



Epinefrin Ve Soğuk Stresinin Tirozin Hidroksilaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi⁺

Şengül Yüksel *, Muhittin Yürekli **

* İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, Malatya

** İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji AD, Malatya

Soğuk stresinin memeli hayvanlarda adrenerjik sistemi uyardığı ve katekolamin sentezinde anahtar rolü olan tirozin hidroksilaz (TH) enzim aktivitesini artırdığı bilinmektedir. Bu çalışmada epinefrin ve soğuk stresinin sıçan adrenal medulla, kalp ve hipotalamus dokularında TH enzim aktivitesi ve total RNA seviyesi üzerine etkileri karşılaştırmalı olarak araştırıldı. Epinefrin uygulaması ile her üç dokuda TH enzim aktivitesi ve total RNA miktarında belirgin artış kaydedildi. 48 saat soğuk stresi uygulaması sonucunda her üç dokuda TH enzim aktivitesinin arttığı belirlendi. Benzer şekilde adrenal medulla hariç kalp ve hipotalamus total RNA miktarında da artış kaydedildi.

Anahtar kelimeler: Epinefrin, Soğuk stresi, Tirozin Hidroksilaz, Sıçan

Effects of Epinephrine And Cold Stress On Tyrosine Hydroxylase Enzyme Activity

It has been known that the cold stress inducts the adrenergic system and increases tyrosin hydroxylase (TH) enzyme activity which has a key role on the catecholamine synthesis. In this study, the effects of epinephrine and cold stress on TH enzyme activity and total RNA level of rat adrenal medulla, heart and hypothalamus were examined comparatively. It was found that there was clear increase of TH enzyme activities and total RNA concentrations in three tissues with administration of epinephrine. It was also observed that there was an increase in TH enzyme activity at the end of the 48-hour cold stress treatment. Similarly, total RNA concentration was increased in heart and hypothalamus except adrenal medulla.

Key words: Epinephrine, Cold Stress, Tyrosine Hydroxylase, Rat

+ *Bu çalışma İnönü Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 97/06 nolu proje kapsamında desteklenmiş ve 2-5 Kasım 2000 tarihleri arasında Denizli'de düzenlenen 6. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresinde poster bildiri olarak sunulmuştur.*

Katekolaminler, homeostazisin korunmasında etkin rol oynayan endokrin ve nörotransmitter aktiviteye sahip biyokimyasal maddelerdir.

Katekolaminler kan-beyin engelini aşamadıklarından beyinde lokal olarak sentez edilmelidirler. Katekolaminler merkezi sinirsel işlevlerde nörotransmitter ve modülatör olarak aktivite gösterirler. Katekolaminlerin sentezi ve salınması beyinde, adrenal kromaffin hücrelerde, sempatik ganglionlarda ve kalpte meydana gelmektedir. Katekolaminlerin biyosentez hızı, biyosentezde yer alan enzimlerin aktivitesinin artmasının bir sonucudur. Bu enzimlerden en çok ifade edileni, reaksiyonun ilk basamağını katalizleyen tirozin hidroksilaz (TH) enzimidir. TH enzim aktivitesindeki değişiklikler pretranslasyonel ve posttranslasyonel düzenlemeleri içeren çok yönlü hücrel kontrol mekanizmaları tarafından kontrol edilmektedir.

Soğuk stresi simpatoadrenal sistemde katekolamin sentez ve salınımını artırmaktadır. Kronik soğuk stresinin beyin, adrenal bez, kalp gibi çeşitli dokularda TH sentezindeki değişiklikleri indüklediği, böylece TH enziminin aktivitesini, mRNA ve protein miktarını önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir.¹⁻⁵

Bu çalışmada, 48 saat 8 °C'de soğuk stresine maruz bırakılan ve 1 mg/kg epinefrin uygulanan (İp) sıçanların adrenal medulla, kalp, hipotalamus gibi organlarında TH enzim aktivitesi ve total RNA seviyeleri değişikliklerin saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deneylerde Kullanılan Sıçanlar: Deneylerde İnönü Üniversitesi DeneY Hayvanları Araştırma Merkezince üretilen 150-250 gr. ağırlığında Üç aylık toplam 21 adet Sprague-Dawley sıçanı kullanıldı. Sıçanlar 12 saat aydınlık/karanlık, havalandırılmı, sabit ısılı odalarda ve özel kafeslerde barındırıldı.

Epinefrin (Adrenalin) Uygulaması: Altı adet sıçana epinefrin (Drogsan) ticari preparatından hazırlanan solüsyon 1 mg/kg dozda enjekte edildi (İp). Uygulamadan sonra hayvanlar bir saat süre ile dinlenmeye bırakıldı bu süreden sonra diseksiyon işlemine geçildi.

Soğuk stresi uygulaması: Soğuk stresi uygulaması için sekiz adet sıçan 48 saat süre ile +8 °C'de soğuk maruz bırakıldı. Her kafeste bir hayvan olacak şekilde sıçanlar 30 dakika ara ile buzdolabına yerleştirildi. Kontrol grubunu oluşturan 6 adet sıçan ise oda sıcaklığında muhafaza edildi. Hayvanlara yeterli miktarda yem ve su verildi.

Diseksiyon işlemi ve Dokuların alınması: Tüm uygulama ve kontrol grubu sıçanlara ketamin 75 mg/kg (İp) olacak şekilde verilerek anesteziye edildi. Hayvanların abdomenlerine bir kesik yapılarak vücudun iç kısmı yukarı doğru göğüs kafesine kadar açıldı. Vena kava kesilip kalbe 20 ml %0.9'luk NaCl enjekte edilerek perfüzyon işlemi tamamlandı. Adrenal bezlerin medulla kısmı, kalp ventrikülü ve hipotalamus dikkatlice alınarak ağırlıkları kaydedildi. Sonifiye edilen homojenatlar kullanılmaya kadar -40 °C'de derin dondurucuda saklandı.

Total Protein Saptanması: Total protein miktarını saptamak için Bradford yöntemi kullanıldı.⁶

TH Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi: TH enzim aktivitesi Reinhard 1986⁷ metodu esas alınarak tamponlar ve

bileşenlerin konsantrasyonlarında değişiklikler yapılarak modifiye edildi ve spektrofotometrik olarak saptandı.

Total RNA Eldesi: Dokulardaki total RNA'nın eldesi için ekstraksiyon, presipitasyon ve yıkama-yeniden çözme işlemleri uygulandı (Chomzynski 1987)⁸. Total RNA miktarı spektrofotometrik analiz ile ölçüldü.

İstatistiksel Yöntem: İstatistiksel değerlendirmelerde SPSS for Windows programı kullanıldı. İstatistiksel analizler her bir dokuda ölçülen parametrelerin uygulama gruplarında, gruplar arası ile kontrol grubu değerleri arasında farkın önemlilik derecesi ANOVA ve Least Significant Differences Testi (LSD) ile yapıldı. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak gösterildi.

BULGULAR

TH Enzim Aktivitesi Değişimi: Adrenal medullada TH enzim aktivitesi kontrol grubu sıçanlarda 32.91±0.60 nmol/mg. protein.saat, epinefrin grubunda 68.21±6.13 nmol/mg. protein.saat ve soğuk stresi grubunda 52.30±7.15 nmol/mg. protein.saat olarak ölçüldü. Uygulama grupları ile kontrol grubu arası farklılık önemli bulundu (P<0.05).

Kalpte TH enzim aktivitesi kontrol grubunda 28.40±4.46 nmol/mg. protein. saat, epinefrin grubunda 37.60±3.32 nmol/mg. protein.saat ve soğuk stresi grubunda 43.84±6.01 nmol/mg. protein.saat olarak ölçüldü. Epinefrin uygulaması ile kalp TH aktivitesi azalmasına karşın kontrolden farkının önemli olmadığı buna karşın soğuk stresi uygulamasının TH enzim aktivitesini önemli ölçüde artırdığı belirlendi (P<0.05).

Hipotalamusta TH enzim aktivitesi kontrol grubu sıçanlarda 50.37±4.13 nmol/mg. protein.saat olarak ölçüldü. Epinefrin grubunda TH enzim aktivitesi 54.81±2.82 nmol/mg. protein.saat, soğuk stresi grubunda ise 54.38±3.58 nmol/mg. protein.saat olarak saptandı ve uygulama gruplarının kontrolden farkı önemli bulunmadı (Tablo 1, Şekil 1).

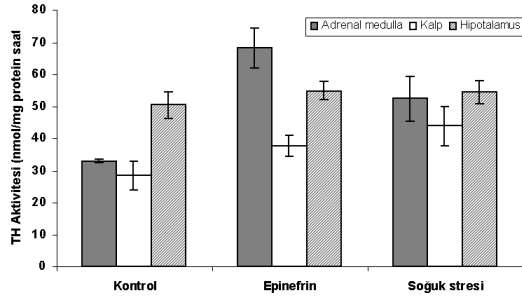
Total RNA Seviyesi Değişimi: Adrenal medulla total

Tablo 1. Epinefrin ve soğuk stresi uygulaması ile TH enzim aktivitesi değişimi.

Grup	TH Aktivitesi (nmol/mg.protein. saat)		
	Adrenal medulla	Kalp	Hipotalamus
Kontrol	32.91 ± 0.61	28.40±4.46	50.37±4.14
Epinefrin	68.21 ± 6.14 *	37.60±3.32	54.81±2.83
Soğuk Stresi	52.30± 7.15 *	43.85±6.01 *	54.38±3.58

* : Kontrolden anlamlı farklı

Epinefrin Ve Soğuk Stresinin Tirozin Hidroksilaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi



Şekil 1. Kontrol, epinefrin ve soğuk stresi uygulanan sıçanlarda adrenal medulla, kalp ve hipotalamusta TH enzim aktiviteleri

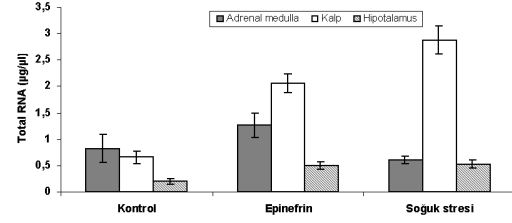
RNA miktarı kontrol grubu sıçanlarında $0.82 \pm 0.27 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak ölçüldü. Epinefrin uygulama grubunda total RNA miktarının arttığı ($1.26 \pm 0.23 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) ve kontrolden farkının anlamlı olduğu belirlendi ($P < 0.05$). Soğuk stresi uygulanan sıçanlarda ise total RNA miktarı $0.60 \pm 0.07 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak bulundu ve kontrol değerden farkının önemli olmadığı saptandı.

Kalp total RNA miktarı epinefrin uygulama grubunda $2.06 \pm 0.18 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ve soğuk stresi grubunda $2.88 \pm 0.26 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak ölçüldü. Kontrol grubu sıçanların kalp total RNA miktarı ise $0.65 \pm 0.10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak kaydedildi. Epinefrin ve soğuk stresi uygulamasının kalpte total RNA seviyesini önemli ölçüde artırdığı ve bu artışın anlamlı olduğu belirlendi ($P < 0.05$).

Hipotalamus total RNA miktarı kontrol grubu sıçanlarda $0.20 \pm 0.04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak bulunurken epinefrin uygulaması ile bu değer $0.50 \pm 0.06 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 'a, soğuk stresi uygulaması ile $0.52 \pm 0.08 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ yükseldiği ve bu artışın önemli olduğu saptandı ($P < 0.05$) (Tablo 2, Şekil 2).

TARTIŞMA

Homeostazisinin korunmasında etkin rol oynayan



Şekil 2. Epinefrin ve soğuk stresi uygulamasının total RNA seviyesine etkisi.

katekolaminler, nörotransmitter madde olarak hem sinirsel hemde hormonal fonksiyona sahip bileşiklerdir. Katekolaminlerin biyosentezi ve salınması kısa sürede gerçekleşmektedir. Katekolaminlerin biyosentezinde ilk basamak reaksiyonu katalizleyen TH enzimi, katekolaminlerin sentez hızını kontrol etmede anahtar rol oynamaktadır. TH enzim aktivitesi, adrenal medullada katekolamin sentez kapasitesinin bir göstergesi ve çeşitli hayvan türlerinde kronik stresin indikatörü olarak kabul edilmektedir.

Epinefrin, genellikle adrenal medullada sentezlenip salınan nörohormonal bir katekolamindir. 4 aşamalı reaksiyon serisinden sonra epinefrin biyosentezi gerçekleşmektedir. Epinefrinin biyosentez hızı, reaksiyonun ilk basamağını katalizleyen TH enzimi tarafından kontrol edilmektedir. Epinefrin özellikle aşırı fizyolojik uyarım durumunda kardiyovasküler sistemi etkileyerek organizmayı acil duruma hazırlamaktadır. Dolaşımda bulunan epinefrin adrenal medullada sentezlenmekte ve adrenal medullar aktiviteyi karakterize etmektedir.⁹

Tirozin hidroksilaz, aromatik L-amino asit dekarboksilaz ve dopamin beta hidroksilaz gibi katekolamin biyosentetik enzimler adrenal medulladaki bütün kromaffin hücrelerinde bulunmaktadır. Adrenerjik hücre gruplarında katekolamin üretiminden öncelikli sorumludurlar.¹⁰

Yapılan bir çalışmada, sıçanlara dopamin verilmesi

Tablo 2. Epinefrin ve soğuk stresi uygulaması ile total RNA seviyesi değişimi.

Grup	Total RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)		
	Adrenal medulla	Kalp	Hipotalamus
Kontrol	0.82 ± 0.27	0.65 ± 0.11	± 0.05
Epinefrin	$1.26 \pm 0.23^*$	$2.06 \pm 0.18^*$	$0.50 \pm 0.07^*$
Soğuk stresi	0.60 ± 0.07	$2.88 \pm 0.26^*$	$0.52 \pm 0.08^*$

* : Kontrolden anlamlı farklı

sonucu adrenal bezlerde DOPA birikiminin arttığı bununda TH enzim aktivitesinin stimülasyonunun bir göstergesi olduğu rapor edilmiştir. Böylece dopamin uygulamasının katekolamin sentezini uyarak TH aktivitesini artırdığı bildirilmiştir.¹¹

Çalışmamızda sıçanlara dışarıdan epinefrin verilmesi ile adrenal medullada TH enzim aktivitesinin ve total RNA konsantrasyonunun önemli seviyede arttığı saptanmıştır. Epinefrinin adrenal medullada TH aktivitesi total RNA miktarı üzerine etkisi diğer uygulama gruplarından çok daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu durum literatür bilgilerini desteklemekte ve benzer çalışmalarla uygunluk göstermektedir.

Epinefrin uygulamasının veya vücutta epinefrin miktarının bir şekilde artmasının kalp fizyolojisi üzerine doğrudan etkisi olduğu bilinmektedir. Bazı araştırmacılar kalp regülasyonunda adrenal medullanın rolünün, kalpte adrenerjik nöral etki azaldığı anda daha önemli olduğunu rapor etmişlerdir.¹² Yaptığımız çalışmada epinefrin uygulaması ile kalp dokusunda total RNA miktarının yüksek olduğu saptandı.

Soğuk maruz kalmak, sempatik sinir sisteminin aktivitesini katekolaminlerin sentez ve salınımının artışına bağlı olarak artırmaktadır. Soğuk stresinin TH enzim aktivitesi, miktarı ve TH mRNA'sı üzerine etkileri konusunda bir çok araştırma yapılmıştır. Literatür bilgileri soğuk stresinin tirozin hidroksilaz enziminin mRNA miktarını, aktivitesini ve konsantrasyonunu artırdığı yönündedir.^{1-5, 13}

Yapılan bir çalışmada soğuk uygulamasından sonra bir saat gibi kısa süre içinde adrenal bez ve beyinde TH mRNA seviyesi normalden %71 oranında artış gösterdiği rapor edilmiştir. Protein seviyesi 24 saat sonra maksimum seviyeye ulaşırken enzim aktivitesi ancak 48 saat sonra maksimum seviyeye ulaştığı bildirilmiştir.³

Tarafımızdan yapılan çalışmada soğuk stresinin katekolamin biyosentezi ve salınması üzerine etkileri, TH enzimi üzerinde araştırılmıştır. Yaptığımız çalışmada sıçanlar 48 saat süre ile 8 °C'de kronik soğuk stresine maruz bırakılmış ve adrenal medullada TH enzim aktivitesinin arttığı bulunmuştur. Soğuk stresi uygulamasının sıçanların adrenal medullasında total RNA konsantrasyonunu değiştirmedeği saptanmıştır. Yaptığımız çalışmada soğuk stresine maruz kalmış sıçanlarda TH enzim aktivitesinin artması literatür bilgileri ile uygunluk göstermektedir.

Çalışmamızda soğuk stresine maruz kalmış sıçanların kalplerinde TH enzim aktivitesinin ve total RNA miktarının arttığı bulunmuştur.

Rat beyinde ventral tegmental bölge ve orta substantia nigradaki dopamin nöronların stresin algılanması ve davranışsal etkilerde önemli rol oynadığı belirlenmiş ve aynı çalışmada kronik soğuk stresin (4 °C-17 gün) dopamin nöron aktivitesini % 64 oranında azalttığı rapor edilmiştir.¹⁴ Yine akut soğuk stresinin merkezi sinir sistemindeki nöronal aktivitesi üzerine yapılan bir çalışmada TH ve fos-çift immünoreaktivite yapılarak soğuk duyarlı nöronların başta rat beyinde pons retiküler bölge olmak üzere talamus, hipotalamik dorsomedial ve supramamillary bölgede lokalize oldukları bildirilmiş, böylece hipotalamus-hipofiz-adrenal ekseninde başka sistemlerinde soğuk süresince homeostasisin sağlanmasında rol oynadıkları iddia edilmiştir.¹⁵ Sıçanlara 4 gün 4 °C'de kronik soğuk stresi uygulanan bir çalışmada; farklı beyin bölgelerinde TH enzim aktivitesi, TH protein miktarı ve TH mRNA seviyesi değişimleri araştırılmış ve her üç parametrede önemli artış kaydedilmiştir. Kronik soğuk stresinin etkileri RNA-DNA hibridizasyon tekniği kullanılarak araştırılmış ve TH mRNA miktarını 4-5 kat artırdığı bildirilmiştir.¹⁶ Çalışmamızda hipotalamusda TH enzim aktivitesi artmasına rağmen bu artışın kontrolden farkının önemli olmadığı, total RNA miktarının ise önemli ölçüde arttığı saptanmıştır. Total RNA miktarındaki artışlar transkripsiyonel prosesteki artışın göstergesidir dolayısıyla total RNA miktarındaki değişiklikler her zaman protein sentez hızını yansıtmayabilir.

KAYNAKLAR

1. Stachowiak M.K., Fluharty S.J., Stricker E.M., Zigmund M.J., Kaplan B.B.; Molecular Adaptations in Catecholamine Biosynthesis Induced By Cold Stress and Sympathectomy; J. Neuroscience Research, 1986, 16: 13-24.
2. Richard F., Biguet N., Labatut R., Rollet D., Mallet J., Buda M.; Modulation Of Tyrosine Hydroxylase Gene Expression In Rat Brain And Adrenals By Exposure To Cold; J. Neuroscience Research 1988; 20:32-37.
3. Baruchin A., Weisberg E.P., Ennis D., Nisenbaum L.K., Naylor E., Stricker E.M., Zigmund M.J., Kaplan B.B.; Effects Of Cold Exposure On Rat Adrenal Tyrosine Hydroxylase: An Analysis Of RNA, Protein, Enzyme Activity, And Cofactor Levels; J. Neurochemistry 1990; 54: 1769 – 1775
4. Fukuhara K., Kvetnansky R., Weise V.K., Ohara H., Yoneda R., Goldstein D.S., Kopin I.J.; Effects of Continuous and Intermittent Cold (SART) Stress on Sympatoadrenal System Activity in Rats; J. Neuroendocrinol.; 1996, 8:1, 65-72
5. Osterhout CA., Chikaraishi DM., Tank AW.; Induction of Tyrosine Hydroxylase Protein and a Transgene Containing Tyrosine Hydroxylase 5' Flanking Sequences by Stress in Mouse Adrenal Gland; J. Neurochem. 1997, 68:3, 1071-1077.
6. Bradford MM.; A Rapid Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding; Anal. Biochem.; 1976, 72: 248-254.
7. Reinhard J.F., Gary K., Smith and Charles A.N.; A Rapid and Sensitive Assay for Tyrosine 3-Monooxygenase Based Upon the Release of ³H₂O and Adsorption of ³(H)-Tyrosine by Charcoal; Life Science; 1986;39: 2185-2189.
8. Chomzynski P., Sacchi N.; Single-step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-phenol-Chloroform Extraction. Anal Biochem.; 1987, 162: 156-159.

Epinefrin Ve Soğuk Stresinin Tirozin Hidroksilaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

9. Noyan A., Fizyoloji Ders Kitabı; Anadolu Üniversitesi Yayınları; No 2; Meteksan Ankara 1989; 1083-1094.
10. Phillips JK., Dubey R., sesiaskevili E., Takeda M., Christie DL., Lipski J.; Differential Expression of Noradrenaline Transporter in adrenergic Chromaffin Cells, Ganglion Cells and Nerve Fibres of the Rat Adrenal Medulla, J. Chem. Neuroanat., 2001 21 (1): 95-104.
11. Kujacic M., Charlsson A.; In vivo Activity of Tyrosine Hydroxylase in Rat Adrenal Glands Following Administration of Quinpirole and Dopamine; Eur.J. Pharmacol.; 1995; 4:278 (1): 9-15
12. Gauthier P., Nadeau R., De Champlin J.; Acute and Chronic Cardiovascular Effects of 6-Hydroxydopamine in Dogs ; Circ. Res.; 1972, 31: 207-217.
13. Liu IM., Niu CS., Chi TC., Kuo DH., Cheng JT.; Investigations of the Mechanism of the Reduction of Plasma Glucose by Cold-Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats; 1999, 92(3): 1137-1142.
14. Moore H., Rose HJ., Grace AA.; Chronic Cold stress Reduced the Spontaneous Activity of Ventral Tegmental dopamine Neurons; Neuropsychopharmacology; 2001, 24(4), 410-419.
15. Baffi JS., Palkovits M., Fine Topography of brain Areas Activated by Cold Stress. A Fos Immunohistochemical Study in Rats, Neuroendocrinology, 2000, 72(2): 102-13.
16. Stachowiak M., Sebbane R., Zigmund M., Kaplan BB.; Effect of Chronic Cold Exposure on Tyrosine Hydroxylase mRNA in Rat Adrenal Gland; Brain Research; 1985, 359: 356-359.

Yazışma Adresi:

Dr. Şengül Yüksel

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi,

Tıbbi Biyoloji AD, 44069 MALATYA

Tel: 422 341 0660/1324

E-mail: syuksel@inonu.edu.tr