

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ADRENOMEDULLİN VE METİLE ADRENOMEDULLİN UYGULAMASININ BAZI
ENDOJEN ANJİOGENİK VE BİYOKİMYASAL FAKTÖRLER ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

NURAN ÇIKCIKOĞLU YILDIRIM

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALATYA
TEMMUZ 2008

Tez Başlığı: Adrenomedullin ve Metile Adrenomedullin Uygulamasının Bazı Endojen Anjiogenik ve Biyokimyasal Faktörler Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Tezi Hazırlayan : **Nuran CIKCIKOĞLU YILDIRIM**

Sınav Tarihi : 18.07.2008

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jurisi Üyeleri

Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN

Mustafa Kemal Üniversitesi

Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ

İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Murat ÖZMEN

İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

İnönü Üniversitesi

Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL

İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Ali ŞAHİN
Enstitü Müdürü

Onur Sözü

Doktora tezi olarak sunduğum “Adrenomedullin ve Metile Adrenomedullin Uygulamasının Bazı Endojen Anjiogenik ve Biyokimyasal Faktörler Üzerine Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Nuran CIKCIKOĞLU YILDIRIM

ÖZET

Doktora Tezi

ADRENOMEDULLİN VE METİLE ADRENOMEDULLİN UYGULAMASININ BAZI ENDOJEN ANJİOGENİK VE BİYOKİMYASAL FAKTÖRLER ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nuran CIKCIKOĞLU YILDIRIM

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

103+ix Sayfa

2008

Danışman: Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ

Adrenomedullin orijinal olarak insan feokromasitomasından izole edilmiş etkin bir hipotansif ve vazodilatör peptittir. Son zamanlarda araştırmacılar AdM'in anjiojenik bir faktör olarak da görev yapabileceğini önermişlerdir. Protein sentezi sonrası proteinlerin ve nükleik asit gibi önemli biyolojik moleküllerin fonksiyonel hale gelmesinde fosforillenme ve metillenme gibi reaksiyonlar önemli derecede rol oynamaktadır.

Bu çalışmada, laboratuvar koşullarında ve stres koşullarında AdM'in anjiojenik etkilerinin araştırılmasıyla birlikte metile adrenomedullinin anjiojenez üzerinde olası etkileri ile antioksidan enzim aktiviteleri gibi bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada İnönü Üniversitesi, Deneysel Hayvanları Merkezinde üretilen 36 adet erkek Wistar sıçanı 1- Kontrol Grubu 2- Stres grubu 3- AdM Uygulama Grubu 4- Met-AdM Uygulama grubu 5- Stres+AdM uygulama grubu 6- Stres+met-AdM uygulama grubu olacak şekilde 6 gruba ayrılmıştır. AdM ve met- AdM uygulamaları 2000 ng/kg olarak i.p olarak günde bir kez olmak üzere 1 hafta süre ile yapılmıştır. Soğuk stresi uygulaması ise, hayvanlar bir hafta süre ile +10 °C 'de soğuğa maruz bırakılarak yapıldı. Sıçanların dokularında katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-P_x) ve matriks metalloproteinaz (MMP-2) enzim aktiviteleri ile Nitrik oksit (NO), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ve İnterlökin-6 (IL-6) düzeyleri tespit edildi. Karaciğer, akciğer, böbrek ve kalp dokularında toplam RNA miktarları tayin edildi.

Sonuç olarak, stresle birlikte AdM uygulaması yapılan gruplarda, AdM'nin tüm dokularda bazı antioksidan enzim aktiviteleri üzerinde telafi edici etkisinin olabileceği sonucuna varılmıştır. Stresle birlikte met-AdM uygulaması yapılan gruplarda, met-AdM'nin kalp hariç diğer dokularda bazı antioksidan enzim aktiviteleri üzerinde telafi edici etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Stresle birlikte AdM uygulandığında, AdM anjiojenik faktörlerden NO ve VEGF'nin düzeylerini arttırmıştır. Buna karşın anjiojenik faktörler, IL-6, TNF- α seviyeleri ile MMP-2 aktivitesi üzerine etkisinin dokular arasında farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Stres+met AdM uygulamasının NO ve VEGF üzerine etkisi AdM uygulaması ile benzer sonuçlar gösterirken, IL-6, TNF- α düzeyleri ile MMP-2 aktivitesi üzerine etkisinin dokulara göre farklılık gösterdiği saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: Adrenomedullin, Metile-adrenomedullin, antioksidan enzimler, anjiojenik faktör, sıçan.

ABSTRACT

Ph.D.Thesis

THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ADRENOMEDULLIN AND METHYL -ADRENOMEDULLIN TREATMENT ON SOME ENDOGEN ANGIOGENIC AND BIOCHEMICAL FACTORS

Nuran CIKCIKOĞLU YILDIRIM

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

103+ix Pages

2008

Supervisor: Prof.Dr. Muhittin YÜREKLİ

Adrenomedullin is a potent vasodilator and hipotensive peptid that was originally isolated from human pheochromocytoma. There is a lot of evidence that adrenomedullin plays important roles in many biological functions as a otocrine, paracrine and endokrin mediators. Recently, it has reported that Adrenomedullin has an angiogenic property. Most proteins undergo post-translational modifications. These modifications like methylation, phosphorylation are extremely important because they provide important biological molecules become functional.

In this study, we investigated the effects of adrenomedullin and methylated adrenomedullin treatment on some endogen angiogenic factors and biochemical changes. Thirty-six male wistar rats were divided into six groups: Control group, Stress group, Adrenomedullin group, methylated adrenomedullin group, stress+adrenomedullin group, stress+ methylated adrenomedullin group. In AdM treated group and met-AdM treated groups, animals received intraperitoneal (i.p) injection of AdM and met-AdM (2000ng/kg body weight) once a day during a week. Stress group animals were exposed +10 °C cold during a week. The activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-P_x) and matrix metalloproteinase (MMP-2) enzymes activities and nitric okside (NO), vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) levels were determined in the tissues of rats. Total RNA levels were determined in liver, lung, kidney and heart tissue of rats.

In conclusion, the groups treated AdM with stress, there was a compensating effect of AdM on some antioxidant enzymes in all tissues. The groups treated met-AdM with stress, there was a compensating effect of met-AdM on some antioxidant enzymes in all tissues except heart. The AdM and stress application, AdM increases VEGF and NO levels. However, it was determined that effects of AdM on IL-6 and TNF- α levels and MMP-2 activity showed differences in various tissues. Stress+ Met AdM treatment effected NO and VEGF levels paralel with AdM, conclisions but IL-6, TNF- α levels and MMP-2 activity showed differences in various tissues.

KEYWORDS: Adrenomedullin, methylated adrenomedullin, antioxidant enzyme, angiogenic factors, rat.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanması ve yşrştşlmesinde her tşrlş desteğini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Muhittin YşREKLİ'ye,

Çalıőmalarım sşreci içerisinde bşlşm imkanlarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bşlşm Baőkanı Prof. Dr. Murat ÖZMEN'e,

Deneysel verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde yardımlarından dolayı Doç. Dr. Saim YOLOğLU ve Dr. Engin TALKAT'a

Çalıőmalarım sşrecinde deneysel aőamada yardımlarını gşrdüğşm Yrd. Doç. Dr. M. İlker DOğRU'ya

Çalışmanın yşrştşlmesinde proje desteğinden dolayı İnşnş Đniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine,

Tezin baőlangıcından bitimine kadar her aşamasında bana destek olan eőim Arő. Gör. Numan YILDIRIM'a,

Hayatım her dşeneminde bana gşvenen ve arkamda olan değerli aileme,

En stresli zamanlarımda bana varlığı ile neőe veren kızım Zeynep YILDIRIM'a

Teőekkřrlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	ÖZET	i
	ABSTRACT	ii
	TEŞEKKÜR	iii
	İÇİNDEKİLER	iv
	SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
	ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
	ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1.	GİRİŞ	1
1.1	Genel Bilgiler	1
1.2	Adrenomedullin.....	3
1.2.1	Adrenomedullinin Keşfi	3
1.2.2	Adrenomedullinin Yapısı ve Sentezi	4
1.2.3	Adrenomedullin'in Biyolojik Etkileri	5
1.3	Anjiyenez	13
1.4	Anjiyolitik Faktörler	17
1.4.1	Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü (VEGF)	17
1.4.2	Nitrik Oksit (NO)	20
1.4.3	Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α).....	25
1.4.4	İnterlökin-6 (IL-6).....	27
1.5	Matriks Metalloproteinazlar.....	29
1.6	Antioksidan Enzimler	33
1.6.1	Süperoksit Dismutaz	33
1.6.2	Katalaz	34
1.6.3	Glutasyon Peroksidaz	35
2.	KAYNAK ÖZETLERİ.....	37
3.	MATERYAL VE METOD.....	46
3.1	Deneylerde Kullanılan Sıçanlar	46
3.1.1	Soğuk Stresi Uygulaması	46
3.1.2	Adrenomedullin Uygulaması	46
3.1.3	Metile-adrenomedullin Uygulaması	46
3.1.4.	Stres ve Adrenomedullin Uygulaması	47
3.1.5	Stres ve Metile-adrenomedullin Uygulaması.....	47
3.2	Diseksiyon İşlemi.....	47
3.3	Organların Alınması ve Homojenizasyonu	47
3.4.	Toplam Protein Ölçümü.....	48
3.4.1	Standart Tüplerin Hazırlanması	48
3.4.2	Örnek İçeren Tüplerin Hazırlanması	48
3.5	Katalaz Aktivite Tayini	48
3.6	Glutasyon Peroksidaz Aktivite Tayini	49
3.7	Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini	49
3.8.	Nitrik Oksit Ölçümü	50
3.9	Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü Ölçümü	50
3.10	Matriks Metalloproteinaz Aktivite Tayini.....	50
3.11	İnterlökin-6 (IL-6) Ölçümü	50
3.12	Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) Ölçümü	51
3.13.	Toplam RNA Analizi	51
3.14	İstatistiksel Yöntem	51
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	52
4.1	Antioksidatif Enzim Aktivite Sonuçları.....	54
4.1.1	Katalaz	54

4.1.2	Süperoksit Dismutaz (SOD)	57
4.1.3	Glutasyon Peroksidaz (GSH-P _x)	59
4.2	Anjiojenik Faktörlerdeki Değişiklikler	62
4.2.1	Nitrik Oksit (NO)	62
4.2.2	Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) Faktörü	65
4.2.3	İnterlökin-6 (IL-6).....	68
4.2.4.	Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü (VEGF)	70
4.2.5.	Matriks Metalloproteinaz (MMP-2)	73
4.2.6.	Toplam RNA Miktarları	76
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	78
6.	KAYNAKLAR	92
7.	ÖZGEÇMİŞ.....	103

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACTH	Adrenokortikotropik hormon
AdM	Adrenomedullin
AMBP-1	Adrenomedullin bağlayıcı protein-1
Ang-1	Angiopoitein
AP-1	Aktivatör protein -1
ATP	Adenozin trifosfat
Bcl-2	B hücre lenfoması
BCDF	İnsan B-hücre farklılaştırma faktörü
BSF	B hücre uyarıcı faktör
BSA	Bovin serum albumin
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
c-GMP	Siklik guanizin monofosfat
Cd ²⁺	Kadmiyum
CGRP ₈₋₃₇	Kalsitonin geni ile ilgili peptit
COX	Siklo oksijenaz
CO ²⁺	Karbondioksit
CRLR	Kalsitonin reseptörü benzeri reseptör
FADD	Fas-associated death domain
Fe	Demir
FGF	Fibroblast growth faktör
gp130	Glikoprotein 130
GSH	Glutatyon
GSH-P _X	Glutatyon peroksidaz
HGF	hepatosit büyüme faktörü
Hg ²⁺	Civa
HIF-1	Hipoxia indüçible factor-1
HPA	Hiptalamus-hipofiz-adrenal
HUVEC	İnsan göbek kordonu endotelial hücresi
H ₂ O	Su
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
IFNβ ₂	İnterlökin-6 reseptörü
Ig G	İmmüoglobulin G
Ig A	İmmüoglobulin A
HPV	İnsan papilla virusu
HSP90	Heat shock protein 90
IL-1 β	İnterlökin-1 β
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
IL-10	İnterlökin-10
IL-13	İnterlökin-13
JAKs	janus kinazlar
JNK	Jun N-terminal kinase
LIF	Leukemia inhibitör faktör
LPS	Lipopolisakkarit
MAPK	Mitojenin aktive ettiği protein kinaz
MMP	Matriks metaloproteinaz
Mn	mangan
MT-1	Membran tip-1
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NF-κB	Nuclear factor-κB

NK	Doğal öldürücü
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
NOS II/iNOS	İnducible nitrik oksit sentaz
NOS III/eNOS	Endotelial nitrik oksit sentaz
NOS I/nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
OH ⁻	Hidroksil radikali
PAMP	Proadrenomedullin N-terminal 20 peptid
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PI ₃	Fosfo inozitol-3
PI ₃ K	Fosfo inozitol – 3 kinaz
PKA	Protein kinaz-A
PVN	Paraventriküler nükleus
RAMP2	Adrenomedullin reseptör bileşeni
ROIs	Reaktif oksijen araçları
STATs	Transkripsiyon aktivatörleri
O ₂	Moleküler oksijene
O ₂ ⁻	Süperoksit
SOD	Süperoksit dismutaz
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TIMPs	Matriks metaloproteinazların doku inhibitörleri
TNF-α	Tümör nekrozis faktör-α
TNFRI	Tümör nekrozis faktör 1
VEGF	Vasküler endotelial growth faktör
VEGF-R1	Vasküler endotelial growth faktör reseptörü-1
αvβ3	İntegrin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Adrenomedullin geni, pre-pro adrenomedullin ve adrenomedullin'in iyosentezi	4
Şekil 1.2 Yeni kan damarlarının oluşumu	16
Şekil 1.3 L-arjininden nitrik oksit sentezi	21
Şekil 1.4 c-GMP bağımlı hücre sinyali	21
Şekil 1.5 Matriks metalloproteinazın şematik olarak etki şekli	30
Şekil 4.1 Karaciğer dokusundaki CAT enzim aktivitesindeki değişiklikler	54
Şekil 4.2 Akciğer dokusundaki CAT enzim aktivitesindeki değişiklikler	55
Şekil 4.3 Böbrek dokusundaki CAT enzim aktivitesindeki değişiklikler	56
Şekil 4.4 Kalp dokusundaki CAT enzim aktivitesindeki değişiklikler	56
Şekil 4.5 Karaciğer dokusundaki SOD enzim aktivitesindeki değişiklikler	57
Şekil 4.6 Akciğer dokusundaki SOD enzim aktivitesindeki değişiklikler	58
Şekil 4.7 Böbrek dokusundaki SOD enzim aktivitesindeki değişiklikler	58
Şekil 4.8 Kalp dokusundaki SOD enzim aktivitesindeki değişiklikler	59
Şekil 4.9 Karaciğer dokusundaki GSH-P _x enzim aktivitesindeki değişiklikler	60
Şekil 4.10 Akciğer dokusundaki GSH-P _x enzim aktivitesindeki değişiklikler	60
Şekil 4.11 Böbrek dokusundaki GSH-P _x enzim aktivitesindeki değişiklikler	61
Şekil 4.12 Kalp dokusundaki GSH-P _x enzim aktivitesindeki değişiklikler	62
Şekil 4.13 Karaciğer dokusundaki NO düzeyindeki değişiklikler	63
Şekil 4.14 Akciğer dokusundaki NO düzeyindeki değişiklikler	63
Şekil 4.15 Beyin dokusundaki NO düzeyindeki değişiklikler	64
Şekil 4.16 Kalp dokusundaki NO düzeyindeki değişiklikler	65
Şekil 4.17 Karaciğer dokusundaki TNF- α düzeyindeki değişiklikler	65
Şekil 4.18 Akciğer dokusundaki TNF- α düzeyindeki değişiklikler	66
Şekil 4.19 Beyin dokusundaki TNF- α düzeyindeki değişiklikler	67
Şekil 4.20 Kalp dokusundaki TNF- α düzeyindeki değişiklikler	67
Şekil 4.21 Karaciğer dokusundaki IL-6 düzeyindeki değişiklikler	68
Şekil 4.22 Akciğer dokusundaki IL-6 düzeyindeki değişiklikler	69
Şekil 4.23 Beyin dokusundaki IL-6 düzeyindeki değişiklikler	69
Şekil 4.24 Kalp dokusundaki IL-6 düzeyindeki değişiklikler	70
Şekil 4.25 Karaciğer dokusundaki VEGF düzeyindeki değişiklikler	71
Şekil 4.26 Akciğer dokusundaki VEGF düzeyindeki değişiklikler	71
Şekil 4.27 Beyin dokusundaki VEGF düzeyindeki değişiklikler	72
Şekil 4.28 Kalp dokusundaki VEGF düzeyindeki değişiklikler	73
Şekil 4.29 Karaciğer dokusundaki MMP-2 enzim aktivitesindeki değişiklikler	73
Şekil 4.30 Akciğer dokusundaki MMP-2 enzim aktivitesindeki değişiklikler	74
Şekil 4.31 Beyin dokusundaki MMP-2 enzim aktivitesindeki değişiklikler	75
Şekil 4.32 Kalp dokusundaki MMP-2 enzim aktivitesindeki değişiklikler	75
Şekil 4.33 Karaciğer dokusundaki toplam RNA miktarlarındaki değişiklikler	76
Şekil 4.34 Akciğer dokusundaki toplam RNA miktarlarındaki değişiklikler	77
Şekil 4.35 Böbrek dokusundaki toplam RNA miktarlarındaki değişiklikler	77
Şekil 4.36 Kalp dokusundaki toplam RNA miktarlarındaki değişiklikler	78

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Önemli anjiojenik faktörler ve etki mekanizmaları.....	17
Çizelge 1.2 TNF- α 'ın tümör ilerlemesindeki etkileri	26
Çizelge 4.1 Adrenomedullin ve metile adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak dokulardaki CAT, SOD ve GSH-P _x enzim aktivitesindeki değişimler ve toplam RNA miktarlarındaki değişimler	52
Çizelge 4.2 Adrenomedullin ve metile adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak dokulardaki NO, TNF- α , IL-6, VEGF düzeyleri ve MMP-2 enzim aktivitesindeki değişimler	53

GİRİŞ

1.1 Genel Bilgiler

Stres, organizmanın fiziksel ve davranışsal uyum cevaplarının çok yönlü ve düzenli ifade ediliş şekli olan homeostazisin bozulması olarak bilinir [1]. Aşırı çevresel şartlara maruz kalma, organizmanın karşı karşıya kaldığı bir stres şeklidir. Soğuğa maruz kalmak da organizmaların karşılaşılabileceği stres koşulları içerisinde yer alır. Stres sonrası anormal durumlar ve fizyopatolojik mekanizmaların araştırılmasında soğuk uygulamasının kullanıldığı hayvan modelleri geliştirilmiştir. İnsanlar açısından stres göz önüne alındığında hem içsel hem de dışsal stres faktörleri son adım olarak ölüme neden olabilirler. Dışsal faktörler arasında alkol, ruhsal durumla ilgili ilaçlar, soğuğa maruz kalma, içsel faktörler arasında ise; zayıflık, fiziksel bitkinlik, gençlerde travmalar, hastalıklar ve vücut sıcaklığının fizyolojik olarak muhafaza edilememesi gibi durumlar sayılabilir. Soğuğa karşı stres cevabının fizyolojik bileşenleri metabolik, dolaşım sal veya hormonal olabilmektedir. Organizmada farklı fizyolojik stresörlere karşı özgül nöroendokrin cevap oluştururlar. Ancak hipofiz-adrenal ve simpatomedulloadrenal eksen (HPA) hemen hemen bütün stresörlere ortak [2]. Uzun süren soğuğa maruz kalma memelilerde metabolik hızı arttırmakta, kahverengi yağ dokusu, karaciğer, böbrek, ince barsak ve kalp gibi metabolik olarak aktif dokuların artan hipertrofisine neden olmaktadır. Mitokondriyal hacim yoğunluğunda, damar çapında, aerobik enzim aktivitesinde, doku oksijen tüketimindeki artışlar uzun süreli soğuğa maruz kalmanın sonuçlarıdır [3].

Adrenomedullin etkin hipotansif ve vazodilatör etkiye sahip 52 aminoasitlik bir peptid'dir. Adrenomedullin düzeyinin hipertansiyonlu hastalarda önemli derecede arttığı bildirilmektedir. Böyle stresörlere ilgili artışların düzenleyici ve koruyucu olarak hizmet ettiği önerilmektedir [2].

Adrenomedullin'in pek çok biyolojik olarak önemli fonksiyonlarda otokrin-parakrin veya endokrin bir aracı olarak rol oynadığına dair kanıtlar mevcuttur. Bu biyolojik fonksiyonlar arasında kan basıncının endotelial düzenlenmesi, sepsis veya oksijen azlığında organ hasarına karşı koruma, susamanın düzenlenmesi yolu ile kan volümünün kontrolü sayılabilir [4].

Böbrek bozuklukları, kalp krizleri, hipertansiyon, sepsis gibi pek çok patolojik durumlarda adrenomedullin'in plazma seviyesinin arttığı gösterilmiş olup, bu durum adrenomedullin'in pek çok patolojik durum gibi kanserde de rol oynayabileceğini akla getirmektedir. Malignant büyümenin metastaz, anjiojenez, büyüme sinyallerinde yeterlilik, apoptozisten kaçma gibi çok adımlı bir işleme bağımlı olduğu ve kanser hücrelerinde aşırı ifade edilen adrenomedullin'in ise malignant büyümenin temeli olarak düşünülen pek çok moleküler ve fizyolojik özelliklerin gelişmesine yardım ettiği önerilmektedir [5].

Tümörün indüklediği anjiojenez, dış kaynaklı yeni damar oluşumu ile sonuçlanan patolojik bir durumdur. Anjiojenik bir faktör olarak adrenomedullin, yeni damar oluşumunun indüklenmesi yolu ile tümörlerde dolaylı bir yaşam faktörü olarak düşünülmektedir [4]. Yeni damar yapımı (anjiojenez, neovaskülarizasyon), vücutta fizyolojik olarak yara iyileşmesi, embriyogenez, menstural siklus gibi durumlarda söz konusudur. Patolojik anjiojenez ise; başta tümörler olmak üzere kollajen doku hasarları, retinopati ve psöralis gibi hastalıklarda mevcuttur [6].

Yeni kan damarlarının oluşumunda çok sayıda faktör rol oynamaktadır. Bunlar arasında vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörleri (FGF-1 ve 2), hepatosit büyüme faktörü (HGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), angiopoiteinler (ang-1 ve 2), tümör nekrozis faktör -alfa (TNF- α), IL-6, IL-8, adrenomedullin ve NO sayılabilir [6]. Anjiojenik moleküller içerisinde en önemlisi ve üzerinde en çok durulanı VEGF'dir. VEGF homodimerik, heparin bağlayıcı, glikoprotein yapısında bir molekül olup, endotelial hücrelerin çoğalmasını, göçünü ve farklılaşmasını sağlamaktadır. Endotelial hücreler için göç ettirici özelliğinin yanı sıra VEGF, hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteinazların da salınımını sağlayarak, invazyon ve metastazı da kolaylaştırmaktadır [7].

Adrenomedullin sıçanlarda, tavşan ve insanda intravenöz olarak verildiğinde damarlarda NO üretimine yol açarak uzun süren hipotansiyona neden olmaktadır [8]. NO, vazorelaksyon, trombosit agregasyonu, immün cevap gibi pek çok önemli fizyolojik olaylara aracılık ettiği bilinen bir radikaldir ama zayıf bir oksidandır. [11]. Ayrıca NO'in endotelial hücrelerin göç yeteneğini ve proliferatif uyarılması yolu ile tümör büyüme sürecinde anjiojenezini uyardığı gösterilmiştir [12].

Oksijen radikalleri adrenomedullin salınmasını uyarmaktadır [8]. Oksidatif stresle ilgili pek çok patolojik durumlar örneğin; hipertansiyon, arteriosklerozis, diyabet, kalp hastalığı, gibi durumlar plazma adrenomedullin konsantrasyonunu arttırmakta ve belkide dengeleyici bir etki yaratmaktadır. Bundan dolayı adrenomedullin'in antihipertansif ve antioksidan özelliğe sahip ideal bir tedavi edici ajan olarak görev yapabileceği önerilmektedir [9].

Hücreler oksidanlara katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD)ve glutatyon peroksidaz gibi (GPX) gibi enzimler ve glutatyon (GSH), vitamin E ve C gibi enzim olmayan moleküller içeren çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları yolu ile oksidanlara cevap verebilirler [10].

SOD'lar süperoksit (O_2^-) radikalinin hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dismutasyonunu sağlayan metalloproteinlerdir. Daha sonra hidrojen peroksit (H_2O_2), katalaz ve sitozolik bir selenoenzim ailesinden olan GP_x tarafından suya (H_2O) dönüştürülür [11].

1.2 ADRENOMEDULLİN

1.2.1 Adrenomedullin'in Keşfi

Yeni bir düzenleyici peptid olarak adrenomedullin, Japon bilim adamları tarafından bazı peptidlerin trombosit-siklik adenzin monofosfat (cAMP) düzeylerine etkisi araştırılırken, feokromositoma hücrelerinden elde edilmiştir. Adrenal medulladan türediği için adrenomedullin denilen bu peptid hakkında ilk makale 1993 yılında sadece onun belirlenmesi ile ilgili değil aynı zamanda kan basıncı üzerine etkilerini de tanımlayacak biçimde dolaşımdaki adrenomedullin'i radyoimmünassay yöntemi ile ölçmek suretiyle yayınlanmıştır [21].

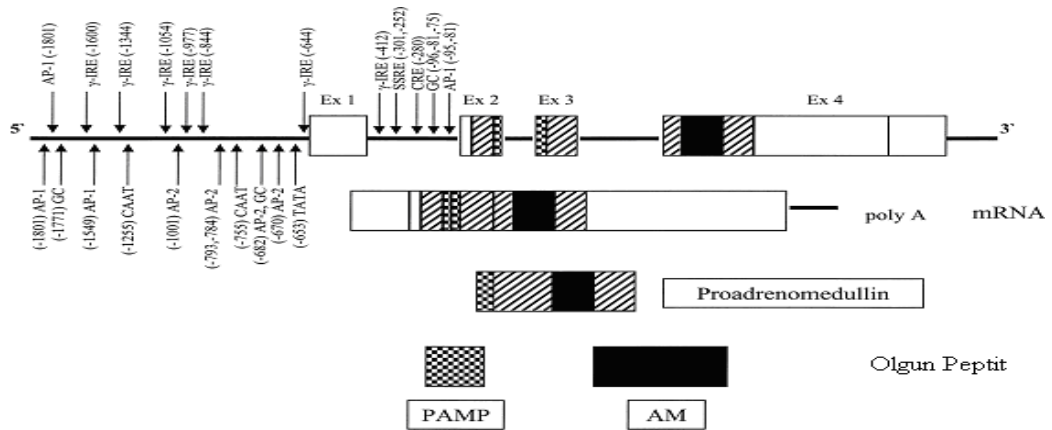
İlk keşfedildiğinden beri adrenomedullin geni adrenal medulla ve endotelial hücrelerde gösterilmiştir. Böylece bu peptidin nitrik oksit (NO) ve endotelin ile birlikte vasküler endotelial hücrelerin salgısal bir ürünü olduğu kabul edilmektedir [22].

1.2.2 Adrenomedullin'in Yapısı ve Sentezi

Adrenomedullin orijinal olarak insan feokromasitomasından izole edilen 52 amino asitlik bir peptittir [13,14].

Adrenomedullin 16. ve 21. kısımlarda tek bir disülfid köprüsü ile bağlanmış ve karboksit terminalinde aminlenmiş tirozin içermektedir. Adrenomedullin büyükçe bir öncül molekülün parçası olarak sentezlenmektedir. Hem insanda hem de sıçanlarda 185 aminoasitten oluşan [22] pre-pro adrenomedullin olarak adlandırılan bir prohormonun translasyon sonrası proteolitik olarak ayrılması ile üretilmiştir. Pre-pro adrenomedullin'in NH₂-terminalindeki 20 aminoasitlik dizi geçici hipotansif etki yaratır ve pro-adrenomedullin N-terminal-20 peptit adını alır [14]. Adrenomedullin, kalsitonin geni ile ilgili bir peptit, amilin, kalsitonini içeren geniş bir regülatör peptid ailesine aittir ve kalsitonin reseptörüne benzer reseptörlerden kaynaklanan geçici reseptörler yolu ile görev yapmaktadır [22].

İnsan adrenomedullin geni 11. kromozoma yerleşmiş ve 4 ekson ve 3 introndan oluşmuştur. Orijinal olarak feokromasitoma ve normal adrenal medullada tanımlanan adrenomedullin gen ürünleri adrenal korteks, böbrek, akciğer, kalp, dalak, ince barsak, tükrük bezleri ve beyini içeren pek çok dokuda ortaya çıkarılmış en çok transkripsiyon ise; endotelial hücrelerde gözlenmiştir [8].



Şekil 1.1 Adrenomedullin geni, pre-pro adrenomedullin ve adrenomedullin'in biyosentezi. İnsan adrenomedullinin'in genomik DNA'sı 4 ekson ve 3 introndan oluşur. Olgun adrenomedullin peptidi 4. eksonda kodlanır [20].

Proinflamatuar sitokinler adrenomedullin gen transkripsiyonunu ve hormon salınımını arttırmaktadır. Kültüre edilmiş vasküler endotelial düz kas hücrelerinde lipopolisakkaritler, interlökin-1 ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α)'ın adrenomedullin gen transkripsiyonunu uyardığı gösterilmiştir.

Diğer gen transkripsiyonu uyarıcıları; retinoikasit, minereokortikoidler, glukokortikoidler, tiroid hormonlarını içermektedir. Kültüre edilmiş vasküler düz kas hücrelerinde adrenomedullin gen transkripsiyonu, c-AMP ve TGF- β (Transforming Growth Factor- β) ve glioma hücrelerinde TNF- α tarafından inhibe edilmiştir [8].

1.2.3. Adrenomedullin'in Biyolojik Etkileri

Adrenomedullin bir dolaşım hormonu olarak görev yapabilir ve kardiyovasküler sistem, böbrek fonksiyonları ve kan basıncının düzenlenmesine karışarak otokrin-parakrin bir aracı olarak da işlev görebilmektedir [15]. Adrenomedullin endotelial hücrelerce NO üretimini artırır. Adrenal bezlerde potasyum ve angiotensin-II ile uyarılan aldesteron salınmasını engeller. Adrenomedullin'in natriüretik ve diüretik hareketi peptit'in tübüler fonksiyon ve renal kan basıncı üzerine etkilerini yansıtır [16]. Adrenomedullin'in damar yapısı üzerine vazodilasyon, vasküler düz kas hücre çoğalmasının düzenlenmesi, endotelial hücre apoptozisinin inhibisyonu, anjiogenezisin ilerletilmesini içeren önemli etkileri vardır [17]. Adrenomedullin ve proadrenomedullin-N terminal-20 peptid dolaşım hormonu olarak rol oynar ve insanda düşük düzeyde (pg/mL) oranında bulunur. Adrenomedullin'in plazma yarı ömrünün yaklaşık olarak 22 dakika olduğu tahmin edilmektedir. Hastalık durumlarında adrenomedullin'in plazma seviyesinin arttığı bildirilmiştir [8]. Adrenomedullin, kanser, diyabet, inflamasyon, sepsis, kardiyovasküler ve renal bozukluklar gibi çok sayıda patolojilerin bir aracısı olarak rol oynar [18]. Akciğer vazodilasyonun yanı sıra adrenomedullin, asetilkolin ve histamine cevapta bronşlarda daralmayı inhibe eder. İçsel adrenomedullin akciğerlerde anti-enflamatuar olarak rol oynayabilir. Lokal olarak üretilen adrenomedullin ve dolaşımdaki adrenomedullin ise insülin salınımını ayarlamaktadır [8]. Adrenomedullin pek çok tümör çeşitinde ifade edilir ve pek çok kanser tipinde mitojenik bir faktör gibi iş görür [18]. Adrenomedullin kanser hücreleri için anti-apoptopik bir yaşamsal faktördür ve komplement-H 'ye bağlanarak immün sistemin dolaylı bir baskılayıcısı olarak rol oynar.

Adrenomedullin düşük oksijen basıncının olduğu ortamlarda HIF-1 bağımlı yolla salgılanarak yeni damar oluşumunu ilerleten etkin bir anjiojenik faktör olarak görev yapar [18]. Bütün bu bilgiler ışığında adrenomedullinin karsinogenez ve tümör ilerlemesinin bir düzenleyicisi olarak görev yaptığı önerilmektedir [19].

A-) Böbrek ile ilişkili etkiler

Damar tonusu düzenleme konusunda güçlü bir vasodilatör olan adrenomedullin, konsantrasyona bağlı olarak köpek renal arterlerinde vasodilasyon yapmaktadır. Yapılan çalışmalar, adrenomedullin bu etkisini endotelial hücreler aracılığı ile NO'ya bağımlı olarak yaptığını ortaya koymuştur. Adrenomedullin uygulaması kalp hızı ve arteriyal kan basıncını etkilemeksizin, renal kan akımını, idrar çıkışını, glomerular filtrasyon hızını, idrar sodyum atılımını doza bağlı olarak artmaktadır [23]. Adrenomedullin'in intrarenal infüzyonu belirgin diüretik ve natriüretik cevaba yol açar. Bu durum glomerular filtrasyon hızını arttırmakta sodyum geri emilimine neden olmaktadır. Adrenomedullin'e renal yanıt NO sentezinin inhibisyonu ile zayıflatılabilir. Bu durum adrenomedullin'in vazodilatör, diüretik ve natriüretik etkilerinin endojen NO salınımı aracılığı ile olduğunu düşündürmektedir [24].

Adrenomedullin mezanşiyal hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir. Trombosit türevi büyüme faktörü ile uyarılmış mitojen aktive edici protein kinaz'ın aktivasyonunu azaltmaktadır. Bütün bunlar adrenomedullin'in mezanşiyal hücre mitojenezini baskıladığını göstermektedir. Adrenomedullin aynı zamanda mezanşiyal hücre kontraksiyonunu düzenleme yeteneğindedir [25]. Glomerulusun immuno-enflamatuvar hasara karşı korunmasında içsel adrenomedullin'in rolü, PKA bağımlı mekanizma yolu ile uyardığı kanıtının bir sonucu olarak önerilmektedir. Proenflamatuvar sitokinler TNF- α ve IL-1 β 'nin böylece mezanşiyal hücrelerde adrenomedullin ile etkileşime girdiği böylece lokal hücrelerden ve makrofajdan serbest radikal oluşumunu azalttığı gösterilmiştir [26].

Adrenomedullin aynı zamanda böbreğin endokrin fonksiyonunu da kontrol edebilir. Perfüze edilmiş sıçan böbrekleri ve kültüre edilmiş fare juxtaglomerular hücreleri adrenomedullin'in renin sekresyonunu doğrudan c-AMP bağımlı mekanizma yolu ile uyardığı kanıtlanmıştır [27].

B-) Adrenal etkiler

İnsan adrenal bezlerinde hem adrenomedullin hem de proadrenomedullin N-terminal 20 peptid (PAMP) için korteks ve medullada bağlanma bölgeleri vardır [28]. Angiotensin II ve potasyumca insan adrenal bezlerinden aldesteron salınımının uyarılması her iki peptid tarafından da önemli derecede inhibe edilir. Adrenomedullin'in etkisi PAMP'dan daha azdır [29]. Sodyum dishomeostazisli iki sıçan modelinde adrenomedullin'in aldesteron hareketini inhibe ettiği kanıtlanmıştır [30]. Böylece adrenomedullin'in minerelokortikoidler üzerine *in vitro* etkisi, *in vivo* olarak da gerçekleşmiştir.

Adrenomedullin'in ACTH'ın uyardığı glukokortikoid sekresyonu üzerine doğrudan etkisi gözlenmemiştir [31]. Koyunda kültüre edilmiş hücrelerde intravenöz adrenomedullin infüzyonu dolaşım kortizol seviyesini ve ACTH'ı düşürmektedir [32]. PAMP varlığında tirozin hidroksilaz aktivitesi azaltılır bu da peptidin katekolamin salınımını ve üretimini değiştirdiğine işaret etmektedir [33].

C-) Kardiyovasküler etkiler

Adrenomedullin kalpte diğer dokularda olduğu gibi hücre büyümesi ve hipertrofiyi inhibe ederek rol oynamaktadır [34]. Kardiyak miyositlerde adrenomedullin angiotensin II'in uyardığı protein sentezini inhibe eder [35]. Hem miyositlerde hem de miyosit olmayan hücrelerde adrenomedullin üretilir, adrenomedullin gen ifadesi IL-1 β tarafından uyarılır [36]. Aşırı yük, izole edilmiş, perfüze edilmiş sıçan kalplerinde sol ventikülde adrenomedullin mRNA ve protein içeriğini artırır [37]. Memeli kardiyak miyositleri ve fibroblastları adrenomedullin üretmektedirler. Ancak adrenomedullinin kalpteki fizyolojik görevi henüz tam açık değildir. Adrenomedullin sıçan miyositlerinde negatif inotropa sahip iken perfüze edilmiş sıçan kalbinde pozitif inotropik etki gösterir [42]. Dolaşım adrenomedullin seviyesi aşırı kalp yükü olan insan modellerinde artırılır ve intravenöz adrenomedullin infüzyonu toplam periferal direnci, ortalama arteriyal basıncı ve son arteriyal baskıyı azaltır. Kalp hastalıkları olan insanlarda adrenomedullin'in infüzyonu sistolik ve diastolik kan basıncını azaltır, kalp hızını artırır, renin seviyesini artırır, plazma aldesteron seviyesini azaltır. Koyunlarda adrenomedullin infüzyonu, kalp debisinde artışa, kalp kasılmasında gücünün artmasına ve taşikardiye neden olmaktadır [8].

Yapılan çalışmalarda adrenomedullin'in izole edilmiş sıçan kalbinde, CGRP₈₋₃₇ veya c-AMP bağımlı protein kinaz inhibitörü H-89'ca engellenemeyen, pozitif inotropik etki gösterdiği kanıtlanmıştır. Adrenomedullin'in kalp uyarıcı etkisi şiddetli hipertansiyon sırasında vasküler hasarı önleyerek koruyucu olabilmektedir [8].

D-) Merkezi sinir sistemine etkileri

Pek çok vazoaaktif peptid için merkezi sinir sistemi hareketleri tamamlayıcıdır ve onların periferik etkilerine paralel seyrederek [37]. Adrenomedullin'in böbrekte natriüretik ve diüretik etkileri su içimini ve tuz alımını inhibe etmek için merkezi sinir sistemi ile birlikte hareket eder. Adrenomedullin'in tuz alımı ve su içme üzerine merkezi sinir sisteminin hareketi peptidin ilk ortaya çıkarılan biyolojik etkisidir [38]. Periferde adrenomedullin'in beyin vasküler yapısı üzerine önemli etkileri bulunmuştur. Adrenomedullin verilmesinden sonra serebral kan akışındaki artışlar, CGRP antagonisti tarafından bloke edilmiştir [39]. Adrenomedullin geni gliada transkribe edilmiştir, adrenomedullin için bu hücrelerde bağlanma bölgeleri vardır. Adrenomedullin normal veya hibrit glia hücrelerinde anti-mitojenik etkiye sahip olabilmektedir [40]. Adrenomedullin'in periferdeki hipotansif etkisine beyinde rastlanmaz [41]. Adrenomedullin'in beyindeki en önemli rolü, hipotalamus-hipofiz-adrenal eksenin düzenlenmesinden sorumlu olmasıdır [42]. Adrenomedullin ve reseptörleri; merkezi sinir sistemi ve hücrelerinde özellikle serebral korteks, pons, medulla oblongata, koroid pleksus, talamus, hipotalamus ve hipofizde gösterilmiştir. Serebral korteks ve diğer alanlardaki geniş dağılımıyla hem nörotransmitter hem nöromodülatör hem de nörohormon rolündedir [43].

Adrenomedullin merkezi sinir sisteminde otonomik sinirleri etkileyerek kardiyovasküler sistemin düzenlenmesinde önemli olabilmektedir. Kan-beyin bariyerinin sürdürülmesini kontrol altına almakta ve kan-beyin bariyerinin önemli bir otokrin-parakrin aracısı olabilmektedir [42]. Hipofiz bezinde adrenomedullin ve PAMP, ACTH salınımını inhibe eder ve adrenal bezlerden aldosteron salınımı da her iki peptid tarafından inhibe edilir. Periferdeki etkin hipotansif etkiler ile birlikte bu etkiler, adrenomedullin ve PAMP'ı vasküler hacim ve elektrolit homeostazisinin fizyolojik düzenleyicisi olarak göstermektedir. Peptid aynı zamanda kalp bozuklukları, sepsis ve iskemik beyin hasarına karşı koruyucu bir avantaj sağlayabilmektedir [8].

E-) İnflamasyon ve sepsis'e etkileri

Adrenomedullin sistemik ve lokal inflamasyon ve sepsis sırasında plazmada yüksek düzeylere ulaşır.

Çok fonksiyonlu peptid enfeksiyon sırasında tamamen inflamasyona neden olarak, hem hormon hem sitokin gibi davranır aynı zamanda bölgesel kan akımı, lökosit göçünü ve farklılaşmasını, elektrolit dengesini, kalp çalışmasını ve glukoz alımını kontrol eder [42].

Adrenomedullin Endotoksinle oluşturulmuş inflamasyonda immün sistemin farklı organ ve hücrelerinde ifade edilirken aynı zamanda dolaşımdaki immün hücrelerde de üretilir [44]. Hem AdM hem de proinflamatuvar sitokinlerdeki (TNF- α , IL-1 β) değişikliklerle sistemik ve lokal inflamasyon başlar. İnflamatuvar cevabın başarısı için adrenomedullinin geçici yükselişi çok önemlidir. Adrenomedullin proinflamatuvar sitokinlerin aşırı üretilmesinden koruyacak proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler arasındaki çok karmaşık geri besleme sisteminin bir parçasıdır ki aynı zamanda sitokin üretimini uyarma yeteneğine de sahiptir [45].

Adrenomedullin, adrenomedullin bağlayıcı proteinler ve komplement faktör H ile etkileşime girerek komplement çalışmasını değiştirebilir. Komplement faktör H'ın katalitik kapasitesini de değiştirir [46]. Çoğu çalışmada AdM'nin inflamasyon boyunca sitokinler gibi inflamatuvar mediatörler ile hem NO-bağımlı hemde NO-bağımsız mekanizmalar ile üretilmesi hem tedavinin devam etmesi hemde hemostazisin yeniden düzenlenmesinde başarılı bir role sahip olduğundan bahsetmektedir fakat bazı olgularda ise hasar ve enfeksiyon cevabı patolojik hasarla sonuçlanabilir [47]. Normalde sepsis ve septik şok sırasında NO-bağımlı mekanizmayla mikroorganizma saldırısına karşı güç sahibi değildir. Fakat kardiyovasküler sistemin doğrudan etkilenmesi ve yaygın oksidatif hasar nedeniyle azot metabolitlerinin üretilmesi sonucunda adrenomedullin ortaya çıkar [48].

F-) Vasküler etkiler

Adrenomedullin, vasküler yapı üzerine vazodilasyon, vasküler düz kas hücre çoğalmasının regülasyonu, endoteliyal apoptozisin inhibisyonu ve anjiogenezin ilerletilmesini içeren önemli etkilerinin olduğu gösterilmiştir [17].

Adrenomedullin, CGRP ve amilin hem *in vivo* hemde *in vitro* çalışmalarda güçlü hipotansif ve vazodilatördür [49].

AdM'nin intravenöz verilmesini takiben hem sistolik hemde diastolik kan basıncında doza bağımlı kademeli düşüş vazodilasyon etkisiyledir [50]. Adrenomedullin endotelyum-bağımlı ve endotelyum-bağımsız mekanizmalar yoluyla sistemik ve pulmoner kan damarlarında nonadrenerjik ve nonkolinerjik vazodilasyon cevabı oluşturur ki kalp, böbrek, adrenal bez ve akciğerlere giden kan miktarı artar [51]. Hem vasküler düz kas hücrelerinde hem de endotelial hücrelerde AdM ve CGRP reseptörleri aracılığı ile intraselüler cAMP konsantrasyonunda artış görülür [52]. Vasküler endotelial hücrelerde cAMP artışı bifazik (önce hücre içi depolardan kısa süreli ardından iyon kanalından) intraselüler kalsiyum artışıyla sonuçlanır ve nitrik oksit sentaz aktive olur. Oluşan NO'ı guanilat siklaz aktivasyonu izler [53]. Venlerde ise endotelyum-bağımlı mekanizma ile rahatlama görülmesine karşın CGRP ve AdM reseptörlerinin aktivasyonu gösterilememiştir [54].

Adrenomedullin'in yukarıda bahsedilen vazodilatör etkilerinin yanında vasküler düz kas hücresinde endotelin üretimini, makrofajlardan kemoatraktan madde salınımını ve vasküler düz kas hücresinin proliferasyonu ve migrasyonunu inhibe eder. Bu özellikleri sayesinde arteriosklerozun ilerlemesini engeller [55]. Arteriosklerotik plak yapısında bulunan makrofajlarda ki düzeyi arteriyel sklerozun şiddeti ile ilişkili olup tıkanıcı periferel arteriyel hastalıklarda da yüksek saptanır [56].

G-) Metabolizmaya ve diyabete etkileri

Adrenomedullin, insülin salınımını ayarlayarak metabolizmayı kontrol etmektedir. Adrenomedullin oral olarak glikoz alınımını takiben insülin salınımını azaltmakta ya da ertelemektedir. Adrenomedullin salınımı üzerine doğrudan etkileri için kanıtlar, zayıf bir şekilde kontrol edilen diyabetiklerde plazma adrenomedullin seviyesinin önemli derecede arttırılması bulgusu ile desteklenmiştir ve hipergliseminin kültüre edilmiş vasküler endotelial düz kas hücrelerinde protein kinaz-c bağımlı yol ile adrenomedullin ifadesini doğrudan düzenlediğini göstermiştir [42].

H-) Kanserde etkileri

Kanserli hücreler ile normal hücreler karşılaştırıldığında; kanserli hücrelerin büyüme sinyallerinde yeterlilik, anti-büyüme sinyallerine karşı duyarsızlık, dokulara saldırmak ve metastaz kabiliyeti, sınırsız çoğalma potansiyeli, anjiojenezi desteklemek ve apoptozisten kaçmak mekanizmalarını kazanmaya ihtiyaçları vardır. Adrenomedullin ilginç olarak bu mekanizmaların pek çoğunda işe karışmaktadır.

Adrenomedullin tümör hücreleri için bir büyüme faktörüdür ve büyüme faktörü eksikliğini indükleyerek apoptozisi azaltır. Adrenomedullin tümör hücre hareketliliğini ve anjiojenezi artırmaktadır [58]. Adrenomedullin, pek çok tümör çeşitlerinde ifade edilir [57] ve malignant hücrelerin pek çok moleküler ve fizyolojik özelliklerinin kötüye gitmesine neden olur [18]. Farklı orijinli (akciğer, kolon, ovaryum, göğüs, prostat, kıkırdak, kemik iliği) çok sayıda insan epiteliyal kanser hücre soylarında adrenomedullin ve reseptörlerinin ifade edildiği kanıtlanmıştır [59]. Adrenomedullin pek çok kanser tiplerinde mitojenik bir faktör gibi görünür ve daha saldırgan tümör teşvik eder [18]. Son beş yıldır kanser hücrelerinin pek çok çeşidinde adrenomedullin'in proliferatif etkisi rapor edilmiştir [59].

Adrenomedullin kanser hücrelerinde apoptozisi önler ve immün sistemin dolaylı bir baskılayıcısı olarak rol oynar [60]. Adrenomedullin'in doğrudan bir apoptozis önleyici faktör olarak da işe karıştığına dair kanıtlar vardır. Kato ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada sıçan endotelial hücrelerinde adrenomedullin'in anti-apoptopik özelliği çalışılmış ve adrenomedullin'in hücre proliferasyonunu indüklemeksizin c-AMP bağımsız bir mekanizma yolu ile apoptozisi baskıladığı gösterilmiştir [61]. Sata ve arkadaşları da yaptıkları çalışmalarda adrenomedullin ve nitrik oksitin endotelial hücre apoptozisini bcl-2-c-GMP bağımsız mekanizma ile endotelial hücre apoptozisini azalttığını göstermişlerdir [62]. Yapılan başka bir çalışmada ise; adrenomedullin'i aşırı ifade eden kötü huylu hücrelerde bax, bid, kaspaz-8 gibi proapoptopik faktörlerin düşük seviyede oldukları gösterilmiştir [63].

Adrenomedullin'in kanser hücrelerinin immün sistem hareketinden kaçmalarına yardımcı olan immün baskılayıcı bir faktör olarak görev yaptığı önerilmektedir. Makrofajlar adrenomedullin üretirler ve lipopolisakkaritler, TNF- α , interlökin- γ , parbolester, retinoikasit ve taxol gibi belli maddelerin bu ifadeyi düzenleme kabiliyeti geniş bir şekilde araştırılmıştır [64].

Kamai ve arkadaşları adrenomedullin'in c-AMP bağımlı bir yol ile makrofaj fonksiyonunu azaltmada önemli bir rol oynadığını önermektedir [65]. Kubo ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada adrenomedullin'in TNF- α 'nın bazal sekresyonunun artırmasının yanı sıra lipopolisakkaritin indüklediği TNF- α ve interlökin -6 sekresyonunu dramatik olarak baskıladığını ifade etmişlerdir [66]. Adrenomedullin'in taşıyıcı protein komplemant faktör H'ye bağlandığı ve onu proteolizden koruyarak yarı ömrünü arttırdığı [58] ve tümör hücrelerinin hayatta kalmalarına yardımcı olduğu ifade edilmektedir [67]. Adrenomedullin'i tümör hücreleri aşırı ifade etmekte ve bu durum komplemant faktör H'in komplemant proteinlerin çalışmasını inhibe etme görevini etkilemektedir. Bundan dolayı adrenomedullin, komplemant faktör H'in fizyolojik fonksiyonlarını arttırarak komplemant proteinlerin çalışmasını inhibe ederek tümörler için bir yaşam faktörü olarak rol oynamaktadır [67].

Hem normal hem de malignant dokunun büyümesi ve yaşamda kalabilmesi, damarlarca sağlanan besin ve oksijene olan ihtiyacının karşılanmasıyla olmaktadır [68]. Tümörün indüklediği anjiyojeniz, dış kaynaklı yeni damar oluşumu ile sonuçlanan patolojik bir durumdur [69]. Hipoksik bir çevrede yaşamda kalabilmek için, tümör hücrelerinde yeni kan damarlarının çoğalması ve böylece oksijen ve besin sağlanması için çeşitli pro-anjiyojenik moleküller salgılanır [58]. Adrenomedullin, tümörlerin tipik özelliği olan düşük oksijen basıncının olduğu ortamlarda hipoksiya ile uyarılan faktör-1 (HIF-1) bağımlı yolca salgılanır ve etkin bir anjiyojenik faktör olarak rol oynar [18]. Kanser hücrelerinin değişik tiplerinde adrenomedullin ifadesinin yüksek seviyelerinin belirlenmesi tümör büyümesini göstermektedir. Adrenomedullin'i aşırı ifade eden tümörler artan damarlaşmanın bir göstergesidir [14]. İnsan tümör hücreleri için adrenomedullin'in otokrin bir büyüme faktörü olabileceği rapor edilmiştir. Adrenomedullin ifadesi için farklı doku orjinli tümör hücre soyları gözlenmiş ve adrenomedullin'in pek çok tümör hücresi tarafından üretildiği kanıtlanmıştır [57]. Bronşyoalveolar karsinoma, meme karsinomaları, kolon adenokarsinomaları, glioblastomalar, nöroblastomalar, ovaryum adenokarsinomaları, prostat karsinomaları, adrenokortikal karsinomalar, kondrosarkomalar, monositik leukemia, ve deri melanomalarında adrenomedullin ifadesi ve reseptörleri belirlenmiştir. [14]. Adrenomedullin klasik anjiyojenik faktörler kadar etkin bir anjiyojenik faktördür. Adrenomedullin'in anjiyojenik rolüne Akt'in endotelial hücrelerde aktivasyonu yolu ile ve mitojenin aktive ettiği protein kinaz ve focal adezyon kinazca aracılık edildiği görülmektedir [70].

Adrenomedullin, Akt, MAPK, CRLR/RAMP2-CRLR/RAMP3 reseptörleri ve merkezi adezyon kinaz aktivasyonu yolu ile endotelial hücreler üzerine anjiyogenik aktivite gösterir ve endotelial hücrelerde lökositlere doğru yapışkanlık ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'nin indüklediği adezyon molekülü gen ifadesinin kontrolünde anti-inflamatuar role sahip olabilmektedir [14]. Adrenomedullin'in anjiyogenik potansiyeli iki yolu kullanır, birincisi; adrenomedullin'in aracılık ettiği anjiyenezin inhibe edilerek tümör ilerlemesi durdurulabilir [71]. Diğer taraftan iskemik bölgelerde adrenomedullin ifadesinin artması hipoksik hareketle ilgili olan patolojiye etraftaki anjiyenezin arttırılması yolu ile yardım eder [72-73]. Adrenomedullin'in anjiyogenik aktivitesi ilk olarak 1998'de gösterilmiş daha sonra pek çok raporlar peptidin anjiyenezin ilerletmek için, *in vitro* durumda düz kas hücreleri ve izole edilmiş vasküler endotelial hücrelerin göçünü ve büyümeyi indüklediğini doğrulamıştır. Adrenomedullin, dişi üreme döngüsünde, embriyonik vasküler gelişim boyunca, iskemiye cevapta vasküler yapının yeniden şekillenmesi süresinde anjiyenezin düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada adrenomedullin'in endotelial bir hücre büyüme faktörü olduğu, *in vivo* olarak anjiyogenik aktiviteye sahip olduğu ve hayvan modellerinde tümör büyümesini ilerlettiği gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise, adrenomedullin'in aynı zamanda vasküler olgunlaşmada rolü olduğu önerilmiştir. Yine son zamanlarda yapılan çalışmalarda adrenomedullin'in sadece kemik iliğinden türetilen mononükleer hücrelerin endotelial hücrelere farklılaşmasını arttırmadığı aynı zamanda vasküler düz kas hücrelerini içeren olgun damarların şekillenmesini kolaylaştırdığı gösterilmiştir [19]. Adrenomedullin ile tedavi yapıldığı zaman yaraların daha hızlı iyileştiği, yoğun bir yeni damar oluşumu, daha iyi bir doku granülizasyonu ve yeni şekillenmiş epitelyumun oluştuğu gösterilmiştir [57]. 52 Leiyomaslı hastaları içeren bir çalışmada adrenomedullin seviyelerinin vasküler yoğunluk ve endotelial hücre çoğalması ilgili olduğu gösterilmiştir ve böylece adrenomedullin'in leiyomasta artan damarlaşmada rol oynadığını ve anti-anjiyogenik tedavi için yeni bir hedef olabileceği önerilmiştir [74]. Oehler ve arkadaşları ise; adrenomedullin'in güçlü bir anjiyogenik faktör olduğunu göstermişlerdir. Adrenomedullin'i aşırı ifade eden insan karsinoma hücre soylarının *in vivo* ve *in vitro* olarak değişen derecelerde artan büyümeyi gösterdiğini önermişlerdir [75].

Martinez ve arkadaşları da *in vitro* ve *in vivo* yöntemler kullanarak adrenomedullin'in anjiyogenik potansiyelini kanıtlamışlardır. Adrenomedullini aşırı ifade eden tavuk aortik halkasından vasküler yapının oluşmasının indüklendiği gösterilmiştir [63].

1.3 ANJİJENEZ

Anjiyenez, önceden var olan kan damarlarından yeni damarların gelişmesi işlemidir. Anjiyenez normal vasküler gelişimde ve önemli patolojilerde kritik rollere sahiptir [76]. Damarların gelişmesi pro ve anti-anjiyogenik faktörler tarafından düzenlenen kompleks bir dengedir. Denge hipoksia ve inflamasyon durumlarında anjiyenez lehine bozulur. Bu durum kronik enflamatuvar hastalıklarda, kanserde, yaraların iyileşmesi gibi durumlarda bir takım fizyolojik yararlar sağlamaktadır [8]. Yeni damar yapımı (anjiyenez, neovaskülarizasyon) vücutta fizyolojik olarak yara iyileşmesi; embriyogenez, menstrüel siklus vb. durumlarda söz konusudur. Patolojik anjiyenez ise başta tümörler olmak üzere kollejen doku hasarları (romatoid artrit), retinopatiler ve psöriasis gibi hastalıklarda, yaraların iyileşmesinde, kronik inflamasyonda, iskemik kardiyovasküler hastalıklarda vb. mevcuttur. Anjiyenezi vaskülogenez, arteriogenez, lenfanjiogenezi içeren pek çok ilgili işlemlerden ayırmak gerekir. Vaskülogenez; embriyonik gelişimin erken aşamasında meydana gelen, primitif hücrelerden yeni kan damarlarının şekillenmesidir. Arteriogenez; yeni arterlerin oluşması, lenfanjiogenez ise; yeni lenfatik damarların oluşmasıdır. [76].

Tümör anjiyenezi kanserlerin büyümesi ve metastaz için esastır [76]. Tümörler yeni damar yapımını gerçekleştiremedikleri takdirde etraf damarlardan difüzyonla beslenir ve en fazla 0,5-1 cm³'lük hacme kadar büyüeyebilirler. Bu hacimden sonra çoğalmaları ve metastaz yapabilmeleri için anjiyenez gereklidir [77].

Tümör dokusunda gerçekleşen patolojik anjiyenez 1970'lerden itibaren ilgi konusu olmuştur. Günümüz teknolojileri ile birlikte anjiyenez mekanizmaları anlaşılmaya çalışılmış ve anti-anjiyogenik tedavi yaklaşımları geliştirilmeye başlanmıştır [76].

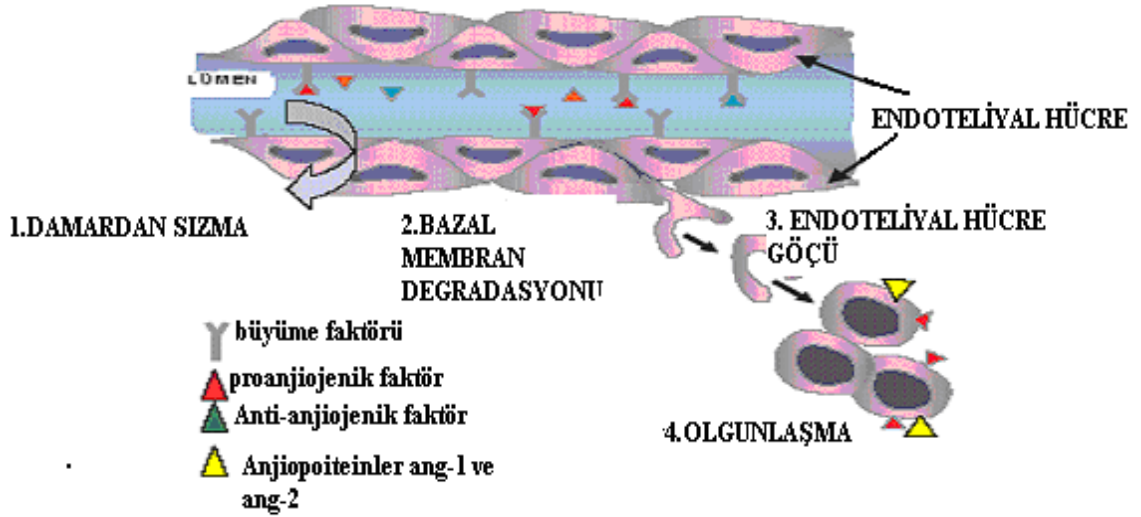
Böylelikle, kanserli bir hastaya anti-anjiyogenik tedavi uygulamak suretiyle; yara iyileşmesi, gebelik vb. durum olmadığı ortamda hastaya hiçbir yan etki olmadan, sadece tümörün etrafındaki damar yapımını bloke edilerek etkili ve spesifik tedavi yaklaşımı yapılmış olacaktır [77].

Bu alan VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) gibi anjiogenezin erken aşamasında permabilite artırıcı faktör olarak ve endotelial hücreye özgü bir mitojen olarak rol oynayan, ayrıca anti-apoptopik protein Bcl-2'in ifadesini indükleyerek endotelial hücrelerin yaşamda kalma kapasitelerini arttıran [78]. Anjiogenik faktörlerin keşfi ile hızlı bir şekilde gelişmiştir. Bu faktörlerin giderek daha çok anlaşılması anti-anjiogenik tedavi oranının gelişmesini muhtemel kılmıştır. Bunun yanı sıra pek çok anti-anjiogenik faktörlerin varlığı da saptanmıştır. Bu da bize anjiogenez mekanizmasının kompleksliğini göstermiştir [76].

Tümör ilişkili anjiogenez; spesifik büyüme faktörlerine, endotelial hücre reseptörlerinin aktivasyonuna ve endotelial hücrelerin çoğalma kapasiteleri ile ve buna hizmet eden hücre dışı matriks bileşenlerine bağlıdır [79]. Hipoksia ve anjiogenezin düzenlenmesi arasında yakın bir ilişki vardır.

Endotelial hücrelerde ve kanser hücrelerinde hipoksiada işe karışan pek çok anjiogenik faktör vardır. Örneğin; VEGF, TNF- α , endotelinler, PDGF, adrenomedullin bunlar arasında yer alır [76]. Bunlar hastanın kan damarlarından yeni bir vasküler yapının dallanması ile sonuçlanan endotelial hücre çoğalmasını, göçünü ve invazyonunu uyarırlar [8]. Aksine trombospondin gibi pek çok anti-anjiogenik faktörler de salınmaktadır. Bu cevapları düzenleyen temel yol hipoksia indüklenebilir faktör-1 ve onun pirolin hidroksilaz tarafından değiştirilmesi yolu ile olduğu bilinmektedir [76].

Anjiogenez, büyüyen dokuda çeşitli işlemler akışı ile karışık bir şekilde düzenlenmektedir. Büyüyen bir doku ister romaotoit pannus, ister arteriosklerotik plak veya bir tümör olsun hipoksia varlığında anjiogenik faktörler üretirler. Bu faktörler yanındaki önceden varolan kapillerin endotelial hücrelerini, ekstraselüler matriksi kırmak için matriks metaloproteinazları üretmek üzere aktive ederler. Önceden varolan bu kapiller ekstraselüler matriksi ve bazal membranı eritmek için matriks metalloproteinazları üretirler. Böylece endotelial hücreler uyarılara doğru hareket etmeye başlarlar. Endotelial hücreler daha sonra çoğalırlar ve ilk başta biraz sızıntılı olan kanı taşıyabilen tüpleri oluştururlar. Bazal membran ve perisitler gibi hücreleri içeren ekstraselüler matriksin sentezi ile yeni damar stabilize edilir. Perisitler gibi yardımcı hücrelerin yapışmasından ve yeni bazal membran oluşmasından sonra, yeni fonksiyonel bir kan damarı oluşur [80] (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Yeni kan damarlarının oluşumu damar geçirgenliğinde bir artışı, bazal membranın proteolitik olarak yıkılmasını ve endotelial hücre göçünü, MMPs, $\alpha_v\beta_3$ ve integrinlerin etkisi altında ekstraselüler matris boyunca dallanmayı gerektirir. Olgunlaşmamış vasküler yatak perisitler ve anjiopoitein/tie sisteminin stabilize edilmiş [78].

Perisitler, anjiogenezin son adımında işe karışan, mezanşimal kökenli pluripotent perivasküler hücrelerdir. Endotelial hücreleri tüplerde toplarlar ve olgun vasküler yatağı yeniden şekillendirirler. Endotelial hücrelerin anjiogenez sırasında hareketi integrinler yolu ile matris ile etkileşim kurularak olur. Bu integrinleri $\alpha_v\beta_3$ içerir ve normal olarak düşük konsantrasyonlarda konstitütif olarak hareketsiz kan damarları üzerinde bulunurlar ama VEGF gibi uyarılara maruz kalmayı takiben yeni oluşan damarların endotelial hücre yüzeylerinden salgılanmaya başlarlar.

VEGF ve $\alpha_v\beta_3$ etkileşimi endotelial hücre göçünü ilerleten Ca bağımlı sinyal yollarını aktive eder. $\alpha_v\beta_3$ aynı zamanda çoğalan ve saldıran endotelial hücrelerin yüzeylerindeki matris metaloproteinazlarda direk olarak bağlanır ve böylece enzimin hücre yüzeyi lokalizasyonunu kolaylaştırır ve onun ekstraselüler matris degradatif etkisine imkan verir [78].

Matris metaloproteinazlar (MMPs), çoğalan vasküler dalların etrafını çevreleyen, stroma hareketinin kolaylaştırılması ve uyarıcı anjiogjenik faktörlerin ekstraselüler matris içinde normal olarak inaktif formda korunmasını içeren pek çok yollarda yeni damar oluşumuna katkıda bulunmaktadır [78].

1.4 Anjiojenik Faktörler

Anjiojenik ajanlar tümör hücrelerinden, monosit, fibroblast gibi ortamdaki diğer hücrelerden, kolajen matriksin yıkımı sonrasında açığa çıkabilirler [79].

Çizelge 1.1 Önemli Anjiojenik Faktörler ve Etki Mekanizmaları

FAKTÖR	ETKİ MEKANİZMASI
Vasküler endotelial büyüme faktörü Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	Endotelial mitojen, Survival faktör, Permeabilite indükleyici
Temel fibroblast büyüme faktörü Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF / FGF-2)	Endotelial mitojen, Anjiojenez indükleyici Survival faktör Flk-1 Ekspresyon indükleyici
FGF-1, FGF-3, FGF-4	Endotelial mitojen Anjiojenez indükleyici
Dönüştürücü Büyüme Faktörü - α Transforming Growth Factor- α (TGF- α)	Endotelial mitojen Anjiojenez indükleyici VEGF ekspresyonu indükleyici
Epidermal Büyüme Faktörü Epidermal Growth Factor (EGF)	Zayıf endotelial mitojen VEGF ekspresyonu indükleyici
Hepatosit büyüme faktörü / Dağıtıcı faktör Hepatocyte Growth Factor/ Scatter Factor (HGF/SF)	Endotelial mitojen, mitojen Anjiojenez indükleyici
Dönüştürücü Büyüme Faktörü - β Transforming Growth Factor- β (TGF- β)	Endotelial büyüme inhibisyonu Anjiojenez indükleyici VEGF ekspresyonu indükleyici
Tümör nekrozis faktör - α Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)	Endotelial mitojen Anjiojenez indükleyici VEGF ekspresyonu indükleyici

Trambosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
Platelet Derived Growth Factor (PDGF)

Endotelyal mitojen
Endotelyal motilite faktörü
Anjiyenez indükleyici

1.4.1 Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)

Anjiyolitik faktörlerin en önemlisi ve üzerinde en çok durulanı Vasküler Endotelyal Growth Factor (VEGF)'dir. Vasküler permability factor olarak ta bilinir.

a-) VEGF yapısı

VEGF homodimerik, heparin bağlayıcı, glikoprotein yapıda bir molekül olup çeşitli alt grupları tanımlanmıştır. VEGF A, B, C, D, E, ya da aminoasit sayısına göre VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, VEGF₁₄₅ gibi izoformları bulunmaktadır [81,84].

VEGF biyolojik aktivitesini temel olarak üç reseptörü ile gerçekleştirir. Tirozin kinaz yapısında olan bu reseptörleri VEGF-R1(flt-1), VEGF-R2(FLK-1/KDR) ve VEGF-R3(Flt-4) olarak sıralanabilir [84]. Bunlardan VEGF-R1 ve VEGF-R2 endotel hücreleri üzerinde iken, VEGF-R3 lenf damarları üzerindedir [82]. VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; fosfolipaz-C, fosfoinozitol-3 kinaz ve ras-GTPaz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerin çoğalmasını, göçünü ve farklılaşmasını sağlar [83]. VEGF'nin pro-anjiyolitik hareketinin VEGF-R2'nin aktivasyonu yolu ile olduğu düşünülmektedir. VEGF, VEGF-R1'e VEGF-R2'den daha büyük bir affinite ile bağlanmasına rağmen, VEGF-R2 vasküler endotelyal hücre permabilitesi, çoğalması, göçü, hayatta kalmasını içeren VEGF'nin anjiyolitik aktivitesinden en çok VEGF-R2 sorumludur. VEGF-R1'in ise; monosit ve makrofaj göçüne, kemotoksisiteye, MMP-9 ifadesine, ve homopoitezis katıldığı önerilmektedir [86].

b-) VEGF ifadesi ve düzenlenmesi

VEGF, hipoksiayı, insülin-benzeri büyüme faktörü-1, transforme edici büyüme faktörü- β , epidermal büyüme faktörüne maruz kalmayı içeren çeşitli uyaranlar altında çeşitli hücre tipleri tarafından salgılanmaktadır [84]. Başta RAS, SRC ve HER-2 onkogenleri olmak üzere VEGF düzeyi, P53 gen mutasyonu, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-13, FGF-4, PDGF, TGF- β , IGF-1, TNF- α ve NO gibi birçok endojen ajan ile düzenlenmekte ve tümör hücrelerinde VEGF ifadesi artmaktadır [86].

VEGF, VEGF-R2 'ye bağlandığı zaman eNOS ifadesini uyaran tirozin kinaz sinyal akışı başlar. NO üretilmeye başlanır. Anjiojenik sinyal akışının bir parçası olarak NO'nun anjiojenik cevaba katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Çünkü NO'nun inhibisyonu anjiojenik büyüme faktörünün etkisini önemli derecede azaltmaktadır [93]. Düşük glikoz seviyesi, oksidatif stres ve özellikle hipoksik ortamda düzeyi hızla artan hipoksia-indüklenebilir transkripsiyon faktörü-1 (HIF-1) de VEGF salınımının da önemli rol oynamaktadır [7].

c-) Biyolojik fonksiyonları

VEGF, embriyonik ve post-natal gelişim sürecinde, vaskülojenez, anjiojenez, lenfojenez'e karışmaktadır. VEGF yetişkinlik sürecinde kemik şekillenmesi, doku rejenarasyonu, hemopoietik kök hücrelerinin yaşamda kalması, eritropoietinin düzenlenmesi ve neoplastik, hematolojik, oküler, enflamatuar ve iskemik hastalıklar gibi patolojik işlemleri içeren, çeşitli görevlere karışmaktadır [87]. Son zamanlardaki bilgiler yetişkin barsak, endokrin pankreas, tiroid ve karaciğerde vasküler yataklarının işlevsel olması için VEGF'ye ihtiyaç gösterdiği önerilmektedir [88].

VEGF; hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteazlar ile ürokinaz ve doku tipi plazminojen aktivatörlerinin salınımını da uyarmakta, böylelikle invazyon ve metastazı da kolaylaştırmaktadır [89]. Ayrıca, muhtemel temel anjiojenik özelliğinin yanı sıra; VEGF'ye maruz kalan damarlarda, endotel hücreleri arasında penetrasyon, vesiküler organeller ve transselüler boşluk oluşumuna olanak sağlayarak vasküler geçirgenliği arttırmaktadır [90].

d-) VEGF ve hastalıklar

VEGF yetişkinlerde pek çok postnatal patolojik işlemler ve hastalıklar için anahtar bir efektördür ve bundan dolayı günümüzde elde edilebilir ve gelişen farmakolojik tedaviler için önemli bir hedef sunmaktadır. Bu koşullar; tümörleri, hematolojik malignansileri, okuler, enflamatuvar, vasküler ve iskemik hastalıkları içermektedir [87]. Melenoma, kolarektal, gastrik, meme, akciğer ve böbrek hücre karsinomalarını içeren pek çok kanserler üzerindeki gözlemler bu kanserlerin VEGF mRNA ifadesi ile ilişkili olduğunu göstermektedir [91].

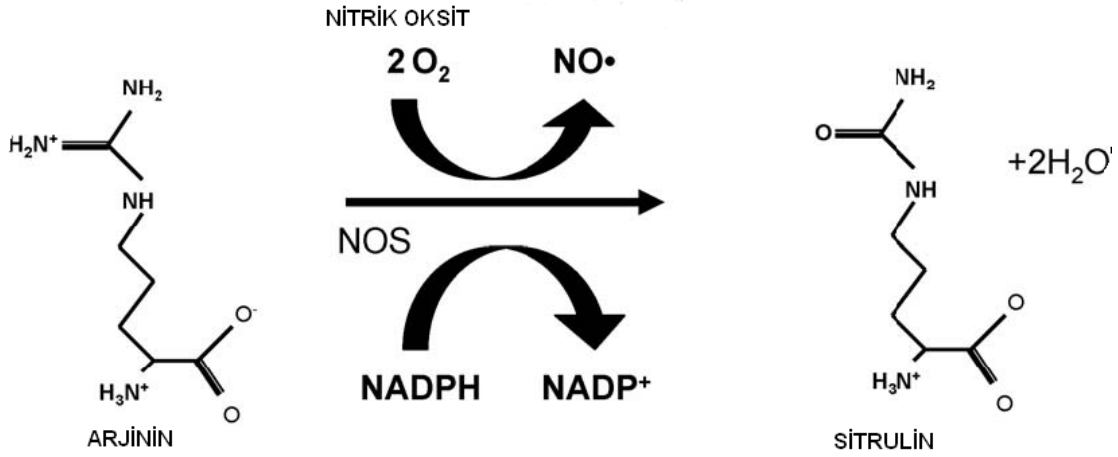
T hücre lenfoması, akut lenfoblastik leukemia, akut lenfositik leukemia ve kronik miyelositik leukemia'yı içeren pek çok hematolojik malignansiler artan VEGF ifadesine işaret etmektedir. Bunun yanı sıra VEGF, noktasal dejenerasyon, diyabetik retinopati, retinal damar tıkanması, iris ve korneal yeni damar oluşumunu içeren pek çok insan okuler hastalıkların patojenik yeni damar oluşumunda işe karışmaktadır [92]. VEGF'nin işe karıştığı diğer durumlar ise; romotoid arterit, psöralis, arteriosklerozis gibi enflamatuvar hastalıkları ve çocuk hemanjioması gibi vasküler hastalıkları ve iskemik durumları içermektedir [86].

1.4.2 Nitrik Oksit (NO)

a-) NO'in kimyası

Nitrik oksit, pek çok reaksiyona aracılık edebilen, yüksek seviyede reaktif bir serbest radikaldir. En dıştaki orbitalinde çiftleşmemiş bir elektron içeren yüksüz bir moleküldür. Çiftleşmemiş elektron NO'in zayıf bir oksidan ya da bir anti-oksidan olarak görev yapmasını sağlayan pek çok reaksiyona girmesine izin vermektedir [12].

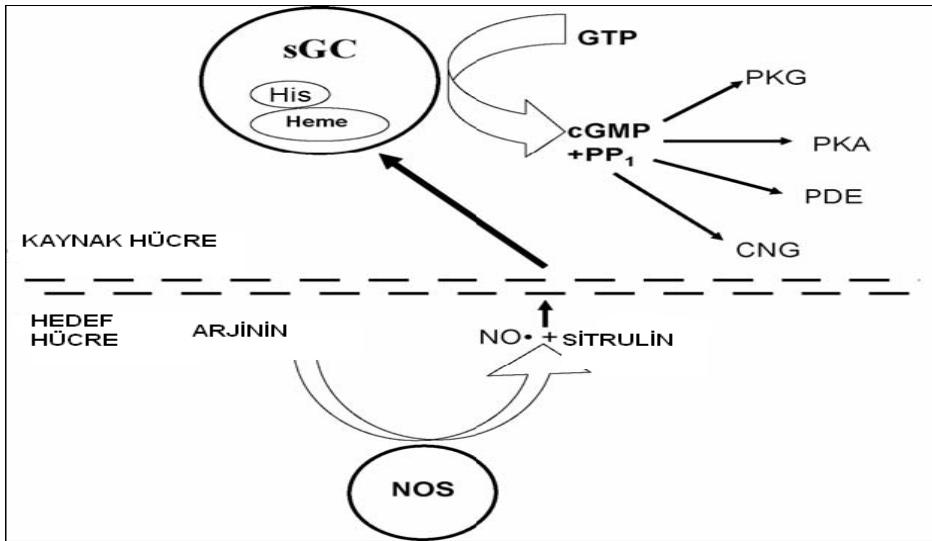
L-arjinin NO'in sentezlenmesi için esansiyel bir aminoasittir. L-arjininin oksidasyonu, nitrik oksit sentaz (NOS) olarak adlandırılan bir enzim ailesi yolu ile katalizlenmektedir. NOS, NADPH ve O₂'yi substrat olarak kullanarak hem L-sitrulini hem de NO'ı ortaya çıkarır [93], (Şekil 1.3).



Şekil 1.3 L-arjininden nitrik oksit sentezi [12].

NO'nun aracılık ettiği fizyolojik etkiler genelde c-GMP tarafından yürütülür. c-GMP düz kasların gevşemesinde, trombosit agresyonundan ve nörotansmisyonundan sorumlu olan moleküler bir mesajcıdır. Onun c-GMP bağımlı mekanizması içinde NO, bağlanır ve guanilat siklazı aktive eder. Böylece guanizin trifosfattan c-GMP sentezi katalizlenir. c-GMP daha sonra, c-GMP fosfodiesterazı kullanan guanilik asite dönüştürülür.

Bu dönüşüm hücre fonksiyonlarını modifiye eden, iyon kanalları, fosfodiesterazlar, protein-kinazları içeren çeşitli hedeflerin tayinine izin vermektedir [94].



Şekil 1.4 c-GMP bağımlı hücre sinyali [12].

b-) NO'in hücresel kaynağı

L-arjininin NO'e katalitik dönüşümünden sorumlu olan enzim nitrik oksit sentaz (NOS) üç izoformda bulunmaktadır. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (NOS II/iNOS), Endotelial nitrik oksit sentaz (NOS III/eNOS) ve nöronal nitrik oksit sentaz (NOS I/nNOS). Hem NOS I hem de NOS II nöral ve endotelial hücrelerde NO seviyesinin düşük bazal seviyesinin sürdürülmesi ve üretilmesi için önemlidir [94].

NOS III membranla ilgili tek izoformdur. Endotelial hücreler, kardiyak miyositler ve hipokampal promidial hücrelerce ifade edilir.

NOS III trombosit agresyonunu baskılar, vasküler tonu sürdürür, düz kas hücre çoğalmasını inhibe eder ve anjiyonezi artırır [95]. NOS I nöronlarda iskelete ait kaslar ve akciğer epitelinde ifade edilir ve nörotansmitter olarak vasküler ve vasküler olmayan düz kasların gevşemesinden sorumludur. NOS I iskelet kaslarının kasılmasında ise karışır ve kontraktıl aktivite süresince NO'in büyük miktarında üretilmesinden sorumludur [95].

NOS II makrofajlar, dentritik hücreler, fibroblastlar, kontrositler, osteoklastlar, astrositler epitelial hücreler ve çeşitli kanser hücrelerini içeren pek çok hücrelerde bulunmuştur [96].

c-) NO'in biyolojik fonksiyonları

NO, vazodilasyon, nörotransmisyon, inflamasyon ve hücre ölümü gibi temel fizyolojik olayların düzenlenmesine proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonu yolu ile karışmaktadır [97].

NO'in mitokondriyal elektron transport zincirinde terminal enzim olan sitokrom c-oksidadza bağlanarak mitokondriyal solunumu düzenlediği bilinmektedir [98]. NO, sitokrom c-oksidadzin hem a₃'ün ferros demirine bağlanarak moleküler oksijenin bağlanmasını inhibe etmektedir [99].

NO programlanmış hücre ölümüne de karışır. NO'in düşük fizyolojik konsantrasyonları apoptozisi önlerken yüksek konsantrasyonlarda ise apoptozisi iletir. NO'in aynı zamanda p53 tümör supresör genini arttırdığı ve bunun da Bax, Bcl-XL oranının artmasıyla sonuçlandığı bulunmuştur [100].

NO, bağıışıklığın düzenlenmesini ve inflamasyonun pek çok yüzünü etkilemektedir. Fibroblastlar, endotelial ve epitelial hücreler, kondrositler, monositler, makrofajlar, antijen sunucu hücreler (APC) ve doğal öldürücü hücreler (NK), NO'ı ifade etmektedir [101]. NO bulaşıcı organizmalara karşı toksik bir ajan olarak rol oynayabilmektedir. Düşük konsantrasyonlarda NO nötrofillerin iyileştirilmesi ve vazodilasyonun indüklenmesi yolu ile pro-enflamuar etki gösterir [102]. Düşük konsantrasyonda NO aynı zamanda T hücre proliferasyonunu inhibe eder ve T hücre büyümesi için düzenleyici bir rol oynamaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda NO, adezyon moleküllerini azaltır, aktivasyonu baskılar ve enflamuar hücrelerin apoptozisini uyarır. NO enflamuar hücreler üzerinde apoptopik etkisi ile anti-supresif ajan olarak rol oynayabilmektedir [101].

NO, vasküler ton, vasküler yapı (düz kas hücre çoğalmasının inhibisyonu), ve kan damarlarındaki hücre-hücre etkileşimi (trombosit agresyonu ve adezyon inhibisyonu, monosit adezyonunun inhibisyonu) gibi çeşitli kardiyovasküler düzenleme mekanizmalarına karışmaktadır.

NO, düz kasta yüksek c-GMP düzeylerince bazal sistemik, koroner ve akciğer vasküler tonunun düzenlenmesi ve sempatik sinir uçlarından norepinefrin salınımının inhibisyonu, damar daraltıcı peptit olan endotelin-1'in inhibisyonunun düzenlenmesine karışmaktadır [102].

Çözülebilir guanilil siklaz aktivitesi bunu takiben c-GMP üretimi yolu ile NO, büyüme faktörlerinin aktivitesini inhibe ederek kardiyovasküler sistemi düzenler ve hücrelerden, endotelial yüzey üzerindeki trombositlerden damar duvarı içerisine salınır [103]. NO üretimi'in aynı zamanda damar genişletici peptitler ve VEGF'in büyümeyi ilerletici etkisine katkıda bulunarak anjiogenezde de rol oynadığı gösterilmiştir [104].

NO, merkezi sinir sisteminde aynı anda her yerde bulunmakta ve merkezi sinir sisteminin düzenlenmesinde pek çok rolleri üstlenmektedir. NO'in periferde norotransmitter olarak rol oynadığı iyi bilinmektedir. O aynı zamanda, snaptik transmisyon ve plastisitenin kompleks bir makinesine aracılık eden sinir sisteminde kimyasal bir mesajcı olarak hizmet etmektedir [105].

NO'in kronik astım, romatoid arterit ve otoimmüniteyi içeren çeşitli immün sistem hastalıklarında önemli rol oynadığı bulunmuştur [106].

NO ve onun türevleri, serbest radikallerin salınımını takiben artan oksijen yükselişine cevapta üretilir ve tipik sağlıklı komşu epiteliyal ve stromal hücrelerdeki hasarı indükler ve böylece karsinogeneze katkıda bulunur. NO tek başına ya da oksijen veya süperoksit ile etkileşerek DNA hasarını ve ardından karsinogenezi indükler [107].

NO aynı zamanda dolaylı olarak hücrel membranlara radikallerin aracılık ettiği hasar yolu ile lipid peroksidlerine neden olmaktadır [108].

Tümörler, büyüme, invazyon, metastaz, anjiojenezi indüklemeye yeteneğiyle sonuçlanan ve NO sinyallerince etkilenebilen pek çok genetik değişimleri içermektedirler. Çeşitli deneysel tümör modelleri NO'nun tümör büyümesi ve metastazın uyarılması üzerindeki doğrudan rolü için önemli kanıtları önermektedirler. Yapılan araştırmalarda NOS aktivitesinin iyi huylu dokular ile karşılaştırıldığında kötü huylularda daha yüksek olduğunu ve tümör ilerlemesi ile NOS aktivitesi arasındaki paralellığı ifade etmişlerdir [12].

NO'nun endoteliyal hücrelerin çoğalma ve göç yeteneğini uyarılması yolu ile tümör büyümesi boyunca anjiojenezi uyardığı gösterilmektedir [109].

Aktif NOS III, VEGF tarafından onun uyarılması yolu ile endoteliyal hücrelerin göçü için gerekli bir faktördür. NOS III, ya NOS III mRNA proteinin artışı yolu ile ya da artan HSP90 ile ilişkili PI₃ kinaz aktivasyonu veya MAPK/PLC γ 'ın aktivasyonu yolu ile VEGF tarafından indüklenebilmektedir. Özetle, NOS tarafından NO'nun üretilmesi anjiojeneze yol açmaktadır [110].

Son zamanlardaki buluşlar NO'nun kanser tedavisinde ve kanser gelişiminde kemo-pretentive bir ajan olarak önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. NO'nun kemoduyarlılık ve immün duyarlılık ajanı olarak kullanıldığı ve bundan dolayı kanser tedavisinde sinerjistik aktivite ile sonuçlanan NO donörlerinin, immün terapi ve kemoterapinin kombinasyonunun uygulanmasının klinik bir uygulama olduğu düşünülebilir. NO donörleri, kemoterapik veya diğer sitotoksik ajanlarca kompleks oluşturularak ta kullanılabilir. Ayrıca NOS II yolu ile içsel NO üretimini aktive edebilen ajanlar kullanılabilir. Tümör hücreleri üzerine NO'nun diğer etkilerinden ayrı olarak NO vericileri vazodilatör etki yaparak tōrepatik potensiyeli artırmaktadır. Böylelikle NO vericilerinin kanser tedavisi uygulaması için kullanılan araçlara eklenmesi beklenmektedir [12].

1.4.3 Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α)

TNF- α inflamasyona, bağışıklığa ve hücrel organizasyona katılan anahtar bir sitokindir. Bu çözülebilir faktör Bacillus-Galmette-Guerin ile enfekte olan, endotoksin uygulanmış farelerin serumundan izole edilmiştir ve hemorajik tümör nekrozisini indüklemek için endotoksin kabiliyetini replike ettiği gösterilmiştir [111]. TNF- α Tip II transmembran proteinleri olan ligandların büyük süper familyasına aittir. 17 kDa'luk bir molekül olup, hücre yüzeyinde TNFRI (p55 reseptörü) ve TNFR2 (p75 reseptörü) olarak bilinen iki farklı homotrimerik reseptöre homotrimer olarak bağlanmaktadır [112]. TNF- α 26 kDa (233 aminoasit)'lık membrana bağlı bir pro-peptit (pro- TNF- α) olarak sentezlenir. 26 kDa'luk formu da fonksiyoneldir ve direk hücre-hücre ilişkisi yolu ile TNFRII'ye bağlanır. Aktive edilmiş makrofajlar TNF- α 'ın temel kaynağı olmasına rağmen, fibroblastlar, astrositler, kupfer hücreleri, düz kas hücreleri, keranositler ve tümör hücrelerini içeren pek çok çeşitli hücrelerce üretilirler [113].

TNFRI ve TNFRII'in sinyal akış kaskadı oldukça kompleks olup, TNF- α ligandının reseptörüne bağlanması ile iyileştirilen pek çok adaptör proteini içermektedir ve en az dört ayrı yolda regule edilir.

1-) kaspaz 8'in FADD'a bağlanarak indüklediği pro-apoptopik yol, 2-) Apoptozis protein-1'in hücrel inhibitörünün TRAFK2'ye bağlanması yolu ile aktive edilen anti-apoptopik program, 3-)JNK bağımlı kinaz kaskadı yolu ile TRAFK2 yolu ile aracılık edilen AP-1 aktivasyonu ve RIP yolu ile NF- κ B aktivasyonu [113].

Tümör gelişiminin inatçı ve çözümlenmemiş inflamasyonla arttığı görüşüne dair kanıtlar her geçen gün artmaktadır. Tümör ilerlemesine aracılık eden anahtar moleküllerden biri tümör nekrozis faktör α sitokinidir. Klinik olarak çeşitli pre-neoplastik ve malignant hastalıklar ile sağlıklı bireylerden alınan serum ve dokular karşılaştırıldığında, sözü edilen hastalıklarda serum konsantrasyonunda bir artış ile TNF- α 'ın ifadesinin arttığı gözlenmiştir. Son yıllarda yüksek dozda TNF- α verilmesinin sitotoksik bir ajan olarak kullanılmasına rağmen, kronik olarak düşük seviyede TNF- α 'ya maruz kalma ve pro-malignant fenotipin elde edilmesi arasındaki ilişkiyi desteleyen önemli kanıtlar sağlanmıştır [114].

TNF- α 'ın tümör ilerlemesinin önemli işlemlerini düzenlediğine dair artan kanıtlar ileri sürülmektedir.

TNF- α kanser hücreleri ve stromal hücrelerden salınarak, reaktif oksijen araçlarını (ROIs), enflamatuar enzimleri (örneğin; nitrik oksit sentaz (NOS), siklo-oksijenaz (COX), matriks metaloproteaz (MMP), hücre adezyon molekülleri ve sitokinler) içeren birçok aracılığı tetikler [114].

Kanser hücrelerinin başarı sağlayabilmesi için, otokrin büyüme sinyalleri, anti-büyüme sinyallerinde duyarsızlık, anjiyogenez, apoptozisten kaçma, invazyon, metastaz ve sınırlandırılmayan çoğalma potansiyeli gibi altı önemli özelliği kazanması gereklidir. Kronik inflamasyon ve regüle edilemeyen TNF- α üretimi bu altı önemli özelliği etkileyerek tümörözenezi ilerletmektedir [115]. Son zamanlardaki çalışmalar, bu anahtar pro-enflamatuar molekülün inhibisyonunun yeni kanser tedavilerini sağlayabileceğini göstermektedir [114].

TNF- α 'ın anjiyogenezini ilerletme kabiliyeti de vardır. VEGF ve onun reseptörü VEGFR2, temel fibroblast büyüme faktörü, IL-8, trombosit aktive edici faktör, epirin A, NO, E-selektin, interselüler adezyon molekülü-1 ve timidin fosforilazı içeren pek çok faktörler TNF- α 'ın pro-anjiyogenezik etkisine aracılık etmektedir [116].

Çizelge 1. 2 TNF- α 'ın Tümör İlerlemesindeki Etkileri

- Nitrik oksit üretimi (DNA/enzim hasarı, cGMP'in aracılık ettiği tümör ilerlemesi)
- Malignant hücreler için otokrin büyüme ve yaşam faktörü
- İnsan papiloma virüsü (HPV) ile enfekte olan hücrelerde E6/E7 mRNA aktivasyonu
- Src kinaz aktivitesi aktivasyonu
- Matriks metaloproteinaz (MMPs) indüklenmesi yolu ile dokuların yeniden şekillenmesi
- Kemokin ve diğer reseptörlerin düzenlenmesi yolu ile tümörlerde lökosit infiltrasyonunun kontrolü
- B-catenin nükleer havuzunun artışı, E-kaderinin azalması
- Tümör hareketliliğinde ve invazyonunda genişleme
- Epitiyalden mezansimale geçiş
- **Anjiyogenez faktörlerinin indüklenmesi**
- Androjen cevabının kaybı

Sonuç olarak, TNF- α 'ın inflamasyon ile tümörojenez arasında önemli bir aracı olduğuna işaret eden kanıtlar bulunmaktadır. Bundan dolayı tümör ve stromal TNF- α 'ın inhibisyonu kanser tedavisi için yeni bir tedavi edici strateji sağlayabilir [114].

1.4.4 İnterlökin-6 (IL-6)

İnterlökin-6 travma, özellikle de yanıklar ve diğer inflamasyona yol açan doku hasarlarına karşı immün cevabı uyarmak için T hücreleri ve makrofajlarca salgılanan pro-enflamatuar bir sitokindir. IL-6 aynı zamanda bir miyokin olup kas tarafından üretilir ve kas kontraksiyonuna cevapta artırılır. Bunun yanı sıra osteoklast oluşumunu uyarmak için osteoblastlar IL-6 salgırlar, pek çok kan damarlarının tunica mediasında düz kas hücreleri pro-enflamatuar sitokin olarak ta IL-6 üretmektedirler [116].

IL-6 daha önce 26-kDa protein, BCDF, BSF, sitotoksik T-hüce farklılaştırıcı faktör, HSF, hibridoma/plasmositom büyüme faktörü, IFN β 2, monosit granülosit indükleyen tip 2 ve trombopoitein olarak adlandırılmış olan bir sitokindir [117].

İnsan interlökin-6'sı ilk kez fitohemaglutinin veya antijen ile uyarılmış periferik mononükleer hücrelerin kültür süpernatantlarında B hücre farklılaştırma faktörü olarak bulunmuştur. 1986 yılında insan IL-6 sı saflaştırılmış ve 1986'da IL-6 dizisinin aminoasit dizisi orataya konmuştur [118].

Dört α -helikal uzun zincir içermektedir. Lenfoid ve non-lenfoid bir çok hücre tipi tarafından üretilen pleitropik bir sitokindir. Ig salınması, akut faz inflamasyon reaksiyonları ve hematopoez gibi birçok biyolojik etkileri vardır. IL-1 ve TNF- α gibi IL- 6 da vücut savunmasında çok önemli rolü olan immünoinflamatuvar yanıtı düzenleyen sitokin kaskadının bir molekülüdür [119]. IL-6 reseptörü kromozomal yerleşimi 7p21-14 (IL-6), 1(IL-6r α), 5 ve 17 (GP130) olan genlerde kodlanmaktadır. IL-6 TVE B lenfositleri, monositler, makrofajlar, fibroblastlar, endotelial hücreler, mast hücreleri, nöronal hücreler, astrositler, mikroglia, mezenşimal hücreler, osteoblastlar, epidermal langerhans hücreleri, keratonositler gibi çok geniş bir hücre grubu tarafından üretilmektedir [117, 119].

a-) İnterlökin-6'nın sinyal yolu

IL-6 Sinyalleri hücre yüzeyi boyunca ligand bağlayıcı IL-6R α (CD126) zincirinden oluşan tip-1 sitokin reseptör kompleksinden ve sinyal iletici bileşen gp130 (CD130)'dan oluşmaktadır. CD130, Leukemia inhibitör faktör (LIF), ciliary nörotrofik faktör, onkostatın M, interlökin-11 ve kardiyotropin-1'i içeren pek çok sitokinler için ortak sinyal dönüştürücüsüdür. Pek çok dokuda hemen hemen her yerde ifade edilir. Aksine CD126 bazı dokular ile sınırlıdır. IL-6 reseptörü ile etkileşim kurduğu için gp130'u ve IL-6R'i bir kompleks oluşturması için tetikler böylece reseptörü aktive eder. Bu kompleksler gp130'un intraselüler bölgelerini bir araya getirerek belli transkripsiyon faktörleri, janus kinazlar (JAKs), sinyal dönüştürücüler, transkripsiyon aktivatörleri (STATs) boyunca bir sinyal iletim kaskadını başlatırlar.

IL-6 sinyal komplekslerinde gp130'u kullanan belkide en iyi çalışılan sitokinlerdir. Membrana bağlı reseptöre ek olarak IL-6R'in çözülebilir formu insan serum ve idrarından saflaştırılmıştır.

Pek çok nöronal hücreler yalnızca IL-6 tarafından uyarılmaya tepkisizdirler ama nöronal hücrelerin farklılaşması ve hayatta kalması sIL-6R'in hareketine bağlıdır [116].

b-) IL-6'nın biyolojik fonksiyonları

IL-6 enfeksiyon, yanıklar, travma ve neoplazya (yeni doku oluşumuna)'ya yanıtta salınmaktadır. IL-6'nın doğrudan hücreler üzerine de etkili olabilmekte, diğer sitokinlerin etkilerine de koagonistik ve ya antogonistik olarak aracılık edebilmekte ve glukokortikoidler ile etkileşebilmektedir [120]. IL-6 ateş ve akut faz cevabının en önemli araçlarından biridir. C-reaktif proteini, kompleman bileşenleri, orosomukois, haptoglobin, fibronojen, proteaz inhibitörleri gibi akut faz proteinlerini sentezlemek için hepatositleri aktive ederek sağlamaktadır. Akut faz cevabı sırasındaki etkilerine IL-1 ve TNF gibi diğer sitokinler de aracılık etmektedir [121].

IL-6, B ve T hücre büyümesi ve farklılaşmasında anahtar rolleri üstlenmektedir. IL-6 B hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması için önemlidir. En önemli etkisi B hücrelerinin plazma hücrelerine daimi farklılaşmasını indüklemesi olduğu bulunmuştur. IL-6 farklılaşmış plazma hücreler için büyüme faktörü olarak görev yapar

antikorlarının salınımını arttırmaktadır. B hücrelerinden Ig G ve Ig A antikorlarının salınımını uyarmaktadır [120].

IL-6 T hücrelerinin ve timositlerin kostimulatörüdür. Erken kemik iliği hematopoetik kök hücrelerinin gelişimi için bir kofaktördür. IL-6 NK hücre aktivitesini de arttırmaktadır [121].

Kas ve yağ dokusunda interlökin-6 artan vücut sıcaklığına yol açan enerji mobilizasyonunu uyarmaktadır. IL-6, patojenle ilgili moleküler örneklerle işaret eden spesifik mikrobiyal moleküllere (PAMPs) cevapta makrofajlarca salgılanmaktadır. Bu PAMP'lar toll-like reseptörler olarak adlandırılan immün sistemi başlatıcı yüksek düzeyde önemli belirleyici moleküllere bağlanırlar. Bu reseptörler hücre yüzeyinde bulunup, inflamatuvar sitokin üretiminde artışa neden olan intraselüler sinyal kaskadını indüklemektedir. IL-6 hibridoma büyümesi için esastır [116]. IL-6 aynı zamanda trombopoiez ve hematopoiez de önemli etkilere sahiptir. Malignant hücreler için bir büyüme faktörü olduğu bilinmektedir [120].

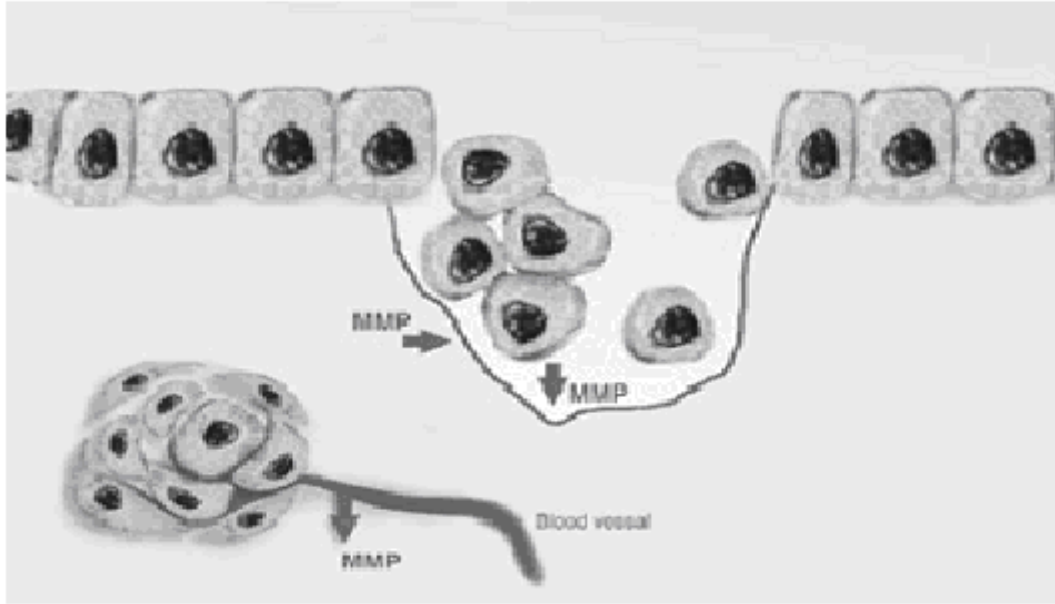
c-) İnterlökin-6 ve hastalıklar

IL-6 bir çok hücre tipi için otokrin büyüme faktörü olmasından dolayı yüksek düzeyde üretimi için plazmositom, multiple myeloma, uterus serviks karsinomu ve kaposis sarkoma gibi bazı malignansiler ile ilişkilendirilmiştir [117]. IL-6 genindeki bir mutasyonun malignant hücrelerin büyümesinde özellikle de multiple myelomada temel rol oynadığı gösterilmiştir. IL-6 romatoid arterit gibi hastalarda sinoviyal dokularda büyük oranlarda bulunur ve B hücrelerinde antikor arttırılmalarını indükler. Otoimmün karaciğer hastalığı olanlarda IL-6 ifadesinin azaldığı gösterilmiştir. Bu bilgi bize IL-6 'ın bu hastalıkların patogenezinde rol oynadığını göstermektedir [120]. IL-6 inhibitörleri menopoz sonrası osteoporoz'un tedavisinde kullanılmaktadır [116]. Romotoid arteritte anti IL-6 reseptör antikorunun kullanılması da yeni bir tedavi edici yaklaşım oluşturmaktadır [120].

1.5 Matriks Metaloproteinazlar

Matriksinler olarak da bilinen matriks metaloproteinazlar (MMPs) asıl görevi ekstraselüler matriksin yıkımı olan çinko bağımlı doğal bir nötral endopeptitler familyasındandır (Şekil 1.5). Bu enzimler normal sağlıklı bireylerde bulunduğu ve

yaraların iyileşmesi, hamilelik, doğum, kemik rezorpsiyonu gibi çeşitli fizyolojik proseslerde önemli roller oynadığı gösterilmiştir. Ekstraselüler matriksin yıkılmasını içeren belli hastalıklardan dolayı MMP'lere olan ilgi artmıştır. Bu hastalıkları romatoid arterit, periodontal hastalıklar ve kanseri içermektedir. Matriks metaloproteinazların doğal inhibitörleri vardır ve bu hastalıkların tedavi edilmesi amaçlanarak sentetik inhibitörleri de geliştirilmektedir [121].



Şekil 1.5 Matriks metaloproteinazın şematik olarak etki şekli

Matriks metaloproteinazlar aşağıdaki karakteristik özellikleri taşımalarına göre fonksiyonel olarak tanımlanmaktadır. MMP'ler ekstraselüler matriksin en az bir bileşenini indirgerler, bir çinko iyonu içerirler, şelatlayıcı ajanlarca inhibe edilirler, latent formda salınırlar ve proteolitik aktivite için aktivasyona ihtiyaç duyarlar, matriks metaloproteinazların doku inhibitörlerince (TIMPs) inhibe edilirler, ortak aminoasit dizilerini paylaşırlar [121]. MMP aktivitesinin düzenlenmesi sentez, sekresyon, aktivasyon ve inhibisyonu içeren çeşitli seviyelerde meydana gelmektedir [122].

a-) Matriks metaloproteinazların sınıflandırılması

Günümüzde insan MMP familyasının 20 üyesi tanımlanmıştır. Dizi homolojisine, domain yapısına ve substrat özgüllüğüne göre MMP'ler dört kategoriye

ayrılmaktadır. Kolejenazlar 1-3(MMP-1,8 ve 13), Jelatinazlar Ave B (MMP-2 VE 9), Stromelisinler 1-3 (MMP-3, 10 ve 11) ve MT-MPs 1-4 (MMPs-14, 15, 16, 17) [121]. Anjiyogeneze katılan matriks metaloproteinazlar MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-19, MMP-26 ve membran tip matriks metaloproteinazları içermektedir [122].

Membran tip-1 (MT-1) MMPler, MMP aktivasyonun yanı sıra tip-1 kolojen ve fibrini içeren çeşitli matriks bileşenlerini yıkar ve anjiyenez sırasında anahtar bir rol oynar. Muhtemelen bunu ekstraselüler sinyalin regüle ettiği protein kinaz kaskadını aktive ederek yapmaktadır [123]. MMP aktivitesinin inhibitörleri kontrol edilemeyen matriks yıkımını önleyerek hücre invazyonunu ilerletebilirler.

Matriks yıkımının yanı sıra matriks metaloproteinazlar anjiyjenik hareketlerini engellemek için protein fragmentleri de üretirler. Bu yeni düzenleyici yollar anjiyenez sırasında aşırı hücre invazyonunun kontrol edilmesine izin vermektedir. Matriks metaloproteinazların kontrolü yolu ile anormal anjiyenezi hedeflemek için yeni ve kesin stratejiler sağlamaktadır [122].

MMP-26 veya matrilisin-2 epiteliyal orjinli kanser hücrelerinde ifade edilir ve fibrinolizis sırasında aktive edildiği görünür. MT-1 MMP'ye benzer şekilde bu enzim de anjiyogeneze katılmaktadır [124]. MMP-19 düz kas hücrelerinde ve kan damarlarında güçlü bir şekilde ifade edilir ancak tümör anjiyenezi için o kadar da önemli olmayabilir [125]. MMP-12 veya metalloelastazlar'ın anjiyenezisi inhibe ettiği görünmektedir. Ürokinaz-plasminojen aktivatörü için hücresele reseptörü bağlayarak reseptörü fonksiyonsuz hale getirir ve fibrin matriksindeki vasküler yapıyı azaltır [126]. Jelatinazlar, MMP-2 ve MMP-9 dokular arasındaki ve vasküler bazal membrandaki kolejenleri yıkarlar ve anjiyenez sırasındaki en önemli MMP'lerdir [127].

b-) Matriks metalloproteinazların biyolojik fonksiyonları

Ekstraselüler matriksin yıkılması embriyonik gelişim, organ morfogenezi, sinir büyümesi, ovulasyon, servikal genişleme, endometriyal döngü, saç folikül döngüsü, kemiklerin yeniden şekillenmesi, yaraların iyileşmesi, anjiyenez, apoptozis vb. pek çok normal biyolojik proses için esastır. MMP'lerin bu olaylarda önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Diğer taraftan bu enzimler bazı patolojik işlemlere de katılmaktadırlar. Örneğin; arterit, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nefrit, nörolojik hastalıklar, kan-beyin bariyerinin kırılması, periodontal hastalıklar, deri ülserleşmesi,

gastrik ülser, korneal ülserleşme, karaciğer fibrozisi, ekzema, fibrotik akciğer hastalıkları sayılabilir [128,129].

MMP'lerin karsinogenezi başlatarak, tümör anjiogenezini genişleterek, tümör büyümesine izin verecek lokal doku yapısını bozarak, metastatik yayılım için bazal membran bariyerlerini kırarak tümör ilerlemesine katkıda bulunduğu inanılmaktadır [130,131]. Son zamanlardaki çalışmalar MMP'lerin tümör hücrelerinin hayatta kalmalarında da önemli rol oynadıklarını göstermektedir [132]. MMP'lerin tümör hücrelerine ve anjiogenik endotelial hücrelere bağlandığı ve bu yolla tümör ilerlemesine katkıda bulunduğu sanılmaktadır [133].

MMP'lerin prostat, pankreas, gastrointestinal sistem, oral kanserler ile myeloma ve glioma gibi pek çok malignansilerin ilerlemesine karıştığına dair güçlü kanıtlar vardır. MMP'lerin hareketlerinin inhibe edilmesi çeşitli kanser tiplerinin tedavisi için yeni bir tedavi edici yaklaşım sunmaktadır. Günümüzde pek çok geniş spektrumlu, düşük molekül ağırlıklı MMP inhibitörleri klinik kullanımlar için değerlendirilmektedir. [121].

c-) Matriks metaloproteinazların hücrel kaynağı

MMP'lerin normal dokularda ifade edildiği bulunmuştur. MMP-2'in normal yetişkin dokularında stromal hücrelerde en çok ifade edilen enzim olduğu bilinmektedir. MMP-7 gastrointestinal sistem ve endometriumda varlığı gösterilirken MMP-9'in hemopoietik hücrelerde bulunduğu gösterilmiştir [134].

Matrilisinler (MMP-7), kolejenaz-3 (MMP-13) ve jelatinaz-A (MMP-2) tümör hücrelerince ifade edilmektedir. MT-MMP'ler tümör hücre membranları üzerinde ifade edilirler [135]. Son zamanlarda interlökin-2'in aktive ettiği NK hücrelerinin MMP-2, MMP-9 ve MT-MMP'leri ürettiği önerilmiştir [136].

d-) Matriks metalloproteinaz aktivitesinin düzenlenmesi

Normal invivo durumlar altında MMP'lerin aktivitesi sıkı bir şekilde kontrol edilir. MMP'lerin aktivitesi transkripsiyon ve zimojen aktivasyonu seviyesinde düzenlenmektedir [137]. MMP'lerin ifadesi çeşitli dışsal sinyallerce indüklenmektedir. Bu dışsal faktörleri; büyüme faktörleri (trombosit türevli büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü-2, epidermal büyüme faktörü), sitokinler (IL-1, tümör nekrozis faktör-

α), kimyasal ajanlar (örneğin; farbol esterleri), fiziksel stres ve onkogenik hücrel transformasyonlar vb. oluşturmaktadır.

Artan MMP gen ifadesi transforming growth factor- β , interlekin-4, IL-10, IL-13 , retinoik asit ve glukokortikoidler gibi baskılayıcı faktörlerce azaltılabilir [137,138].

Pek çok MMP'ler hücreler tarafından inaktif zimojenler olarak salgılanırlar. Periselüler boşlukta proteolitik olarak aktive edilirler. ProMMP formunun bu latentliği prodomaindeki sistein ile katalitik domaindeki çinko arasındaki kovalent bağca sürdürülür. MMP'lerin aktivasyonu sistein-çinko etkileşiminin bozulmasını gerektirmektedir.

Salgılanan ProMMP'ler plasmin, tripsin, mast hücre triptazınca in vitro olarak aktive edilir. ProMMP'ler ayrıca reaktif oksijenler, deterjanlar, SH-reaktif ajanlarınca da aktive edilebilirler [129,137].

MMP'lerin aktiviteleri spesifik inhibitörlerce inhibe edilir: Matriks metalloproteinazların doku inhibitörleri, kimyasal MMP inhibitörleri, nonspesifik proteinaz inhibitörleri [137,138].

1.6 ANTİOKSİDAN ENZİMLER

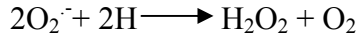
Bütün organizmalar hidroksil radikali (OH^\cdot), süper oksit anyonu (O_2^\cdot) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi, reaktif oksijen türelerine maruz kalırlar. Böyle reaktif oksijen türleri proteinler, nükleik asitler ve lipidleri içeren pek çok makromoleküllerde büyük hasarlara yol açabilirler ve hücre ölümlerine neden olabilirler.

Ancak hücreler, katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimleri ve glutatyon, vitamin E ve C gibi non-enzimatik molekülleri içeren çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları yolu ile oksidanlara cevap verebilmektedir [10]. Antioksidanlar, serbest radikallerle tehlikesiz bir şekilde reaksiyona giren ve hayati moleküller hasar görmeden önce zincir reaksiyonunu sonlandıran ve böylece hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan moleküllerdir [139].

1.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz süperoksit radikalini(O_2^\cdot), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüştüren metalloproteinlerdir. Hemen hemen bütün organizmalarda bulunmakta ve oksidatif strese karşı savunmada önemli rol

oynamaktadır [140]. Mikroorganizmalardan en yüksek yapılı canlılara kadar, aerobik koşullarda yaşayan canlıların bütün doku, hücre ve hücre organelleri SOD içerirler.



Bütün canlılardaki SOD enzimi kofaktör olarak içerdiği metal iyonuna göre 3 grupta toplanabilir [141].

a-) Bakır ve Çinko İçeren Dismutazlar (Cu, Zn-SOD)

Esas bulunduğu yerler ökaryotik hücrelerin sitozolü ve eritrositlerdir. Enzimin etkinliği için Cu mutlaka gerekli olup, CO^{2+} , Hg^{2+} ve Cd^{2+} ile yer değiştirebilir. Dismutasyon, Cu ile O_2^- arasındaki etkileşim ile başarılmaktadır. Bu enzim mitokondri matriksi dışında ökaryotik hücrelerin her organelinde bulunur ve 21 nolu kromozomda lokalize olmuştur [141].

b-) Mangan İçeren Dismutazlar (Mn-SOD)

Ökaryotların mitokondrisinde ve prokaryotlarda bulunmaktadır [11]. Mn-SOD anerobik koşullarda bulunmaz yalnız oksijene maruz kalmayı takiben hızla sentezlenir [144].

c-) Demir ve Mangan İçeren Dismutazlar (Fe-SOD, Mn-SOD)

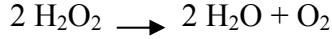
Fe-SOD aerobik olarak büyüyen hücrelerin yanı sıra anerobik olanlarda da sentezlendiğinden dolayı konstutatif olduğuna inanılır [144]. Bazı bakteriler ise birden fazla SOD içermektedirler [141]. *E.coli* süper oksit dismutazın üç izoenzimatif formuna da sahiptir [144]. Bu tip mikroorganizmalarda matriks enziminin (Mn-SOD) endojen O_2^- radikallerine karşı, demir içeren dismutazın (Fe-SOD) ise çevreden gelen radikallere karşı koruyucu fonksiyon gördüğü tahmin edilmektedir [141].

1.6.2 Katalaz (CAT)

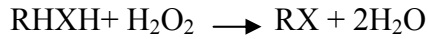
Katalaz, aerobik hücrelerde peroksizomlara yakın olarak bulunur ve hücreleri hidrojen peroksitin toksik etkilerinden korumakla görevlidirler [143]. CAT, tetramerik

yapıya sahip, moleküler ağırlığı 240.000 olan aktif merkezinde dört tane “ferrihem” grubu ihtiva eden bir hemoproteindir [141].

Yüksek konsantrasyonlarda hidrojen peroksiti (H_2O_2) yıkarak iki elektron dismutasyonu ile oksijen (O_2) ve suya (H_2O) katalizler.



Alternatif olarak düşük hidrojen peroksit konsantrasyonlarında askorbat ve fenollerini içeren alkoller gibi kosubstrat redükleyicileri kullanarak peroksidaz olarak rol oynayabilirler.

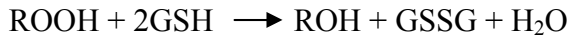
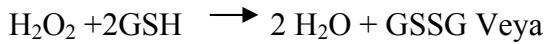


Memeli hücrelerinde NADPH katalaza bağlanır ve enzimi H_2O_2 tarafından inaktive edilmesine karşı korur.

Memeli hücrelerinde enzimin büyük çoğunluğu peroksizomlarda lokalize olmuştur [142]. Ayrıca sıçan kalbi mitokondri matriksinde de bulunmaktadır [141].

1.6.3 Glutatyon Peroksidaz (GP_x)

GP_x , çözülebilen bir selenoprotein olup, pek çok dokuda ifade edilmektedir. H_2O_2 'ye karşı hücrel antioksidan savunmada önemli bir rol oynamaktadır ve organik hidroperoksitlerdir. H_2O_2 'i ve organik hidroperoksitleri suya ve alkole redükler [146]. Glutatyon peroksidazlar memeli hücrelerinde sitozol ve mitokondriyal matrikste lokalize olmuşlardır. GP_x GSH'ı bir redüktant olarak kullanarak hidroperoksitleri yıkar [10].



Bu zamana kadar beş GP_x izoenzimi tanımlanmıştır. Bundan dolayı tek bir enzimden çok bir enzim ailesi olarak adlandırılabilir [147]. Sitozolik ve mitokondriyal GP_x (GP_x-1) ve fosfolipid hidroperoksit GP_x (GP_x-4 , $PHGP_x$) pek çok dokularda bulunmaktadır. Gastrointestinal GP_x (GP_x-2) ve ekstraselüler GP_x (GP_x-3), gastrointestinal sistem ve böbrekte bulunur. Selenyum bağımlı GP_x (GP_x-5) fare epididimisinde özellikle ifade edildiği gösterilmiştir. GP_x-1 her an her yerde bulunur ve hidrojen peroksit ve organik peroksitlere karşı hücrel savunmada merkezi rol oynamaktadır [145].

Katalaz ve glutatyon peroksidaz her ikisinde hidrojen peroksiti suya ve oksijene dönüştürmektedirler. İkisi de aynı işi yapmalarına rağmen katalaz substrat olarak sadece hidrojen peroksiti kullanırken, glutatyon peroksidaz ise farklı substratlar da kullanabilmektedir.

GP_x normal fizyolojik koşullar altında hidrojen peroksit konsantrasyonundaki çok küçük değişikliklerde bile ilk koruyucu cevabı oluşturmaktadır. Katalaz ise; hidrojen peroksit konsantrasyonları fizyolojik konsantrasyonların çok çok üstünde olduğu zaman görev yapmaktadır [146].

Beslenme kompozisyonu, iz element durumu ve vitaminler gibi pek çok çevresel faktörlerin enzim aktivitesini değiştirdiği bulunmuştur. Beslenme enzim aktivitesi üzerinde en önemli etkidir [147].

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Stojilkovi vd. sıçan beyin hipokampusunda kronik ve akut olarak strese maruz kalmanın Mn-SOD, Cu-SOD ve CAT aktiviteleri üzerine etkilerini araştırmışlar ve kronik stresin oksidatif enzim aktivitelerini artırdığını bulmuşlardır [148].

Yoshimoto ve arkadaşları ise *in vivo* olarak adrenomedullin'in oksidatif strese karşı koruyucu bir role sahip olduğunu göstermişlerdir [149]. Oba ve arkadaşları tarafından reaktif oksijen türlerinin indüklediği padosit hasarına karşı adrenomedullin'in koruyucu olarak içsel antioksidan potansiyele sahip olabileceği gösterilmiştir [150].

Ohno vd. akut ve kronik soğuk stresin glutatyon ve ilgili enzimler üzerine etkilerini rat eritrositlerinde araştırmışlardır. Soğuğa alışmaya çalışan ve soğuğa adapte olan sıçanların kanlarında glutatyon seviyeleri kontrollere göre daha düşük gözlenmiştir. Süper oksit dizmutaz aktivitesi soğuğa alışmaya çalışan sıçanlarda önemli düzeylerde artarken, soğuğa adapte olmuş sıçanlarda da artma eğiliminde olduğu belirlenmiştir. Eritrositlerdeki glutatyon peroksidaz seviyesi ise tutarsız bulunmuştur, soğuğa alışmaya çalışanlarda artarken adapte olanlarda azaldığı tespit edilmiştir [151].

Şahin ve Gümüşlü soğuk stresinin antioksidan enzim aktiviteleri, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu üzerine etkilerini çeşitli dokularda belirlemeye çalışmışlardır. Sonuç olarak; soğuk stresinin oksidan/antioksidan sistemin dengesini bozduğunu, enzimatik ve non-enzimatik antioksidan durumlarını değiştirerek, protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu yolu ile pek çok dokularda oksidatif hasara neden olduğunu bulmuşlardır [1].

Selman vd. uzun süreli soğuğa maruz kalmanın küçük bir memelide antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerini araştırmışlar ve iskelet, kalp ve böbrek kaslarında katalaz aktivitesinde bir artış gözlenmişlerdir. Kalp kasında GSH-P_x aktivitesi artmıştır buna karşın toplam SOD aktivitesinde herhangi bir dokuda gruplar arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir [3].

Yüksel vd. sıçanlarda soğuk strese homeostatik cevapta adrenomedullin'in katkısını araştırmış ve onların toplam serum proteinlerini, glukoz, trigliserid ve kolesterol seviyeleri ile kan basınçlarını oda sıcaklığında, soğuk stresi uygulaması ile, adrenomedullin uygulaması yapılarak ve soğuk stres ve adrenomedullin uygulayarak gözlemlenmiştir.

48 saatlik soğuk stresinin protein, kolesterol ve trigliserid düzeylerini azalttığını ve glukoz seviyesini arttırdığını, yalnız adrenomedullinin uygulamasının ise; total protein ve kolesterol seviyesini azalttığı, glukoz ve trigliserit konsantrasyonunu arttırdığını bulmuşlardır [2].

Yapılan bir çalışmada ağır metal ve adrenomedullin uygulamasının bazı sıçan dokularında antioksidan savunma sistemi üzerine etkilerini araştırmıştır ve AdM'nin kurşun ve kadmiyumun neden olduğu oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin sınırlı ve belirli bir düzeyde olduğu kanaatine varmıştır [185].

Kim vd. kalp ve iskelet kaslarında soğuk stresinin vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) protein ve gen ifadesi üzerine etkilerini erkek winstar sıçanlarında çalışmışlardır. VEGF mRNA ve protein ifadesinin soğuk uygulama yapılmış kalp kaslarında önemli derecede arttığı ancak baldır kaslarında akut olarak soğuğa maruz kalmayı takiben VEGF mRNA ve protein ifadesinin azaldığı bulunmuştur. VEGF geninin kalp ve iskelet kasının soğuğa adaptasyonunda anjiogenez ve termogenez uyararak temel bir düzenleyici faktör olarak rol oynadığını önermişlerdir [152].

Ohler ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada yeni geliştirilmiş anti-AdM monoklonal antibadilerini kullanarak immunohistokimyasal yöntem ile çeşitli kötü huylu meme tümörlerinde adrenomedullin peptidinin ifadesini araştırmışlar, ayrıca meme kanserli hastalarda ve sağlıklı kontrollerinde adrenomedullin plazma konsantrasyonlarını radioimmünoassay ile belirlemişlerdir. Sonuç olarak AdM peptidinin meme kanserinde çokça ifade edildiğini ve ifadenin derecesinin lenf nodu metastazı ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Plazma AdM'sinin lenf nodu metastazının bağımsız bir göstergesi olduğunu ifade etmişlerdir [153].

Fernandez-Sauze vd. yaptıkları çalışmada anjiogenezin farklı aşamaları ile ilgili olan insan göbek bağı endotelial hücreleri fenotipi üzerinde adrenomedullin'in rolünü analiz etmişlerdir ve adrenomedullin'in insan göbek bağı endotelial hücrelerinin göçünü ve invazyonunu doza bağımlı olarak arttırdığını rapor etmişlerdir [154].

Imuro vd. adrenomedullin'in anjiogenik özelliği olduğu hipotezini lazer dopler perfüzyon görüntülerini kullanarak test etmişlerdir ve adrenomedullin'in arka bacak iskemisi olan farelerde kan akışının iyileştirilmesini uyardığını bulmuşlardır. İskemili olan bacakta adrenomedullin'in bu etkisinin VEGF ifadesini arttırmak yolu ile olduğu ve artan kan akışının artan kapiler yoğunluğu gösterdiğini bulmuşlardır. Böylece adrenomedullin'nin VEGF ifadesini ve Akt aktivasyonunu arttırmak yolu ile anjiogenik özelliklere aracılık ettiğini göstermişlerdir.

AdM'nin iskemide tedavi edici bir ajan olarak kullanılabilceğini, aksine adrenomedullin inhibitörlerinin ise; tümör büyümesinin klinik olarak idaresinde kullanılabilceğini önermişlerdir [155].

Martinez vd. meme tümör hücrelerinde adrenomedullin'in aşırı ifade edilmesinin etkilerini araştırmışlar ve tümörler için adrenomedullin'in bir yaşam faktörü olarak rol oynadığı fikrini desteklemişlerdir. Fizyolojik olarak etkin adrenomedullin inhibitörlerinin geliştirilmesi ile de kanserle klinik mücadelede yarar sağlanabileceğini önermişlerdir [156].

Oyar ve arkadaşları hem iskemi öncesi hem de reperfüzyon sırasında adrenomedullin verilmesinin etkilerini araştırmışlar ve adrenomedullin verilmesinin geçici aortik kapanmayı takiben spinal kord hasar olayını önemli derecede azaltabileceğini önermişlerdir [157].

Miyashita vd. yaptıkları çalışmada adrenomedullin'in vasküler yenilemedeki rolünü araştırmışlardır. İnsan göbek kordonu endotelial hücrelerinde (HUVEC) adrenomedullin'in Akt'nin fosforilasyonu arttırdığını ve bu etkinin adrenomedullin antagonistiği, protein kinaz-A veya fosfoinozitol-3 kinaz inhibitörlerince inhibe edildiğini göstermişlerdir. Ayrıca adrenomedullin tek katlı yaralanmış HUVEC *in vitro* olarak yeniden endotelizasyonunu ve fare jel plaklarında *in vivo* olarak yeniden damarlaşmayı sağlamıştır. Bu bulgular ışığında; adrenomedullin'in endotelial hücrelerinde Akt'in PKA ve PI₃K-bağımlı aktivasyonu ile ilgili vasküler yenilemede önemli roller oynayabileceği, doku iskemisi ve vasküler hasarlarda tedavi amaçlı kullanılabilceğini önermişlerdir [158].

Abe vd. aşırı derecede ifade edilen adrenomedullin'in iskemik dokulara koleteral akışını arttırıp arttırmadığını test etmişlerdir. Yabancıl tip farelerde arka bacak iskemisini indüklemişler ve *in vivo* elektroporasyonu takiben insan adrenomedullinini ifade eden hazırlanmış plazmiti enjekte etmişlerdir. Adrenomedullin kan akışının düzelmesini sağlamış ve kapiller yoğunluğu önemli derecede arttırmıştır. Ayrıca adrenomedullin'in iskemiyeye cevapta e-NOS'un aktivasyonu yolu ile endotelial hücrelerde büyümeyi ilerlettiğine işaret edilmiştir [159].

Pavel vd. gastroenteropankreatik ve bronşiyal sistem karsinomalı 46 hastada radioimmunoassay ile adrenomedullin'in plazma seviyeleri ölçülmüştür ve 31 hastada adrenomedullin'in doku ifadesi çalışılmıştır. Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında adrenomedullin'in plazma seviyelerinin önemli derecede arttığı bulunmuştur.

Sonuç olarak anjiojenik bir peptid olan adrenomedullin'in doku ve plazma seviyelerinin nöroendokrin karsinomalı hastalarda tümör ilerlemesinin bir belirteci olduğu gösterilmiştir [160].

Xia vd. yaptıkları çalışmalarda orta serebral damar tıkanması sonrası 24 saatte iskemik beyin hasarı üzerine AdM peptidinin infüzyonunun etkisini araştırmışlardır. AdM'nin infüzyonunun, serebral iskemi/reperfüzyondan sonra 2, 4 ve 8. günlerde nörolojik zararı önemli derecede azalttığını bulmuşlardır. Bunun yanı sıra, AdM uygulaması iskemi/reperfüzyon sonrasında 15 günde iskemik bölgelerde kapiller yoğunluğu arttırmıştır. Paralel çalışmalarda AdM uygulaması kültüre edilmiş endotel hücrelerin çoğalmasını arttırmıştır. *In vitro* ve *in vivo* AdM etkileri, kalsitonin geni ile ilgili peptid ve AdM reseptör antagonistleri ile bloke edilmiştir. Bunun yanı sıra AdM'nin etkilerine artan serebral NO seviyeleri ve azalan NADPH oksidaz aktiviteleri ve süperoksit anyon üretiminin eşlik ettiği de önerilmiştir. Bu sonuçlar, devamlı olarak dış kaynaklı AdM peptidinin sağlanmasının, nöronal ve gliyal hücrelerin hayatta kalmalarını düzelterek ve artan nitrik oksit oluşumu ve oksidatif stresin baskılanması yoluyla anjiojenezin ilerletilmesiyle iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğunu göstermişlerdir [161].

Soydinç vd. tarafından cerrahi ve radyoterapi uygulanmış 20 akciğer kanserli hastalarda matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) ve doku matriks metalloproteinaz inhibitörleri (TIMP-1)'nin tedavi öncesi düzeylerini ELISA yöntemi ile belirlenmiş ve sağlıklı kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Hastaların MMP-9 ve TIMP-1 düzeyleri kontrol gruplarına göre anlamlı bulunmuştur ve klinikte rutin olarak kullanılabilen parametreler olarak düşünülmüştür [162].

Yapılan bir çalışmada insan kanser invazyonu, apoptozisi, büyümesi ve anjiojenezinde matriks metalloproteinaz-7 (MMP-7)'in rolünü araştırılmış, MMP-7'in pek çok kanserli insan dokularında aşırı ifade edildiği ve kanserin ilerlemesi ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir [163].

Martin vd. yapmış oldukları çalışmada vasküler endoteliyal growth faktörlerin ifadesinin boyun ve baş hücre kanseri olan hastalarda ilk radyoterapi sonrası sonuçların belirlenmesinde bir belirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmışlardır ve VEGF ifadelerinin sonucun bir göstergesi olarak kabul edilebileceğini önermişlerdir [84].

Özçelik vd. akut lösemili hastalarda anjiojenezi değerlendirmişlerdir. Çalışma için on üç hasta kullanılmış ve kemik iliği örnekleri immunohistokimyasal olarak willebrand faktör ile boyanmıştır. Her kemik iliği örneğinde damar yoğunluğunun en fazla olduğu alanlardan iki tanesinde mikrodamar sayımı yapılmış ve kemik iliği mikrodamar sayısının akut lösemili hastalarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli oranda arttığı bulunmuş ve akut lösemilerin patogenezinde anjiojenezin rolü olabileceği kanaatine varılmıştır [164].

Kim vd. adrenomedullin'in anjiojenik rolünü ve endotelial hücrelerdeki sinyal yollarını araştırmışlar ve adrenomedullin'in anjiojenik rolünü endotelial hücrelerde, mitojenin aktive ettiği adezyon-kinaz, fokal-adezyon-kinaz, Akt'in aktivasyonu yolu ile gerçekleştirdiğini göstermişlerdir [165].

Hauge vd. hipoksik koşullarda salgılanan anjiojenik bir faktör olan adrenomedullin'in uterus leiomyom vasküler yoğunluğu ile ilişkili olduğunu ve adrenomedullin'in böyle iyi huylu fakat klinik olarak problemlü uterus tümörlerinin anti-anjiojenik tedavisi için yeni bir hedef olarak tanımlanabileceğini önermişlerdir [166].

Nikitenko vd. adrenomedullin (AdM)'in insan uterusunda var olduğunu göstermişlerdir ve AdM'in insan endometrial anjioenezindeki daha ileri rolünü araştırmak için gebe olmayan endometrial endotelyum kültürü ve izolasyonu için bir yöntem geliştirmişlerdir. AdM'in endotelial hücrelerin büyümesini ilerlettiğini ve endometriyal endotelial hücrelerde cAMP yi indüklediğini göstermişlerdir. Böylece AdM'in insan endometrial endotelial hücreleri için otokrin bir büyüme faktörü olduğunu ve endometrial anjiojenizde rol oynadığını kanıtlamışlardır [167].

Pedersen vd. bir miyokin olarak IL-6' ın rolünü araştırmış ve sağlık için yararlı olduğu düşünülen pek çok ayrı metabolik ve fizyolojik etkilere sahip olduğunu ve yeni tanımlanmış bu miyokinlerin ve onların reseptörlerinin pek çok hastalıkların ve metabolik bozuklukların tedavisinde hedef olarak görev yapabileceğini önermişlerdir [168].

Slater vd. yapmış oldukları çalışmada insan büyüme hormonunun ve interlökin-6'nın hem endometriozis'in ilerlemesinde hem de endometriyal karsinomada rol oynayabileceğini göstermişlerdir [169].

Naudin vd. şizofrenide IL-6 ve TNF- α 'ın farklı rollerini araştırmışlar ve bu sitokinlerin dolaşım seviyelerini belirlemişlerdir. TNF- α 'ın dolaşım seviyesini hastalarda kontrollere göre oldukça yüksek olduğu IL-6'nın da hastalardaki arttığı gözlenmiştir. Bu sitokinlerin hastalığın genetik zeminini yansıtabileceği hipotezi kurulmuştur [170].

Szlosarek vd. tümör ilerlemesinin anahtar moleküllerinden biri olarak TNF- α 'yı göstermişler ve çeşitli pre-neoplastik ve malignant hastalarda sağlıklı bireylerin doku ve serumları karşılaştırıldığında artan serum konsantrasyonlarını ve TNF- α 'ın artan ifadesini gözlemlemişlerdir [114].

Bonavida vd. nitrik oksit'in kanserdeki pek çok rolünü açıklamaya çalışmışlar ve NO'nin kanser tedavisinde yeni bir tedavi edici ajan olarak kullanılabileceğini önermişlerdir [12].

Fizyolojik stres immün sistemi farklı yollardan etkileyebilir ve bu durum stresle ilgili hastalıklarla sonuçlanabilir. Stresin immün sistem üzerine etkisi değişkendir ve bireye özgüdür. Stres özellikle de kronikse en çok rastlanan cevap immün sistemin baskılanmasıdır. Yapılan bu çalışmada farklı akademik yıllarda olan 183 öğrencide araştırma yapılmış ve TNF- α , IL-2 çözülebilir reseptör alfa ve IL-4 ölçülmüştür. TNF- α seviyesi oldukça yüksek sınav endişesine sahip olan grup da önemli ölçüde daha düşüktür ve bu durum spesifiktir [171].

Son zamanlardaki çalışmalar adrenomedullin (AdM) ve adrenomedullin bağlayıcı protein-1 (AMBP-1) verilmesinin kardiyovasküler stabilitenin sürdürülmesini sağladığı ve sepsiste ölüm oranını azalttığı doğrultusundadır. Ancak AdM/AMBP-1 yararlı etkilerinden sorumlu mekanizma henüz açıklanmamıştır.

Wu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise AdM ve AMBP'in birlikte etkin olarak LPS'in indüklediği TNF- α ifadesini ve salınımını özellikle primer kültüre edilmiş kupfer hücrelerinde etkin olarak baskıladığını göstermişlerdir. Bu sonuçlar ise AM/AMBP'in proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- α üzerine azaltıcı etkisinin sepsiste doku hasarı ve inflamatuvar cevabın önlenmesindeki yararlı etkilerinden sorumlu bir mekanizma sergilediğini önermektedir [172].

Yapılan bir başka çalışmada bölgesel beyin iskemisi olan sıçanlarda serum ve beyin dokusunda TNF- α ve IL-6 ifadesi araştırılmıştır. Bölgesel beyin iskemisinin iskemik dokularda TNF- α ve IL-6 yüksek mRNA ifadesini indüklediğini IL-6 ve TNF- α 'ın serum seviyelerini arttırdığı görülmüştür [173].

Ya-Li vd. yaptıkları çalışmada sıçanlarda serum IL-2, IL-6 ve TNF- α düzeylerinde stresin indüklediği değişiklikler üzerine kombine besinlerin etkilerini araştırmışlardır. Stresle birlikte IL-6 ve TNF- α düzeylerinin arttığını ancak IL-2 düzeylerinin azaldığını bulmuşlardır. Oral olarak kombine besin verilmesinin, soğuk suya daldırılma ve akut ve kronik olarak hapsedilme stresi sonrasında artan serum TNF- α düzeyini azalttığını ve azalan IL-2 seviyelerini arttırdığını göstermişlerdir [174].

Adrenomedullin mitojenik ve anjiyojenik kabiliyeti olan ve androjenler tarafından regüle edilen çok fonksiyonlu düzenleyici bir peptittir, prostatta çokça ifade edilir. Shibata vd. yaptıkları çalışmada kısırlaştırılmış sıçan modellerinde androjen prostatik kan akışının regülasyonunun AdM ve VEGF ile olan ilişkisini araştırmışlardır ve AdM'in sinyal iletim yollarında VEGF'in görevini azaltıcı bir etkiye sahip olduğunu önermişlerdir [175].

Ravishankar vd. kronik hipoksiya sonucunda artan VEGF anne serum düzeylerinin servikal viskoelastisitede ölçülebilir değişikliklere neden olup olmayacağını araştırmışlardır. Normal ve hamile olmayan sıçanlarla karşılaştırıldığında VEGF serum düzeylerinin hipoksiya ile arttığı gözlenmiştir [178].

Sasaki vd. yaptıkları çalışmada erişkin sıçan miyokardiyumunda hipoksiyanın neden olduğu oksidatif stresin anjiyojenik bir faktör olan VEGF düzeyini artırıp arttırmadığını araştırmışlardır. Sonuç olarak oksidatif stresin kanda oksijen eksikliği yarattığını bunun da kalp VEGF protein ifadesinin arttırdığını, bu durumun miyokardiyal anjiyoenez'i tetikleyebileceğini önermişlerdir [179].

Pek çok çalışma vasküler tonun regülasyonunda temel endotelial faktör olan NO'nin strese maruz kalma sonrası gözlenen pek çok patofizyolojik duruma karıştığını göstermiştir. Cordellini vd. yaptıkları çalışmada strese uyum cevaplarına NO'nin katılıp katılmadığını araştırmışlardır ve plazma arjinin seviyesinde bir azalma ve sıçanların paraventriküler nükleusunda NOS mRNA düzeyinde bir artış gözlenmiş bu bulgular da NO'un strese uyumda rol oynadığını göstermiştir [176].

Ishizuka vd. tarafından yapılan başka bir çalışmada ise sıçanların paraventriküler nükleus (PVN) bölgesinde NO ve norepinefrin salınımı üzerine farklı stres çeşitlerinin etkileri araştırılmıştır. Hapsedilme, tuz yüklemesi ve su verilmemesi gibi stres koşullarından sonra PVN'de NO sentaz ifadesinin arttığı bulunmuştur [177].

MMP-2 kollejenin yanı sıra laminin ve fibronektini de yıkar bundan dolayı kardiyomiyositlerin ekstraselüler matriksini bozar, kronik kalp hastalıklarının da ise kolejen sentezi ve oksidatif stresin arttığı rapor edilmiştir.

Kunishige vd. yaptıkları çalışmada kronik kalp hastalıklarının akut ve kronik fazlarında MMP'lerin serum seviyelerini açıklamışlardır. Serum MMP-2 seviyelerinin artan oksidant stres ile arttığını göstermişlerdir [180].

İnflamasyon doku hasarına cevapta önemli bir bileşendir, kalp krizi sonrası aktif bir rol oynar. Fibrozis, yeniden doku şekillenmesi ve yeni damar oluşumuna yol açar. Kalp krizi sonrası anjiyojenik ve anjiostatik durumu incelemek amacıyla Suyama vd tarafından yapılan çalışmada sitokin ve kemokin mRNA'larının doku ifadesi analiz edilmiştir. İskemik olmayan miyokardiyum VEGF'yi de içeren anjiyojenik sitokinleri yüksek seviyede ifade ederken, iskemik miyokardiyum ise, IL-6'yı da içeren inflamatuvar sitokinler 24 saat içinde hızlı bir şekilde artmıştır [181].

Savaş vd. yaptıkları çalışmada bipolar efektif bozukluklarda adrenomedullin ve nitrik oksitinin muhtemel rolünü araştırmışlar ve hasta gruplarında hem NO hem de AdM plazma seviyelerinin kontrollere göre önemli derecede yüksek olduğunu göstermişlerdir. Adrenomedullin NO salınımını uyarak ve adenilat siklazı aktive ederek vazorelaksasyon sağlamaktadır bundan dolayı bu sonuçlara da dayanarak bu iki molekülün beyinde beraber rol oynayabileceğini önermişlerdir [182].

Zoroğlu vd. yaptıkları çalışmada otizimde adrenomedullin ve nitrik oksitinin patofizyolojik rolünü araştırmışlardır. Adrenomedullin ve NO'un bir metaboliti olan total nitrit seviyelerini plazmada ölçmüşlerdir. Otistik gruplarda ortalama total nitrit ve adrenomedullin seviyelerinin kontrol değerlerine göre önemli derecede yüksek olduğunu saptamışlardır [183].

Yüksel vd. sıçan hipotalamus, hipofiz adrenal eksenini antioksidant savunma sistemi üzerine soğuk stresinin etkilerini araştırmışlardır. Hipotalamus ve adrenal medullada CAT aktivitesi artarken, SOD aktivitesinin azaldığını ve sub-akut soğuğa maruz kalmanın glutatyon redüktaz aktivitesinde artışa neden olduğunu ayrıca çalışılan bütün dokularda glutatyon S-transferaz enziminin arttığını bulmuşlardır [184].

Yi vd. yaptıkları çalışmada adrenomedullin'in TGF- β 1 üretimini ve TGF- β 1'in indüklediği MMP-2 ifadesini inhibe ederek hepatik stellat hücrelerinin aktivasyonuna karıştığını ve TGF- β 1 tarafından indüklenen MMP-2 ifadesinin artışını baskılayabileceğini önermişlerdir [186].

Tsuruda vd yaptıkları çalışmada sıçan aortik fibroblastlarında adrenomedullin'in MMP-2 aktivitesini arttırdığını bulmuşlardır [187].

Valentine vd. yaptıkları çalışmada kültüre edilmiş koroner düz kas hücrelerinde oksidatif stresin MMP-2 'yi aktive ettiğini bulmuşlardır [188].

Proteinlerin/enzimlerin ve/veya diğer bazı biyolojik moleküllerin işlevlerini yerine getirebilmeleri onların posttranslasyonel değişime uğramalarına bağlıdır. Proteinlerin sentez sonrası modifikasyonları proteinlerin serin, treonin ya da tirozin aminoasitlerinden fosforillenmesi ya da arjinin gibi aminoasitlerden metillenmesidir. Adrenomedullin ile ilgili yapılan çalışmalarda literatür bilgilerine göre metile adrenomedullin ile araştırmaya rastlanmamış olup, bu çalışma sonucunda elde edilecek sonuçlar ile bilim dñnyasına olası yeni veriler sağlanmış olacaktır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Deneylerde Kullanılan Sıçanlar

Deneylerde İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Birimi tarafından üretilen Wistar ırkı erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar; kontrol (K), adrenomedullin (AdM); Metile adrenomedullin (met-AdM), stres+AdM, stres+met-AdM ve stres grubu olmak üzere eşit sayıda altı gruba ayrılmıştır. Sıçanlar deney gününe kadar 12 saat aydınlık/karanlık, havalandırılmalı, 24°C’de, özel kafeslerde barındırıldı. Sıçanların ağırlıkları 190-250 g arasında olup, sıçanlara standart sıçan yemi ve içebildikleri kadar su verildi.

3.1.1. Soğuk stresi uygulaması

Soğuk stresi uygulaması için hayvanlar bir hafta süre ile +10 °C ’de soğuğa maruz bırakıldı. Kontrol grubunu oluşturan 6 adet sıçan ise, 24°C’de muhafaza edildi.

3.1.2 Adrenomedullin uygulaması

Adrenomedullin deney gruplarına bir hafta boyunca her gün aynı saatte 2000 ng/kg vücut ağırlığı olacak şekilde günde bir kez intraperitoneal (i.p) enjeksiyon ile serum fizyolojik içerisinde çözündürülen AdM (Calbiochem Adrenomedullin-1-50 Rat) uygulandı.

3.1.3. Metile-adrenomedullin uygulaması

Adrenomedullin metilasyon kiti kullanılarak metile edildi ve metilasyon FTIR analizi ile belirlendi. Metile-adrenomedullin deney gruplarına bir hafta boyunca her gün aynı saatte 2000 ng/kg vücut ağırlığı olacak şekilde günde bir kez intraperitoneal olarak metile- adrenomedullin uygulaması yapıldı.

3.1.4. Stres ve adrenomedullin uygulaması

Bir hafta boyunca +10°C soğuğa maruz bırakılan sıçanlara aynı zamanda hafta süresince hergün aynı saatte 2000 ng/kgvücut ağırlığı olacak şekilde günde bir kez intraperitoneal olarak adrenomedullin uygulaması yapıldı.

3.1.5. Stres ve metile-adrenomedullin uygulaması

Bir hafta boyunca +10°C soğuğa maruz bırakılan sıçanlara bir hafta süresince hergün aynı saatte olmak üzere 2000 ng/kgvücut ağırlığı olacak şekilde günde bir kez intraperitoneal olarak metile- adrenomedullin uygulaması yapıldı.

3.2. Diseksiyon İşlemi

Sıçanları bayıltmak için anesteziik madde olarak ketamin kullanıldı. Sıçanlara ketamin 75 mg/kg'lık dozda i.p enjeksiyon ile verilerek 2-3 dakika içerisinde bayılmaları sağlandı. Tüm uygulama ve kontrol gruplarındaki sıçanlar bayılma işleminden sonra, abdomen bölgelerinden açılarak kalbin vena kasi kesildi. Kan vücuttan uzaklaştırıldı ve bu uzaklaştırma işleminde kalbe 20 mL serum fizyolojik enjekte edildi.

3.3. Organların Alınması ve Homojenizasyonu

Perfüzyon işleminden sonra karaciğer, akciğer, böbrek, kalp ve beyin tamamen alındı. Dokular serum fizyolojik ile tekrar perfüze edilerek temizlendi. Doku örnekleri taraları alınmış deney tüplerine alınarak doku ağırlıkları kaydedildi. Tartım işleminden sonra tüpe fosfat tamponu (pH 7,2 % 0.2 triton) eklenerek, buz içerisinde (PVC, Kinematica, homojenizatör Statu) ile tüm doku örneği parçalanıncaya kadar homojenize edildi. Homojenizasyon işleminin ardından doku örnekleri +4°C'de 10.000 g'de 10 dakika Ole Dich 157.MP mikrosantrifüj cihazı ile santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant örnekleri analizler yapılıncaya kadar -70 °C'de derin dondurucuda saklandı.

3.4. Toplam Protein Ölçümü

Toplam protein miktarını saptamak için Bradford yöntemi (1976) kullanıldı [190]. Bu yöntemde standart protein olarak bovine serum albumin (BSA) kullanıldı. Çizilen standart protein grafiği kullanılarak örneklerin toplam protein miktarları saptandı.

3.4.1 Standart tüplerin hazırlanması

Standartlar 2 µg-20 µg BSA içerecek şekilde iki tekrarlı olarak hazırlandı. 1. standarta 158 µl, 2. standarta 156 µl, 3. standarta 154 µl, 4. standarta 152 µl, 5. standarta 150 µl 6. standarta 140 µl su konuldu ve her bir standarta 40 µl Bradford boya çözeltisi eklenerek son hacim 200 µl'ye tamamlandı.

3.4.2. Örnek içeren tüplerin hazırlanması

Doku homejenatları 50 kez sulandırıldı. Daha sonra her bir örneğe 40µl Bradford boya çözeltisi konularak 200 µl'ye tamamlandı.

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

3.5. Katalaz Aktivite Tayini

Karaciğer, akciğer, böbrek, kalp süpernatant örneklerinde katalaz aktivitesimodifiye luck yöntemi kullanılarak ölçüldü ve aktivite saptandı [191]. Yöntemde

- 1/15 M Na-K fosfat tamponu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$) pH 7 ve
- Derişik (%35) H_2O_2 çözeltisi kullanıldı. Hazırlanan fosfat tamponunun 100 mL'sine, 160µL derişik H_2O_2 çözeltisi pipetlendi. Çözelti kör olarak kullanıldı.

Karaciğer, akciğer, böbrek ve kalp dokularında katalaz aktivitelerini belirlemek için yine aynı karışımdan 1000 µL alınıp kuarz küvete pipetlendi ve üzerine karaciğer örneklerinden 5µL, akciğer örneklerinden 20 µL, böbrek örneklerindena 10 µL, kalp örneklerinden 10 µL olacak şekilde süpernatan eklendi. Küvet bir kez karıştırıldıktan sonra (Shimadzu UV-1601 UV/VIS) spektrometrede 240 nm dalga boyunda (30 sn. boyunca) absorbans değişimi okundu. Ünite enzim aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Ünite} = \frac{\Delta\text{OD} \times 1 \text{ dk} \times 1000}{0.036 \times \mu\text{L süpernatan}}$$

3.6. Glutasyon Peroksidaz Aktivite Tayini

Karaciğer, akciğer, böbrek ve kalp süpernatan örneklerinin GSH-P_x enzim aktivitesi glutasyon peroksidaz tayini kiti (Cayman Chemical Company ticari firmasının ürettiği The Cayman Chemical Glutathione Peroxidase Assay Kit (Catalog No: 703102)) kullanılarak 340 nm’de mikropilaka okuyucuda (Molecular Devices Corp, Versamax[®]) ölçüldü. Yapılan ölçümler sonucunda kit içeriğinde verilen protokole göre standart grafik çizildi. Enzim aktivitesi standart grafik kullanılarak hesaplandı.

3.7. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini

Karaciğer, akciğer, böbrek ve kalp süpernatan örneklerinde SOD enzim aktivitesi Cayman Chemical Company ticari firmasının ürettiği The Cayman Chemical Superoxide Dismutase Assay Kit (Catalog No: 706002) ile 450 nm’de mikropilaka okuyucuda (Molecular Devices Corp, Versamax[®]) ölçüldü. Yapılan ölçümler sonucunda kit içeriğinde verilen protokole göre standart grafik çizildi. Enzim aktivitesi standart grafik kullanılarak hesaplandı.

3.8. Nitrik Oksit Ölçümü

Karaciğer, akciğer, kalp ve beyin süpernatant örneklerinde NO düzeyi Cayman Chemical Company ticari firmasının ürettiği The Cayman Chemical Nitrate/ Nitrite Assay Kit (Catalog No: 780001) ile 540 nm'de mikrolaka okuyucuda (Molecular Devices Corp, Versamax[®]) ölçüldü. Yapılan ölçümler sonucunda kit içeriğinde verilen protokole göre standart grafik çizildi. Nitrik oksit düzeyleri standart grafik kullanılarak hesaplandı.

3.9. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) Ölçümü

Karaciğer, akciğer, kalp ve beyin süpernatant örneklerinde VEGF miktarı Pierce Biotechnology, Inc. tarafından üretilen Endogen Human VEGF ELISA Kit (IL 61105) ile 450 nm'de mikrolaka okuyucuda (Molecular Devices Corp, Versamax[®]) saptandı. Yapılan ölçümler sonucunda kit içeriğinde verilen protokole göre standart grafik çizildi. VEGF miktarları standart grafik kullanılarak hesaplandı.

3.10. Matriks Metalloproteinaz Aktivite Tayini

Karaciğer, akciğer, kalp ve beyin süpernatant örneklerinin MMP-2 aktivitesi AnaSpec Corporate Headquarter ticari firması tarafından üretilen EnzoLyteTM520 MMP-2 Assay Kit (Catalog: 71151) ile 490nm/520nm'de fluorometrik olarak mikrolaka okuyucuda (Molecular Devices Corp, Versamax[®]) saptandı.

3.11. İnterlökin-6 (IL-6) Ölçümü

Karaciğer, akciğer, kalp ve beyin süpernatant örneklerindeki IL-6 miktarı Biosource ticari firması tarafından üretilen The Biosource Rat IL-6 Immunoassay Kiti (Catalog: KRC0061) kullanılarak 450 nm'de mikrolaka okuyucuda (Molecular Devices Corp, Versamax[®]) saptandı. Yapılan ölçümler sonucunda kit içeriğinde verilen protokole göre standart grafik çizildi. IL-6 miktarları standart grafik kullanılarak hesaplandı.

3.12 Tümör Nekrozis faktör- α (TNF- α) Ölçümü

Karaciğer, akciğer, kalp ve beyin süpernatant örneklerinde TNF- α düzeyi Biosource ticari firması tarafından üretilen The Biosource Rat TNF- α Immunoassay Kiti (Catalog: KRC3011) kullanılarak 450 nm'de mikropłaka okuyucuda (Molecular Devices Corp, Versamax[®]) ölçüldü. Yapılan ölçümler sonucunda kit içeriğinde verilen protokole göre standart grafik çizildi. TNF- α düzeyleri standart grafik kullanılarak hesaplandı.

3.13 Toplam RNA Analizi

Toplam RNA analizi Tümer vd.(1997)'e göre yapıldı [192]. Karaciğer, akciğer, böbrek ve kalp dokuları (pH 7.2 % 0.2 triton) fosfat tamponu eklenerek homojenize edildi. Bu homojenatlardan 100 μ l alındı ve daha sonra 800 μ l RNAzol çözeltisi ile 80 μ l kloroform eklenerek tüp kapatıldı. 15 sn vorteksle karıştırıldı 5 dakika buz üzerinde bekletildi. 12000g'de 4°C'de 25 dakika santrifüj edilip üstteki renksiz sıvı yeni bir tüpe alındı. Daha sonra 400 μ L izopropanol eklenerek 4°C'de 15 dakika bekletildi. 12000g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı dökülüp pelete 800 μ L %75'lik etanol eklenip vorteksle karıştırıldı. Karışım 10000 g'de 8 dakika olmak üzere 4°C'de santrifüj edildi ve üstteki sıvı dökülerek ve tüp kurutuldu. Daha sonra 15 μ l distile su ilave edilerek 1000 μ l'ye tamamlandı ve 260 nm'de spektrofotometrik olarak absorbans değerleri belirlendi. Toplam RNA miktarları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı; göre hesaplandı.

$$(40/V(\mu\text{L})) \times O.D_{260} = \text{Toplam RNA } \mu\text{g/mL}$$

3.14 İstatistiksel Yöntem

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS for Windows Version 12.0 paket program ile yapıldı. Ölçülebilir değişkenlere ilişkin veriler ortalama \pm standart hata ile verildi. İki'den fazla olan deney gruplarının karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi , ikili karşılaştırmalarda ise Duncan testi uygulandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Adrenomedullin ve metile Adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak sıçanların karaciğer, akciğer, böbrek ve kalp dokularında antioksidatif enzimler olan CAT, SOD ve GSH-P_x aktiviteleri ölçüldü. Karaciğer, akciğer, beyin ve kalp dokularında ise anjiyojenik faktörler olan NO, TNF- α , IL-6, VEGF düzeyleri araştırıldı ve yine anjiyojenizde rol oynayan MMP-2 enzim aktivitesi ölçüldü. Çalışmanın amacına yönelik yapılan deneysel çalışmalardan elde edilen veriler çizelge 4.1 ve çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Sonuçlar dokulardaki antioksidatif enzim aktivitelerindeki değişiklikler ve anjiyojenik faktörlerdeki değişiklikler olmak üzere iki başlık altında incelendi.

Çizelge 4.1. Adrenomedullin ve metile adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak dokulardaki CAT, SOD ve GSH-P_x enzim aktivitesindeki değişimler ve toplam RNA miktarlarındaki değişimlerinin karşılaştırılması.

Karaciğer	CAT (U/mg prot.)	SOD (Unit)	GSH-P _x (Unit)	Toplam RNA(μ g/mL)
Kontrol	297 \pm 3.20 ^a	33.1 \pm 3.84 ^{a,b,c}	136 \pm 1.91 ^{a,b}	3.66 \pm 0.11
AdM	240 \pm 22.50 ^{cd}	33.2 \pm 2.23 ^{a,b,c}	143 \pm 9.41 ^a	2.55 \pm 0.21
Met-AdM	265 \pm 4.53 ^{bc}	37.1 \pm 0.59 ^{a,b}	84.4 \pm 4.94 ^d	2.39 \pm 0.16
Stres + Kontrol	223 \pm 2.42 ^d	29.9 \pm 1.41 ^c	122 \pm 5.44 ^{b,c}	2.18 \pm 0.08
Stres + AdM	270 \pm 7.76 ^b	31.7 \pm 0.43 ^{b,c}	108 \pm 2.61 ^c	3.21 \pm 0.18
Stres+Met- AdM	265 \pm 1.56 ^{bc}	38.7 \pm 3.25 ^a	83.2 \pm 3.77 ^d	3.45 \pm 0.17
Akciğer				
Kontrol	43.8 \pm 13.38 ^{a,b,c}	84.4 \pm 4.63 ^a	64.7 \pm 5.31 ^b	2.87 \pm 0.13
AdM	50.6 \pm 4.69 ^a	75 \pm 5.73 ^a	75.1 \pm 7.60 ^b	3.58 \pm 0.20
Met-AdM	48.8 \pm 1.66 ^{a,b}	83.8 \pm 1.99 ^a	64.9 \pm 1.64 ^b	3.05 \pm 0.15
Stres + Kontrol	47.7 \pm 4.56 ^{a,b,c}	91.9 \pm 2.88 ^a	66.6 \pm 5.31 ^b	2.75 \pm 0.11
Stres + AdM	35.5 \pm 2.19 ^c	88.8 \pm 6.45 ^a	122 \pm 17.85 ^a	1.94 \pm 0.11
Stres+Met- AdM	37.5 \pm 3.85 ^{b,c}	91.2 \pm 2.11 ^a	63.6 \pm 2.17 ^b	2.15 \pm 0.15
Böbrek				
Kontrol	175 \pm 17.17 ^a	38.9 \pm 8.77 ^c	72.7 \pm 13.18 ^a	4.45 \pm 0.18
AdM	171 \pm 4.43 ^{a,b}	59.6 \pm 2.46 ^b	83.5 \pm 14.75 ^a	4.16 \pm 0.17
Met-AdM	150 \pm 5.27 ^{b,c}	47.8 \pm 1.19 ^c	62.8 \pm 1.29 ^a	3.45 \pm 0.11
Stres + Kontrol	168 \pm 4.98 ^{a,b}	42.4 \pm 2.64 ^c	85.7 \pm 16.2 ^a	3.57 \pm 0.18
Stres + AdM	160 \pm 3.11 ^{a,b,c}	38.6 \pm 1.78 ^c	64.0 \pm 1.12 ^a	3.48 \pm 0.10
Stres+Met- AdM	146 \pm 5.85 ^c	97.3 \pm 3.91 ^a	61.1 \pm 1.44 ^a	3.04 \pm 0.14
Kalp				
Kontrol	64.6 \pm 16.14 ^a	85.5 \pm 11.10 ^{a,b}	134 \pm 20.32 ^a	4.54 \pm 0.12
AdM	42.2 \pm 1.64 ^b	92.3 \pm 4.69 ^a	92.9 \pm 12.17 ^{a,b}	3.45 \pm 0.20
Met-AdM	56.5 \pm 5.92 ^{a,b}	87.9 \pm 1.56 ^{a,b}	72.5 \pm 3.46 ^b	3.71 \pm 0.25
Stres + Kontrol	57.4 \pm 5.30 ^{a,b}	66.7 \pm 9.58 ^{c,d}	73.8 \pm 25.91 ^{b,b}	3.15 \pm 0.12
Stres + AdM	49.7 \pm 3.43 ^{a,b}	72.7 \pm 4.06 ^{b,c}	66.1 \pm 5.30 ^b	2.32 \pm 0.08
Stres+Met- AdM	38.9 \pm 1.32 ^b	51.9 \pm 3.01 ^d	103 \pm 14.51 ^a	2.67 \pm 0.18

Çizelgedeki harflerin tanımı: Değerleri takip eden farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir (p<0.05). Aynı harfler ise değerler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını göstermektedir (p>0.05).

Çizelge 4.2. Adrenomedullin ve metile adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak dokulardaki NO, TNF- α , IL-6, VEGF düzeyleri ve MMP-2 enzim aktivitesindeki değişimler.

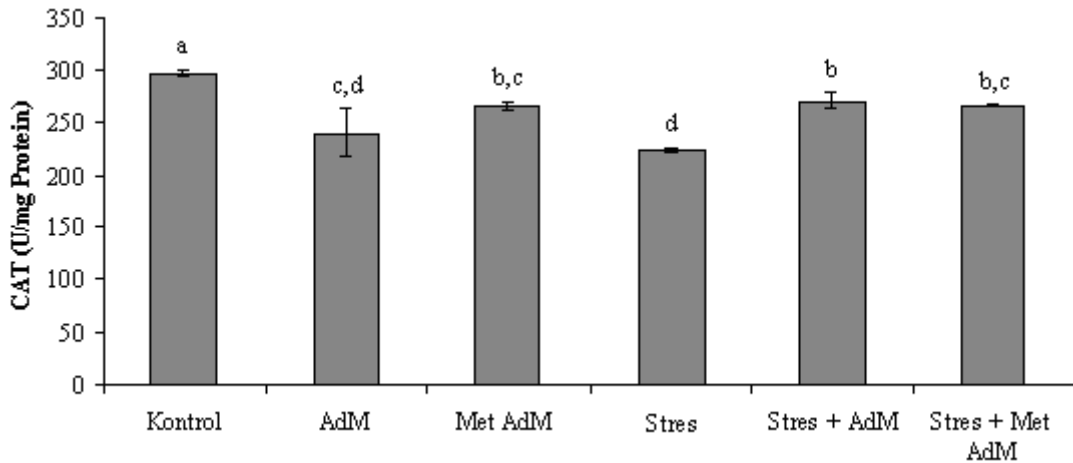
Karaciğer	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	NO (μ M)	VEGF (pg/mL)	Mmp-2 (RFU)
Kontrol	168 \pm 27.83 ^{c,d}	120 \pm 9.79 ^d	1.69 \pm 0.37 ^{b,c}	326 \pm 12.81 ^{b,c}	322 \pm 8.37 ^a
AdM	236 \pm 9.23 ^{b,c,d}	345 \pm 9.12 ^a	8.84 \pm 1.45 ^a	392 \pm 3.65 ^b	194 \pm 24.96 ^d
Met AdM	426 \pm 55.39 ^a	215 \pm 5.44 ^b	3.29 \pm 0.54 ^b	220 \pm 23.81 ^c	271 \pm 8.69 ^{a,b,c,b}
Stres + Kont	365 \pm 8.13 ^{a,b}	111 \pm 3.68 ^d	0.81 \pm 0.25 ^c	219 \pm 20.60 ^c	309 \pm 34.39 ^a
Stres + AdM	124 \pm 17.64 ^d	189 \pm 1.80 ^c	8.12 \pm 0.23 ^a	536 \pm 46.42 ^a	219 \pm 20.23 ^{c,d}
Stres + Met AdM	293 \pm 17 ^{a,b,c}	237 \pm 11.95 ^b	8.07 \pm 0.94 ^a	554 \pm 31.25 ^a	241 \pm 11.20 ^{b,c,d}
Akciğer					
Kontrol	55.2 \pm 9.36 ^b	169 \pm 33.23 ^c	1.69 \pm 0.41 ^b	259 \pm 17.13 ^c	130 \pm 9.71 ^c
AdM	27.4 \pm 3.45 ^c	230.18 \pm 1.33 ^{a,b}	2 \pm 0.23 ^b	325 \pm 18.46 ^c	415 \pm 27.67 ^a
Met AdM.	24.1 \pm 4.15 ^c	241 \pm 2.90 ^a	6.31 \pm 0.71 ^a	787 \pm 26.65 ^a	171 \pm 11.53 ^c
Stres + Kont	136 \pm 11.57 ^a	131 \pm 8.75 ^d	3.02 \pm 0.27 ^b	327 \pm 27.08 ^c	232 \pm 3.52 ^b
Stres + AdM	53.3 \pm 4.90 ^b	207 \pm 5.18 ^b	8.31 \pm 0.84 ^a	649 \pm 34.19 ^b	148 \pm 7.63 ^c
Stres + Met AdM	30.8 \pm 3.74 ^c	204 \pm 10.84 ^b	8.75 \pm 0.81 ^a	827 \pm 16.15 ^a	176 \pm 20.52 ^c
Beyin					
Kontrol	29.9 \pm 12.44 ^b	51.7 \pm 6.38 ^c	2.27 \pm 0.73 ^c	750 \pm 47.30 ^b	343 \pm 32.49 ^{a,b}
AdM	44.1 \pm 8.62 ^{a,b}	115 \pm 6.84 ^d	2.80 \pm 0.20 ^c	458 \pm 37.98 ^c	300 \pm 19.91 ^b
Met AdM.	41.6 \pm 4.67 ^{a,b}	203 \pm 7.75 ^b	2.44 \pm 0.053 ^c	345 \pm 19.70 ^c	361 \pm 12.99 ^{a,b}
Stres + Kont	62.4 \pm 11,09 ^a	156 \pm 4.33 ^c	2.17 \pm 0.67 ^c	888 \pm 73.30 ^b	348 \pm 19.00 ^{a,b}
Stres + AdM	49.1 \pm 6,66 ^{a,b}	143 \pm 10.74 ^{c,d}	10.44 \pm 0.83 ^a	775 \pm 17.86 ^b	332 \pm 16.31 ^{a,b}
Stres + Met AdM	24.4 \pm 5,27 ^b	242 \pm 13.97 ^a	6.67 \pm 0.55 ^b	1307 \pm 59.64 ^a	377 \pm 10.85 ^a
Kalp					
Kontrol	120 \pm 13.76 ^c	241 \pm 18.47 ^a	2.33 \pm 0.71 ^c	429 \pm 42.95 ^c	139 \pm 5.08 ^c
AdM	383 \pm 35.74 ^a	214 \pm 9.99 ^a	2.96 \pm 0.83 ^c	332 \pm 18.13 ^d	191 \pm 42.99 ^{b,c}
Met AdM	242 \pm 17.67 ^b	226 \pm 16.16 ^a	2.73 \pm 1.10 ^c	350 \pm 1.65 ^{c,d}	227 \pm 16.98 ^b
Stres + Kont	128 \pm 20.65 ^c	174 \pm 28.46 ^a	3.31 \pm 0.51 ^c	369 \pm 11.98 ^{c,d}	229 \pm 3.82 ^b
Stres + AdM	150 \pm 4.06 ^c	201 \pm 6.07 ^a	9.41 \pm 1.02 ^a	583 \pm 13.77 ^b	222 \pm 9.12 ^b
Stres + Met AdM	110 \pm 30.60 ^c	234 \pm 20.65 ^a	5.78 \pm 0.57 ^b	807 \pm 50.59 ^a	290 \pm 9.70 ^a

Çizelgedeki harflerin tanımı: Değerleri takip eden farklı harfler istatistiksel olarak farkın önemli olduğunu ($p < 0.05$), aynı harfler ise farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını göstermektedir ($p > 0.05$).

4.1. Antioksidatif Enzim Aktivite Sonuçları

4.1.1. Katalaz (CAT)

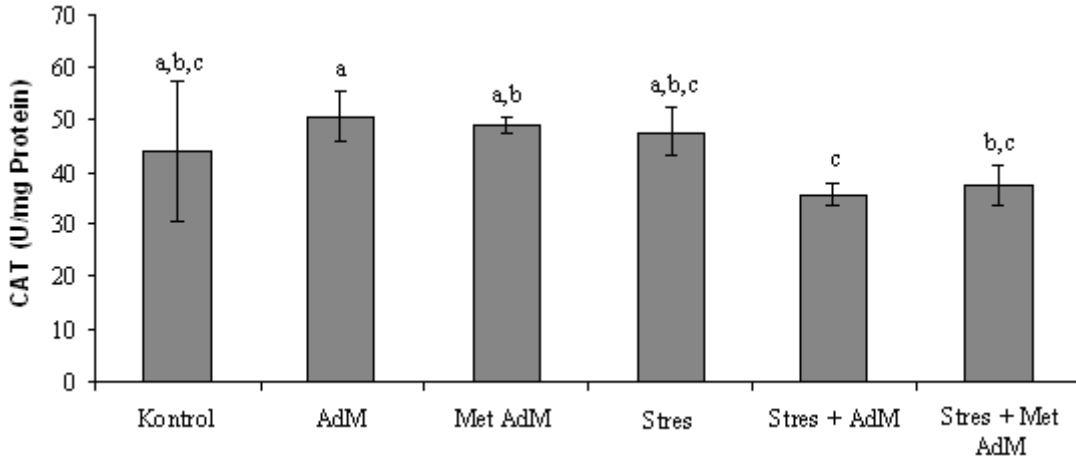
Karaciğer dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, enzim aktivitesi kontrol gruplarına göre AdM ve met-AdM grubunda azaldığı gözlenmiştir ve bu değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulama gruplarında ise; enzim aktivitesinin stres grubuna göre AdM ve Met-AdM gruplarında arttığı gözlenmiştir ($p<0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda AdM ve Met-AdM gruplarındaki enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre azaldığı gözlenmiştir ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda enzim aktivitesinin AdM uygulama grubunda arttığı ($p<0.05$), Met-AdM uygulama gruplarında ise stres uygulaması sonucunda enzim aktivitesinin değişmediği görülmüştür ($p>0.05$), (Şekil 4.1, Çizelge 4.1).



Şekil 4.1. Karaciğer dokusundaki CAT enzim aktivitesindeki değişiklikler. Uygulama gurupları arasındaki ikili karşılaştırmalarda, harfler üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farkın önemli olduğunu ($p<0.05$), aynı harfler ise istatistiksel olarak farkın önemli olmadığını göstermektedir ($p>0.05$). Bu durum diğer tüm grafikler için geçerlidir.

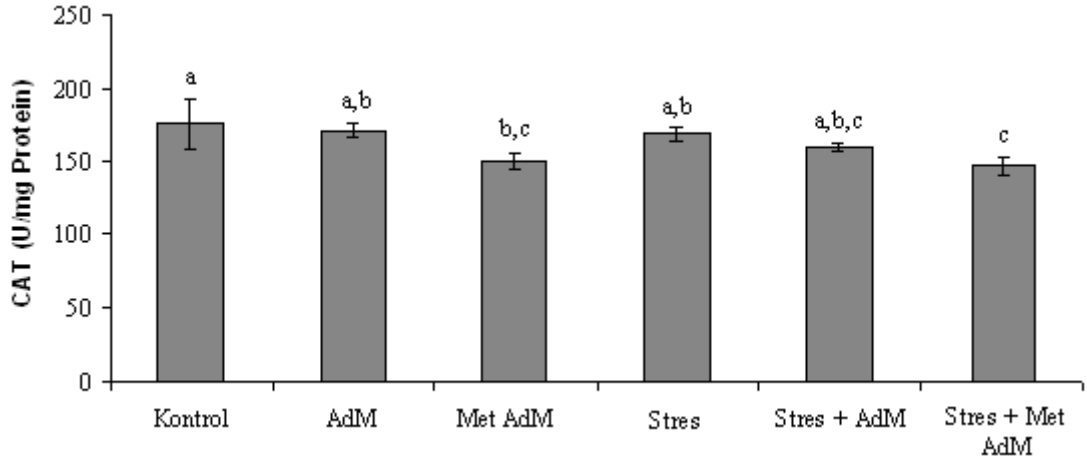
Akciğer dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, enzim aktivitesi kontrol gruplarına göre AdM ve met-AdM grubunda arttığı gözlenmiştir ve bu değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulama gruplarında ise; stres uygulama grubuna göre enzim aktivitesinin AdM ve Met-AdM gruplarında azaldığı gözlenmiştir ($p<0.05$).

Stres uygulaması yapılan gruplarda AdM ve Met-AdM gruplarındaki enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre azaldığı, stres uygulaması sonucunda enzim aktivitesinin AdM ve Met-AdM uygulama gruplarında azaldığı görülmüştür ($p<0.05$), (Şekil 4.2, Çizelge 4.1).



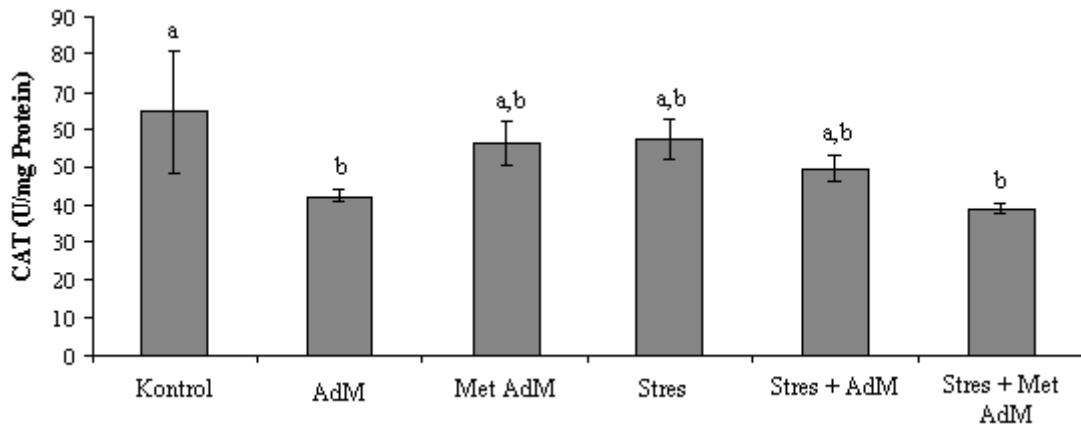
Şekil 4.2. Akciğer dokusundaki CAT enzim aktivitesindeki değişiklikler.

Böbrek dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, enzim aktivitesinin kontrol gruplarına göre AdM ve met-AdM grubunda azaldığı gözlenmiştir ve bu değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulama gruplarında ise; enzim aktivitesinin stres uygulama grubuna göre AdM ve Met-AdM gruplarında azaldığı gözlenmiştir ($p<0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda AdM ve Met-AdM gruplarındaki enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre azaldığı, stres uygulaması sonucunda enzim aktivitesinin AdM uygulama gruplarında ve Met AdM uygulama grubunda azaldığı bulunmuştur ($p<0.05$), (Şekil 4.3, Çizelge 4.1).



Şekil 4.3. Böbrek dokusundaki CAT enzim aktivitesindeki değişiklikler.

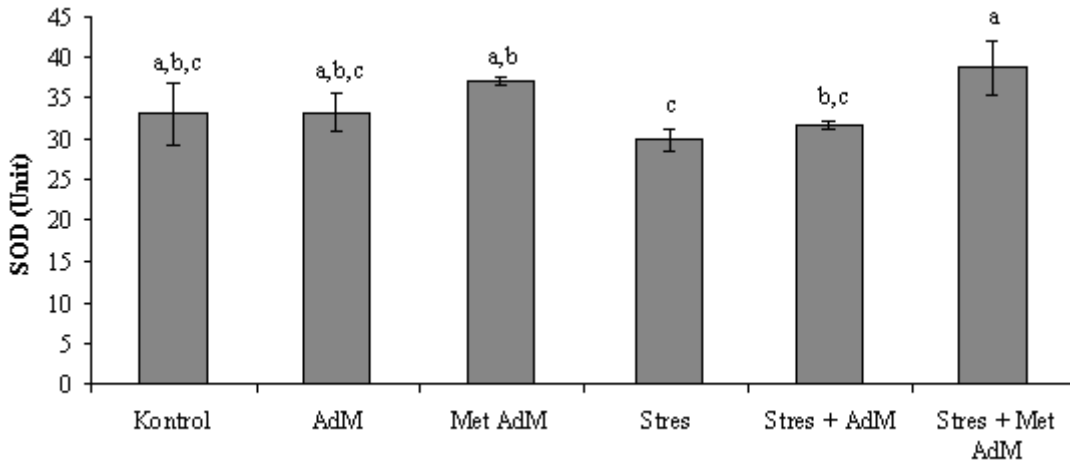
Kalp dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, enzim aktivitesi kontrol gruplarına göre AdM ve met-AdM grubunda azaldığı gözlenmiştir ve bu değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$). Stres uygulama gruplarında ise; enzim aktivitesinin stres grubuna göre AdM ve Met-AdM gruplarında azaldığı gözlenmiştir ($p < 0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda AdM ve Met-AdM gruplarındaki enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre azaldığı, stres uygulaması sonucunda enzim aktivitesinin AdM uygulama gruplarında arttığı, Met-AdM uygulama grubunda ise azaldığı görülmüştür ($p < 0.05$), (Şekil 4.4, Çizelge 4.1).



Şekil 4.4. Kalp dokusundaki CAT enzim aktivitesindeki değişiklikler.

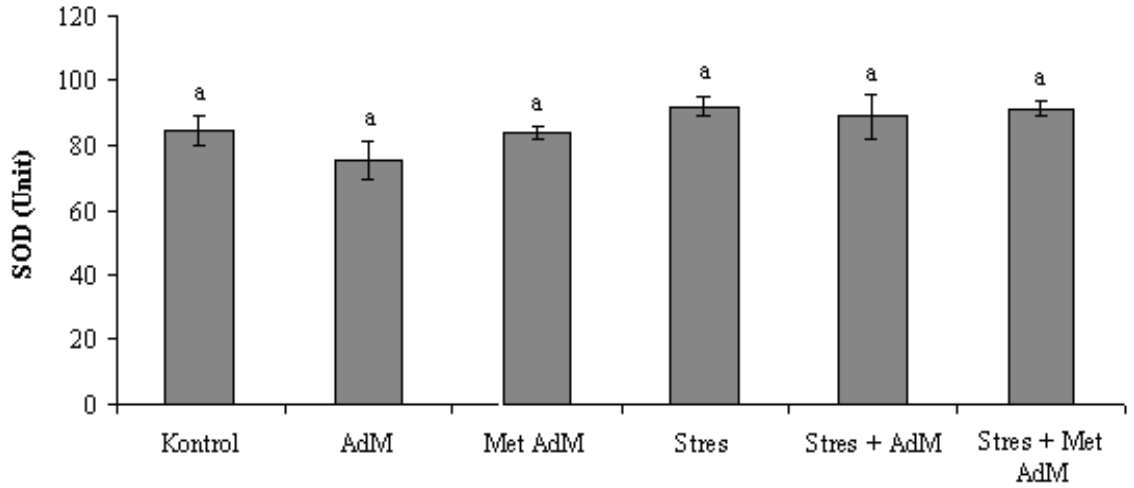
4.1.2. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Karaciğer dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, enzim aktivitesi kontrol gruplarına göre AdM grubunda değişmezken ($p>0.05$), met-AdM grubunda arttığı gözlenmiştir ve bu değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulama gruplarında ise; enzim aktivitesinin stres grubuna göre AdM ve Met-AdM gruplarında arttığı gözlenmiştir ($p<0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda enzim aktivitesi kontrol grubuna göre AdM gruplarında azaldığı, Met-AdM gruplarında ise enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre arttığı saptanmıştır ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda enzim aktivitesinin AdM uygulama gruplarında azaldığı Met-AdM uygulama grubunda ise arttığı görülmüştür ($p<0.05$). (Şekil 4.5, Çizelge 4.1).



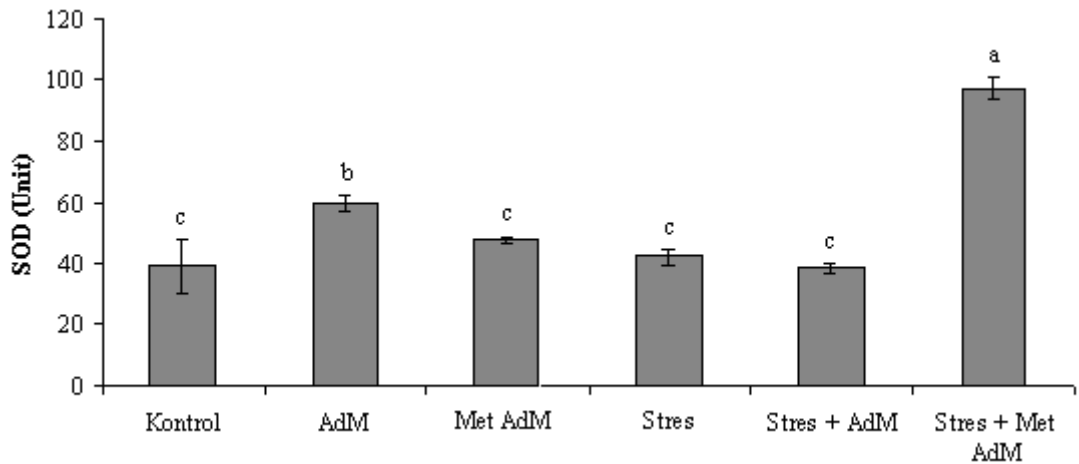
Şekil 4.5. Karaciğer dokusundaki SOD enzim aktivitesindeki değişiklikler.

Akciğer dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, enzim aktivitesi kontrol gruplarına göre AdM ve met-AdM grubunda azaldığı gözlenmiştir ancak bu değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$). Stres uygulama gruplarında ise; enzim aktivitesinin stres uygulama grubuna göre AdM ve Met-AdM gruplarında azaldığı ancak bu değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda Met-AdM gruplarındaki enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre değişmediği, AdM grubunda ise azaldığı ancak bu değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$). Stres uygulaması sonucunda enzim aktivitesinin AdM ve Met-AdM uygulama gruplarında arttığı fakat bu değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$). (Şekil 4.6, Çizelge 4.1).



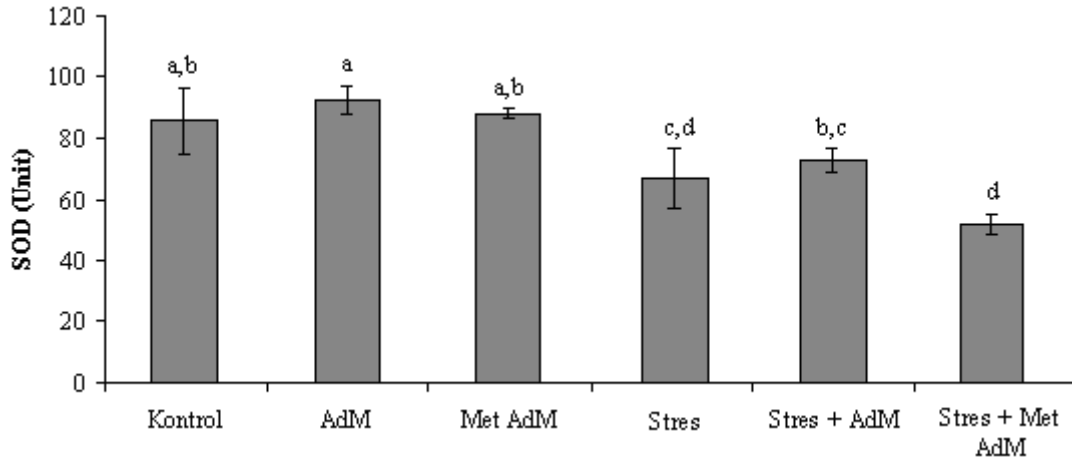
Şekil 4.6. Akciğer dokusundaki SOD enzim aktivitesindeki değişiklikler.

Böbrek dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, enzim aktivitesinin kontrol gruplarına göre AdM ve met-AdM grubunda arttığı gözlenmiştir ve bu değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$). Stres uygulama gruplarında ise; enzim aktivitesinin stres grubuna göre AdM gruplarında azaldığı ancak bu değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p > 0.05$), Met-AdM grubunda ise; arttığı gözlenmiştir ($p < 0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda AdM gruplarındaki enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre değişmezken ($p > 0.05$), Met-AdM uygulama grubunda artmıştır ($p < 0.05$). Stres uygulaması sonucunda enzim aktivitesinin AdM uygulama gruplarında azaldığı, Met AdM uygulama grubunda ise arttığı bulunmuştur ($p < 0.05$), (Şekil 4.7, Çizelge 4.1).



Şekil 4.7. Böbrek dokusundaki SOD enzim aktivitesindeki değişiklikler.

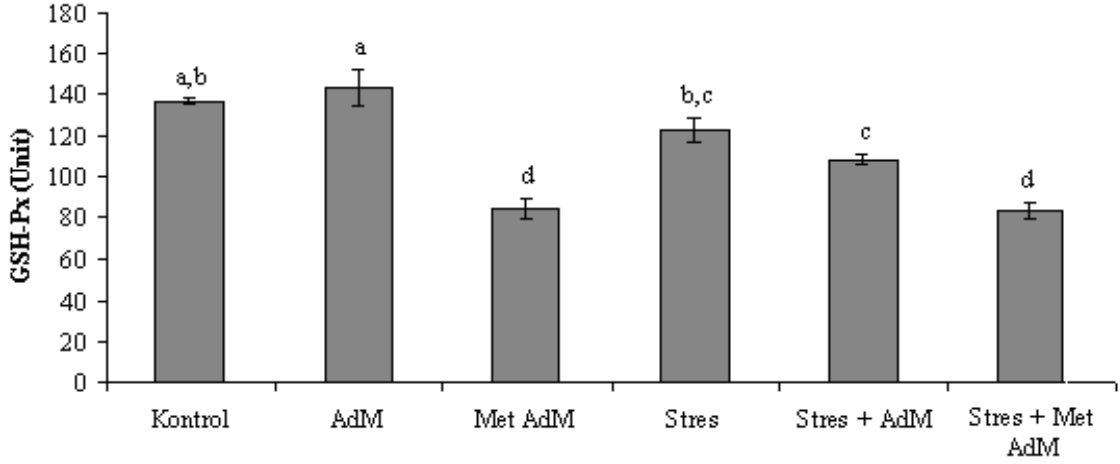
Kalp dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, enzim aktivitesi kontrol gruplarına göre AdM grubunda artarken ($p<0.05$), Met-AdM grubunda arttığı ancak değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0.05$). Stres uygulama gruplarında ise; enzim aktivitesinin stres grubuna göre AdM grubunda azaldığı ancak değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0.05$), Met-AdM gruplarında ise arttığı gözlenmiştir ($p<0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre AdM grubunda arttığı ancak değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0.05$), Met-AdM grubunda ise arttığı saptanmıştır ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda enzim aktivitesinin AdM ve Met-AdM uygulama gruplarında azaldığı görülmüştür ($p<0.05$), (Şekil 4.8, Çizelge 4.1).



Şekil 4.8. Kalp dokusundaki SOD enzim aktivitesindeki değişiklikler.

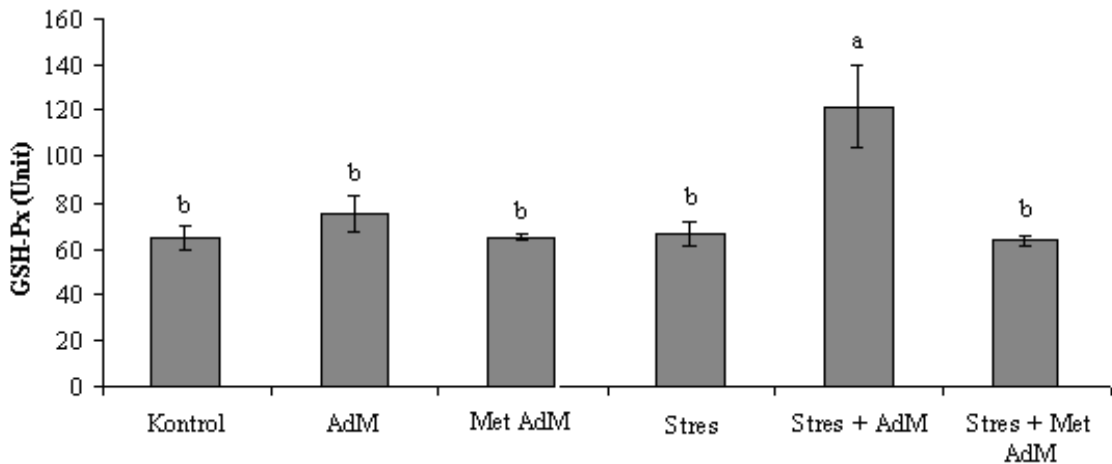
4.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-P_x)

Karaciğer dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, enzim aktivitesinin kontrol gruplarına göre AdM grubunda arttığı, Met-AdM grubunda azaldığı gözlenmiştir ve bu değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulama gruplarında ise; enzim aktivitesinin stres grubuna göre AdM ve Met-AdM gruplarında azaldığı gözlenmiştir ($p<0.05$). Stres uygulama grubunda kontrol grubuna göre AdM ve met-AdM gruplarında enzim aktivitesinin azaldığı saptanmıştır ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda enzim aktivitesinin AdM uygulama gruplarında azaldığı ($p<0.05$), Met AdM uygulama grubunda ise değişmediği bulunmuştur ($p>0.05$). (Şekil 4.9 , Çizelge 4.1).



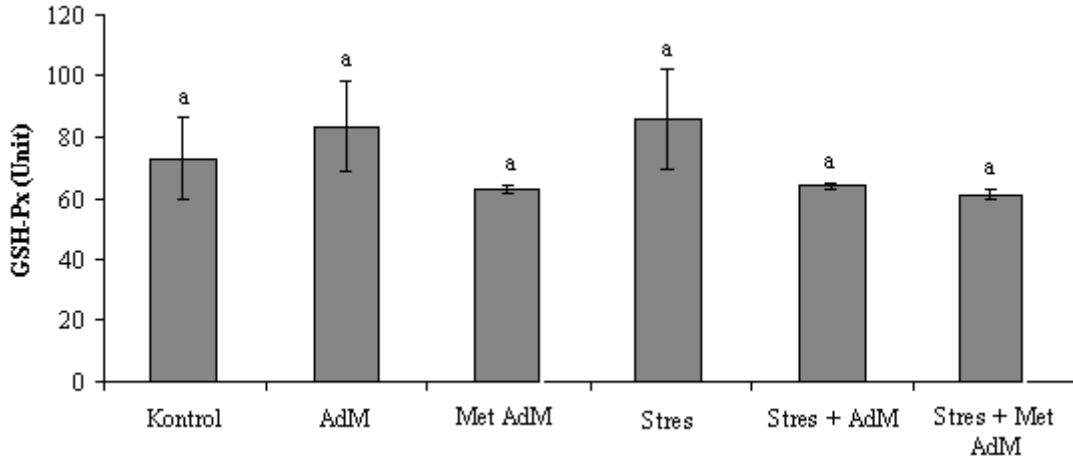
Şekil 4.9. Karaciğer dokusundaki GSH-P_x enzim aktivitesindeki değişiklikler.

Akciğer dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, enzim aktivitesinin kontrol gruplarına göre AdM uygulama grubunda arttığı ancak bu değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0.05$), Met-AdM gruplarında ise; değişmediği saptanmıştır ($p>0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda enzim aktivitesinin stres grubuna göre, AdM uygulama grubunda artarken ($p<0.05$), Met-AdM uygulama grubunda istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Stres uygulaması sonucunda enzim aktivitesinin kontrole göre AdM uygulama gruplarında arttığı ($p<0.05$), Met AdM uygulama grubunda ise değişmediği bulunmuştur ($p>0.05$). Stres uygulaması sonucunda enzim aktivitesinin AdM uygulama gruplarında arttığı ($p<0.05$), Met AdM uygulama grubunda ise değişmediği bulunmuştur ($p>0.05$), (Şekil 4.10, Çizelge 4.1).



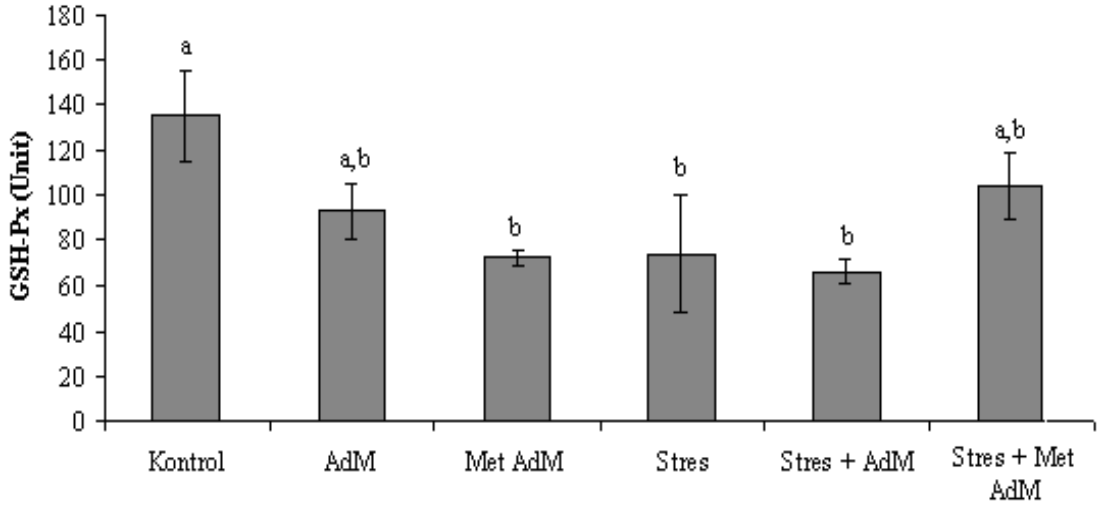
Şekil 4.10. Akciğer dokusundaki GSH-P_x enzim aktivitesindeki değişiklikler.

Böbrek dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, enzim aktivitesinin kontrol gruplarına göre AdM grubunda arttığı, Met-AdM uygulama grubunda ise azaldığı ancak değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda enzim aktivitesinin stres grubuna göre, AdM ve Met-AdM uygulama grubunda azaldığı ancak bu değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$). Stres uygulaması sonucunda enzim aktivitesinin kontrole göre AdM ve Met AdM uygulama grubunda azaldığı ancak değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$). Stres uygulaması sonucunda enzim aktivitesinin AdM uygulama grubunda azaldığı ancak bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ve Met AdM uygulama grubunda ise enzim aktivitesinin değişmediği saptanmıştır ($p>0.05$), (Şekil 4.11, Çizelge 4.1).



Şekil 4.11. Böbrek dokusundaki GSH-P_x enzim aktivitesindeki değişiklikler.

Kalp dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, enzim aktivitesinin kontrol gruplarına göre AdM ve Met-AdM grubunda azaldığı saptanmıştır ($p<0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda enzim aktivitesinin stres grubuna göre, AdM uygulama grubunda azalırken ancak bu değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0.05$), Met-AdM uygulama grubunda arttığı görülmüştür ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda enzim aktivitesinin kontrole göre AdM ve Met AdM uygulama grubunda azaldığı saptanmıştır ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda enzim aktivitesinin AdM uygulama gruplarında azaldığı ($p<0.05$), Met AdM uygulama grubunda ise arttığı bulunmuştur ($p<0.05$), (Şekil 4.12, Çizelge 4.1).

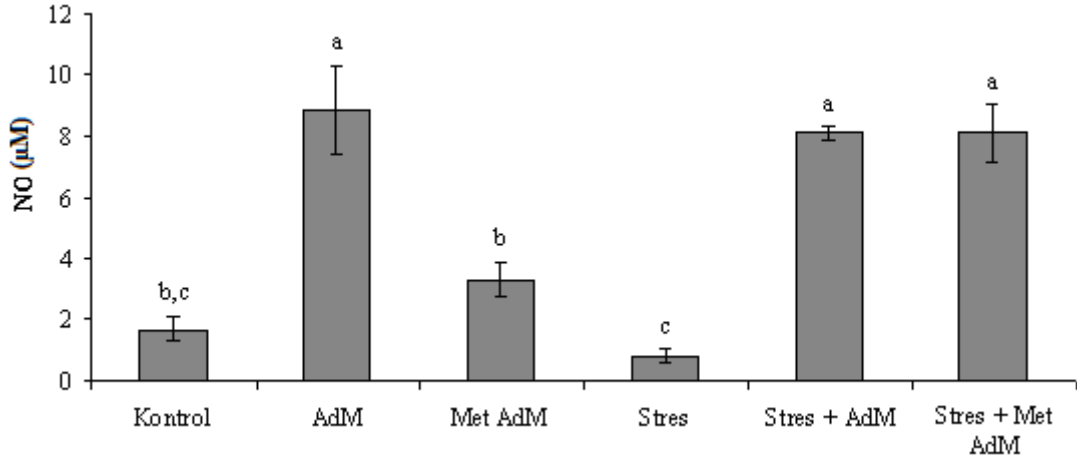


Şekil 4.12. Kalp dokusundaki GSH-P_x enzim aktivitesindeki değişiklikler.

4.2. Anjiojenik Faktörlerdeki Değişiklikler

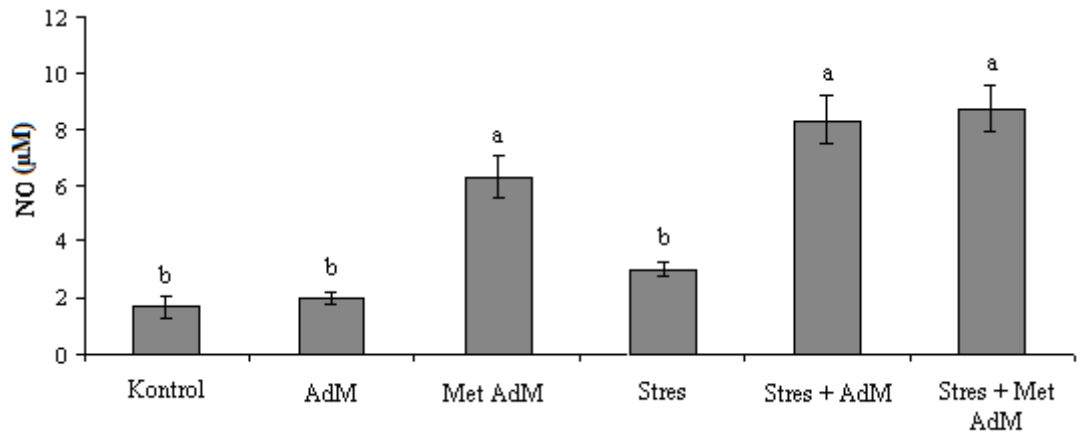
4.2.1. Nitrik Oksit (NO)

Karaciğer dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, NO seviyelerinin kontrol gruplarına göre AdM ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda NO seviyelerinin stres grubuna göre, AdM ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda NO seviyelerinin kontrole göre AdM ve Met AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda NO seviyelerinin AdM azaldığı ancak bu değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0.05$) Met AdM uygulama gruplarında ise arttığı saptanmıştır ($p<0.05$), (Şekil 4.13, Çizelge 4.1).



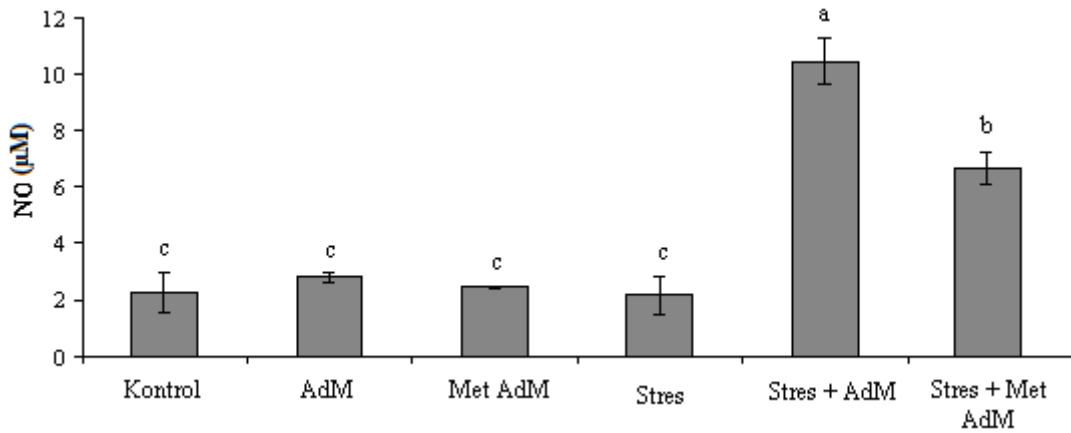
Şekil 4.13. Karaciğer dokusundaki NO düzeyindeki değişiklikler. Uygulama gurupları arasındaki ikili karşılaştırmalarda, barlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farkın önemli olduğunu ($p<0.05$), aynı harfler ise istatistiksel olarak farkın önemli olmadığını göstermektedir ($p>0.05$). Bu durum aşağıdaki tüm grafikler için geçerlidir.

Akciğer dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, NO seviyelerinin kontrol gruplarına göre AdM uygulama grubunda değişmezken ($p>0.05$), Met-AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda NO seviyelerinin stres grubuna göre, AdM ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda NO seviyelerinin kontrole göre AdM ve Met AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda NO seviyelerinin AdM ve Met AdM uygulama gruplarında arttığı saptanmıştır ($p<0.05$), (Şekil 4.14, Çizelge 4.1).



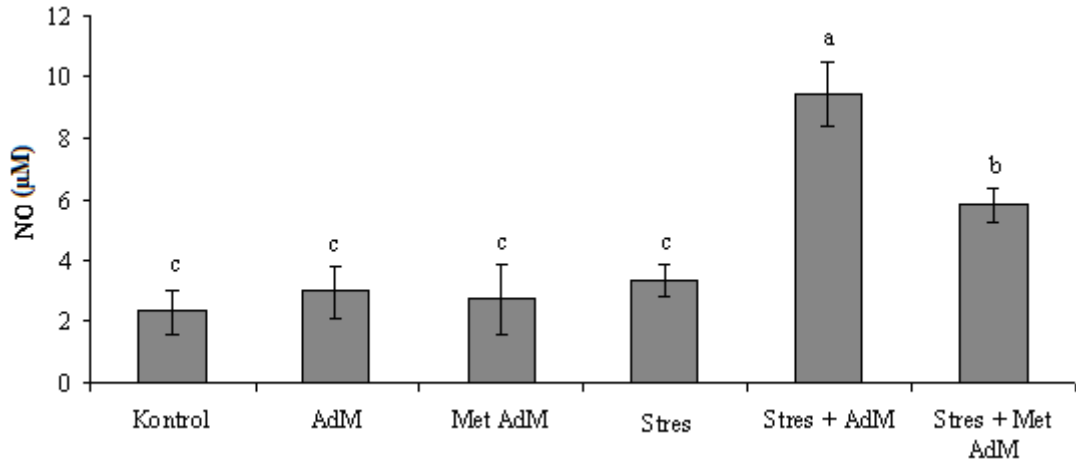
Şekil 4.14. Akciğer dokusundaki NO düzeyindeki değişiklikler.

Beyin dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, NO seviyelerinin kontrol gruplarına göre AdM uygulama ve Met-AdM uygulama grubunda değişmediği görülmüştür ($p>0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda NO seviyelerinin stres grubuna göre, AdM ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda NO seviyelerinin kontrole göre AdM ve Met AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda NO seviyelerinin AdM ve Met AdM uygulama gruplarında arttığı saptanmıştır ($p<0.05$). (Şekil 4.15, Çizelge 4.1).



Şekil 4.15. Beyin dokusundaki NO düzeyindeki değişiklikler.

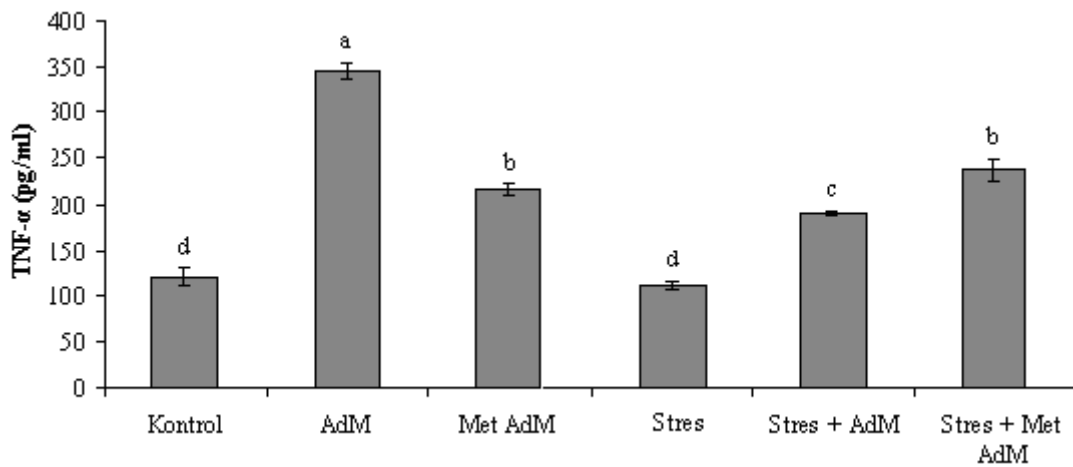
Kalp dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, NO seviyelerinin kontrol gruplarına göre AdM uygulama ve Met-AdM uygulama grubunda değişmediği görülmüştür ($p>0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda NO seviyelerinin stres grubuna göre, AdM ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda NO seviyelerinin kontrole göre AdM ve Met AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda NO seviyelerinin AdM ve Met AdM uygulama gruplarında arttığı saptanmıştır ($p<0.05$), (Şekil 4.16, Çizelge 4.1).



Şekil 4.16. Kalp dokusundaki NO düzeyindeki değişiklikler.

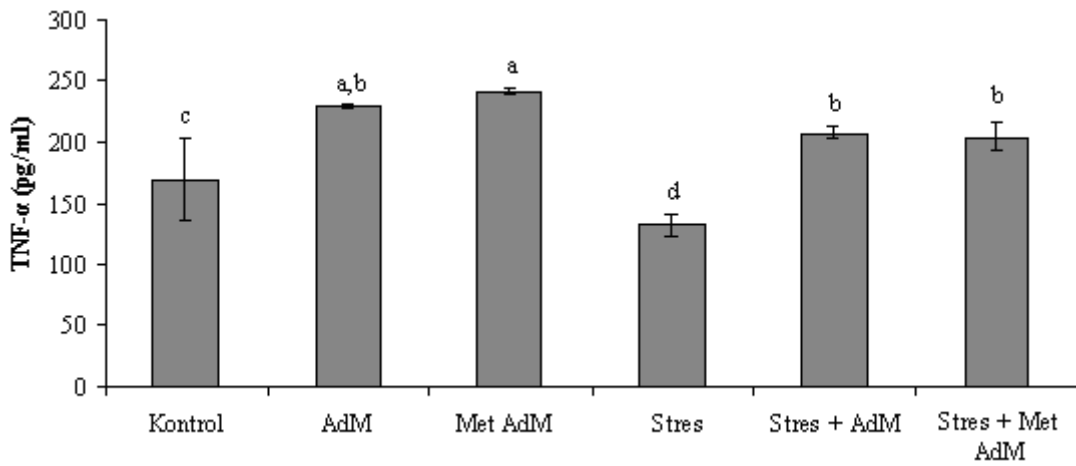
4.2.2. Tümör Nekrozis-alfa (TNF- α) Faktörü

Karaciğer dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, TNF- α seviyelerinin kontrol gruplarına göre AdM uygulama ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı görülmüştür ($p < 0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda TNF- α seviyelerinin stres grubuna göre, AdM ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p < 0.05$). Stres uygulaması sonucunda TNF- α seviyelerinin kontrole göre AdM ve Met AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p < 0.05$). Stres uygulaması sonucunda TNF- α seviyelerinin AdM uygulama grubunda azaldığı ($p < 0.05$) ve Met AdM uygulama gruplarında değişmediği saptanmıştır ($p > 0.05$), (Şekil 4.17, Çizelge 4.2).



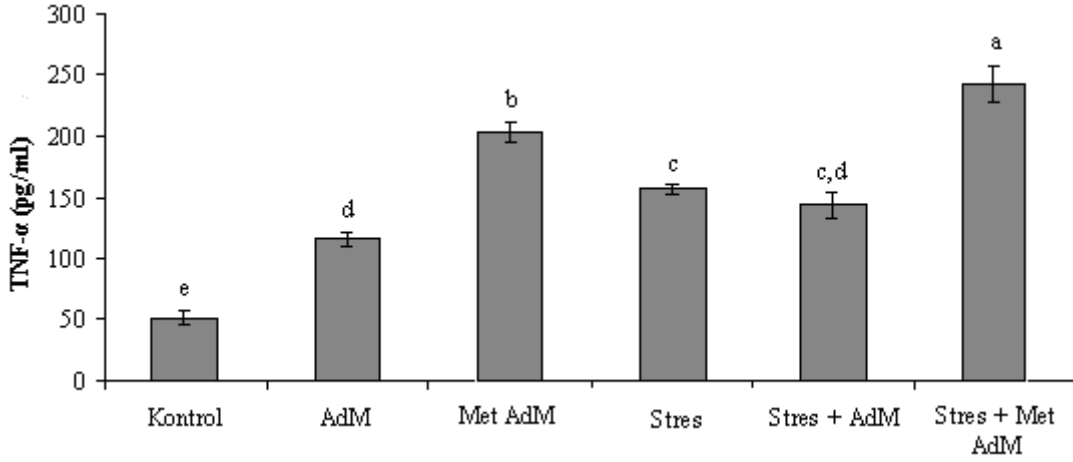
Şekil 4.17. Karaciğer dokusundaki TNF- α düzeyindeki değişiklikler.

Akciğer dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, TNF- α seviyelerinin kontrol gruplarına göre AdM uygulama ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı görülmüştür ($p<0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda TNF- α seviyelerinin stres grubuna göre, AdM ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda TNF- α seviyelerinin kontrole göre AdM ve Met AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda TNF- α seviyelerinin AdM ve Met AdM uygulama gruplarında azaldığı saptanmıştır ($p<0.05$), (Şekil 4.18, Çizelge 4.2).



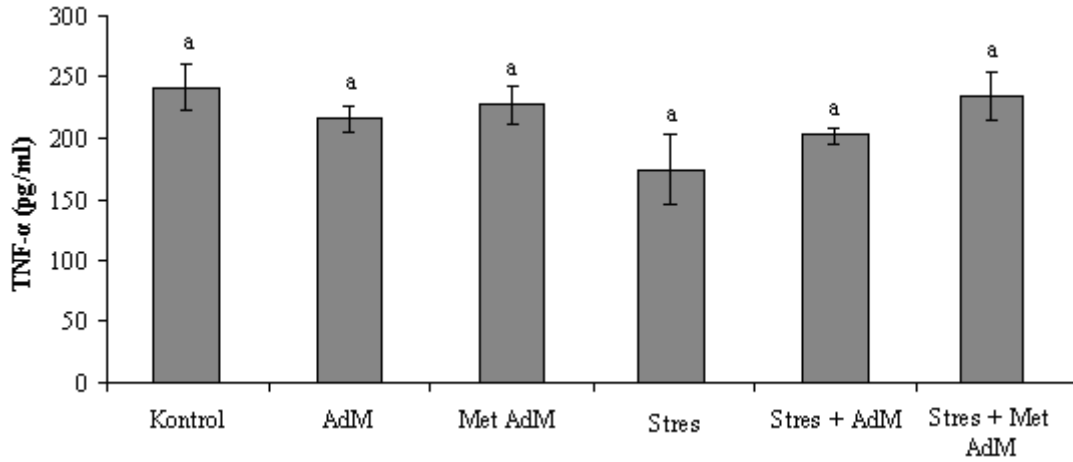
Şekil 4.18. Akciğer dokusundaki TNF- α düzeyindeki değişiklikler.

Beyin dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, TNF- α seviyelerinin kontrol gruplarına göre AdM uygulama ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı görülmüştür ($p<0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda TNF- α seviyelerinin stres grubuna göre, AdM uygulama grubunda azaldığı, Met-AdM uygulama grubunda ise arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda TNF- α seviyelerinin kontrole göre AdM ve Met AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda TNF- α seviyelerinin AdM ve Met AdM uygulama gruplarında arttığı saptanmıştır ($p<0.05$), (Şekil 4.19, Çizelge 4.2).



Şekil 4.19. Beyin dokusundaki TNF- α düzeyindeki değişiklikler.

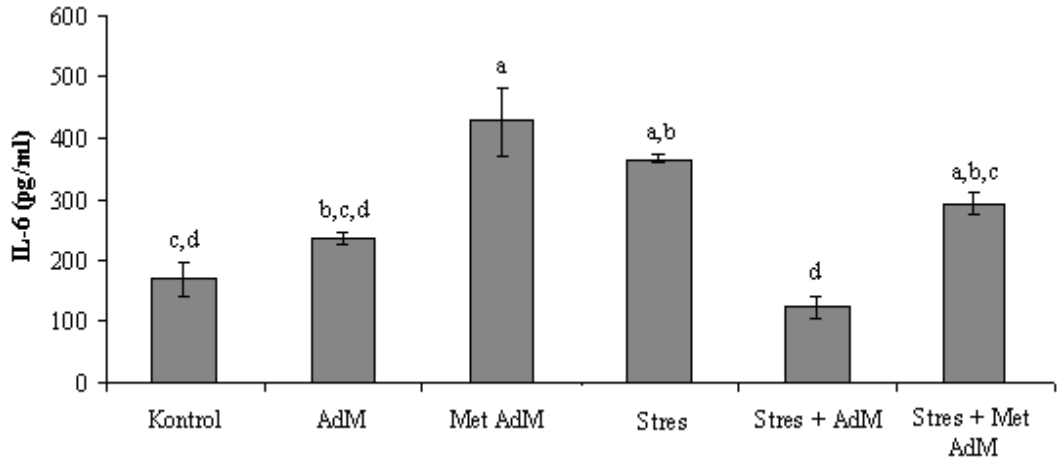
Kalp dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, TNF- α seviyelerinin kontrol gruplarına göre AdM uygulama ve Met-AdM uygulama grubunda azaldığı ancak değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda TNF- α seviyelerinin stres grubuna göre, AdM ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı ancak değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Stres uygulaması sonucunda TNF- α seviyelerinin kontrole göre AdM ve Met AdM uygulama grubunda azaldığı ancak bu değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Stres uygulaması sonucunda TNF- α seviyelerinin AdM ve Met AdM uygulama gruplarında değişmediği görülmüştür ($p>0.05$), (Şekil 4.20, Çizelge 4.2).



Şekil 4.20. Kalp dokusundaki TNF- α düzeyindeki değişiklikler.

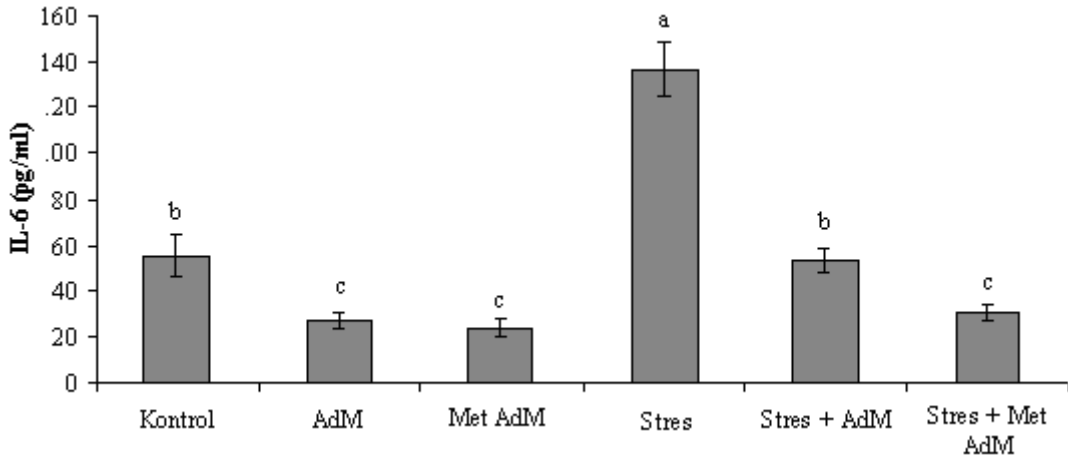
4.2.3. İnterlökin-6 (IL-6)

Karaciğer dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, IL-6 seviyelerinin kontrol gruplarına göre AdM ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda IL-6 seviyelerinin stres grubuna göre, AdM ve Met-AdM uygulama grubunda azaldığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda IL-6 seviyelerinin kontrole göre AdM uygulama grubunda azaldığı, Met-AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda IL-6 seviyelerinin AdM ve Met-AdM uygulama grubunda azaldığı saptanmıştır ($p<0.05$), (Şekil 4.21, Çizelge 4.2).



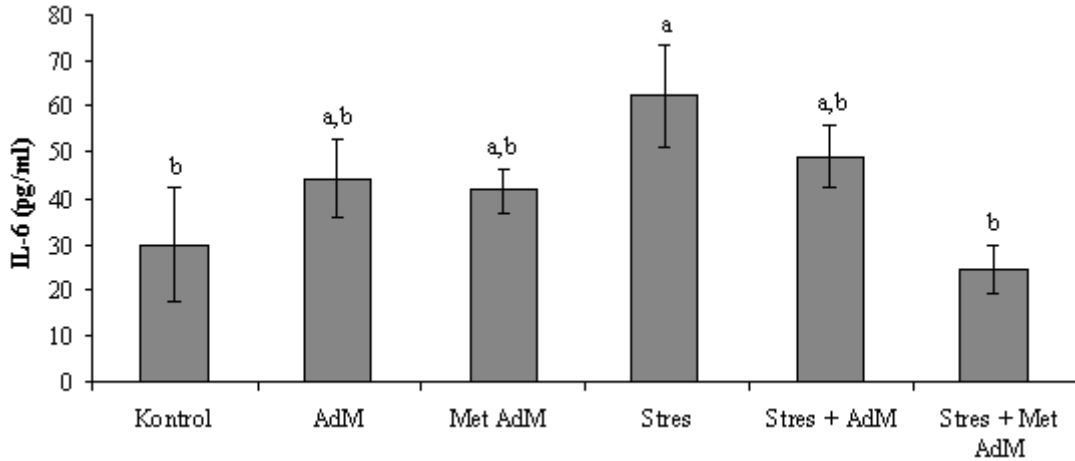
Şekil 4.21 Karaciğer dokusundaki IL-6 düzeyindeki değişiklikler.

Akciğer dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, IL-6 seviyelerinin kontrol gruplarına göre AdM ve Met-AdM uygulama grubunda azaldığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda IL-6 seviyelerinin stres grubuna göre, AdM ve Met-AdM uygulama grubunda azaldığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda IL-6 seviyelerinin kontrole göre AdM grubunda değişmezken ($p>0.05$), Met-AdM uygulama grubunda azaldığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda IL-6 seviyelerinin AdM uygulama grubunda arttığı ($p<0.05$) ve Met-AdM uygulama grubunda değişmediği saptanmıştır ($p>0.05$), (Şekil 4.22, Çizelge 4.2).



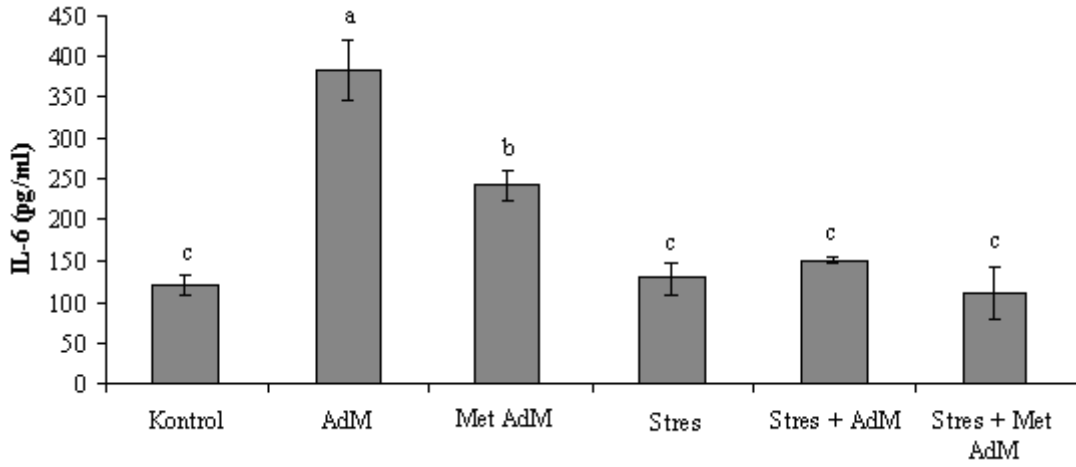
Şekil 4.22. Akciğer dokusundaki IL-6 düzeyindeki değişiklikler.

Beyin dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, IL-6 seviyelerinin kontrol gruplarına göre AdM ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda IL-6 seviyelerinin stres grubuna göre, AdM ve Met-AdM uygulama grubunda azaldığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda IL-6 seviyelerinin kontrole göre AdM grubunda artarken ($p<0.05$), Met-AdM uygulama grubunda değişmediği bulunmuştur ($p>0.05$). Stres uygulaması sonucunda IL-6 seviyelerinin AdM uygulama grubunda değişmezken ($p>0.05$), Met-AdM uygulama grubunda azaldığı saptanmıştır ($p<0.05$), (Şekil 4.23, Çizelge 4.2).



Şekil 4.23. Beyin dokusundaki IL-6 düzeyindeki değişiklikler.

Kalp dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, IL-6 seviyelerinin kontrol gruplarına göre AdM ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda IL-6 seviyelerinin stres grubuna göre, AdM ve Met-AdM uygulama grubunda değişmediği bulunmuştur ($p>0.05$). Stres uygulaması sonucunda IL-6 seviyelerinin kontrole göre AdM ve Met-AdM uygulama grubunda değişmediği bulunmuştur ($p>0.05$). Stres uygulaması sonucunda IL-6 seviyelerinin AdM ve Met-AdM uygulama grubunda azaldığı saptanmıştır ($p<0.05$), (Şekil 4.24, Çizelge 4.2).

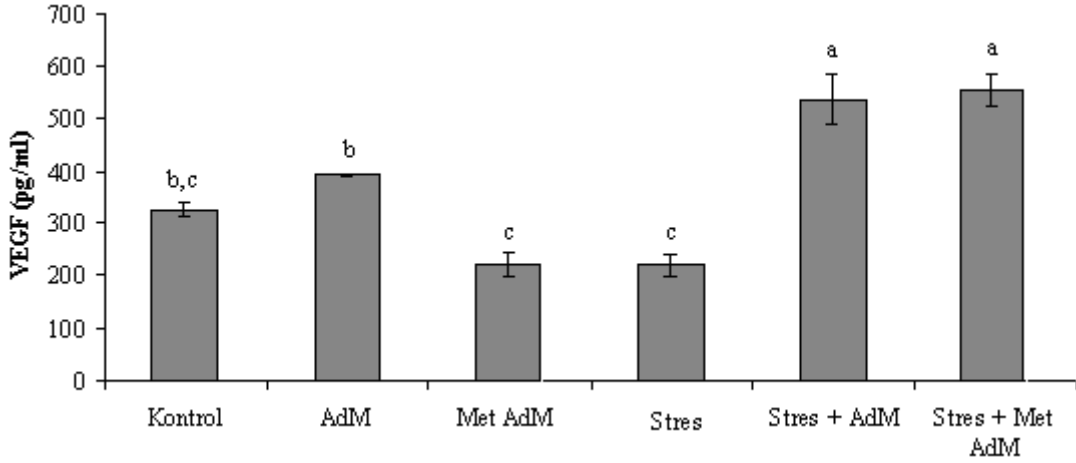


Şekil 4.24. Kalp dokusundaki IL-6 düzeyindeki değişiklikler.

4.2.4. Vasküler Endotelial Büyüme Faktör (VEGF)

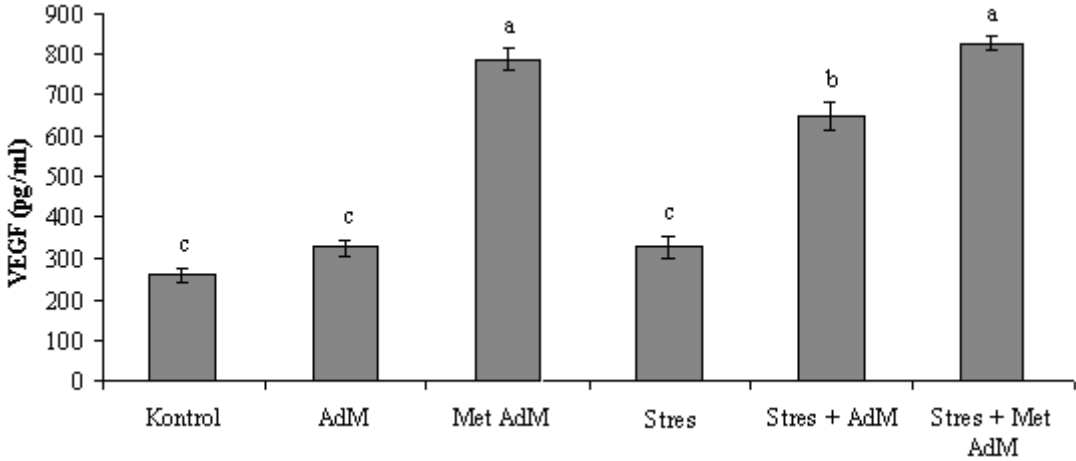
Karaciğer dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, VEGF seviyelerinin kontrol gruplarına göre AdM uygulama grubunda arttığı Met-AdM uygulama grubunda azaldığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda VEGF seviyelerinin stres grubuna göre, AdM ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$).

Stres uygulaması sonucunda VEGF seviyelerinin kontrole göre AdM ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda VEGF seviyelerinin AdM ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı saptanmıştır ($p<0.05$), (Şekil 4.25, Çizelge 4.2).



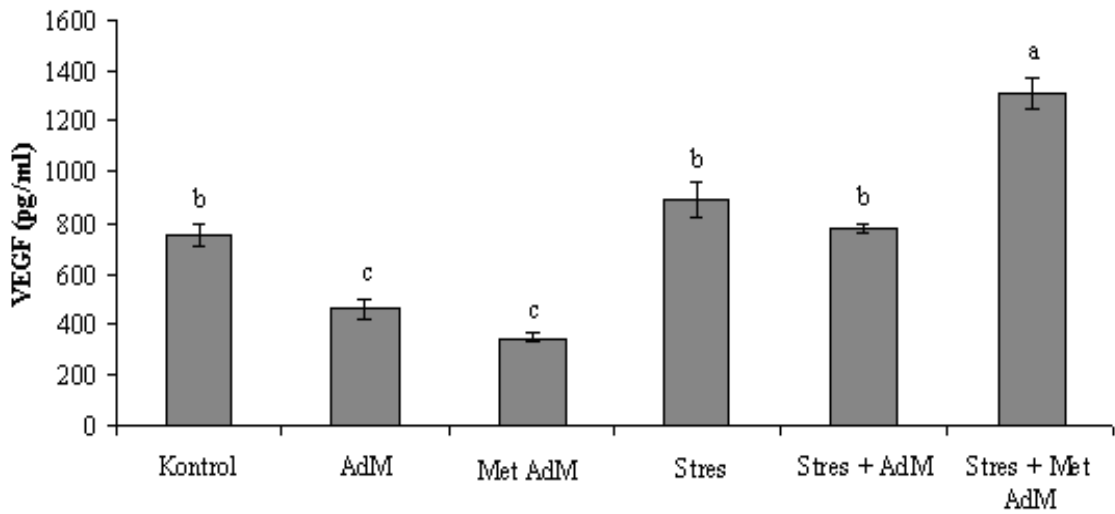
Şekil 4.25. Karaciğer dokusundaki VEGF düzeyindeki değişiklikler.

Akciğer dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, VEGF seviyelerinin kontrol gruplarına göre AdM uygulama grubunda değişmediği ($p>0.05$), Met-AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda VEGF seviyelerinin stres grubuna göre, AdM ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda VEGF seviyelerinin kontrole göre AdM ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda VEGF seviyelerinin AdM grubunda arttığı ($p<0.05$), Met-AdM uygulama grubunda ise; değişmediği saptanmıştır ($p>0.05$), (Şekil 4.26, Çizelge 4.2).



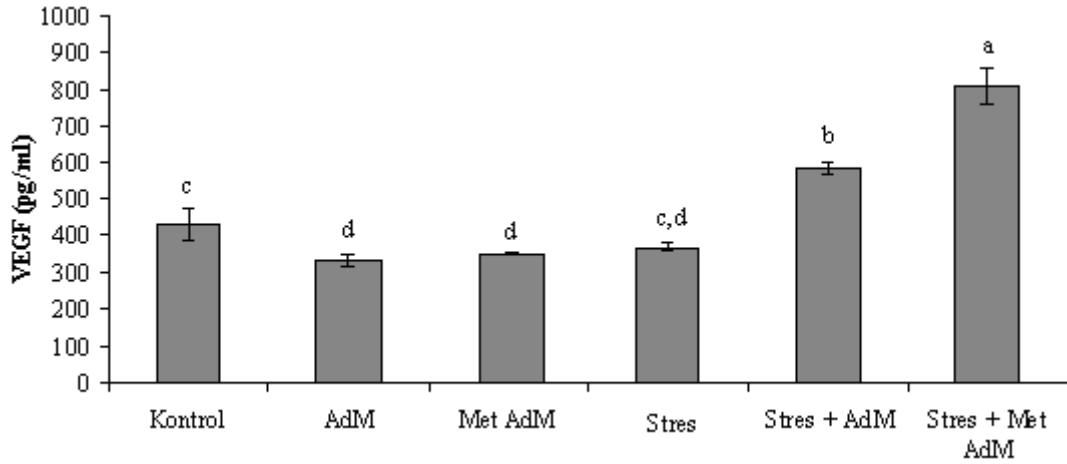
Şekil 4.26. Akciğer dokusundaki VEGF düzeyindeki değişiklikler.

Beyin dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, VEGF seviyelerinin kontrol gruplarına göre AdM ve Met-AdM uygulama grubunda azaldığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda VEGF seviyelerinin stres grubuna göre, AdM uygulama grubunda azaldığı ancak bu değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$), Met-AdM uygulama grubunda ise arttığı saptanmıştır ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda VEGF seviyelerinin kontrole göre AdM uygulama grubunda değişmediği ($p>0.05$), Met-AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda VEGF seviyelerinin AdM ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı saptanmıştır ($p<0.05$), (Şekil 4.27, Çizelge 4.2).



Şekil 4.27. Beyin dokusundaki VEGF düzeyindeki değişiklikler.

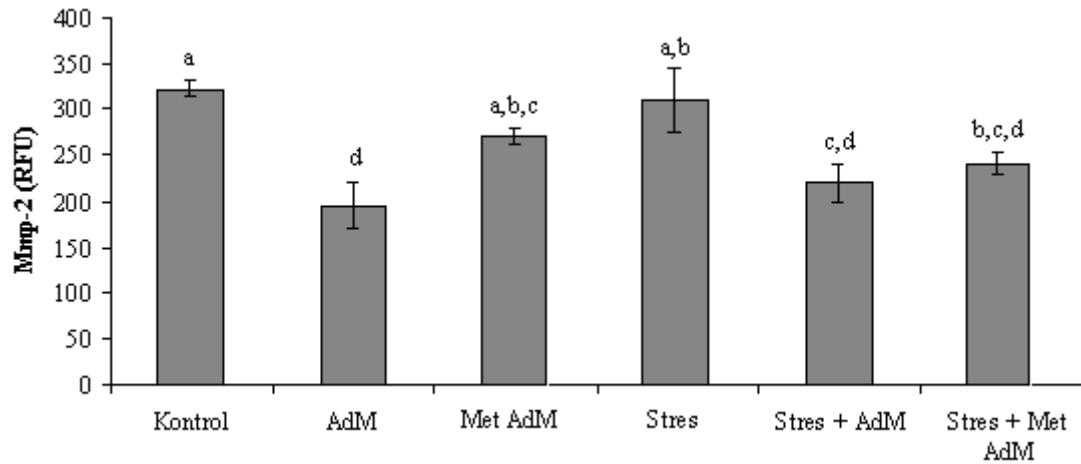
Kalp dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, VEGF seviyelerinin kontrol gruplarına göre AdM ve Met-AdM uygulama grubunda azaldığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda VEGF seviyelerinin stres grubuna göre, AdM uygulama ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı saptanmıştır ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda VEGF seviyelerinin kontrole göre AdM ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda VEGF seviyelerinin AdM ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı saptanmıştır ($p<0.05$), (Şekil 4.27, Çizelge 4.2).



Şekil 4.28. Kalp dokusundaki VEGF düzeyindeki değişiklikler.

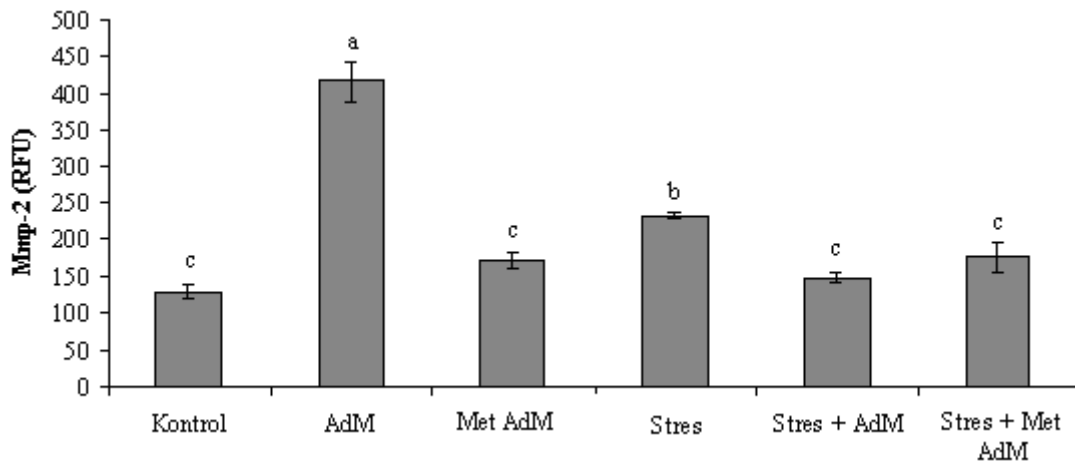
4.2.5. Matriks Metalloproteinaz (MMP-2)

Karaciğer dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, MMP-2 enzim aktivitesinin kontrol gruplarına göre AdM ve Met-AdM uygulama grubunda azaldığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda MMP-2 enzim aktivitesinin stres grubuna göre, AdM ve Met-AdM uygulama grubunda azaldığı saptanmıştır ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda MMP-2 enzim aktivitesinin kontrole göre AdM ve Met-AdM uygulama grubunda azaldığı bulunmuştur ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda MMP-2 enzim aktivitesinin AdM uygulama grubunda arttığı, Met-AdM uygulama grubunda azaldığı saptanmıştır ($p<0.05$), (Şekil 4.29, Çizelge 4.2).



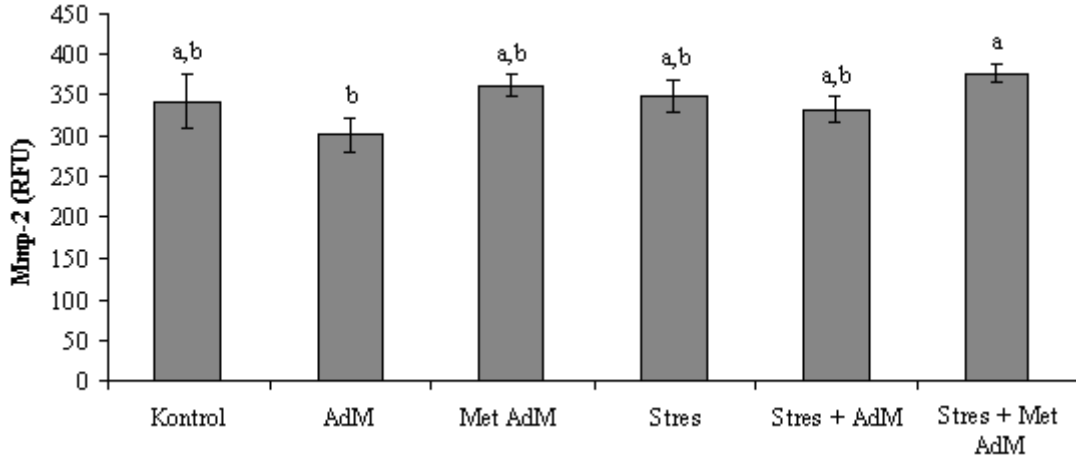
Şekil 4.29. Karaciğer dokusundaki MMP-2 enzim aktivitesindeki değişiklikler.

Akciğer dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, MMP-2 enzim aktivitesinin kontrol gruplarına göre AdM uygulama artarken ($p<0.05$), Met-AdM uygulama grubunda değişmediği bulunmuştur ($p>0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda MMP-2 enzim aktivitesinin stres grubuna göre, AdM ve Met-AdM uygulama grubunda azaldığı saptanmıştır ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda MMP-2 enzim aktivitesinin kontrole göre AdM ve Met-AdM uygulama değişmediği saptanmıştır ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda MMP-2 enzim aktivitesinin AdM uygulama grubunda azaldığı ($p<0.05$), Met-AdM uygulama grubunda değişmediği saptanmıştır ($p>0.05$), (Şekil 4.30, Çizelge 4.2).



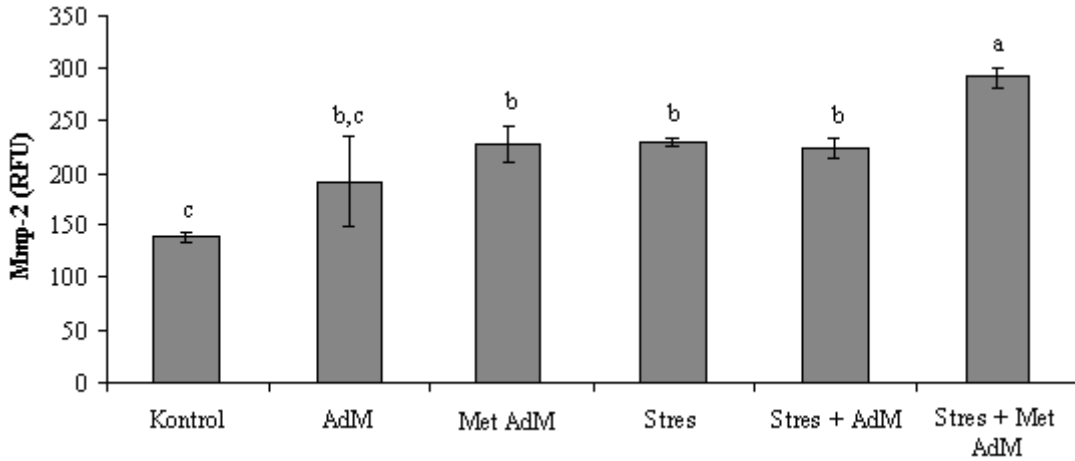
Şekil 4.30. Akciğer dokusundaki MMP-2 enzim aktivitesindeki değişiklikler.

Beyin dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, MMP-2 enzim aktivitesinin kontrol gruplarına göre AdM uygulama grubunda azaldığı bulunmuştur ($p<0.05$), Met-AdM uygulama grubunda ise, değişmediği saptanmıştır ($p>0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda MMP-2 enzim aktivitesinin stres grubuna göre AdM uygulama grubunda değişmezken ($p>0.05$), Met-AdM uygulama grubunda arttığı saptanmıştır ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda MMP-2 enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre AdM uygulama grubunda değişmezken ($p>0.05$), Met-AdM uygulam grubunda arttığı saptanmıştır ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda MMP-2 enzim aktivitesinin AdM ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı saptanmıştır ($p<0.05$). (Şekil 4.31, Çizelge 4.2).



Şekil 4.31. Beyin dokusundaki MMP-2 enzim aktivitesindeki değişiklikler.

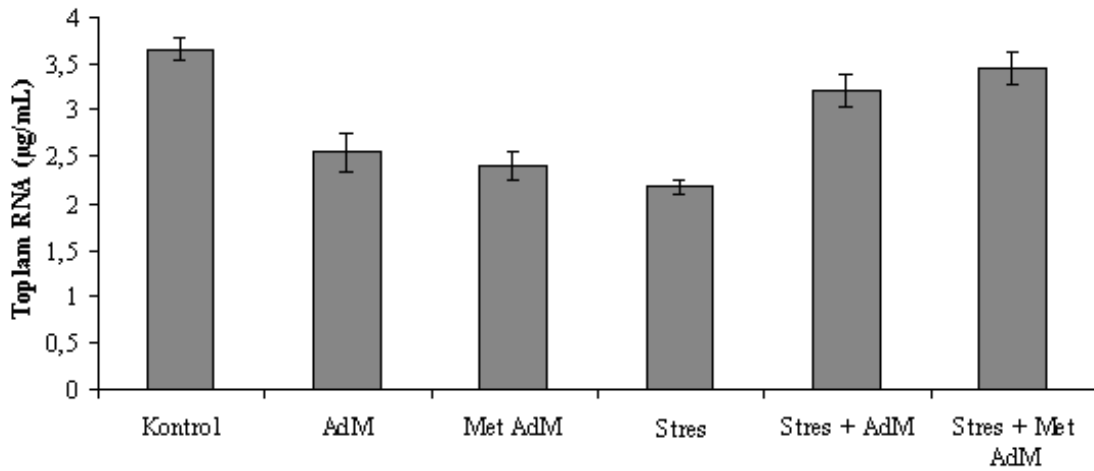
Kalp dokusunda stres uygulaması yapılmayan gruplarda, MMP-2 enzim aktivitesinin kontrol gruplarına göre AdM ve Met-AdM uygulama grubunda ise, arttığı saptanmıştır ($p < 0.05$). Stres uygulaması yapılan gruplarda MMP-2 enzim aktivitesinin stres grubuna göre AdM uygulama grubunda değişmediği ($p > 0.05$), Met-AdM uygulama grubunda ise arttığı saptanmıştır ($p < 0.05$). Stres uygulaması sonucunda MMP-2 enzim aktivitesinin kontrole göre AdM ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı saptanmıştır ($p < 0.05$). Stres uygulaması sonucunda MMP-2 enzim aktivitesinin AdM ve Met-AdM uygulama grubunda arttığı saptanmıştır ($p < 0.05$), (Şekil 4.32, Çizelge 4.2).



Şekil 4.32. Kalp dokusundaki MMP-2 enzim aktivitesindeki değişiklikler.

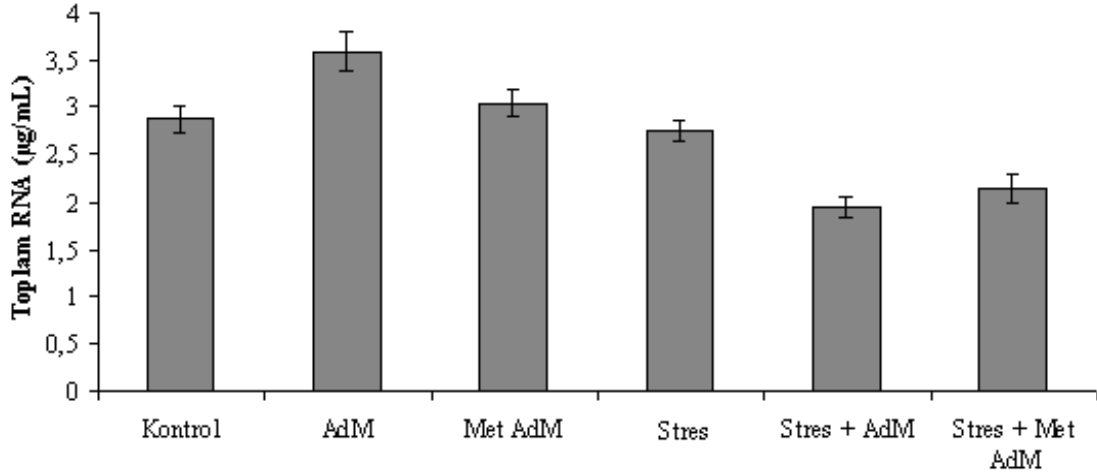
4.3 Toplam RNA Miktarları

Karaciğer dokusunda, stres uygulaması yapılmayan guruplarda toplam RNA miktarlarında kontrol grubuna göre hem AdM gurubunda hem de Met AdM gurubunda azalma görülmüştür ve bu değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Stres uygulama guruplarında ise toplam RNA miktarlarının stres grubuna göre AdM ve Met AdM guruplarında arttığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). Stres uygulaması yapılan guruplarda kontrol grubuna göre AdM ve metr-AdM uygulama guruplarında bir azalma görülmüştür ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda toplam RNA miktarlarının AdM ve Met AdM guruplarında arttığı görülmüştür ($p<0.05$), (Şekil 4.33, Çizelge 4.1).



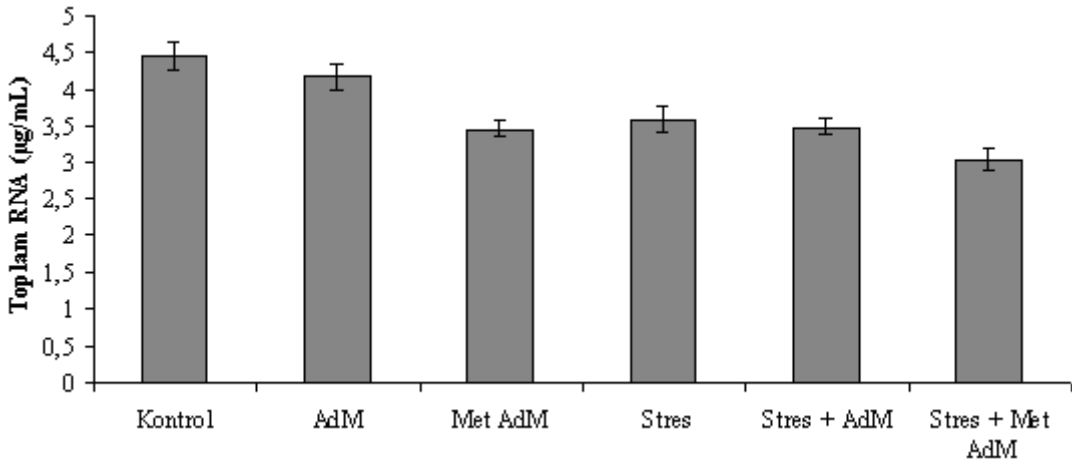
Şekil 4.33. Karaciğer dokusundaki toplam RNA miktarlarındaki değişiklikler, AdM uygulama grubuna, Stres grubuna, Stres+ Met AdM grubuna, Stres+AdM grubuna ve Met-AdM uygulama grubuna göre istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$).

Akciğer dokusunda, stres uygulaması yapılmayan guruplarda toplam RNA miktarlarının kontrol grubuna göre AdM ve Met AdM gurubunda arttığı görülmüştür ve bu değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Stres uygulama guruplarında ise toplam RNA miktarlarının stres grubuna göre AdM ve Met AdM guruplarında azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). Stres uygulaması yapılan guruplarda kontrol grubuna göre bir azalma kaydedilmiştir ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda toplam RNA miktarlarının AdM ve Met AdM guruplarında azaldığı görülmüştür ($p<0.05$), (Şekil 4.34, Çizelge 4.1).



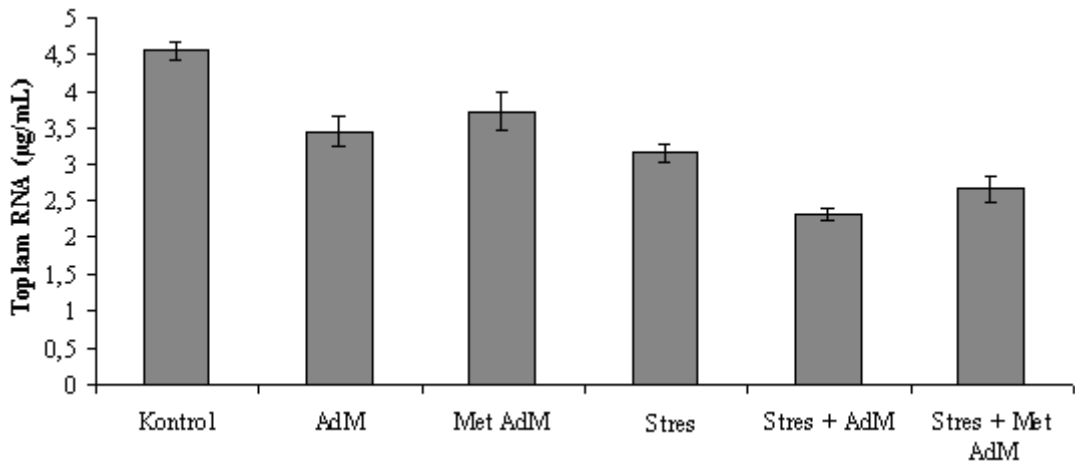
Şekil 4.34. Akciğer dokusundaki toplam RNA miktarındaki değişiklikler. AdM uygulama grubuna, Stres grubuna, Stres+ Met AdM grubuna, Stres+AdM grubuna ve Met-AdM uygulama grubuna göre istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$).

Böbrek dokusunda, stres uygulaması yapılmayan gruplarda toplam RNA miktarları kontrol grubuna göre hem AdM gurubunda hem de Met AdM gurubunda azaldığı belirlenmiştir ve bu değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Stres uygulama guruplarında ise stres grubuna göre toplam RNA miktarlarının AdM ve Met AdM guruplarında azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). Stres uygulaması yapılan guruplarda kontrol grubuna göre AdM ve Met AdM guruplarında bir azalma görülmüştür ($p<0.05$). Stres uygulaması sonucunda toplam RNA miktarlarının AdM ve Met AdM guruplarında azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.05$), (Şekil 4.35, Çizelge 4.1).



Şekil 4.35. Böbrek dokusundaki toplam RNA miktarlarındaki değişiklikler, AdM uygulama grubuna, Stres grubuna, Stres+ Met AdM grubuna, Stres+AdM grubuna ve Met-AdM uygulama grubuna göre istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$).

Kalp dokusunda, stres uygulaması yapılmayan guruplarda toplam RNA miktarları kontrol grubuna göre hem AdM gurubunda hem de Met AdM gurubunda azaldığı belirlenmiştir ve bu değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Stres uygulama guruplarında ise toplam RNA miktarlarının stres grubuna göre AdM ve Met AdM guruplarında azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). Stres uygulaması yapılan guruplarda kontrol grubuna göre AdM ve Met AdM guruplarında bir azalma görülmüştür ($p <0.05$). Stres uygulaması sonucunda toplam RNA miktarlarının AdM ve Met AdM guruplarında azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.05$), (Şekil 4.36, Çizelge 4.1).



Şekil 4.36. Kalp dokusundaki toplam RNA miktarlarındaki değişiklikler, AdM uygulama grubuna, Stres grubuna, Stres+ Met AdM grubuna, Stres+AdM grubuna ve Met-AdM uygulama grubuna göre istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$).

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Aşırı çevresel şartlara maruz kalma, organizmanın karşı karşıya kaldığı bir stres şeklidir. Soğuğa maruz kalmak organizmaların karşılaşılabileceği stres koşulları içerisinde yer almaktadır. Soğuğa karşı stres cevabının fizyolojik bileşenleri metabolik, dolaşım sal veya hormonal olabilmektedir. Farklı fizyolojik stresörler kendine özgü nöroendokrin cevap şekli gösterirler [2].

Uzun süre soğuğa maruz kalmanın memelilerde metabolik hızı arttırdığı, kahverengi yağ dokusu, karaciğer, böbrek, ince barsak ve kalp gibi metabolik olarak aktif dokuların artan hipertrofisine yol açtığı ve mitokondriyal hacim yoğunluğunda, damar çapında, aerobik enzim aktivitesinde, doku oksijen tüketiminde artışlara neden olduğu görülmüştür [3].

Adrenomedullin Kitamura vd. tarafından keşfedilmiş çok fonksiyonlu bir peptittir. Hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği, pulmoner hipertansiyon, kronik böbrek yetmezliği, doku iskemisi veya hipoksia, sitokinlerle oluşan yangı hasarı gibi patolojik durumlara karşı cevap olarak plazma ve doku AdM seviyeleri artmaktadır. Artan plazma ve doku AdM seviyelerinin humoral veya otokrin/parakrin tarzda toksik faktörler tarafından ortaya çıkan doku hasarı veya doku iskemi veya patolojik olarak bozulan dolaşıma karşı düzenleyici olarak fonksiyon yaptığı kabul edilmektedir [185].

Malignant büyümenin metastaz, anjiojenez, büyüme sinyallerinde yeterlilik, apoptozisten kaçma gibi çok adımlı bir işleme bağımlı olduğu ve kanser hücrelerinde aşırı ifade edilen adrenomedullin'in ise malignant büyümenin temeli olarak düşünülen pek çok moleküler ve fizyolojik özelliklerin gelişmesine yardım ettiği önerilmektedir Böbrek bozuklukları, kalp krizleri, hipertansiyon, sepsis gibi pek çok patolojik durumlarda adrenomedullin'in plazma seviyesinin artması adrenomedullin'in pek çok patolojik olayda rol oynayabileceğini akla getirmektedir [5].

Ayrıca oksidatif stresle ilgili pek çok patolojik durum örneğin; hipertansiyon, arteriosklerozis, diyabet, kalp hastalığı, gibi durumlar plazma adrenomedullin konsantrasyonunu arttırmakta ve bu artış belki de dengeleyici bir etki yaratmaktadır. Bundan dolayı adrenomedullin'in antihipertansif ve antioksidan özelliğe sahip ideal bir tedavi edici ajan olarak görev yapabileceği önerilmektedir [9].

Adrenomedullinin çok fonksiyonlu bir polipeptid hormon olmasının yanı sıra otokrin ve parakrin rolleriyle organizmada çok sayıda işlevde görev almaktadır [4].

Protein sentezi sonrası proteinlerin ve nükleik asit gibi önemli biyolojik moleküllerin fonksiyonel hale gelmesinde fosforillenme ve metillenme gibi reaksiyonlar önemli derecede rol oynamaktadır. Proteinlerin sentez sonrası modifikasyonları onların sinyal iletiminde önemli olmasını ve hücre dışı olaylara hızlı ve organize bir şekilde ardışık olarak toplu cevap verilmesini mümkün kılar. Proteinlerin sentez sonrası modifikasyonları, proteinlerin serin, treonin ya da tirozin aminoasitlerinden fosforillenmesi ya da arjinin gibi aminoasitlerden metillenmesidir [189]. Adrenomedullinin anjiogenez işlevinde yer alabileceği bazı çalışmalarda belirtilmiştir [4] ve ayrıca adrenomedullin ile NO arasında etkileşim olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [8].

NO aynı zamanda radikal bir gaz olarak değerlendirildiğinde meydana gelebilecek diğer radikal grupların antioksidan sistemi etkilemesi mümkündür [12]. Bu çalışmada literatürde herhangi bir veriye rastlayamadığımız, laboratuvar koşullarında ve stres koşullarında adrenomedullinin anjiogenez etkilerinin araştırılmasıyla birlikte metile edilmiş adrenomedullinin anjiogenez üzerinde olası etkileri ile antioksidan enzim aktiviteleri gibi bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yapılan bu çalışmada adrenomedullin ve metile-adrenomedullin uygulamasının vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), tümör nekroz faktör- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), nitritoksit (NO) gibi bazı anjiogenez faktörleri ile anjiogenezde rol oynayan matriks metalloproteinaz (MMP) enzim aktivitesi, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-P_X) gibi bazı antioksidan enzim aktiviteleri belirlenmiş, ilgili dokuların toplam RNA düzeyleri çalışılmıştır.

Stres uygulaması yapılmayan gruplarda adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak katalaz (CAT) enzim aktivitesi araştırılmış ve karaciğer dokusunda, böbrek dokusunda ve kalp dokusunda kontrole göre bir azalma görülmüştür. Akciğer dokusunda ise kontrole göre bir artış gözlenmiştir. Stres uygulaması yapılmayan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak, karaciğer, böbrek ve kalp dokularında enzim aktivitesi kontrole göre azalırken, akciğerde artmıştır. Stres uygulaması yapılan gruplarda adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak karaciğer dokusunda stres grubuna göre bir artış gözlenirken, akciğer, böbrek ve kalp dokularında azalma saptanmıştır. Stres uygulaması yapılan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak stres grubuna göre karaciğer dokusunda bir artış gözlenirken, akciğer, böbrek ve kalp dokularında azalma saptanmıştır.

Stres uygulaması yapılan gruplarda AdM uygulamasına bağlı olarak enzim aktivitesi kontrole göre tüm dokularda azalmıştır. Stres uygulaması yapılan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak enzim aktivitesi kontrole göre tüm dokularda azalmıştır. Yine stres uygulaması yapılan gruplarda enzim aktivitesi kontrole göre karaciğer, böbrek ve kalp dokularında azalırken, akciğerde artmıştır.

Yapılan bir çalışmada karaciğer ve akciğer dokularında adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak CAT enzim aktivitesinde bir fark görülmemiş ancak böbrek dokusunda bir azalma bulunmuştur [185]. Selman vd. uzun süreli soğuğa maruz kalmanın küçük bir memelide antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerini araştırmışlar ve iskelet, kalp ve böbrek kaslarında katalaz aktivitesinde bir artış gözlemişlerdir [3]. Yüksel ve Asma yaptıkları çalışmada soğuk stresine bağlı olarak hipotalamus ve adrenal medullada CAT aktivitesinin arttığını saptamıştır [184]. Ancak metile-adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak CAT enzim aktivitesindeki değişikliklerle ilgili herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Stres uygulaması yapılmayan gruplarda adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi araştırılmış ve böbrek ve kalp dokusunda bir artış gözlenmiş, akciğer dokusunda enzim aktivitesinde bir azalma gözlenirken, karaciğer dokusunda enzim aktivitesi değişmemiştir. Stres uygulaması yapılmayan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak, karaciğer, böbrek ve kalp dokularında enzim aktivitesi kontrole göre artarken, akciğerde değişmemiştir. Stres uygulaması yapılan gruplarda adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak karaciğer ve kalp dokularında stres grubuna göre bir artış gözlenirken, akciğer, böbrek dokularında değişme görülmemiştir. Stres uygulaması yapılan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak stres grubuna göre karaciğer ve böbrek dokularında bir artış gözlenirken, kalp dokusunda azalma saptanmıştır, akciğerde ise değişme gözlenmemiştir. Stres uygulaması yapılan gruplarda AdM uygulamasına bağlı olarak enzim aktivitesi kontrole göre böbrek ve akciğer dokularında değişmemiş, karaciğer ve kalp dokularında azalmıştır. Stres uygulaması yapılan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak enzim aktivitesi kontrole göre karaciğer ve böbrek dokularında artmış, akciğer dokusunda değişmemiş, kalp dokusunda azalmıştır. Yine stres uygulaması yapılan gruplarda enzim aktivitesi kontrole göre akciğer ve böbrek dokularında artmış, kalp ve karaciğer dokularında azalmıştır.

Literatüre bakıldığında yapılan bir çalışmada adrenomedullin uygulamasının SOD enzim aktivitesini önemli derecede baskıladığı gözlenmiştir [185].

Selman vd. toplam SOD aktivitesinde herhangi bir dokuda gruplar arasında önemli bir farklılık gözlememiştir [3]. Ohno vd. akut ve kronik soğuk stresin SOD enzim aktivitesi üzerine etkilerini rat eritrositlerinde araştırmışlardır. Süperoksit dismutaz aktivitesi soğuğa alışmaya çalışan sıçanlarda önemli düzeylerde artarken soğuğa adapte olmuş sıçanlarda da artma eğiliminde olduğu belirlenmiştir [151]. Stojilkovi vd. sıçan beyin hipokampusunda kronik ve akut olarak strese maruz kalmanın Mn-SOD, Cu-SOD ve CAT aktiviteleri üzerine etkilerini araştırmışlar ve kronik stresin oksidatif enzim aktivitelerini artırdığını bulmuşlardır [148]. Yüksel vd. hipotalamus ve adrenal medullada SOD enzim aktivitesinin soğuk stresi uygulamasına bağlı olarak azaldığını rapor etmişlerdir [184].

Stres uygulaması yapılmayan gruplarda adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak GSH-P_x enzim aktivitesi araştırılmış ve karaciğer, böbrek ve akciğer dokusunda kontrole göre bir artmış görülmüştür, kalp dokusunda ise kontrole göre bir azalma gözlenmiştir. Stres uygulaması yapılmayan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak, karaciğer, böbrek ve kalp dokularında enzim aktivitesi kontrole göre azalırken, akciğerde değişmemiştir. Stres uygulaması yapılan gruplarda adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak karaciğer, böbrek ve kalp dokularında stres grubuna göre bir azalma gözlenirken, akciğer dokusunda artış saptanmıştır. Stres uygulaması yapılan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak stres grubuna göre karaciğer, akciğer ve böbrek dokularında bir azalma gözlenirken, kalp dokusunda artış saptanmıştır. Stres uygulaması yapılan gruplarda AdM uygulamasına bağlı olarak enzim aktivitesi kontrole göre böbrek, kalp ve karaciğerde azalma gözlenirken, akciğerde artmıştır. Stres uygulaması yapılan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak enzim aktivitesi kontrole böbrek, kalp ve karaciğerde azalırken akciğerde değişmemiştir. Yine stres uygulaması yapılan gruplarda enzim aktivitesi kontrole göre karaciğer ve kalp dokularında azalmış, böbrek dokusunda artmış, akciğer dokusunda değişmemiştir.

Literatüre baktığımızda, yapılan bir çalışmada ise karaciğer ve böbrek dokularında adrenomedullin uygulama gruplarındaki GSH-P_x enzim aktiviteleri kontrol gruplarına göre önemli düzeyde artarken, akciğer dokusunda GSH-P_x enzim aktiviteleri bakımından AdM grubu ile kontrol grubu arasında bir fark bulunmadığı saptanmıştır [185].

Ohno vd. akut ve kronik soğuk stresin glutasyon ve ilgili enzimler üzerine etkilerini sıçan eritrositlerinde araştırmışlar ve eritrositlerdeki glutasyon peroksidaz seviyesini tutarsız olduğunu bildirmişlerdir [151].

Selman vd. uzun süreli soğuğa maruz kalmanın memelilerde antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerini araştırmışlar. Kalp kasında GP_X aktivitesi arttığını saptamışlardır [3].

Stres uygulaması yapılmayan gruplarda adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak NO seviyeleri araştırılmış ve akciğer, beyin ve kalp dokularında kontrole göre değişmezken, karaciğer dokusunda artış gözlenmiştir. Stres uygulaması yapılmayan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak NO seviyeleri kontrole göre, beyin ve kalp dokularında değişmezken, karaciğer ve akciğerde artmıştır. Stres uygulaması yapılan gruplarda adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak stres grubuna göre NO seviyelerinde tüm dokularda artış gözlenmiştir. Stres uygulaması yapılan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak stres grubuna göre NO seviyelerinde tüm dokularda artış saptanmıştır. Stres uygulaması yapılan gruplarda AdM uygulamasına bağlı olarak NO seviyesi kontrole göre tüm dokularda artmıştır. Stres uygulaması yapılan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak NO seviyesi kontrole göre tüm dokularda artmıştır. Yine stres uygulaması yapılan gruplarda NO seviyesi kontrole göre akciğer ve kalp dokularında artarken, karaciğerde azalmış, beyinde ise değişmemiştir.

Literatüre baktığımızda Cordellini vd. tarafından yapılan çalışmada strese uyum cevaplarına NO'nin katılıp katılmadığını araştırmışlardır ve plazma arjinin seviyesinde bir azalma ve sıçanların paraventriküler nükleusunda NOS mRNA düzeyinde bir artış gözlenmiş bu bulgular da NO'un strese uyumda rol oynadığını bildirmişlerdir [176]. Ishizuka vd. tarafından yapılan başka bir çalışmada ise sıçanların paraventriküler nükleus (PVN) bölgesinde NO ve norepinefrin salınımı üzerine farklı stres çeşitlerinin etkileri araştırılmıştır. Kapalı tutulma, tuz yüklemesi ve su verilmemesi gibi stres koşullarından sonra PVN'de NO sentaz ifadesinin arttığı bulunmuştur [177]. Savaş vd. yaptıkları çalışmada bipolar efektif bozukluklarda adrenomedullin ve nitrik oksitin muhtemel rolünü araştırmışlar ve hasta gruplarda hem NO hem de AdM plazma seviyelerinin kontrollere göre önemli derecede yüksek olduğunu göstermişlerdir. adrenomedullin NO salınımını uyararak ve adenilat siklazı aktive ederek damar rahatlamasını sağlar bundan dolayı bu sonuçlara da dayanarak bu iki molekülün beyinde beraber rol oynayabileceğini önerilmiştir [182].

Zoroğlu vd. yaptıkları çalışmada otizmde adrenomedullin ve nitrik oksit in patofizyolojik rolünü araştırmışlardır. Adrenomedullin ve NO'un bir metaboliti olan toplam nitrit seviyelerini plazmada ölçmüşler ve otistik gruplarda ortalama total nitrit ve adrenomedullin seviyelerinin kontrol değerlerine göre önemli derecede yüksek olduğunu saptamışlardır [183].

Abe vd. aşırı derecede ifade edilen adrenomedullin'in iskemik dokulara koleteral akışını artırıp artırmadığını test etmişlerdir. Araştırmacılar yabancı tip farelerde arka bacak iskemisini indüklemişlerdir ve in vivo elektroporasyonu takiben insan adrenomedullinini ifade eden hazırlanmış plazmiti enjekte etmişlerdir. Adrenomedullinin kan akışının düzelmesini ve kapiller yoğunluğu önemli derecede arttırdığı rapor edilmiştir Ayrıca adrenomedullin'in iskemiyeye cevapta e-NOS'un aktivasyonu yolu ile endotelial hücrelerde büyümeyi ilerlettiğine işaret edilmiştir [159]. Yine literatür verilerine göre metile-adrenomedullin uygulaması ve NO ile ilgili bir çalışmanın bulunmadığı görülmüştür.

Stres uygulaması yapılmayan gruplarda adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak TNF- α seviyeleri araştırılmış, karaciğer akciğer, beyin dokularında kontrole göre artarken, kalp dokusunda azalmıştır. Stres uygulaması yapılmayan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak TNF- α seviyeleri kontrole göre, karaciğer, akciğer ve beyin dokularında artarken, kalp dokusunda değişmemiştir. Stres uygulaması yapılan gruplarda adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak stres grubuna göre TNF- α seviyelerinde karaciğer, akciğer ve kalp dokularında artmış, beyin dokusunda ise azalma gözlenmiştir. Stres uygulaması yapılan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak stres grubuna göre TNF- α seviyelerinde tüm dokularda artış saptanmıştır. Stres uygulaması yapılan gruplarda AdM uygulamasına bağlı olarak TNF- α seviyesi kontrole göre karaciğer, akciğer, beyin dokularda artarken, kalp dokusunda azalmıştır. Stres uygulaması yapılan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak TNF- α seviyesi kontrole göre karaciğer, akciğer ve beyin dokularında artarken, kalp dokusunda değişmemiştir. Yine stres uygulaması yapılan gruplarda TNF- α seviyesi kontrole göre karaciğer, akciğer ve kalp dokularında azalırken, beyinde ise artmıştır.

Literatür verilerine göre Yapılan bir çalışmada farklı akademik yıllarda olan 183 öğrencide ve TNF- α , IL-2 çözülebilir reseptör alfa ve IL-4 ölçülmüştür. TNF- α seviyesi oldukça yüksek endişeye sahip olan sınava giren grupta önemli ölçüde düşük bulunmuştur ve bu durumun spesifik olduğu ifade edilmiştir [171].

Wu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise adrenomedullin (AdM) ve adrenomedullin bağlayıcı protein-1 AMBP'in birlikte etkin olarak lipopolisakkarit'in indüklediği TNF- α ifadesini ve salınımını özellikle de primer kültüre edilmiş kupfer hücrelerinde etkin olarak baskıladığını göstermişlerdir.

Bu sonuçlar ise AM/AMBP'in proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- α üzerine olan azaltıcı etkisinin sepsiste doku hasarı ve inflamatuvar cevabın önlenmesindeki yararlı etkilerinden sorumlu bir mekanizma sergilediğini önermektedir [172]. Yapılan bir başka çalışmada bölgesel beyin iskemisi olan sıçanlarda serum ve beyin dokusunda TNF- α ifadesi araştırılmış ve bölgesel beyin iskemisinin iskemik dokularda TNF- α yüksek mRNA ifadesini indüklediği TNF- α 'ın serum seviyelerini arttırdığı görülmüştür [173]. YA-Li vd. yaptıkları çalışmada sıçanlarda serum TNF- α düzeylerinde stresin indüklediği değişiklikler üzerine kombine besinlerin etkilerini araştırmışlar ve stresle birlikte TNF- α düzeylerinin arttığını bulmuşlardır [174]. Szlosarek vd. tümör ilerlemesinin anahtar moleküllerinden biri olarak TNF- α 'yı göstermişler ve çeşitli pre-neoplastik ve malignant hastalarda sağlıklı bireylerin doku ve serumlarını karşılaştırıldığında artan serum konsantrasyonuna ve TNF- α 'ın artan ifadesini gözlemlemişlerdir [114].

Stres uygulaması yapılmayan gruplarda adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak IL-6 seviyeleri araştırılmış ve karaciğer, beyin ve kalp dokularında kontrole göre artarken, akciğer dokusunda azalma gözlenmiştir. Stres uygulaması yapılmayan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak IL-6 seviyeleri kontrole göre, beyin, kalp ve karaciğer dokularında artarken, akciğerde azalmıştır. Stres uygulaması yapılan gruplarda adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak stres grubuna göre IL-6 seviyelerinde karaciğer, akciğer, beyin dokularında azalma gözlenmiştir. Kalp dokusunda ise değişme gözlenmemiştir. Stres uygulaması yapılan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak stres grubuna göre IL-6 seviyelerinde tüm dokularda azalma saptanmıştır. Stres uygulaması yapılan gruplarda AdM uygulamasına bağlı olarak IL-6 seviyesi kontrole göre kalp, beyin ve akciğer dokularında değişmezken, karaciğerde azalmıştır. Stres uygulaması yapılan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak IL-6 seviyesi kontrole göre karaciğer dokusunda artmış, akciğerde, beyin ve kalpte ise azalmıştır. Yine stres uygulaması yapılan gruplarda IL-6 seviyesi kontrole göre kalp hariç tüm dokularda artmıştır. Kalp dokusunda ise, değişmemiştir.

Literatür verilerine göre Naudin vd. şizofrenide IL-6 ve TNF- α 'ın farklı rollerini araştırmışlar ve bu sitokinlerin dolaşım seviyelerini belirlemişlerdir. TNF- α 'ın dolaşım seviyesinin hastalarda kontrollere göre oldukça yüksek olduğu IL-6' ın da hastalarda arttığı gözlenmiştir ve bu sitokinlerin hastalığın genetik zeminini yansıtabileceği hipotezi kurulmuştur [170].

YA-Li vd. yaptıkları çalışmada sıçanlarda serum IL-2, IL-6 ve TNF- α düzeylerinde stresin indüklediği değişiklikler üzerine birleştirilmiş besinlerin etkilerini araştırmışlardır. Stresle birlikte IL-6 ve TNF- α düzeylerinin arttığını ancak IL-2 düzeylerinin azaldığını bulmuşlardır [174].

Stres uygulaması yapılmayan gruplarda adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak VEGF seviyeleri araştırılmış, karaciğer ve akciğer dokularında kontrole göre artarken, beyin ve kalp dokularında azalma gözlenmiştir. Stres uygulaması yapılmayan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak VEGF seviyeleri kontrole göre, beyin, karaciğer ve kalp dokularında azalırken, akciğerde artmıştır. Stres uygulaması yapılan gruplarda adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak stres grubuna göre VEGF seviyelerinde karaciğer, akciğer ve kalp dokularında artmış, beyin dokusunda ise, azalmıştır. Stres uygulaması yapılan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak stres grubuna göre VEGF seviyelerinde tüm dokularda artış saptanmıştır. Stres uygulaması yapılan gruplarda AdM uygulamasına bağlı olarak VEGF seviyesi kontrole göre beyin hariç tüm dokularda artmıştır. Beyinde ise, değişmemiştir. Stres uygulaması yapılan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak VEGF seviyesi kontrole göre tüm dokularda artmıştır. Yine stres uygulaması yapılan gruplarda VEGF seviyesi kontrole göre akciğer ve beyin dokularında artmış, kalp ve karaciğer dokularında azalmıştır.

Literatür verilerine göre Imuro vd. adrenomedullin'in anjiyojenik özelliği olduğu hipotezini lazer dopler perfüzyon görüntülerini kullanarak test etmişlerdir ve adrenomedullin'in arka bacak iskemisi olan farelerde kan akışının iyileştirilmesini uyardığını bulmuşlardır. İskemili olan bacakta adrenomedullin'in bu etkisinin VEGF ifadesini arttırmak yolu ile olduğu ve artan kan akışının artan kapiler yoğunluğu gösterdiğini bulmuşlardır. Böylece adrenomedullin'nin VEGF ifadesini ve Akt aktivasyonunu arttırmak yolu ile anjiyojenik özelliklere aracılık ettiğini göstermişlerdir. Adrenomedullin iskeminin tedavisinde ve tedavi edici bir ajan olarak kullanılabilirliğini, aksine inhibitörlerinin ise; tümör büyümesinin klinik olarak idaresinde kullanılabilirliğini önermişlerdir [155].

Adrenomedullin mitojenik ve anjiojenik kabiliyeti olan ve androjenler tarafından regüle edilen çok fonksiyonlu regülatör bir peptittir ve prostatta çokça ifade edilir. Shibata vd. yaptıkları çalışmada kısırlaştırılmış sıçan modellerinde androjen prostatik kan akışının regülasyonunun AdM ve VEGF ile olan ilişkisini araştırmışlardır ve AdM'in sinyal iletim yollarında VEGF'in görevini azaltıcı bir etkiye sahip olduğunu önermişlerdir [175].

Ravishankar vd. kronik hipoxia sonucunda artan VEGF anne serum düzeylerinin servikal viskoelastisitede ölçülebilir değişikliklere neden olup olmayacağını araştırmışlardır. Normal ve hamile olmayan ratlarla karşılaştırıldığında VEGF serum düzeylerinin hipoksiya ile arttığı gözlenmiştir [178]. Sasaki vd. yaptıkları çalışmada erişkin rat miyokardiyumunda hipoxianın neden olduğu oksidatif stresin anjiojenik bir faktör olan VEGF düzeyini artırıp artırmadığını araştırmışlardır. Sonuç olarak oksidatif stresin kanda oksijen eksikliği yarattığını bunun da kalp VEGF protein ifadesinin arttırdığını ve bu durum miyokardiyal anjiojenez'i tetikleyebildiğini önermişlerdir [179]. Kim vd. kalp ve iskelet kaslarında soğuk stresinin vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) protein ve gen ifadesi üzerine etkilerini erkek winstar sıçanlarında çalışmışlardır. VEGF mRNA ve protein ifadesinin soğuk uygulama yapılmış kalp kaslarında önemli derecede arttığı ancak baldır kaslarında akut olarak soğuğa maruz kalmayı takiben VEGF mRNA ve protein ifadesinin azaldığı bulunmuştur. VEGF geninin kalp ve iskelet kasının soğuğa adaptasyonunda anjiojenez ve termogenezi uyararak temel bir düzenleyici faktör olarak rol oynadığını önerilmiştir [152].

Stres uygulaması yapılmayan gruplarda adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak matris metalloproteinaz (MMP-2) enzim aktivitesi araştırılmış ve kalp ve akciğer dokularında artmış, karaciğer ve beyin dokularında kontrole göre bir azalma görülmüştür. Stres uygulaması yapılmayan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak, karaciğerde azalmış, akciğer ve beyinde değişmemiş, kalp dokusunda da artmıştır. Stres uygulaması yapılan gruplarda adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak enzim aktivitesi karaciğerde azalmış, akciğerde ve beyinde değişmemiş, kalpte de artmıştır. Stres uygulaması yapılan gruplarda met-AdM uygulamasına bağlı olarak stres grubuna göre beyin, akciğer ve kalp dokularında artarken, karaciğerde azalmıştır.

Stres uygulaması yapılan gruplarda AdM uygulamasına bağılı olarak enzim aktivitesi kontrole akciğer ve beyinde değişmezken, kalpte azalmış, akciğerde ise değişmemiştir. Stres uygulaması yapılan gruplarda met-AdM uygulamasına bağılı olarak enzim aktivitesi kontrole göre akciğer, beyin ve kalpte artarken, karaciğerde azalmıştır. Yine stres uygulaması yapılan gruplarda enzim aktivitesi kontrole göre akciğer ve kalpte artarken, karaciğerde azalmış, beyinde ise değişmemiştir.

Literatüre baktığımızda Kunishige vd. yaptıkları çalışmada kronik kalp hastalıklarının akut ve kronik fazlarında MMP'lerin serum seviyelerini açıklamışlardır. Serum MMP-2 seviyelerinin artan oksidant stres ile arttığını göstermişlerdir [180]. Yi vd. yaptıkları çalışmada adrenomedullin'in TGF-β1 üretimini ve TGF-β1'in indüklediği MMP-2 ifadesini inhibe ederek hepatik stellat hücrelerinin aktivasyonuna karıştığı ve TGF-β1 tarafından indüklenen MMP-2 ifadesinin artışını baskılayabileceğini önermişlerdir [186].

Tsuruda vd yaptıkları çalışmada sıçan aortik fibroblastlarında adrenomedullin'in MMP-2 aktivitesini arttırdığını bulmuşlardır [187].

Valentine vd. yaptıkları çalışmada kùltüre edilmiş koroner düz kas hücrelerinde oksidatif stresin MMP-2'yi aktive ettiğini bulmuşlardır [188].

Soğuk bir çevrede artan termogeneze, aerobik metabolizmada bir artışla sonuçlanır. Özellikle de kalp ve iskelet kaslarında oksijen tüketiminde bir artış olur ve soğuğa maruz kalma boyunca kalp kası fibrillerine kan akışı artar. Taylor vd. ve Gao vd. kalp hücrelerinin hipertrofisini, toplam kapiller yoğunluğun arttığını ve 5°C 'de ratlarda kapiller yol boyunca arteriolar kapillerden venular kapillere doğru difüzyon alanının azaldığını rapor etmişlerdir. Bütün bu değişiklikler, soğuğa adaptasyondan sonra kardiyak hipertrofiyi takiben oksijen dağıtım kapasitesinin arttırılması gerektiğini göstermektedir.

Kronik soğuğa maruz kalma sonrası, önceden varolan ve yeni oluşan venular kapillerden arterilizasyon kolaylaşabilir. Soğuğa maruz kalma veya hipoksiya, damar ve makaslama geriliminde artışı indükler aynı zamanda damarlardaki anjiojenezi uyarır. Damarların sayısı ile yoğunluğundaki artış ve difüzyon uzaklığındaki azalma soğuğa maruz kalma süresinde kas dokularına oksijen sağlanması yardımcı olabilir. VEGF anjiojenez prosesinde regulator faktörler arasında dominanttır.

Kim vd. soğuk stresin damar yoğunluğunda ve sayısında bir artışı indüklediğini önermişler ancak soğuğa maruz kalma sonrası anjiojenez mekanizmasını henüz açıklayamamışlardır.

Son zamanlarda Bae vd. tarafından kronik olarak soğuk suya konulan hayvanlarla karşılaştırıldığında Kore denizine dalan kadınlarda soğuk sudaki yaşamları boyunca yüksek kapillariteye sahip oldukları rapor edilmiştir. [152].

Pek çok çalışma vasküler tonun regulasyonunda temel endoteliyal faktör olan NO'nun stres sonrası gözlenen pek çok patofizyolojik duruma karıştığını göstermiştir. Strese uyum cevaplarına NO'in katılıp katılmadığı araştırılmış ve plazma arjinin seviyesinde bir azalma ve sıçanların paraventriküler nükleusunda NOS mRNA düzeyinde bir artış gözlenmiş bu bulgular da NO'un strese uyumda rol oynadığını göstermiştir [176].

Oksidatif stresin kanda oksijen eksikliği yarattığını bunun da kalp VEGF protein ifadesinin arttırdığını ve bu durum miyokardiyal anjiojenez'i tetikleyebildiği önerilmiştir [179]. MMP-2 kollejenin yanı sıra laminin ve fibronektini de yıkar bundan dolayı kardiyomiyositlerin ekstraselüler matriksini bozar. Kronik kalp hastalıklarının da ise kolejen sentezi ve oksidant stresin arttığı rapor edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda kronik kalp hastalıklarının akut ve kronik fazlarında MMP'lerin serum seviyelerini açıklamışlardır. Serum MMP-2 seviyelerinin artan oksidant stres ile arttığını göstermişlerdir [180].

Bütün bu bilgiler ışığı altında fizyolojik bir stres çeşidi olan soğuğa maruz kalmanın damar yoğunluğunda ve sayısında bir artışı tetiklediğini söyleyebiliriz. Ancak bu mekanizmanın nasıl gerçekleştiği ve hangi dokularda nasıl işlediği henüz tam olarak açıklanmamıştır. Sonuçlarımızda anjiojenik faktörler dokulara göre farklı değişimler göstermişlerdir. Bu farklılıklar soğuk stresi uygulamasının süresinden veya doku özgüllüğünden kaynaklanabilir.

Fizyolojik stres immün sistemi farklı yollardan etkileyebilir ve bu durum stresle ilgili hastalıklarla sonuçlanabilir. Stresin immün sistem üzerine etkisi değişkendir ve bireye özgüdür. Stres özellikle de kronikse en çok rastlanan cevap immün sistemin baskılanmasıdır [171]. Anjiojenik özelliğinin yanı sıra birer immün sistem elamanı olan TNF- α ve IL- 6 daki değişikliklere baktığımızda yine dokulara göre farklılık gösterdiği gözlenmiştir.

Strese fizyolojik cevapta hipotalamus-hipofiz-adrenal eksen aktive edilir, arkasından kan akımına kortikosteronlar salınır. Stres cevabı nedeni ile kortikosteron artışı, serbest radikal oluşumunun artmasına neden olur, serbest radikaller ise, SOD, CAT ve GSH-P_x aktivitesini inhibe eder.

Aerobik organizmalarda, stresli durumlar, aşırı serbest radikal oluşumuna neden olur ve böylece antioksidan dengesi bozulur.

Soğuk stresin antioksidan sistem üzerine etkileri de yine bir çok araştırmacı tarafından açıklanmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada sonuçlarımız dokulara göre farklılık göstermekle birlikte soğuk stresinin oksidan/antioksidan sistemin dengesini bozduğunu, enzimatik antioksidan durumlarını değiştirdiğini söyleyebiliriz ve farklı uygulama sürelerinin farklı sonuçlar doğuracağı kanaatindeyiz.

Yapılan bu çalışmada aynı zamanda adrenomedullin ve metile- adrenomedullin uygulamasının çeşitli dokularda anjiojenik faktörler ve antioksidan enzimler üzerine etkileri de araştırılmıştır.

Adrenomedullin'in oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin sınırlı ve belirli düzeyde olduğunu söyleyebiliriz. Bu etkilerin sınırlı olması AdM'in miktarı, uygulama süresi, şekli ve doku farklılıklarından kaynaklanabileceğini söyleyebiliriz. Örneğin adrenomedullin'in intravenöz veya intraarteriyal uygulanması intraperitoneal verilmesinden daha etkili olabilmektedir. Yine doku özgülüğü önemli bir faktördür ve enzim aktivitelerinde farklı sonuçlar ortaya çıkmasına neden olabilir. Adrenomedullin'in biyolojik cevaplarının oldukça yavaş geliştiği göz önüne alınırsa daha uzun süreli adrenomedullin uygulanması farklı sonuçlar oluşturabilir.

Adrenomedullin uygulamasının anjiojenik faktörler üzerindeki etkileri de yine değişken olup dokulara göre ve çalışılan anjiojenik faktörün çeşidine göre değişmektedir.

Yapılan çalışmada anjiojenik faktörlerin soğuk stresi uygulamasına bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Soğuk bir çevrede artan termogenez, aerobik metabolizmanın artırılması ile sonuçlanır , özellikle kalp ve iskelet kaslarında oksijen tüketiminin artmasına neden olur. Bundan dolayı soğuğa maruz kalma kapiller anjiojenezi uyarır. Kapillerin yoğunluğunun ve sayısının artırılmasına neden olur ve böylece soğuğa maruz kalma sürecinde oksijen sağlanmasının düzenlenmesi sağlanır.

Yapılan çalışmada metile-adrenomedullin uygulamasına bağlı olarak çeşitli dokularda anjiojenik faktörler ve antioksidan enzimler üzerine etkileri de araştırılmıştır. Bazı parametrelerde adrenomedullin'in etkisini azalttığı, bazılarında arttırdığı bazılarını da hiç etkilemediği gözlenmiştir.

Protein metilasyonun sitokin sinyali, iyon kanalı fonksiyonu, nöronal farklılaşma, nükleer transport, T hücre aktivasyonu, yaşlanma, protein tamiri, stres cevabı, transkripsiyon regülasyonunu içeren anahtar hücresel olaylarda rol oynadığı düşünüldüğünde adrenomedullinin metilasyonunda olası rolleri olabileceğini söyleyebiliriz.

Literatürde benzer bir çalışma olmadığından metile adrenomedullin'in dokulardaki yanıtlarını yorumlayabilmek için daha ileri düzeyde çalışmalar yapılması gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Şahin E., Gümüslü. S, *Cold-stress-induced modulation of antioxidant defence: role of stressed conditions in tissue injury followed by protein oxidation and lipid peroxidation*, **Int J. Biometerol** (2004) 48: 165-171.
2. Yüksel Ş., Akbay A, Yürekli M., *Contibution of Adrenomedullin to homeostatic response to cold Stress in rat model*, **Pathophysiol** 8 (2002) 243-247.
3. Selman C., McLaren.S.J., Himanka J.M. and Speakman R.J., *Effect of Long –Term Cold Exposure on Antioxidant Enzyme Activities In Small Mammal*, **Free Radical Biol&Med**, vol.28, no.8, pp 1279-1285, 2000
4. Bunton D.C, Petrie M.C, Hillier C, Johnstone F, McMurray J.V, *The Clinical Revelence of Adrenomedullin: a promising profile*, **Pharmacol& Therap**, Volume 103, Issue 3, September 2004, pages 179-201.
5. Zudaire E., Martinez A., Cuttitta F., *Adrenomedullin and Cancer*, **Regul. Pept**, Volume 112, Issues 1-3, 15 april 2003, pages 175-183.
6. Dvorak H.F, *Angiogenesis: update 2005*, **J. Thromb. Haemost.**, 3: 1835-1842.
7. Güllü İ, *Anjiyenez ve Antianjiyjenik Tedaviler*, **XIII.TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi**, Non-Hodgin Lenfoma, 18-22 mayıs 2004.
8. Samson W. K., *Adrenomedullin and the control of fluid and electrolyte homeostasis*, **Ann Rev Physiol** Vol. 61: 363-389 1999.
9. Cao Y., Kuwasako K, Kato J., Yanagita T., Tsuruda T, Kawano J, Nagoshi Y, Chen F.A, Wada A, Suganuma T, Eto T, Kitimura K, *Beyond vasodilation : The Antioxidant Effect of Adrenomedullin in Dahl Saltisensitive Rat Aorta*, **Biochem Biophy Res Com** 332 (2005) 866-872.
10. Grant M.C., Perone G, Dawes I.W., *Glutathione and Catalase Provide Overlapping Defenses for Protection aganist hydrogen Peroxide in the yeast Saccharomyces cerevisiae*, **Biochem Biophy Res Com**, 253, 893-898 (1998).
11. Mruk D.D., Silvestrini B., Mo.M, Cheng C.Y, *Antioxidant Superoxide Dismutase- a Review : its function, regulation in the testis, and role in male fertiliy*, **Contracept.** 65 (2002) 305-311.
12. Bonavida B, Khineche S, Huerta-Yepez S, Garban H, *Therapeutic potential of nitric oxide in cancer*, **Drug Res Updates** 9 (2006) 157-173.
13. Doğru M.İ, Doğru. A.K, Gül M, Eşrefoğlu M, *Effects of Adrenomedullin on rat exposed to lead*, **J. Appl. Toxicol.**, 2008.
14. Domenico Ribatti Beatrice Nico Raffaella Spinazzi, Angelo Vacca and Gastone G. Nussdorfer, *The role of adrenomedullin in angiogenesis*, **Pept.** Volume 26, Issue 9, September 2005, Pages 1670-1675.
15. A. Balat, M. Çekmen, M. Yürekli, H. Gülcan, O. Kutlu, Y. Türköz and S. Yoloğlu, *Adrenomedullin and nitrite levels in children with minimal change nephrotic syndrome*, **Pediat. Neph.**, Volume 15, Numbers 1-2 / October, 2000 70-73.
16. A. Balat, M. Çekmen, M. Yürekli, O. Kutlu Islek İ, Sönmezgöz E., Çakır M., Y. Türköz and S. Yoloğlu, *Adrenomedullin and nitrite levels in children with Bartter syndrome*, **Pediat. Neph.** (2000) 15: 266-270.
17. Nikitenko LL, Smith DM, Hague S, Wilson CR, Bicknell R, and Rees MCP, *Adrenomedullin and The Microvasculature*, **Trends in Pharmacol Sci**, Volume 23, Issue 3, 1 March 2002, pages 101-103.
18. Zudaire E, Martínez A, Cuttitta F., *Adrenomedullin and cancer*, **Regul Pept.** 2003 Apr 15;112(1-3):175-83.
19. L L Nikitenko, S B Fox, S Kehoe, M C P Rees and R Bicknell, *Adrenomedullin and tumour angiogenesis*, **Brit. J Canc.** (2006) 94, 1-7.

20. Jougasaki M, Burnett Jr JC. *Adrenomedullin as a regulator peptide*. **Nephrol Dial Trans.** 2000; 15: 293-95.
21. Hinson JP, Kapas S, Smith DM. *Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide*. **Endocr Rev** 2000;21:138-67.
22. Cameron VA, Fleming AM. *Novel sites of Adrenomedullin gene expression in mouse and rat tissues*. **Endocr**1998; 53: 979-85.
23. Kalman S., *Adrenomedullin: Yeni bir renal Düzenleyici peptid*, **Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi** 2002: 11(4)198-201.
24. Hirata Y, Hayakawa H, Suzuki Y, et al. *Mechanisms of adrenomedullin-induced vasodilatation in the rat kidney*. **Hyperten.** 1995; 25: 790-95.
25. McGregor D, Trougton RW, Frampton C, et al. *Hypotensive and natriuretic actions of adrenomedullin in subjects with chronic renal impairment*. **Hyperten.** 2001;37:1279-84.
26. Chini E. N., Choi E., Grande J. P., Burnett J. C. and Dousa T. P., *Adrenomedullin Suppresses Mitogenesis in Rat Mesangial Cells via cAMP Pathway*, **Biochem Biophys Res Comunications** Volume 215, Issue 3, 24 October 1995, Pages 868-873.
27. Chini EN , Chini CC, Bolliger C, Jougasaki M, JP Grande etal, *Cytoprotective role of Adrenomedullin in glomerular cell injury: central role of cAMP signalling pathway*, **Kidney Int**, 52: 917-25.
28. Jensen B. L.; Krämer B. K.; Kurtz A., *Adrenomedullin Stimulates Renin Release and Renin mRNA in Mouse Juxtaglomerular Granular Cells*, **Hyperten.** 1997;29:1148-1155.
29. G Nussdorfer, GP Rossi, G Mazzocchi, *Role of adrenomedullin and related peptides in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis – Pept.* 1997;18(7):1079-89.
30. Andreis P. G., Neri G., Prayer-Galetti T., Rossi G. P., Gottardo G., Malendowicz L. K. and Nussdorfer G. G. , *Effects of Adrenomedullin on the Human Adrenal Glands: An in Vitro Study*, **The J.Clin. Endocrin & Metabolism** Vol. 82, No. 4 1167-1170.
31. Yamaguchi T; Baba K; Doi Y; Yano K; Kitamura K; Eto T, *Inhibition of Aldosterone Production by Adrenomedullin, a Hypotensive Peptide, in the Rat , Hyperten..* 1996;28:308-314.)
32. Aamiro H.Y.; Mazzocchi G.; Rebuffat P.; Gottardo G.; Nussdorfer G.G., *Adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide inhibit aldosterone secretion in rats, acting via a common receptor*, **Life Sci**, Volume 58, Number 10, 2 February 1996 , pp. 839-844(6).
33. Parkes D. G., May C.N. , **J. Neuroendocrinol**, Volume 7 Issue 12 Page 923-929, December 1995.
34. Kobayashi H, Yamamoto R, Niina H, Katoh F, Kuwasako K etal, *Adrenomedullin and PAMP in adrenal chromaffin cells*, Presented at 1 st Intl.Symp. AM and PAMP , Osaka ,Japon.1998.
35. Tsuruda T; Kato J; Kitamura K; Kuwasako K; Imamura T; Koiwaya Y; Tsuji T; Kangawa K; Eto T, *Adrenomedullin: A Possible Autocrine or Paracrine Inhibitor of Hypertrophy of Cardiomyocytes*, **Hyperten..** 1998;31:505-510.
36. Sato A. and Autelitano D. J., *Adrenomedullin Induces Expression of c-fos and AP-1 Activity in Rat Vascular Smooth Muscle Cells and Cardiomyocytes*, **Biochem and Biophy Res Com.**, Volume 217, Issue 1, 5 December 1995, Pages 211-216.
37. Nishikimi T, horio T, Yoshihara N, Nagaya N, Matuo M, Kangawa K, *Adrenomedullin in failing heart*. Presented at 1 st Intl. Symp. AM and PAMP, Osaka, Japon.

38. Muphy TC, Samson W.K. 1995. The novel vasoactive hormone adrenomedullin inhibits water drinking in rat, **Endocrin.**, 136: 2459-63.
39. Samson W.K. and Murphy T.C. , *Adrenomedullin Inhibits Salt Appetite*, **Endocrin.**Vol. 138, No. 2 613-616.
40. Lang MG., Paterno R, ;. Faraci FM, . Heista DD , *Mechanisms of Adrenomedullin-Induced Dilatation of Cerebral Arterioles*, **Stroke**. 1997;28:181-185.
41. Shimokubo T.; Sakata J.; Kitamura K.; Eto T; Kangawa K.; Matsuo H. *Augmented adrenomedullin concentrations in right ventricle and plasma of experimental pulmonary hypertension*, **Life Sci**, Volume 57, Number 19, 29 September 1995 , pp. 1771-1779(9).
- 42.Samson W K., Murphy TC., and Resch Z T. , *Central mechanisms for the hypertensive effects of preproadrenomedullin-derived peptides in conscious rats*, **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 274: R1505-R1509, 1998.
43. Halaç. U.G, *İskemik İnmede İlk 72 saat Plazma Adrenomedullin Düzeyinin Lezyon Lokalizasyonu*, Etiyolojik Alt Gruplar ve Prognozla İlişkisi (uzmanlık tezi), İstanbul, 2005.
- 44.Kubo A, Minamino N, Isumi Y, Katafuchi T, Kangawa K, Dohi K, Matsuo H. *Production of adrenomedullin in macrophage cell line and peritoneal macrophage*. **J Biol Chem** 1998;273:16730-16738.
- 45.Isumi Y, Shoji H, Sugo S, Tochimoto T, Yoshioka M, Kangawa K, Matsuo H, Minamino N. *Regulation of adrenomedullin production in rat endothelial cells*. **Endocrinol** 1998;139:838-846.
46. Pio R, Martinez A, Unsworth EJ, Kowalak JA, Bengoccea JA, Zipfel PF, Elasser TH, Cuttita F. *Complement factor H is a serum-binding protein for adrenomedullin, and the resulting complex modulates the bioactivities of both parties*. **J Biol Chem** 2001;276:12292-12300.
47. Houfbauer KH, Schoof E, Kurtz A, Sanner P. *Inflammatory cytokines stimulate Adrenomedullin expression through nitric oxide-dependent and –independent pathways*. **Hyperten**, 2002;39:161-167.
48. Jiang W, Jiang HF, Cai DY, Pan CS, Qi YF, Pang YZ, Tang CS. *Relationship between contents of adrenomedullin and distributions of neutral endopeptidase in blood and tissues of rats in septic shock*. **Regul Pept**. 2004;118:199-208.
- 49.Özbek E, Soylu A, Davarcı M, Balbay M.D, *The role of adrenomedullin in varicocele and impotence*,**BJU international** (2000) 86, 694-698.
50. Oya H, Nagaya N, Furuichi S, Nishikimi T, Ueno K, Nakanishi N, Yamagishi M, Kangawa K, Miyatake K. *Comparison of intravenous adrenomedullin with atrial natriuretic peptide in patients with congestive heart failure*. **Am. J. Cardiol** 2000;86:94-98.
51. Nuki C, Kawasaki K, Kitamura K, Takenaga M, Kangawa K, Eto T, Wada A. *Vasodilator effect of AM and CGRP receptors in rat mesenteric vascular beds*. **Biochem Biophys Res Commun** 1993;196:245-251.
52. Kato J, Kitamura K, Kangawa K, EtoT. Receptors for adrenomedullin in human vascular endothelial cells. **Eur J Pharmacol** 1995;289:383-385.
53. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. *Nitric oxide:physiology, pathophysiology and pharmacology*. **Pharmacol Rev** 1991;43:109-142.
54. Barber DA, Park YS, Burnett JC, Miller VM. *Adrenomedullin-mediated relaxations in veins are endothelium-dependent and distinct from arteries*. **J Cardiovasc Pharmacol**.1997;30:695-701.

55. Kohno M, Kano H, Horio T, Yokokawa K, Yasunari K, Takeda T. *Inhibition of endothelin production by adrenomedullin in vascular smooth muscle cells.* **Hyperten.** 1995;25:1185-1190.
56. Nakayama M, Takahashi K, Murakami H, Sasano H, Shirato K, Shibahara S. *Adrenomedullin in monocytes and macrophages: possible involvement of macrophage-derived adrenomedullin in atherogenesis.* **Clin Sci** 1999;97:247-251.
57. Pio R.; Martinez A.; Cuttitta F., *Cancer and diabetes: two pathological conditions in which adrenomedullin may be involved* , **Pept.** Volume 22, Number 11, November 2001 , pp. 1719-1729.
58. Martínez A , *A new family of angiogenic factors*, **Canc. Let.**, Volume 236, Issue 2, Pages 157-163.
59. Miller M. J , Martínez A, Unswort E.J, Thiele C.J , Moody T.W, Elsasser T. and Cuttitta F, *Adrenomedullin Expression in Human Tumor Cell Lines its potential role as an autocrine growth factor*, **J.Biol Chem.** Volume 271, Number 38, Issue of September 20, 1996 pp. 23345-23351
60. <http://en.wikipedia.org/wiki/Angiogenesis>
61. Kato H, Shichiri M, Marumo F and Hirata.Y, *Adrenomedullin as an Autocrine/Paracrine Apoptosis Survival Factor for Rat Endothelial Cells* **Endocrin.** Vol. 138, No. 6 2615-2620.
62. Sata M; Kakoki M; Nagata D; Nishimatsu H; Suzuki E; Aoyagi T; Sugiura S; Kojima H; Nagano T; Kangawa K; Matsuo H; Omata M; Nagai R; Hirata Y, *Adrenomedullin and Nitric Oxide Inhibit Human Endothelial Cell Apoptosis via a Cyclic GMP-Independent Mechanism*, **Hyperten.** 2000;36:83.
63. Martínez. A, Vos M, Guédez L, Kaur G, Chen Z, Garayoa M, Pio R, Moody T, Stetler-Stevenson W.G., Kleinman H.K., Cuttitta F, *The Effects of Adrenomedullin Overexpression in Breast Tumor Cells* , **JNCI J Nation Cancer Institute** 2002 94(16):1226-1237
64. Zaks-Zilberman. M, Salkowski, C.A ,Elsasser T, Cuttitta F, and Vogel S. N, *Induction of Adrenomedullin mRNA and Protein by Lipopolysaccharide and Paclitaxel (Taxol) in Murine Macrophages* , **Infect. Immun.** October 1998, p. 4669-4675, Vol. 66, No. 10
65. Kamoj, H., Kanazawa, H., Hirata, K., Kurihara, N., Yano, Y., Otani, S.(1995) *Adrenomedullin inhibits the secretion of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin-8 family, from rat alveolar macrophages.* **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **211**, 1031–1035.
66. Kubo. A, Minamino N, Isumi Y, Katafuchi T, Kangaw K, Dohi K, and Matsuo H, *Production of Adrenomedullin in Macrophage Cell Line and Peritoneal Macrophage*, **J Biol Chem**, Vol. 273, Issue 27, 16730-16738, July 3, 1998
67. Fedarko N.S, Fohr B, Robey P.G., Young M.F., and Fisher L. W, *Factor H Binding to Bone Sialoprotein and Osteopontin Enables Tumor Cell Evasion of Complement-mediated Attack*, **J. Biol. Chem.**, Vol. 275, Issue 22, 16666-16672, June 2, 2000.
68. Hanahan D and Folkman J, *Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis*, **Cell**, Vol. 86, 353–364, August 9, 1996.
69. Papetti M. and Herman I. M. , *Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis*, **Am J Physiol Cell Physiol** 282: C947-C970, 2002
70. Kim W, Moon S, Jeong M, Kim S.H, Lee S, So J and Park S.K, *Angiogenic Role of Adrenomedullin through activation of Akt . mitogen-activated protein kinase and focal adhesion kinase in endothelial cells*, **Fed. Am.Soc. Exp. Biol.** J. 17(2003) 1937-1939.
71. Ishikawa T, Chen J, Jin,WangJ, Okada F, Sugiyama T, Kobayashi T, Shindo M, Higashino F, Katoh H, Asaka M, Kondo T, Hosokawa M and Kobayashi M,

- Adrenomedullin antagonist suppresses in vivo growth of human pancreatic cancer cells in SCID mice by suppressing angiogenesis* **Oncogene** (2003) 22, 1238–1242. doi:10.1038/sj.onc.1206207
72. S.Imuro, T.Shinto, N.Moriyama, T. Amaki, P.Niu, N, Takeda, *Angiogenic effects of adrenomedullin in iskemi and tumor growth*, **Circ. Res.** 95 (2004)415-423.
73. Xia C.F, Yin H, Borlongan C.V, Chao J, *Adrenomedullin Gene Delivery Protects Against Cerebral Ischemic Injury by Promoting Astrocyte Migration and Survival*, **Human Gene Therapy**. 2004, 15(12): 1243-1254.
74. Hague S, Zhang L, Oehler MK, Manek S, MacKenzei IZ, Bicknel R, et al ,*Expression of hipoxically regulated angiogenic factor adrenomedullin correlates with uterine leioma vascular density*, **Clin. canc. Res.** 2000; 6(7):2808-14.
75. Oehler M.K, Hague S., Rees M. CP and Bicknel R, *Adrenomedullin promotes formation of xenografted endometrial tumors by stimulation of autocrine growth and angiogenesis*, **oncogene** 25 April 2002, Volume 21, Number 18, Pages 2815-2821.
76. Haris. A.L, *Angiogenesis as a new target for cancer control*, **EJC Supplements**, Vol NO.2 (2003) 1-12.
77. Folkman J, *Tumor Angiogenesis: Therapeutic implications*. **N.Eng J. Med** 1971; 285: 1182-6.
78. Bushhan M.,Yong.S.H., Brenchley.P.E.C and Griffiths C.E.M, *Recent advances in cutaneous angiogenesis*, **British journal of angiogenesis** ,2002, 147:418-425.
79. Klagsbrun M, D' Amore P. *Vascular endothelial growth factor and its receptors*. **Cytokine Growth Factor Rev** 1996; 7: 259-70.
80. Griffioen W.A, *Therapeutic Approaches of Angiogenesis Inhibition: Are We Tackling the Problem at the Right Level?*,**Trends Cardiovasc. Med.**2007; 17: 171-176
81. Ferrara N. *VEGF: An update on biological and therapeutic aspects*.**Curr Opin Biotechnol** 2000; 11: 517-24.
82. Kliche S, Waltenberger J. *VEGF receptor signaling and endothelial function*. **JUBMB Life** 2001; 52(1-2): 61-6.
83. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M et al. *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis*. **Am J Pathol** 1995; 146: 1029-39.
84. S.G. Martin, C. Orridge, A. Mukherjeeand D.A.L. Morgan, *Vascular Endothelial Growth Factor Expression Predicts Outcome after Primary Radiotherapy for Head and Neck Squamous Cell Cancer*, **Clin. Onc.** Volume 19, Issue 1, February 2007, Pages 71-76
85. D. Ribatti, *The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review*, **B J of Haematol** 128(3):303-309, February.
86. Quoc T. Ho and Calvin J. Kuo, *Vascular endothelial growth factor: Biology and therapeutic applications* ,**Inter.J.Biochem&Cell Biol.** Volume 39, Issues 7-8, July-August 2007, Pages 1349-1357 2005.
87. Ferrara N , Carver-Moore K , Chen. H , Dowd M. , Lu. L , O'Shea K.S. , L Powell-Braxton , K J Hillan , M W Moore *Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene*, **Nature**. 1996 Apr 4;380 (6573):439-42 8602242 [Cited: 85]
88. KambaT,Tam BY, Hashizume H, et al.*VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal. adult microvasculature*. **Am J Physiol Heart Circ phys.** 290. H560-H576.
89. Ferrara N, Davis-Smyth T. *The biology of vascular endothelial growth factor*. **Endocrin Rev** 1997; 18: 4-25.

90. Bates DO, Hillman NJ, Williams B et al. *Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors*. **J Anat** 2002; 200:587-597.
91. D. P. Berger, L. Herbstritt, W. A. Dengler, D. Marmé, R. Mertelsmann and H. H. Fiebig *Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human tumor models of different histologies*, **Annal. of Oncol.** 6:817-825, 1995.
92. Gerber. H.P, Ferrara. N, *The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis* **J of molecu. Med.**,81, 20-31.
93. Stuehr, d.j.,2004. *Enzyme of the L-arginin to nitric oxide pathway*. **J.Nutr.** 134.2748S-2751S, Discussion2765S-2767S
94. Haynes V. Elfring.S.,Traaseth N.,Giulivi,C.,2004, *Mitochondrial nitric oxide synthase: enzyme expression, charecterization, and the regulation*. **J.Bioenergy. Biomembr.**36, 341-346.
95. Drew. B.,Leeuwenburg.C.,2002.*Aging and the role of reactive nitrogen species*. **Ann. N.Y.Acad.Sci.**959, 66-81.
96. Blaise G.A., Gauvin D., Gangal M.,Authier S., *Nitric oxide, cell signalling and cell death*, **Toxicol.** 208, 2005, 177-192.
- 97.Krumenacker. J.S., Hanafy, K.A., Murad, F,2004. *Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cylase*. **Brain. Res. Bull.** 62, 505-515.
98. Moncada S.,Erusalimsky J.D.,2002, *Does NO modulate mitocontrial energy generation and apoptpsis?* **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**3,214-220.
99. Giuffre A. Brone, M,C, Mastronicola, D.,d'Itri. E.Sarti, P.Brunori,M., 2000.*Rection of nitric oxide with the turnover intermediates of cytocrome c oxidase: reaction pathway and functional Effects*: **Biochemistry** 39, 15446-15453.
100. Brune B, 2003, *Nitric oxide: NO apoptosis or turning it on?* **Cell death Differ.** 10, 864-869.
101. Coleman. C.W.,*NO in immunity and inflamation*. **Int. Immunopharmacol.**1,1397-1406. 2001
102. Bodgan. C.2001, *Nitric oxide and the regulation of gene expression*. **Trends cell biol.**11,66-75.
- 103 Cannon III, R.O.1998. *Role of the nitric oxide in cardiovascular Disease : focus on the endotelium*. **Clin.Chem.**44.1809-1819.
104. Ziche. M., Morbidelli.L.,2000. *Nitric oxide and angiogenesis*. **J.Neurooncol.**50, 139-148.
105. Bicker G., *Stop and Go with NO: Nitric oxide as a regulator of cell motility in simple brains*, 2005. **bioessays** 27, 495-505.
- 106.Van Der Vliet. A.,Eiserich, J.P, Cross C.E, 2000.*Nitric Oxide: a proinflammatory mediator in lung Disease?* **Respir. Res.**1, 67-72.
107. Lala.P.K.,1998. *Significance of nitric oxide in carcinogenesis and cancer therapy*. **Canc. Met. Rev.**17.1-6.
108. Janero, D.R., 1990. *Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic incides of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury*. **Free Radic.Biol. Med.**9, 515-540.
109. Jenkins, D.C. Charles, I.G.Thomsen L.L.,Moss, D.W.Homless, L.S.,Baylis S.A.Et.al.1995. *Role of nitric oxide in tumor growth*.**Proc.Natl.Acad.Sci.(USA)**92,4392-4396.
110. Lala.P.K.,Chakroborty C., 2001, *Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumor progression*. **Lancet Oncol.**2, 149-156.
111. Carswell E.A, Old.J.A, Kassel R.L, Green S, Fioere N, Williamson B, *An endotoxin-induced serum factor that cuses nekrosis of tumors*. **Proc Natl Acad Sci USA** 1975;72:3666-70.

112. MacEwan D.J. *TNF reseptor subtypesignalling: differences and celular concequences.* **Cell Sig.**2002; 14:477-92.
113. Chen G, Goeddel D.V. *TNF-R1 signalling: a beatiful pathway .* **Science** 2002; 296:1634-5.
114. Szlosarek .P.,Chaerles A.K, Ballwill R.Frances, *Tumor necrosis factor- α as a tumor promoter,* **Europ. J. Cancer** 42(2006) 745-750.
- 115.http://en.wikipedia.org/wiki/Tumor_necrosis_factor-alpha
- 116.http://en.wikipedia.org/wiki/Interleukin_6
117. Abbas AK ,Lichtman AH, Pober JS.: *Cellular and Molecular Immunology.2nd ed.* **Philadelphia** ,W.B.sounders, 1994.
118. Hirano T, Kishimoto T. Interleukins 4, 5and 6.in: Lachman PJ, Peters DK,Rosen FS ,Walport MJ (Eds). **Clinic. aspects immun.** Boston:Blackwell scientific publications, 5th edition 1993:299-313.
119. Elgert KD. **Immunology: understanding the Immun System.** New York ,Wiley-Liss,1996.
- 120.<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Immunology/Students/Spring2003/Sole/myfavprotein.htm>.
121. Alexandrova R., Nikolova E, *Matriks metalloproteinases and cancer,* **Experimental Pathol. Parasitol.**, 5/8, 2002.
122. Chris J, *Matrix Metalloproteinase and angiogenesis,* **Curr Opin Nephrol Hypertens** 11:295-299.
123. Gingras D, Bousguet-Gagnon N, Langiois S, et al, *Activation of extraceluler signal- regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane type-1matrix metalloproteinase (MT-1 MMP)* **FEBS lett** 2001; 507:231-236.
124. Marchenko GN, Rtnikov DV, et al, *Charecterization of matrix metalloproteinase-26, a novel metalloproteinase widely expressed in cancer cells of epithelial origin.* **Biochem J.** 2001; 356:705-718.
125. Djonov V, Hogger K, Sedlacek R, et al, *MMP-19 : celular lokalization of a novel metalloproteinase within normal breast tissue and mammary gland tumors.* **J.Pathol** 2001; 195: 147-155.
126. Kolwijk P, Sidenius N, Peters E, et al, *Proteolisis of the urokinase-type plasminogen activator reseptor by metalloproteinase-12: implication for angiogenesis in fibrin matrices.* **Blood** 2001; 97: 3123-3131.
127. Patterson M.L, Atkinson S.J, Knaupher V, Muphy G, *Specific collegenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain.* **FEBS lett** 2001; 503: 158-162.
128. Parks W.C., r.p.Mecham.*Matrix metalloproteinases.* **Acedemic pres,** San Diego.1998.
129. Nagase H.,J.F. Woessner Jr.*Matrix metalloproteinase –* **J.Biol.Chem.** 274, 1999, 21491-21494.
130. Liaw.L, H.C..Crawford, *Function s of the extracelular matrix and matrix degradating proteases during tumor progression,* **Brazillian J.Med.Biol.Res,** 32,1999,805-812.
131. McCawley. L.J.L.M.Matrisian. *Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression-***Mol.Med.**Today.6, 200.149-156.
132. Jhonson N.M.,Ahonen. V.M.Kahari, *matrix metalloproteinases in tumor invasion,***Cell.Mol.Life SCI.**20, 2000,5-15.
133. BrooksP.C, S.S.Stromblad, L.C.Sanders,T.L., Von Schalscha, .Aimes,W.B.Stetler-Stecenson J.P.Quigley D.A.,Cheresh, *Localization of matrix metlloproteinase MMP-2*

to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha V \beta 3$.-**Cell**, 85, 1996, 683-693.

134. Parsons S.L.,S.A.Watson.P.D.,Brown H.,M.Collins,R.J.C.Steele. *Matrix metalloproteinases*.-**Br.J.Surg**, 84, 1997, 160-166.

135. Guo H.S., Zucker M.K,Gordon P.B, Toole,C.Biswas, *Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells*, **J.Biol.Chem.**272, 1997, 24-27.

136.Kelly.T M.Borset, E.Abe, D.Gaddy-Kurten, R.D.Sanderson, *Matrixmetalloproteinases in multiple myeloma*, **Leuk.Lymphoma**, 37,2000, 273-281.

137. Ravanti L., VM. Kahari,*matrix metalloproteinase in wound repair(Review)*-**Int.J.Mol-Med**.6, 2000, 391-407.

138. Cawston T. *Matrix metalloproteinase s and TIMPs: propeptides and implication for the rheumatic diseases*- **Mol.Med.Today**, 1998,4,130-137.

139. Aslantürk Ö., Çelik(Aşkın) T, *Serbest Radikaller, Antioksidanlar ve Kanser Arasındaki İlişki, Klinik Biyokimya ve Kanser Sempozyumu* 26-29 Eylül 2002.

141. Yılmaz İ, 3- **Metilokolantrenin Sıçanların Yaşlanma Sürecinde Radikal Süpürücü Enzimler ve Toplam Glutasyon Düzeyine Olan Etkisi**, İnönü Üniversitesi, Doktora tezi, 1995.

142. Chaudiere J.,Ferari-Ilhou.R.,*Intra celular antioxidants: From Chemical to Biochemical Mechanisms*, **Food .Chem. Toxicol.** 37 (1999) 949-962.

143.

www.callutheran.edu/Academic_Programs/Departments/BioDev/omm/catalase/cat1.htm

144. Moddy S.C. AND Hassan M.Hosni, *Anerobic Biosynthesis of Manganese – Containing Superoxide Dismutase in Escherichia coli*, **FEMS Microbiol. Lett.** 25pp.12821-12825,1984.

145. Takeshita S., Inoue N, Ueyama T, Kawashima S, Yokoyama M, *Shear STRESS Enhances Glutathione Peroxidase Expression in Endothelial Cells*, **Biochem. Biophys. Res Commun** 273, 66-71 (2000).

146. Drevet J.R., *Tje antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa : A complex story*, **Molecular and Cellular Endocrin.** 250 (2006) 70-79.

147. Mezes M, Erdelyi M, Shaaban G, Virag G, Balogh K, Weber M, *Genetics of glutathione peroxidase*, **Symposium**, Volume 47 (1-4): 135-138. 2003.

148.Stojilkovi V, Todorovi A., Kasapovi J, Pejic S, *Antioxidant Enzyme Activity in rat hippocampus after chronic and acute stress*, **Biophys. from molecules to brain: in memory of radoslav .Andjus**,Volume 1048,373-376(2005) 149.Yoshimoto T,Fukai N,Sato R,Sugiyama T,oZAWA n, Shichiri M, Hirata Y, *Adrenomedullin Effects of Adrenomedullin on Angiotensin II-induced reactive oxygen species generation in vascular smooth muscle cells*, **Endocrin**,2004 July,145(7):3331-7 2004.

150.Oba S, Hino M, Fujita T, *Adrenomedullin protects against oxidative stress-induced podocyteinjury as an endogenous antioxidant*, **Nephrol Dial Transplant** 2 nov 2007.

151.Ohno H, Kondo T,Fujiwara Y,Tagami S,Kuroshima A,Kawakami Y, *Effects of cold stress on glutathione and related enzymes in rat erythrocytes*,**Inter. J. Biometerol.**,volume 35,number2,june 1991,111-113.

152.Kim J.V, Yi H.K, Hawang P.H, Yoon J.S, Kim H, J, *Effects of cold-water immersion on VEGF m-RNA and protein expression in heart and skeletal muscles of rats*, **Acta Physiol. Scand.**,volume 183,Issue 4, Page 389-397,April 2005.

153. Ohler MK., Fisher DC., Orlowska-Volk M, Herle F, Kieback DG, Rees MC, Bicknell R, *Tissue and Plasma Expression of The Angiogenic Peptide Adrenomedullin in Breast Cancer*, **Br J Cancer**, 2003 Nov 17;89(10): 1927-33.

154. Fernandez-Sauze S, Delfiono C, Mabrouk K, Dussert C, Chinot O, Martin P, Grisoli P, *Effects of Adrenomedullin on endothelial cells in multistep process of angiogenesis, Involvement of CRLR/RAMP2 and CRLR/RAMP3 receptors*, **Inter. J. of Canc.**, Vol.108, issue 6, pages 797-804.
155. Iimuro S, Shinto T, Moriyama N, Amiki T, Niu P, Takeda N, Iwata H, Zhang Y, Epihara A, Nagai R, *Angiogenic Effects of Adrenomedullin in ischemia and tumor growth*, **Circ. Res.** 2004 August; 20; 95(4) 415-23.
156. Martinez Alfredo, Vos Michele, Guendez Liliana, Kaur Gurmeet, Chen Zhong, Garayoa Mercedes, Pio Ruben, Moody Terry, Stetler-Stevensen G. William, Kleinman K. Hynda, Cuttitta Frank, *The Effects of Adrenomedullin Overexpression in Breast Tumor Cells*, **J. Natl Cancer Inst** 2002; 94:1226-37.
157. Oyar Öz Eser, Korkmaz Ayhan, Kardeş Özgür, Ömeroğlu Suna, *Aortic Cross-Clamping-Induced Spinal Cord Oxidative Stress in Rabbits: The Role of a Novel Antioxidant Adrenomedullin*, **J. Surgic. Res.** (2007).
158. Miyashita K, Itoh H, Sawada N, Fukunaga Y, Sone M, Yamahara K, Yurigi-Kobayashi T, Park K. and Nakao K. *Adrenomedullin, Provokes Endotelial Akt activation and Promotes Vascular Regeneration Both In vitro and In vivo*, **FEBS letters**, volume 544, Issues 1-3, 5 June 2003, Pages 86-92.
159. Abe M, Sata M, Nishimatsu H, Nagata D, Suzuki E, Terauchi Y, Kadowaki T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Hirata Y and Nagai R, *Adrenomedullin Augments Collateral Development in Response to Acute Ischemia*, **Biochem and Biophysic. Res. Com**, Volume 306, Issue 1, 20 June 2003, pages 10-15
160. Pavel ME, Hoppe S, Papadopoulos T, Linder V, Mohr B, Hahn EG, Lohmann T, Schuppan D. *Adrenomedullin is a Novel Marker of Tumor Progression in Neuroendocrine Carcinomas*, **Horm Metab Res** 2006; 38:112-118.
161. Xia CF, Yin H, Borlongan CV, Chao J and Chao L. *Postischemic Infusion of Adrenomedullin Protects Against Ischemic Stroke by Inhibiting Apoptosis and Promoting Angiogenesis*, **Exp. Neur.** , Volume 197, Issue 2, February 2006, Pages 521-530
162. Soyduñç H.O, Çamlıca H, Duranyılmaz .D, Sağlam K.E, Taş.F, Yasasever.V, Dalay.N, *Matriks Metalloproteinazlar ve Akciğer Kanseri*, **Türk Onkoloji Dergisi**, 2006; 21(2): 53-56.
163. Iı M., Yamamoto H, Adachi Y, Maruyama Y and Shinomura Y, *Role of Matrix Metalloproteinase-7 (Matriysin) in Human Cancer Invasion, Apoptosis, Growth, and Angiogenesis*, **Exp. Biol. Med** 231:20-27, 2006.
164. Özçelik T, Ali R, Özkalemkaş F, Özkocaman V, Ozan Ü, Öztürk H, Tunalı A, *Akut Lösemili Hastalarda Anjiyenezsin Değerlendirilmesi*, **Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi**, 29(2): 1-6, 2003.
165. Stephen J. Clarke and Rohini Sharma, *Angiogenesis inhibits in cancer-mechanism of action*, **Exp. clin. pharmacol**, 2006, 29:9-12. rq12qw
166. Hauge S, Zhang L, Ohler K.M, Manek S, MacKenzie Z. Ian, Bicknell R ve Rees C.P.M., *Expression of the Hypoxically Regulated Angiogenic Factor Adrenomedullin Correlates with Uterine Leiomyoma Vascular Density*, **Clin. Cancer Res.**, Vol6, 2808-2814, July 2000.
167. Nikitenko LL, MacKenzie IZ, Rees MCP and Bicknell R. *Adrenomedullin is an Autocrine Regulator of Endotelial Growth in Human Endometrium*, **Molecul. Human Repr.**, vol.6, no.9, 811-819, September 2000.
168. Pedersen K. Bente and Christian P. Fischer, *Beneficial health effects of exercise-the role of IL-6 as a myokine*, **TRENDS in Pharmacol. Sci.** Vol.28 No.4.

169. Slater Micheal, M.cooper, C.R.Murphy, *Human growth hormone and interleukin-6 are upregulated in endometriosis and endometrioid adenocarcinoma*, **Acta histochemica** 108(2006) 13-18.
170. Naudin J, Capo C, Giusano B, Mege J.L, Azorin J.M, *A differential role for interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in schizophrenia?*, **Schizophrenia Res.** 26 (1997) 227-233.
171. S Chandrashekara , K Jayashree , H B Veeranna , H S Vadiraj , M N Ramesh , A Shobha , Y Sarvanan , Yeragani K Vikram, *Effects of anxiety on TNF-alpha levels during psychological stress.* **J Psychosom Res.** 2007 Jul ;63 (1):65-9 17586339
172. Wu R, Zhou M, Wang P. *Adrenomedullin and adrenomedullin binding. protein-1 downregulate TNF- in macrophage cell line and rat Kupffer. Cells*, **Regul pept.**, 112 (2003) 19-26.
173. *Expression of interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in brain tissue and serum of rats with focal brain ischemia*, **J. chiana med. Univ.** 36(1): 5-6, 19 2007.
174. Li Liu, Hui Bi, Su-Min Chi, Rong Fan, Yue-Min Wang, Xin-Liang Ma, Yao-Ming Chen, Wen-Jing Luo, Jian-Ming Pei and Jing-Yuan Chen, *The effect of compound nutrients on stress-induced changes in serum IL-2, IL-6 and TNF- α levels in rats* , , **Cytokine** Volume 37, Issue 1, January 2007, Pages 14-21
175. Y. Shibata, B. Kashiwagi, S. Arai, T. Magari, K. Suzuki, S. Honma *Participation of adrenomedullin and its relation with vascular endothelial growth factor in androgen regulation of prostatic blood flow in vivo.* **Urol.**, Volume 68, Issue 5, Pages 1127-1131
176. A.Cordellini S.; Vassilieff V.S *Decreased Endothelium-Dependent Vasoconstriction to Noradrenaline in Acute-Stressed Rats Is Potentiated by Previous Chronic Stress: Nitric Oxide Inv.*, Volume 30, Number 1, January 1998 , pp. 79-83(5)
177. E Ishizuka Y.; Jin Q.-H.; Ishida Y.; Kato K.; Kunitake T.; Hanamori T.; Mitsuyama Y.; Kannan H., *Effects of different stress on nitric oxide and norepinephrine releases in the paraventricular nucleus region in conscious rats* **Neur. Res.**, Volume 31, Supplement 1, 1998 , pp. 240-240(1)
178. Sfakianaki A., İrina A, Ravishankar V., Bahtiyar .O.M, Dulay A, Buhimschi.C.S, *Relation Of Metarnal Serum Levels Of Vascular Endothelial Growth Factor And Tensile Properties Of The Cervix In Arat Model Of Chronic Hipoxia*, **Am. J. Obst&Gnecol.**Page.425.
179. Hiroaki Sasaki, Partha S. Ray, Li Zhu, Nathaniel Galang and Nilanjana Maulik., *Oxidative stress due to hypoxia/reoxygenation induces angiogenic factor VEGF in adult rat myocardium: possible role of NF κ B* ,**Toxicol.** Volume 155, Issues 1-3, 30 November 2000, Pages 27-35
180. Kunishige M, Akutagawa O, Sakai Taku, Rakugi H, Ogihara T, Nishibe A, Hata T., Kijima Y, *Elavation Of Serum Matrix Metalloproteinase (Mmp)-2 And Oxidant Stress İn Patient With Acute Worsening Of Chronic Heartfailure*, **J. card. Fail.** Vol. 11 NO.9 Suppl 2005.page.85
181. Suyuma T, Miyamoto Y, Osugi S, Ueoka Y, Matsumoto T, Ishida C, Miyagawa S, Taketani S, Akimaru H, Kurata H, *Constitutive Production And İschemic Responses Of Angiogenic And Angiostatic Cytokines İn Miyocardium*, **J. card. Fail.** Vol. 11 NO.9 Suppl 2005.page.85
- 182.Savas HA, Herken H, Yurekli M, Uz E, Tutkun H, Zoroglu SS, Ozen ME, Cengiz B, Akyol O. *Possible role of nitric oxide and adrenomedullin in bipolar affective disorder* **Neuropsychobiol.** 2002;45(2):57-61183.

183. Zoroglu SS, Herken H, Yurekli M, Uz E, Tutkun H, Savas HA, Bagci C, Ozen ME, Cengiz B, Cakmak EA, Dogru MI, Akyol O. *The possible pathophysiological role of plasma nitric oxide and adrenomedullin in schizophrenia* **J Psychiatr Res.** 2002 Sep-Oct;36(5):309-15
184. Şengül Yüksel and Dilek Asma, *Effects of extended cold exposure on antioxidant defense system of rat hypothalamic–pituitary–adrenal axis* , **J. Therm . Biol.** Volume 31, Issue 4, May 2006, Pages 313-317
185. Doğru. M.İ., ‘*Ağır Metal ve Adrenomedullin Uygulamsının Bazı Sıçan Dokularında Antioksidan Savunma Sistemi Üzerine Etkilerinin Araştırılması*’, İnönü Üniversitesi, Doktora tezi, Malatya, 2007.
186. Wang, Yi; Zhang, Jin-Sheng; Qian, Jin; Huang, Guang-Cun; Chen, Qi, *Adrenomedullin regulates expressions of transforming growth factor- β 1 and β 1-induced matrix metalloproteinase-2 in hepatic stellate cells*, **Inter. J. Exper. Path.**, Volume 87, Number 3, June 2006 , pp. 177-184(8)
187. Toshihiro Tsuruda, Johji Kato, Yuan-Ning Cao, Kinta Hatakeyama, Hiroyuki Masuyama, Takuroh Imamura, Kazuo Kitamura, Yujiro Asada and Tanenao Eto ,*Adrenomedullin induces matrix metalloproteinase-2 activity in rat aortic adventitial fibroblasts*, **Biochem. Biophysic. Res. Commun** Volume 325, Issue 1, 3 December 2004, Pages 80-84.
188. Valentin F, Bueb JL, Kieffer P, Tschirhart E, Atkinson J *Oxidative stress activates MMP-2 in cultured human coronary smooth muscle cells*, **Fundam Clin Pharmacol.** 2005 Dec;19(6):661-7
189. <http://web.indstate.edu/thcme/mwking/protein-modifications.html>
190. Bradford MM. *A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding.* **Anal Biochem** 1976; 72: 248-54.
191. Luck H. *Methods of enzymatic analysis*, Verlag Chemie, Academic Pres, New York, 1988, 885-888.
192. Tümer N, Rochelle J. S L. and Yürekli M, *Exercise training reverses the age-related decline in tyrosine hydroxylase expression in rat hypothalamus.* **J. Geront.:** Biological Science, 52A (5), B255-B259, 1997.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Gaziantep’te doğdu. İlk ve orta öğrenimini Gaziantep’te tamamladı. 1997 yılında İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2001 yılında mezun olup aynı yıl Yüksek lisans eğitimine başladı. 2003 yılında Yüksek lisans eğitimini tamamlayıp, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Doktora eğitimine başladı. Evli ve bir çocuk annesi olup İngilizce bilmektedir.