygulamasından sonra SD Ratlarında adrenal medullada TH enzim aktivitesindeki değişimleri gösteren grafik.

Tablo 3.5 Kontrol, soğuk stresi ve soğuk stresi+prazosin'in rat adrenal medulla TH mRNA seviyeleri üzerindeki etkileri.

	Total RNA µg/µl	OD Ünitesi /µg RNA	OD Ünitesi /adrenal
Kontrol	1.13	0.37±0.03	0.46±0.15
Soğuk str.	1.21	1.03±0.22	1.23±0.26
Soğuk Str + Prazosin.	0.77	1.51±0.18	1.15±0.12



Şekil 3.7 Kontrol, soğuk stresi ve soğuk stresi + prazosine maruz kalan ratlarda adrenal medullada TH mRNA seviyeleri.

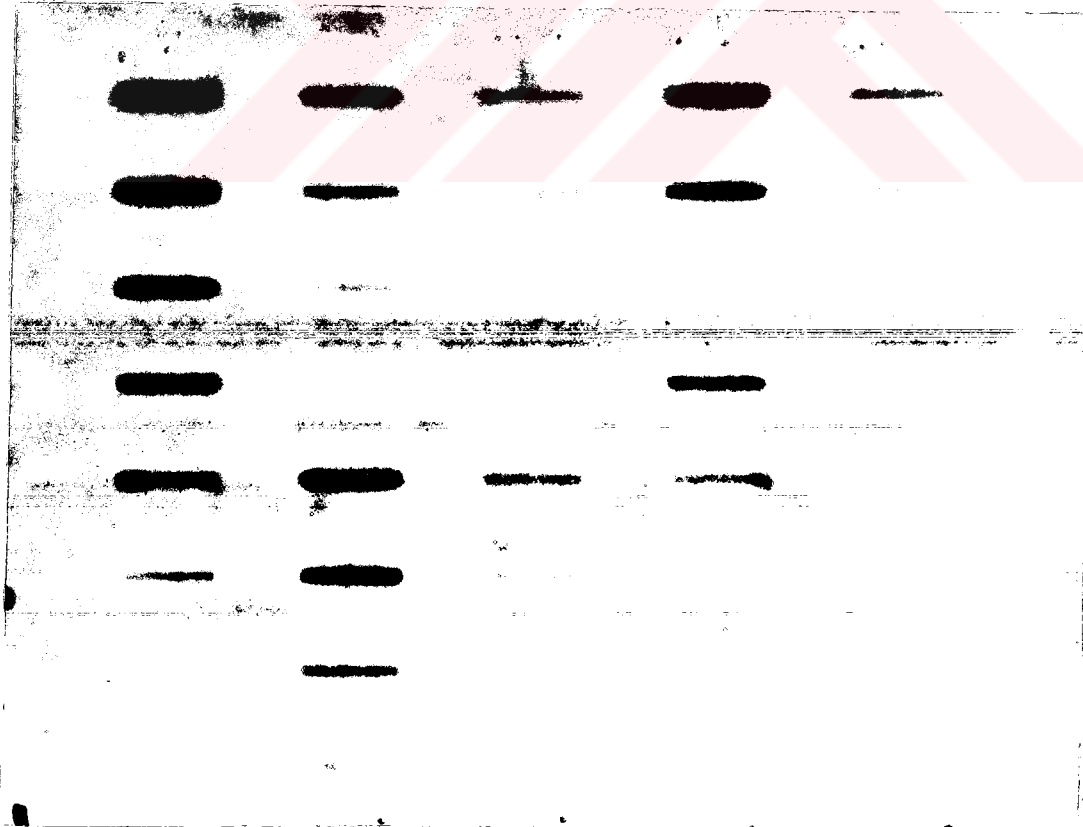


Şekil 3.8 Soğuk stresi ve soğuk stresi+prazosin uygu lamasına ait RNA jel elektroforezi. A-B) Kontrol, C-D) Soğuk Str., E-F) Soğuk Str + Prazosin, G) Standart, a) 28S RNA, b) 18SRNA.

Şekil 3.9a, 3.9c ve Şekil 3.9e'de kontrol ve soğuk stresi grubu ratlarda adrenal medullada, slot blot şeması ve Şekil 3.9b, 3.9d ve Şekil 3.9f'de soğuk stresi ve soğuk stresi+prazosin'e maruz kalan ratlarda adrenal medullada tirozin hidroksilaz mRNA otoradyografik bantları görülmektedir.

	1	2	3	4	5	6
A	S	soğuk stresi	kontrol	soğuk stresi	kontrol	
B	T					
C	A					
D	N					
E	D	soğuk stresi	kontrol	soğuk stresi	kontrol	
F	A					
G	R					
H	T					

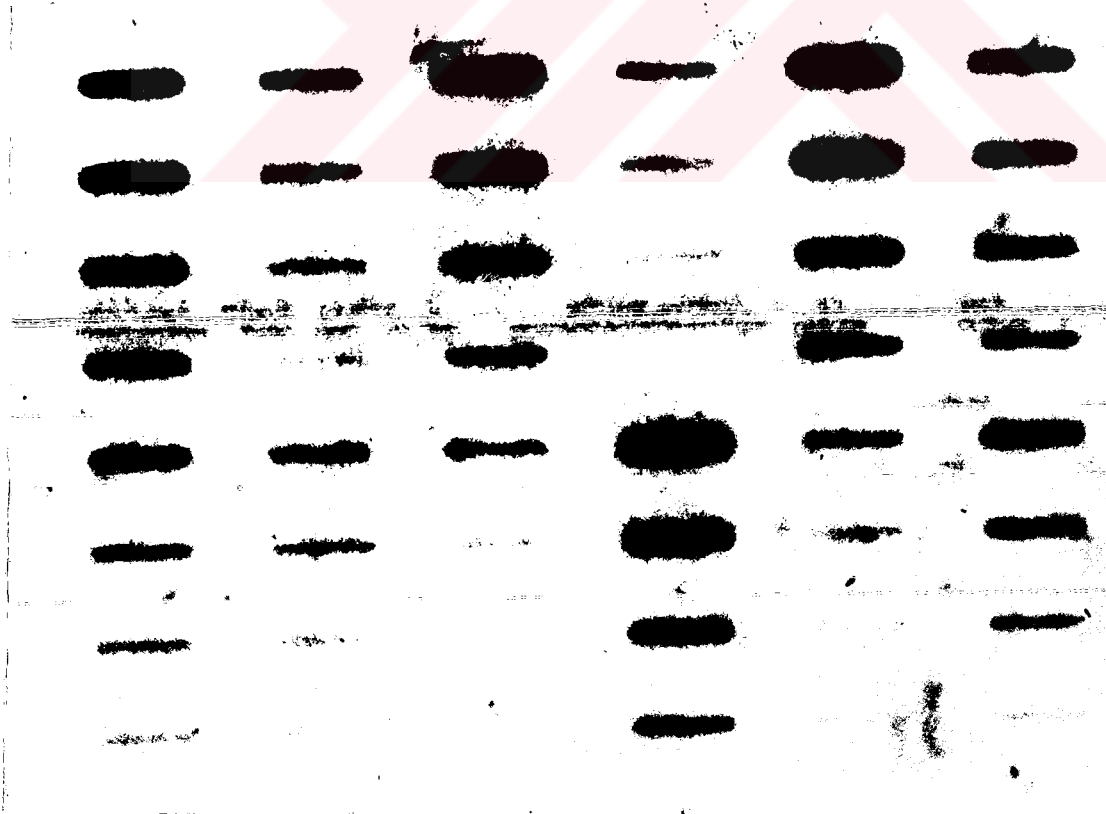
Şekil 3.9a Standart, kontrol ve soğuk stresi grubu ratlarda total RNA uygulama bölgelerini gösteren slot blot şeması.



Şekil 3.9b Standart ve kontrol grubu ratlardan elde edilen otoradyografik bantlar.

	1	2	3	4	5	6
A	S	soğuk stresi				
B	T					
C	A					
D	N					
E	D	kontrol				
F	A					
G	R					
H	T					

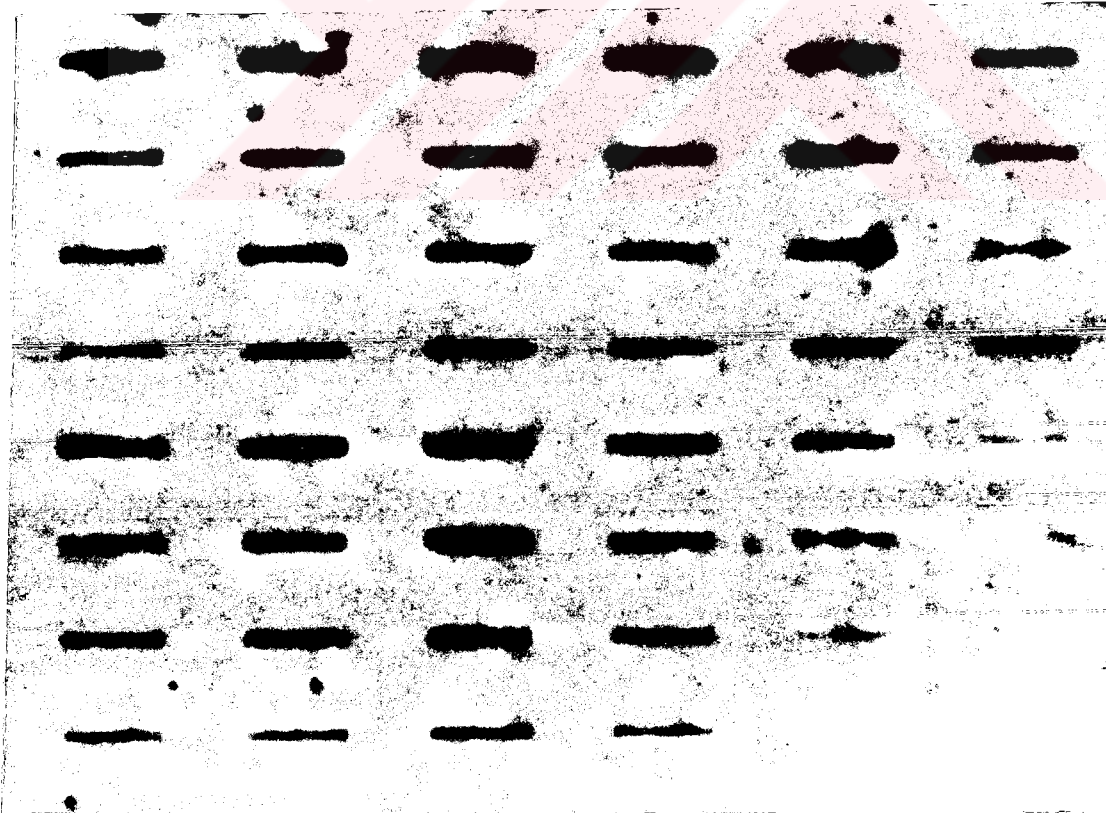
Şekil 3.9c Standart, kontrol ve soğuk stresi grubu slot blot şeması.



Şekil 3.9d Standart ve kontrol grubu otoradyografik

1	2	3	4	5	6	
soğuk stresi	soğuk stresi + prazosin	soğuk stresi	soğuk stresi + prazosin	soğuk stresi	S T A N	A
soğuk stresi + prazosin	soğuk stresi	soğuk stresi + prazosin	soğuk stresi	soğuk stresi + prazosin	D A R T	B C D E F G H

Şekil 3.9e Standart, soğuk stresi ve soğuk stresi + Prazosin uygulaması slot blot şeması.



Şekil 3.9f Standart, soğuk stresi ve soğuk stresi + prazosin uygulaması otoradyografik bantları.

4. TARTIŞMA

Farmokolojide, fizyolojide ve biyokimyadaki deneysel çalışmalar, katekolaminlerin merkezi sinirsel işlevlerde nörotransmitter ve modülatör olarak önemli rolleri olduğunu göstermiştir (18).

Çevresel ve kimyasal değişiklikler, yaşlanma ve çeşitli stres yaratıcı etkenler katekolaminlerin biyosentezini etkilemektedir. Yaşlanmaya bağlı olarak dolaşımda bulunan katekolaminlerin seviyesinde artış gözlenmektedir. Katekolaminlerin seviyesindeki bu artış hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar, karbohidrat ve yağ asit metabolizmalarıyla ilgili hastalıkların ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır. Bazı durumlarda katekolaminlerin biyosentezinde meydana gelen azalma ise parkinson hastalığına neden olmaktadır (2, 21). Soğuk stresi ve çeşitli ilaç uygulamaları da katekolaminlerin biyosentezini uyarmaktadır. Gastrik/duodonal ülser, depresyon durumlarında katekolamin seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (12).

İnsanlardaki bulgular, ratlarda yaşlanmaya bağlı olarak yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlara benzerlik göstermektedir. İnsanlarda dolaşımdaki NE seviyelerinde yaşlanma ile artış olduğu anlaşılmıştır. İnsanlarda yaşlanma ile sıklıkla ortaya çıkan hipertansiyon, yüksek kolesterol seviyesi, kalp hastalıkları gibi rahatsızlıklarda katekolaminlerin seviyelerindeki değişimlerde önemli rol oynamaktadır (2).

Yaşlanmanın katekolamin biyosentezi üzerindeki etki-

leri genç ve yaşlı ratlarda beyinde, adrenal medullada ve simpatetik gangliada araştırılmıştır. Katekolamin biyosentezinde yer alan enzimlerden tirozin hidroksilaz ve dopa-dekarboksilaz enzimlerinin aktivitesinde beyinde önemli değişiklikler görülmüş ve enzimlerin aktivitesinde 1.5-2.5 kat kadar artış kaydedilmiştir (2). Yaşlanmaya bağlı olarak adrenal medullada ve sinir uçlarında katekolaminlerin biyosentezindeki bu artış aynı zamanda tirozin hidroksilaz enzim aktivitesinin de arttığını göstermektedir. Yaşlanmaya bağlı olarak adrenerjik aktivitedeki değişimler yönünden adrenal medulla ve kalp arasında resiprokal bir ilişki vardır. Kalpte adrenerjik sinir aktivitesi azaldığı zaman adrenal medullada adrenerjik aktivite artmaktadır ve bunun terside doğrudur. Bu şekildeki resiprokal ilişki, organizmada homeostazis'in sürdürülmesi için oldukça önemlidir (8). Yaşlanma ile birlikte kalpte adrenerjik aktivitenin azaldığına dair çok sayıda araştırma vardır ve bu durum adrenal medullanın önemini vurgulamaktadır (82-86). Yine yaşlanma ile kalpte ortaya çıkan nörokimyasal transmisyon-daki azalmanın presinaptik α_2 reseptör fonksiyonunda azalma ile birlikte olduğu gösterilmiştir (2). Kısaca, bu bulgular kalpte azalan adrenerjik aktivitenin homeostazisin sürdürülmesindeki önemini göstermektedir. Çünkü adrenerjik sinir sisteminde sinir sisteminde yer alan DOPA, NE ve EPI homeostazisin sürdürülmesinde fonksiyoneldir. Yaşlanma ile dolaşımdaki katekolaminlerin seviyesi artarken beyinde azalmaktadır. Ölümden hemen sonra insan beyinde yapılan araştırmalar dopamin ve norepinefrin seviyelerinin hipotalamusta azaldığını göstermiştir (86). Yaşlı ratlarda da hipotala-

musta dopamin içeriğinin azaldığı rapor edilmiştir (88).

Eksersiz gençlerde olduğu kadar yaşlı bireyler içinde önem taşımaktadır. Eksersiz kardiyovasküler kapasiteyi artırabilir ve miyokardiyal oksijen ihtiyacı sağlıklı insanlarda olduğu gibi kardiyovasküler hastalığı olanlarda da azalır. Eksersiz aynı zamanda hipertansiyonu da kontrol edebilmektedir (3,10).

Yaşlanma ve eksersiz tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi üzerindeki etkileri yapılan bir çalışmada incelenmiş ve eksersiz yaptırılmış yaşlı ratlarda tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi genç ratlardan daha yüksek bulunmuştur (3).

Tarafımızdan yapılan çalışmada da eksersiz yaptırılmış yaşlı ratlarda hipotalamusta, tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi, eksersiz yaptırılmamış olan yaşlı ratlardan daha yüksek bulunmuştur. Eksersizli yaşlı ratlardaki tirozin hidroksilaz enzim aktivitesindeki artış aynı zamanda istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Eksersiz uygulaması ile artan tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi bulgusu, hipotalamusta katekolaminlerin seviyelerinin azalmaları ile ortaya çıkan rahatsızlıkların giderilmesinde önemli olabileceğini göstermektedir. Beyinde katekolaminlerin sentezinin azalması özellikle dopamin'in sentezinin azalması ile parkinson hastalığı ortaya çıkmaktadır. Parkinson hastalığı, dopamin verilerek giderildiği göz önüne alınırsa, beyinde katekolaminlerin seviyesinin artmasında eksersiz önemi ortaya çıkmaktadır.

Adrenal medullada tirozin hidroksilaz mRNA seviyesindeki artış biyolojik aktif mesajın artmış olduğunu göster-

rir. Soğuk stresine bağılı olarak, tirozin hidroksilaz mRNA seviyelerindeki değişikliklerin açıklanmasında iki temel mekanizma ileri sürülmektedir. Birincisi, splanik sinir aktivitesindeki artışın, soğuk stresi etkisi altında periferik termoreseptörlerin uyarımı ile olmasıdır. İkincisi hipotansif streslere yada soğuk stresine tepki olarak hipofiz/adrenokortikal yolu ile salınan glukokortikoidlerle olmasıdır (38,58,63).

Soğuk stresine maruz kalmak, cAMP konsantrasyonunu ve tirozin hidroksilaz enzim aktivitesini arttırdığı belirtilmiştir. Bu konuda yapılan bir çalışmada soğuk stresine maruz kalma esnasında adrenokortikotropik hormonun hipofiz bezinden normal durumlara göre daha hızlı oranda salınabildiği gösterilmiştir (51).

Fizyolojik uyarımların tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi üzerindeki etkileri test edilmiş ve aşırı fizyolojik uyarımların önemli derecede enzim aktivite artışına neden olduğu rapor edilmiştir (89). Yapılan bir çalışmada hipofiz bezi çıkarıldıktan sonra uygulanan stresin hala tirozin hidroksilaz enzim aktivitesinde önemli artışa neden olduğu gösterilmiştir (65,66). Artan tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi splanik sinirlerin kesilmesiyle bozulmuştur. Bu durum stresde artan tirozin hidroksilaz enzim aktivitesinin, sinir yoluyla gerçekleştirildiğini göstermektedir.

Kinetik çalışmalardan elde edilen sonuçlarda tirozin hidroksilaz enzim aktivitesinde meydana gelen artışın, enzimin aktif merkezlerinin sayısının artışıyla ilgili olduğunu göstermiştir (90). Bu durumu test etmek için protein

sentez inhibitörleri, cycloheximide ve actinomycin-D kullanılarak bir çalışma yapılmıştır. Reserpine ve Phenoxybenzamine gibi adrenerjik bloke edici ajanlarla muamele edilen ve protein sentez inhibitörleri verilen ratlarda tirozin hidroksilaz enzim aktivitesinde artışın devam ettiği gözlenmiştir. Bu durum enzimin sentezinin artmasından daha çok daha önce sentezlenmiş enzimin aktif merkezlerinin sayısının arttığını göstermektedir. Aynı zamanda tirozin hidroksilaz enzim aktivitesindeki bu artış adrenal bezde simpatetik gangliada sinir impulslarındaki artışı da göstermektedir.

Soğuk stresi uygulanarak yapılan başka bir çalışmada ise ratlar 6°C'de 4 hafta soğuk stresine maruz bırakılmış ve sonuçta sistolik, diyastolik kan basıncının arttığı ve kardiyovasküler hipertansiyonun indüklenebildiği rapor edilmiştir (91).

Soğuk stresine maruz kalan ratlarda tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi ve TH mRNA seviyeleri birçok bilim adamı tarafından araştırılmıştır. Yapılan çalışmalara göre soğuk stresinin TH enzim aktivitesini ve TH mRNA seviyelerinin ratların adrenal medullasında arttığı gösterilmiştir (32,38,40,41,45,51,57,58,66-71,80,91,92).

Yapılan bir çalışmada 7 gün +5°C'de soğuk stresine maruz kalan ratlarda tirozin hidroksilaz mRNA'sı kontrollerine göre 2-3 kat artış göstermiştir (38). Başka bir çalışmada ise 12 saat +5°C'lik soğuk stresi uygulamasının tirozin hidroksilaz mRNA'sını 5 kat arttırdığı rapor edilmiştir (41). Diğer bir çalışmada ise tirozin hidroksilaz enzim aktivitesinin +4°C'lik soğuk stresini takiben 24 saat içinde

arttığı gösterilmiştir. Tirozin hidroksilaz enzim antibadileri ile yapılan çalışmalarda, enzimin molekül sayısındaki artışla tirozin hidroksilaz aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir (51). Yapılan bir çalışmada, ratlar 4 gün +4°C'ye maruz bırakılmış ve tirozin hidroksilaz enzim aktivitesinin % 330, tirozin hidroksilaz mRNA seviyesinin ise %167 oranında arttığı rapor edilmiştir (57). Bu konuda yapılan diğer çalışmalarda da soğuk stresi uygulaması ile adrenal medullada katekolamin sentezinin ve salınmasının arttığı rapor edilmiştir (40, 57,60,71). Yapılan diğer bir çalışmada ise +5°C'de 1-48 saat arası soğuk stresine maruz kalan ratlarda tirozin hidroksilaz mRNA seviyesinin birinci saatte kontrole göre %58 oranında arttığı gösterilmiştir (92).

Tarafımızdan yapılan çalışmada ise ratlar 48 saat 4°C'de soğuk stresine maruz bırakılmış ve adrenal medullada tirozin hidroksilaz enzim aktivitesinin artışının yanı sıra tirozin hidroksilaz mRNA seviyelerinde arttığı bulunmuştur. Yine üç hafta 4°C'de soğuk stresine ve soğuk stres+ prazosine maruz kalan ratlarda da tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi ve tirozin hidroksilaz mRNA seviyelerinde artış bulunmuştur. Hipertansiyon tedavisinde kullanılan prazosin soğuk stresi ile ortaya çıkan katekolamin biyosentezindeki artışı önleyememiştir. Dolaşımında artan katekolamin seviyesi kan basıncını yükseltmektedir. Prazosin etkisini α_1 reseptörlerini inhibe ederek damar düz kaslarının büzülme ve kasılmasını engelleyerek gösterir ve kan basıncını düşürür. Soğuk stresi ile birlikte uygulanan prazosin' in etkisini gösterememesi; soğuk stresinin etkisini sinirsel yolla, prazosinin etkisini hormonal yolla göstermesi ile açıklana-

bilir.

Bu konuda yapılan benzer bir çalışmada, hipertansiyon tedavisinde kullanılan reserpine'nin tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi ve tirozin hidroksilaz mRNA seviyesine etkisi araştırılmıştır (71). Bu çalışmaya göre reserpine ile muamele edilen ratlarda tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi ve tirozin hidroksilaz mRNA seviyesi kontrol grubuna göre 2.5 kat artış göstermiştir. Alfa adrenerjik bloke edici ajanlarla yapılan başka bir çalışmada da ratlara piperoxane (5 mg/kg iv) verildiğinde beyinde hippokampüste TH enzim aktivitesinin arttığı ve frontal korteksde, phentolamine (5 mg/kg ip) yada prazosin (10 mg/kg ip) verildikten 60 dakika sonra tirozin hidroksilaz enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir (21).

Bu çalışmada; a) yaşlanmanın, ve eksersiz hipotalamusta tirozin hidroksilaz aktivitesi üzerine etkisi ve b) soğuk stresi ve soğuk stresi+prazosin'in adrenal medullada tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi ve tirozin hidroksilaz mRNA seviyeleri üzerindeki etkileri çalışılmıştır. Organizma iç ve dış stres yapıcı etkenlerden birine maruz kalabileceği gibi birden fazla etkene de maruz kalabilmektedir. Soğuk stresi+prazosin'in etkisinin araştırılmasında olduğu gibi, birden fazla stres yapıcı etken karşısında katekolamin biyosentezinin, özellikle tirozin hidroksilaz enzim biyosentezinin, nasıl ve hangi mekanizmayla etkilendiği bundan sonra yapılacak olan araştırmalarla açıklanmalıdır.

EK 1 EKERSİZ UYGULAMASI

Ratlarda Eksersiz Uygulaması						
Hafta No	5 aylık ratlar			24 aylık ratlar		
	Hız dk/m	Eğim	Süre dk.	Hız dk/m	% Eğim	Süre dk.
1	25	0	12-20	15	0	12-2
2	25	2.5	22-30	15	2.5	22-30
3	25	5.0	32-40	15	5.0	32-40
4	30	0	42-50	20	0	42-50
5	30	2.5	52-60	20	2.5	52-60
6	30	5.0	60	20	5.0	60
7	30	7.5	60	20	7.5	60
8	30	10	60	20	10	60
9	30	12.5	60	20	12.5	60

EK 2 ÇALIŞMADA KULLANILAN ÇÖZELTİLER

1- % 1 SDS (Sodyum dodesil sülfat) çözeltisi

0.2 N NaOH

% 1 SDS (W/V)

Çözelti 10 N NaOH ve % 10 SDS'den taze olarak
hazırlandı

2- TE (Tris EDTA) Tamponu

10 mM Tris.HCl (pH 7.5)

1 mM EDTA (Etilendiamintetraasetikasit) (pH 8.0)

3- TBE (Tris borat EDTA) Tamponu

108 g Tris bazı

55 g Borik asit

40 ml 0.5 M EDTA (pH 8)

4- 20 X SSC (Sodyum salin sitrat)

175.3 g NaCl bir miktar distile suda çözüldü,

88.2 Sodyum sitrat 800 ml distile suda çözüldü,

pH NaOH ile 7.0'a ayarlandı, hacim 1 lt'ye distile su
ile tamamlandı.

5- Jel Yükleme Tamponu

% 0.25 Bromfenol mavisi

% 0.25 Xylene cyanol

% 30 Glycerol

6- RNA Yükleme Boyası

25 ml Glycerol

5 ml 100 mM NaH_2PO_4

0.2 g Brom fenol mavisi yada 20 ml % 0.4'lük solüsyonu

0.4 g Brom fenol mavisi/xylene cyanol boya karışımı

Hacim deiyonize su ile 50 ml'ye tamamlandı 30 dakika

süre ile otoklav edildi.

7- Prehibridizasyon Çözeltisi, (500 ml için) Son Konst.

12.5 ml, 1 M KH_2PO_4 pH 7.4

25 mM

125 ml 20 X SSC

5 X SSC

25 ml 100 X Denhardt's çözeltisi

5 X

5 ml 5 mg/ml Salmon sperm DNA'sı

50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

250 ml % 100 formamid

% 50

82.5 ml Distile su

-

Bu çözelti hazırlandıktan sonra kullanılmaya kadar

-80°C'de saklandı ve kullanılmadan hemen önce 5-10 dakika

95°C'de ısıtılarak buz içinde soğuması sağlandı.

8- Hibridizasyon Çözeltisi (500 ml için) Son konst.

12.5 ml, 1 M KH_2PO_4 pH 7.4

25 mM

125 ml 20 X SSC

5 X SSC

25 ml 100 X Denhardt çözeltisi

5 X

5 mg/ml Salmon sperm DNA'sı

50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

250 ml %100 formamid

% 50

50 g dekstran sülfat

% 10

Yukarda verilen çözeltiler bir gece manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı ve hacim 500 ml'ye tamamlandı. Salmon sperm DNA'sı ilave edilmeden önce 5-10 dakika 95 °C'de ısıtıldı ve soğuması için buz küvetine konuldu.

9- % 1'lik Agaroz Jeli (RNA için)

0.5 g agaroz

50 ml 1 X TBE tamponu

50 µl etidyum broid (500 µg/ml)

10- 100 X Denhardt Çözeltisi

5 g ficoll

5 g Polyvinylprolidine

5 g BSA

Hacim deiyonize su ile 250 ml'ye tamamlandı ve 0.22 µm'lik filtreden süzülerek steril edildi.

ÖZGEÇMİŞ

4.4.1960 tarihinde Amasya'nın Merzifon ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Ankara'da tamamladı. Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümüne 1980 yılında girdi. Bu bölümden Biyolog ünvanı alarak 1985 yılında mezun oldu. 1986 yılında İnönü Üniversitesinde Arş. Grv. olarak göreve başladı ve aynı yıl Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisansa başladı. 1988 yılında Master derecesi aldı ve doktora başladı.

Temmuz 1992-Haziran 1993 tarihleri arasında A.B.D'de Florida Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji bölümünde teknisyen olarak görev yaptı ve Veterans Administration Hospital Geriatric Research Education and Clinical Center da yaşlanma ile ilgili çalışmalara katıldı. Doktora tezinin deneysel aşamasını A.B.D'de bulunduğu sürede tamamladı.

Halen İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Arş.Grv. olarak çalışmaktadır. Evli ve bir çocuk babasıdır.

Yayınları

1. M.Yürekli., *Enterobius vermicularis*'in (Kılkurdu) bazı Malatya merkez ilkokulu öğrencilerinde yayılışına ailesel faktörlerin etkisi. Yüksek lisans Tezi., İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya 1988.
2. M.Yürekli., M.Özmen., E.M. Gözükar., A.N.Bozcuk., *Enterobius vermicularis*'in (Kılkurdu) bazı Malatya merkez ilkokulu öğrencilerinde yayılışına ailesel faktörlerin etkisi. IX Ulusal Biyoloji Kongresi 21-23 Eylül Sivas, 1988.

3. M. Özmen., M Yürekli., A.N.Bozcuk., Bazı Malatya merkez ilkokulu öğrencilerinde *Enterobius vermicularis* (Kılkurdu) yayılışına çevresel faktörlerin etkisi. IX Ulusal Biyoloji Kongresi 21-23 Sivas 1988.
4. N.Tümer., J. LaRoche., S.Yenice., M.Yürekli., Effect of mild cold exposure and age on tyrosine hydroxylase gene expression. The Endocrine Society 75th Annual Meeting June 9-12 Las Vegas Nevada 1993.



KAYNAKLAR

1. Lehninger A.L., Principles of Biochemistry. The Johns Hopkins University School of Medicine. New York. Worth Publishers, Inc. (1982).
2. Roberts J., Imer N., Age related changes in autonomic function of catecholamines. Review of Biological in Aging 3: 27-298 (1987).
3. Tümer N., Hale C., Lawler L. and Strong R., Modulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the rat adrenal gland by exercise; effects of age. Molecular Brain Research (0): 1-6 (1972).
4. Stryer L., Biochemistry. W.H. Freeman and Company. Sanfransisco, (1982).
5. Weinreb E.L., Anatomy and Physiology. Community College of Philadelphia. Addison-Wesley Publishing Company. California. (1984).
6. Devlin T.M., Textbook of Biochemistry. Hahnemann University School of Medicine. A Wiley Medical Publication New York (1986).
7. Nagatsu T., Levitt M. and Udenfriend S., Tyrosine hydroxylase. J. Biol. Chem., 239: 2910-2917, (1964).
8. Gauthier P., Nadeau R., de Champlin J., Acute and chronic cardiovascular effects of 6-hydroxydopamine in dogs. Circ. Res. 31: 207-217, (1972).
9. Mueller R. A., Thoene H., Axelrod J., Adrenal tyrosine hydroxylase; compensatory increase in activity after chemical sympatectomy. Science 163: 468-469 (1969).

10. McHenry P.L., Ellestad M.H., Flether G.F., Froelicher V., Hartley H., Mitchell J.H., Froleicher E.S.S., A position for health professionals by the committee on exercise and cardiac rehabilitation of the council on clinical cardiology, American Heart Association Special Report. *Circulation* 81 (1): 396-398, (1990).
11. Noyan A., *Fizyoloji Ders Kitabı. Anadolu Üniversitesi Yayınları No 2. Meteksan Ankara.* (1980).
12. Gary B.G., Stress and brain noradrenalin, A review: *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 9: 223-243, (1985).
13. Scarpace P.J., Tumer N. and Scott L.M., β -adrenergic function in aging. *Drugs and Aging* 1(2): 116-129, (1991).
14. Sibley D.R., Lefkowitz R.S., Molecular mechanism of receptor desensitization using the beta-adrenergic receptor coupled adenylate cyclase system as a model. *Nature* 317: 124-129, (1985).
15. Katzung B.G., *Basic and Clinical Pharmacology.* Fourth edition (1989).
16. Brown E.L., Coker III G.T. and O'Malley K.L., Organization and evolution of the tyrosine hydroxylase gene. *Biochemistry.* 26: 5208-5212 (1987).
17. Bostwick J.R., Le WD., A tyrosine hydroxylase assay in microwells using coupled nonenzymatic decarboxylation of dopa. *Analytical Biochemistry* 192: 125-130 (1991).
18. Richardson K.T., *Therapeutic Review Survey of*

- Ophthalmology. 17 (2): 120-131, (1972).
19. Caine D.B., Karoum F., Ruthven C.R.J. and Sandler M.,
The metabolism of orally administered L-DOPA in
Parkinsonism. Br. J.Pharmacol. 37: 57-68, (1969).
 20. Coyle J.T., Tyrosine hydroxlyase in rat brain-
cofactor requirments, regional and subcellular
distribution. Biochemical Pharmacology 21: 1935-1944,
(1972).
 21. Masserano J.M., Weiner N., Tyrosine hydroxylase
regulation in the central nervous system. Molecular
and Cellular Biochemistry. 53/54: 129-152 (1983).
 22. Weiner N., The basic neuroscience, the nervous system
(Brady R.O. ed) 1: 341-354, Raven Press New York
(1975).
 23. Levitt M., Spector S., Sjoerdsma A. and Unfriend S.,
Elucidation of the rate-limiting step in norepi-
nephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig
heart. J.Pharma-col exp. Ther., 148: 1-8 (1965).
 24. Lovenberg W., Bruckwick E.A., Hanbauer I., Proc.
Natl. Acad. sci. USA 72: 2955-2958, (1975).
 25. Ames M.M., Lerner P., Lowenberg W., J. Biolchem 253:
27-31, (1978).
 26. Blumenthal J.A., Emery C.F., Madden D.J.ü George
L.K., Coleman R.E., Riddle M.W., McKee D.C., Reasoner
J., Williams R.S., Cardiovascular and behavioral
effects of aerobic exercise training in healthy older
men and older women. J. Geron. 44(5): 147-157 (1989).
 27. Krebs E.G. and Beavo J.A., Phosphorylation-dephos-
phorylation of enzymes. Ann Rev. Biochem. 48: 923-959

- (1979).
28. Guidotti A. and Costa E., Transsynaptic regulation of tyrosine 3-monooxygenase biosynthesis in rat adrenal medulla. *Biochem. Pharmacol.* 26: 817-823 (1977).
 29. Weiner N., Lee F.L., Dreyer E. and Barnes E., *Life Sci.* 22: 1197-1216, (1978).
 30. Morgenroth VH III., Baadle-Biber M. and Roth RH., *Proc Natl. Acad. Sci.* 71: 4283-4287 (1974).
 31. Roth R., Morgenroth VH III. and Salzman P.M., Tyrosine hydroxylase allosteric activation induced by stimulation of central noradrenergic neurons. *Pharmacol.* 289: 327-343 (1975).
 32. Zigmond R.E., The long term regulation of ganglionic tyrosine hydroxylase by preganglionic nerve activity. *Fed. Proc.* 39: 3003-3008 (1980).
 33. Masserano J.M. and Weiner N., The rapid activation of adrenal tyrosine hydroxylase by decapitation and its relationship to a cyclic AMP-dependent phosphorylating mechanism. *Mol. Pharmacol.* 16: 513-528, (1979).
 34. Masserano J.M and Weiner N., *Life Sci.* 29: 2025-2029 (1981).
 35. Masserano J.M. and Weiner N., Regulation and function of monoamine enzymes. *McMillan London*: 75-81 (1981).
 36. Kurosawa A., Guidotti A. and Costa E., *Mol. Pharmacol* 15: 115-130 (1979).
 37. Kurosawa A., Guidotti A. and Costa E., *Science* 193: 691-693 (1976).
 38. Stachowiak M.K., Fluharty S.J., Stricker E.M.,

- Zigmond M.J. and Kaplan B.B., Molecular adaptations in Catecholamine biosynthesis induced by cold stress and sympathectomy. *Journal of Neuroscience Research*. 16: 13-24 (1986).
39. Leduc J., Catecholamine production and release in exposure and acclimation to cold. *Acta Physiol Scand*. 53 (183): 1-101, (1961).
40. Fluharty s.j., Synder, G.L., Zigmond M.JK., Stricker E.M., Tyrosine hydroxylase activity and catecholamine biosynthesis in the adrenal medulla of rats during stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 233: 32-38 (1985b).
41. Stachowiak M., Stricker E.M., Zigmond M.J. and Kaplan B.B., A cholinergic antagonist blocks cold stress-induced alterations in rat adrenal tyrosine hydroxylase mRNA. *Molecular Brain Research* 3: 193-196, (1988).
42. Thonen H., Induction of tyrosine hydroxylase in peripheral and central adrenergic neurons by cold-exposure of rats. *Nature* 288: 861-862, (1970).
43. Natelson B., Stress, predisposition and the onset of serious disease: Implications about psychomatic etiology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 7: 511-527, (1983).
44. Anisman H. and Zacharko R., Depression: The predisposing influence of stress. *Behav Brain Sci*: 5: 89-137, (1982).
45. Sharma V.N. and Khanna N.K., Effect of cold stress on epinephrine and norepinephrine contents in the rat heart. *Ind. Jour. Med. Res.* 57: 877-888, (1969).

46. Leduc J., Origin and importance of catecholamines in the response to cold exposure. *ActoPhysiol. Scand.* 53 (183): 50-65 (1961).
47. Von Euler U.S., Exposure to cold and cathecholamines. *Fed. Proc.* 19 (5): 79-81, (1960).
48. Avakian E.V., Horvath S.M. and Colburn R.W., Influence of age and cold stress on plasma catecholamines levels in rats. *Journal of the Autonomic Nervous System.* 10: 127-133, (1984).
49. Palmer G.J., Ziegler M.A and Lale C.R., Responses of norepinephrine and blood pressure to stress increases with age. *J.Gerontol.* 33: 482-487, (1978).
50. ZieglerM.G.,Lale C.R. and Kapin I.J., Plasma noradrenaline increases with age. *Nature* 261: 333-335 (1976).
51. Costa E., Guidotti A. and Hanbauer I., Do cyclic nucleotides promote the trans-synaptic inductrion of tyrosine hydroxylase ? *Life Science* 14: 1169-1188, (1974).
52. Lehman M. and Kuhl J., Free plasma catecholamines, heart rates, lactate levels and oxygen uptake in competition weight lifters, cyclists and untrained control subjects. *Int. J. Sports. Med.* 7: 18-21 (1986).
53. Mazzeo R.S., Age related alterations in sympathetic adrenal medullary responses to stress. *Gerontology* 32: 172-183, (1986).
54. Ostman I. and Nyback H.S., Adaptive changes in central and pripheral noradrenergic neurons in rats

- following chronic exercise. *Neuroscience* 1: 41-47, (1976).
55. Mazzeo R.S., Colburn R.W. and Horvath S.M., Effect of aging and endurance training on tissue catecholamine response to strenuous exercise in Fischer 344 rats. *Metab.* 35: 602-607, (1986).
56. Smith M.A., Brady L.S., Glowa ., Gold P. and Herkenham M., Effects of stress and adrenalectomy on tyrosine hydroxylase mRNA levels in the locus cereleus by in situ hybridization. *Brain Research.* 544: 26-32 (1991).
57. Richard F.N., Faucon-Biguet R., Labatat D., Rollet J., Mallet and Buda M., Modulation of tyrosine hydroxylase gene expression in rat brain and adrenals by exposure to clod. *Journal of Neuroscience Research.* 20:32-37 (1988).
58. Lamoroux A., Faucon N., Samolyk D., Privat A., Salomon J.C., Pujal J.F. and Mallet J., Identification of cDNA clones coding for rat tyrosine hydroxylase antigen. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA* 79: 3881-3885 (1982).
59. Lewis E.J., Tank A.W., Weiner N. and Chikarashi D.M., Regulation of tyrosine hydroxylase mRNA by glucocorticoid and cyclic AMP in rat pheochromocytoma cell line. *J. Biol. Chem.* 258: 14632-14637 (1983).
60. Fluharty S.J., Synder G.L., Stricker E.M. and Zigmond M.J., Short and long term changes in adrenal tyrosine hydroxylase activity during insulin-induced hypoglycemia and cold stress. *Brain Res.* 267: 384-387,

- (1987).
61. von Euler U.S., Adrenergic neuroeffector transmission. The Structure and Function of Nervous Tissue Vol. 2 Academic Press. New York&London (1969).
 62. Udenfriend S., Zaltzman-Nirenberg P. and Nagatsu T., Inhibitors of purified beef adrenal tyrosine hydroxylase Biochem. Pharmacol. 14: 837-845 (1965).
 63. Baetge E.E., Kaplan B.B., Reis D.J. and Joh T.H., Translation of tyrosine hydroxylase from poly(A) mRNA in pheochromocytoma cells is enhanced by dexamethasone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1269-1273, (1981).
 64. Tuğlacı P., Tıp Sözlüğü., Ar Basım Yayım ve Dağıtım A.Ş. İstanbul (1983).
 65. Kaufman S. and Friedman S., Dopamine β -hydroxylase. Pharmacol. Rev. 17: 71-100 (1965).
 66. Kvetnansky R., Gewirtz G.P., Weise V.K. and Kopin I.J., Effect of hypophysectomy on immobilization-induced elevation of tyrosine hydroxylase and phenylethanolamine-N-methyl transferase in the rat adrenal. Endocrinology. 89: 46-49 (1971).
 67. Miner L.L., Baruchin A. and Kaplan B.B., Effect of cold stress on cholinergic receptors in the rat adrenal gland. Neuroscience Letters. 106 (3): 339-344 (1989).
 68. Kaplan B.B., Stachowiak M.K., Stricker E.M. and Zigmond M.J., Regulation of adrenal tyrosine hydroxylase gene expression during cold stress. Amino acid in Health and Disease: New Perspectives. Alan R.

- Liss. New York 285-302, (1987).
69. Stachowiak M., Sebbane R., Stricker E.M., Zigmond M.J. and Kaplan B.B., Effect of chronic cold exposure on tyrosine hydroxylase mRNA in rat gland. *Brain Research*. 359: 356-359, (1985).
 70. Chuang D.M. and Costa E., Biosynthesis of tyrosine hydroxylase in rat adrenal medulla after exposure to cold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 4570-4574 (1974).
 71. Tank A.W., Lewis E.J., Chikaraishi D.M. and Weiner N., 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).
 72. Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem*. 72: 248-254 (1976).
 73. Reinhard J.F., Gary K., Smith and Charles A.N., A rapid and sensitive assay for tyrosine 3-monooxygenase based upon the release of $^3\text{H}_2\text{O}$ and adsorption of ^3H -tyrosine by charcoal. *Life Science* 39: 2185-2189 (1986).
 74. Chomczynski P., Sacchi N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*. 162: 156-159, (1987).
 75. Strong R., Moore M.A., Hale C., Wessels-Reiker M. and Richardson ., Modulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the rat adrenal gland by age and

- reserpine. *Mol. Br. Res* 8: 55-62 (1990).
76. Biguet N.F., Buda M., Lamoroux A., Samolyk D. and Mallet J., Time course of the changes in TH mRNA levels in rat brain and adrenal medulla after a single injection with reserpine. *EMBO. J.* 5 287-291, (1986).
77. Ausebel F.M., Brent R., Kingston E.R., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl A., *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol. 1-2 Jhon Wiley & Sons, New York, (1992).
78. Reis D.J., Ross R.A. and Joh T.H., Changes in the activity and amounts of enzymes synthesizing catecholamines and acetylcholine in brain, adrenal medulla and sympathetic ganglia of aged rat and mouse. *Brain Res.* 136:465-474 (1977).
79. McGeer E.G., McGeer P.L. and Wada J.A., Distribution of tyrosine hydroxylase in human and animal brain. *J. Neurochem.* 18: 1647-1658 (1971).
80. Simpkins J.W., Mueller G.P., Huang H.H. and Meites J., Evidence for depressed catecholamine and enhanced serotonin metabolism in aging male rats. Possible relation to gonadotropin secretion. *Endocrinology* 100: 1672-1678, (1977).
81. Hassler R.G. and Christ J.F. (eds). *Parkinson-specific motor and mental disorders*. *Advances in Neurology*. Vol. 40: Raven Press New York (1984).
82. Gribbin B., Pickering T.G., Sleight P. and Peto R., Effect of age and high blood pressure on baroreflex sensitivity in man. *Circ. Res.* 29: 424-431, (1971).
83. Rothbaum D.A., Shaw D.J., Angell C.S. and Shock N.W.,

- Cardiac performance in unanesthetized senescent male rat. *J. Gerontol* 28: 287 (1973).
84. Rothbaum D.A., Shaw D.J., Angell C.S. and Shock N.W., Age differences in the baroreceptor response of rats. *J. Gerontol.* 29: 488-492, (1974).
85. Rowe J.W. and Troen B.R., Sympathetic nervous system and aging in man. *Endocr. Rev.* 1: 167-179, (1980).
86. Shimada K., Kitazumi T., Sadakane N., Ogura H. and Ozawa T., Age-related changes of baroreflex function, plasma norepinephrine and blood pressure. *Hypertension.* 7: 113-117, (1985).
87. Adolfson R.S., Gottfries C.G., Roos B.E. and Winblad B., Post-mortem distribution of dopamine and homovanillic acid in human brain, variations related to age and a review of the literature. *J. Neural Transm.* 45: 81-105, (1979).
88. Carfagna N., Trunzo F. and Moretti A., Brain catecholamine content and turnover in aging rats. *Exp. Gerontol.* 20: 265-269, (1985).
89. Axelrod J., Mueller R.A., Henry J.P. and Stephens R.M. Changes in enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of noradrenaline and adrenaline after psychosocial stimulation. *Nature* 225: 1059-1060 (1970).
90. Mueller R.A., Thoenen H. and Axelrod J., Increase in tyrosine hydroxylase activity after reserpine administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 169: 74-79 (1969).
91. Fregly M.J., Kikta D.C., Threault R.M., Torres J.L. and Barney C.C., Development of hypertension in rats during chronic exposure to cold. *J. Appl. Physiol.* 66 (2): 741-749, (1989).

92. Baruchin A., Weisberg P., Miner L.L., Ennis D., Nisenbaum L.K., Naylor E., Stricker E.M., Zigmond M.J. and Kaplan B.B., Effect of clod exposure on rat adrenal tyrosine hydroxylase: An analysis of RNA, protein, enzyme activity and cofactor levels. *Journal of Neurochemistry* 54: 1769-1775, (1990).

