



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDOTEL HÜCRELERDE OKSİTOSİNİN NİTRİK OKSİT
SENTEZİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN MEKANİZMASI VE
ÖSTROJENİN OKSİTOSİNİN ETKİLERİNİN
DÜZENLENMESİNDEKİ ROLÜ**

HÜMEYRA TURAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. A. Serpil Bilsel

İSTANBUL-2008

I. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım da danışmanlığımı yapan, her konuda destek ve bilgisini benden esirgemeyen, her türlü imkanı sağlayan değerli hocam Prof. Dr.Serpil Bilsel'e teşekkürlerimi sunarım.

Ve diğer Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri, değerli hocalarım; Prof.Dr. Kaya Emerk'e, Prof.Dr. Süha Yalçın'a, Prof.Dr. Nesrin Kartal Özer'e, Prof.Dr. Yavuz Taga'ya, Prof.Dr. Goncagül Haklar'a ve Prof.Dr. Önder Şirikçi'ye;

Çalışmalarım süresince yardım aldığım ve ortak çalışma yaptığım Özlem Gümüştekin, Özgür Tekeli'ye ve Ömer Kaçar'a ;
canım arkadaşım, dostum Tuğba Bayram'a, başta Gökçeçiçek Gülyaz ve Burak Yazgan olmak üzere tüm yüksek lisans öğrencilerine desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, dualarıyla hep yanımda olduklarını bildiğim canım ailem; babam Talip Turan, annem Fatma Turan ve kardeşlerim Sümeyra Turan ve Ekrem Turan'a sonsuz teşekkürler.

Ayrıca her zaman yanımda olan ve desteğiyle bana güç veren nişanlım Ekrem Akdeniz'e her zaman yanımda olması dileğiyle sonsuz teşekkürler.

Bu tez çalışması Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı (SAĞ-YLS-140607-0106) no'lu proje tarafından desteklenmiştir

II. İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR	I
II. İÇİNDEKİLER	II
III. KISALTMALAR	IV
IV. ŞEKİL, RESİM VE TABLOLARIN LİSTESİ	VI
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Endotel Hücreler	5
4.2. Nitrik Oksit ve Nitrik Oksit Sentazlar	10
4.3. Östrojen	16
4.3.1. Östrojen ve Östrojen Reseptörleri	17
4.3.2. Östrojenin damar sistemi üzerine etkileri	17
4.3.2.1. Östrojenin direkt vasküler etkileri	18
4.3.2.2. Östrojenin diğer vasküler etkileri	20
4.3.3. Östrojen ve nitrik oksit	22
4.4. Oksitosin	25
4.4.1. Oksitosin ve Oksitosin Reseptörü	26
4.4.2. Sinyal Mekanizması	28
4.4.3. Oksitosin ve Damar sistemi	28
4.4.4. Oksitosin ve Nitrik Oksit	30
5. GEREÇ VE YÖNTEMLER	
5.1. Kullanılan Gereçler	31
5.2. Kullanılan Çözeltiler	32
5.2.1. Hücre kültürü çözeltileri	32
5.2.2. Protein İzolasyonu çözeltileri	34
5.2.3. SDS-PAGE ve transfer çözeltileri	35
5.2.4. Western Blotting malzemeleri ve çözeltileri	37

5.3. Yöntemler	38
5.3.1. Endotel hücre kültürü	38
5.3.2. Nitrik oksit ölçümü	40
5.3.3. Protein izolasyonu	42
5.3.4. BCA Protein Tayin Yöntemi	42
5.3.5. SDS-PAGE Yöntemi	43
5.3.6. Western Blotting Yöntemi	44
5.3.6.1. Western Transfer (Islak Transfer)	45
5.3.6.2. Western Blotlama	47
5.3.6.3. Karanlık Oda İşlemleri	47
5.3.7. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	48
6. BULGULAR	
6.1. Nitrik Oksit Ölçümü Sonuçları	49
6.2. Endotel Hücrelerde BCA Protein Yöntemi ile Protein Miktarlarının Tayini	50
6.3. Western Blot Analiz Sonuçları	51
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	53
8. KAYNAKLAR	56
9. ÖZGEÇMİŞ	71
10. ETİK KURUL ONAYI	72

III. KISALTMALAR

ADP:	Adenozin difosfat
ANP:	Atrial Natriüretik Peptit
APS:	Amonyum Persulfat
BCA:	Biçinkonik Asit
BH ₄ :	Tetrahydrabiopterin
BSA:	Sığır Serum Albumin
cGMP:	Siklik guanozin monofosfat
sGC:	Çözüdür guanilat siklaz
DCC:	Dekstran kaplı karbon
E2:	17β-östradiol
EDHF:	Endotel kaynaklı hiperpolarize faktör
EDTA:	Etilendiamintetraasetik asit
ELAM:	Endotelyal Lökosit Adezyon Molekölü
eNOS:	Endotelyal nitrik oksit sentaz
FAD:	Flavin adenin dinükleotid
FMN:	Flavin mononükleotid
FCS:	Fetal dana serumu
HBS:	HEPES
HCl:	Hidroklorik asit
HDL:	Yüksek dansiteli lipoprotein
ICAM:	İntrasellüler hücre adezyon molekülü
LDL:	Düşük dansiteli lipoprotein
NADPH:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NO:	Nitrik oksit
NOA:	Nitrik oksit analizörü
NOS:	Nitrik oksit sentaz
eNOS:	Endotelyal nitrik oksit sentaz
iNOS:	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
nNOS:	Nöral nitrik oksit sentaz
MAP Kinaz:	Mitojen aktivated protein kinaz

OT: Oksitosin

OTR: Oksitosin reseptörü

P: Progesteron

PAI: Plazminojen aktivator inhibitörü

PBS: Fosfat buffer salin

PGI₂: Prostaglandin

PMSF: Fenilmetansülfonilflorid

SDS: Sodyum dodesil sulfat

SDS-PAGE: Sodyum dodesil sulfat poliakrilamid jel elektroforezi

sGC: Çözünür guanilat siklaz

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletildiamin

tPA: Doku plazminojen aktivatoru

uPA: Ürokinaz plazminojen aktivatoru

VCAM: Vasküler hücre adezyon molekulu

IV. ŞEKİL, RESİM VE TABLOLARIN LİSTESİ

i. Şekillerin listesi

Şekil 4.1: Endotel hücrelerin damar içi pozisyonları

Şekil 4.2: Damar fizyolojisine ilişkin endotel hücrelerden salınan maddeler

Şekil 4.3: NO biyosentezi

Şekil 4.4: NOS enziminde elektron akışı

Şekil 4.5: Endotelden düz kas hücresine NO diffüzyonu

Şekil 4.6: Östrojen sentezinin şematik gösterilişi

Şekil 4.7: Damar duvarındaki östrojen etkileri

Şekil 4.8: Non genomik yolakla, endotel hücre üzerindeki östrojen kaynaklı vazodilatasyon

Şekil 4.9: Östrojenin endotel hücrelerden non-genomik yolakla PI 3-kinaz/Akt yolağını aktive etmesi

Şekil 4.10: Oksitosin hormonunun yapısı

Şekil 4.11: OT ve OTR'nin etkileşimi

Şekil 5.1: Konfluent endotel hücre kültürü

Şekil 5.2: Western Blotting yöntemi prensibi

Şekil 5.3: Western blotting transfer

Şekil 6.1: Endotel hücre kültüründen elde edilen nitrik oksit sonuç

Şekil 6.2: Oksitosin reseptörü için Western Blotting analiz sonuçları

Şekil 6.3: X-Ray film üzerinde oksitosin reseptörler bandlarının görüntüsü

ii. Tabloların listesi

Tablo 4.1: Endotel hücrelerden salgılanan başlıca maddeler

Tablo 4.2: Endotel disfonksiyonu ile birlikte olan bozukluklar

Tablo 4.3: Östrojenin etkileri

Tablo 6.1: Nitrik oksit miktarlarına göre yapılan istatistiksel analiz sonucunda anlamlı çıkan parametrelerin t testi p değerleri

Tablo 6.2: Oksitosin reseptör artışlarına göre yapılan istatistiksel analiz sonucunda anlamlı çıkan parametrelerin t testi p değerleri

1.ÖZET

Son yıllarda yapılan araştırmalar, oksitosinin bir kardiovasküler hormon olabileceğini göstermektedir. Oksitosin (OT) kan basıncı ve kalp atış hızını endokrin veya nöroendokrin yollarla doğrudan veya vazoaaktif aracılardan salınımını stimüle ederek etkilemektedir. Oksitosin ve oksitosin reseptörlerinin (OTR) varlığı kalpte ve damar sisteminde gösterilmiştir. Hücre kültüründe OTR'lerinin OT tarafından uyarımı endotel hücrelerden nitrik oksit (NO) salınımına sebep olmuştur. Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışma ile damar sisteminde östrojen regülasyonuna hassas bir oksitosin sisteminin olduğu gösterilmiş olsa da mekanizması tam olarak kesinlik kazanmamıştır. Bu çalışmada steroid hormonlardan 17 β -östradiolün (E2) ve progesteronun (P) insan endotel hücrelerinde OTR sentezi ve OT ile uyarılan NO üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

İnsan umbilikal veninden izole edilen endotel hücreler kültür edilmiş ve 3 pasajlama sonunda hücreler, hormon içermeyen medyum veya tek başına OT/E2/P hormonları ile veya bu hormonların kombinasyonlarını içeren medyumlar ile 24 saat inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonunda medyumlardaki NO miktarı NO analizörü Sievers 280i ile ölçülmüştür. Hücre lizatlarında Western Blot analizi ile OTR tayini yapılmıştır.

Kontrol hücreleri ile kıyaslandığında tüm tek hormon ile inkübe edilmiş hücrelerin medyumlardaki NO miktarındaki anlamlı artış şu sırayla meydana gelmiştir; E2, OT, P. Endotel hücrelerinin E2+OT ve OT+P gibi hormon kombinasyonlarıyla inkübasyonu sonucunda NO salınımında OT, E2 ve P ile tek başına inkübe edilmiş hücrelere göre bir azalma gözlenmiştir. Steroid hormonlarla inkübasyon sonucunda OTR miktarlarında artış gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar seks steroidleri E2 ve P'nin OTR sentezi ve aktivitesinde önemli rollere sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Nitrik oksit, oksitosin, seks steroidleri, western blotting

2.SUMMARY

The Effect Of Oxytocin On Nitric Oxide Synthesis And The Role Of Estrogen On Regulation Of Oxytocin Action In Endothelial Cell Culture

Evidence suggests that oxytocin (OT) is a cardiovascular hormone. OT influence blood pressure and heart rate by endocrine and neuroendocrine pathways directly and/or by stimulating the release of vasoactive mediators. OT and OT receptor (OTR) synthesis have been demonstrated in heart compartments and the vasculature. Stimulation of OTR by OT caused release of nitric oxide from endothelial cells in culture. Although the vascular OT system seems to be modulated by estrogens, the mechanism is not clear yet. In this study we aimed to investigate the effect of steroid hormones 17 β -estradiol (E2), progesterone (P) on the synthesis of OTR and oxytocin induced NO release from human endothelial cells.

Endothelial cells isolated from human umbilical veins were cultured and after 3 passages incubated by hormone free medium or medium containing OT/estradiol / progesterone or combination of these hormones. After 24 hours of incubation NO metabolite levels were measured in the media by NO analyzer Sievers 280i. In cell lysates OTR were assayed by Western Blotting.

Compared to controls, all the hormone when applied singly caused an increase in NO levels with the order of potency E2, OT, P. Yet, incubation of endothelial cells with OT+ E2 or with OT+P resulted in a decrease of the release of NO compared to only OT or E2 or P incubated cells. OTR levels were found to be increased by both E2 and P. These results show that sex steroid have important role in the regulation of both synthesis and the activity of OTR.

Key words: Nitric oxide, oxytocin, sex steroids, western blotting

3.GİRİŞ VE AMAÇ

Mezoderm kaynaklı, tek katlı yassı bir doku olan endotel, kan ve damar düz kas hücreleri arasına yerleşmiştir. Endotelyumun yapısal bütünlüğünün sürekliliği kalp-damar-kan üçlüsünün koordinasyon içinde işlevlerinin yürütülmesinde önemlidir. Endotelden, kan akışı, oksijen basıncı ve reseptör aracılı uyarıcılar gibi faktörlere yanıt olarak birçok vazoaaktif madde salınmaktadır.

Endotelden salgılanan NO, prostasiklin (PGI_2), endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör (EDHF) gibi maddeler vazodilatör etkili, endotelinler (ET-1, ET-2, ET-3) ve tromboksan A2 gibi maddeler ise vazokonstriktör etkilidirler (1). Endotel kaynaklı NO vazodilatasyona neden olmasından başka trombosit agregasyonunu, lökosit adezyonunu ve düz kas hücre proliferasyonunu inhibe ederek aterogenezi geciktirdiğinden dolayı damar sağlığı açısından çok önemli bir moleküldür (2-7).

Östrojen kalp damar sağlığını koruma açısından önemli bir hormondur. Araştırmalar östrojenin önemli vasküler etkilerinin bir kısmı nitrik oksit aracılığıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Östrojenin endotel hücrelerdeki nitrik oksit sentaz (NOS) miktarını ve aktivitesini arttırdığı ve damarlarda vazodilatasyona sebep olduğu bilinmektedir.

Bir nonapeptit olan oksitosinin de kardiovasküler etkilerinin olduğu son yıllarda yapılan araştırmalarla gösterilmiştir. Kalpte ve çeşitli damarlarda oksitosin ve oksitosin reseptörlerinin varlığı saptanmıştır. Endotel hücrelere oksitosin uygulanmasıyla hücre içi kalsiyum hareketlenmesi, artmış nitrik oksit üretimi ve hücre proliferasyonu gözlenmiştir (8). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, damar sisteminde östrojenik düzenlemeye hassas olan bir oksitosin sistemi olduğu gösterilmiştir. Östrojen uygulaması vena cavada oksitosin ve oksitosin reseptörleri gen ekspresyonunda artışa neden olmuştur (9).

Bugüne kadar östrojenin kalp-damar sistemi üzerindeki koruyucu etkisine yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Ancak oksitosinin NO sentezi üzerindeki etkileri ve östrojenin bu etkilerin düzenlenmesindeki rolü henüz net olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada insan endotel hücrelerinde oksitosinin ve seks steroidleri östrojen ve progesteronun NO salgılanması üzerindeki etkileri ve de seks steroidlerinin oksitosin reseptör sentezi üzerindeki etkileri araştırılarak aydınlatılmaya çalışılmıştır. Ayrıca bu

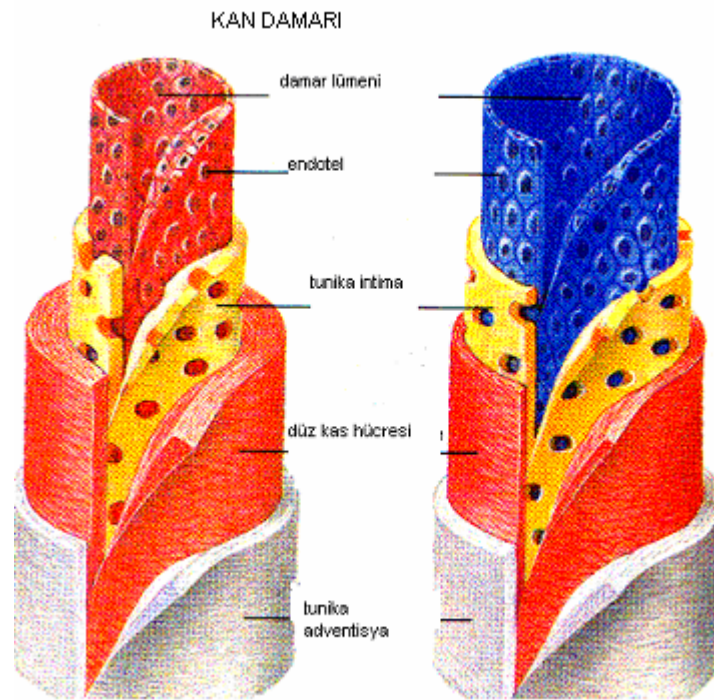
Çalışmayla birlikte kalp damar sisteminde önemli etkileri olabilecek, ancak çok az araştırılmış bir hormon olan oksitosin hakkında bilgi sağlanmaya çalışılmıştır.

4.GENEL BİLGİLER

4.1. Endotel Hücreler:

Kan damarının iç kısmını kaplayan endotel hücreler, vasküler homeostazın sağlanmasında temel rol oynayan, yaklaşık $(1-6) \times 10^{13}$ hücreden oluşan büyük bir endokrin organdır (10).

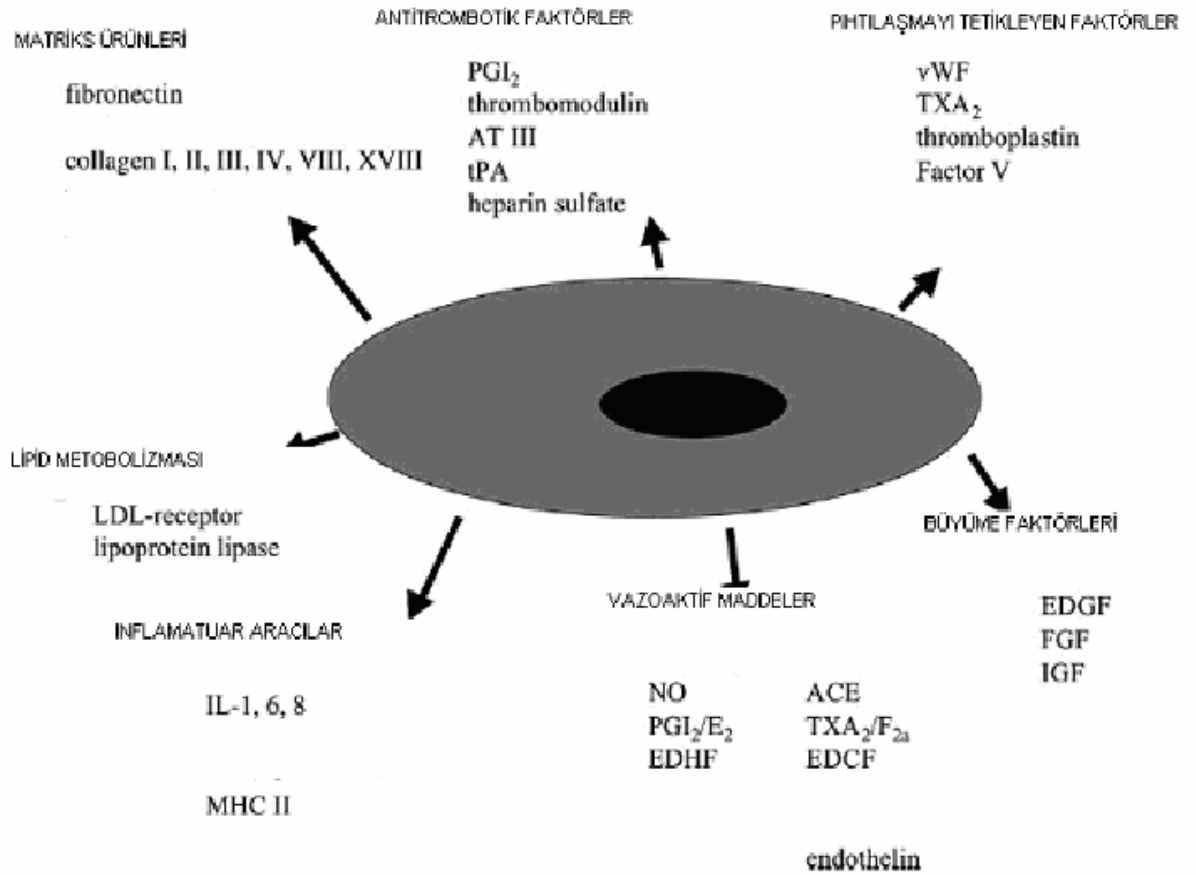
Damar duvarı ile kan arasında seçici bir bariyer gibi davranan endotel hücreler, kritik basal ve birçok metabolik fonksiyonları olan multifonksiyonel hücrelerdir (11,12).



Şekil 4.1: Endotel hücrelerin damar içi pozisyonları (13)

Endotel hücrelerinin fonksiyonları şu şekilde özetlenebilir;

1. Dolaşım ve damar duvarı arasında seçici geçirgen bir bariyer oluştururlar.
2. Çeşitli vazoaktif maddeler üreterek damar tonüsünün kontrolünde rol oynarlar.
3. Damar düz kas hücresinin proliferasyon ve migrasyonunu düzenlerler.
4. Koagülasyon ve fibrinolitik olaylarda modülatör olarak rol oynarlar.
5. İnflamatuar ve immünolojik olaylarda yer alırlar (12)



Şekil 4.2 : Damar fizyolojisine ilişkin endotel hücrelerden salınan maddeler (10)

Endotel hücreleri morfolojik yapıları ve bulundukları yer dolayısı ile vasküler düz kas hücreleri ile kan dolaşımının elemanları arasında (trombosit, monosit, enzimler, hormonlar v.s) selektif geçici bir bariyer oluşturur (14,15).

Ayrıca başta NO, prostasiklin, endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör (EDHF) ve endotelin gibi vazodilatasyona veya vazokonstriksiyona sebep olan birçok vasoaktif madde üretilip salarak, damar tonusunu kontrol ederler. Bu maddeler; trombin, bradikinin ve ADP gibi birçok kimyasal uyarıcılara cevap olarak veya kan basıncı veya akışındaki değişikliklere cevap olarak salınırlar (16).

Endotelden salınan vasoaktif maddelerin en önemlilerinden biri olan NO yarı ömrü 5-10 saniye olan, endotel fonksiyonlarının bir çoğunda rol alan önemli bir biyolojik habercidir. Güçlü vazodilator etkisinin yanı sıra nitrik oksit, endotele lökosit

yapışmasını, vasküler düz kas proliferasyonunu ve trombosit agregasyonunu engellemektedir (17).

Çözünür koagülasyon sistemine ve trombosit agregasyonu üzerinde etkilere sahip olan endotel hücreler sağlıklı olduklarında damar içi koagülasyonu engellerler. Bunun için endotel hücreler tarafından trombosit aktivasyonunu etkileyen NO, prostaglandin, trombomodulin ve heparin benzeri maddeler gibi birçok madde üretilir (12).

Ayrıca endotel hücreler, doku plazminojen aktivatör (tPA), ürokinaz plazminojen aktivatör (uPA) ve plazminojen aktivatör inhibitör (PAI) gibi maddeler üreterek fibrinolitik yolda görev alırlar (18).

Endotel hücreler çeşitli büyüme faktörleri salgılayarak büyüme düzenlenmesi, ekstrasellüler matriks bileşenlerinin üretimi gibi birçok olayda yer alır. Anjiogenez ve vaskülojenizde önemli bir role sahiptirler (19).

Endotel hücreleri ayrıca bir hücrenin başka bir hücre veya ekstrasellüler matriks ile ilişkisini sağlayan membran proteinleri olan intraselüler adezyon molekülü (ICAM) ve vasküler hücre adezyon molekülleri (VCAM) gibi adezyon molekülleri sentezleyerek lökosit migrasyonu inflamasyon ve endotel hücre hasarında önemli rol oynarlar (20).

Kısacası endotel hücreler çeşitli fiziksel ve kimyasal uyarıcılara cevap verip hemostaz, vazomotor tonus, immün ve inflamatuvar cevapları regüle eder (19).

Tablo 4.1: Endotel hücrelerden salgılanan başlıca maddeler (12)

Endotel hücrelerden salgılanan maddeler
1- Vasokonstriktörler • Angiotensin converting enzim (ACE) • Endotelinler (ET-1, ET-2, ET-3) • Angiotensin II
2- Vasodilatatörler • Nitrik oksit (NO) • Endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktörler • Prostaglandin (PGI₂)
3- Antitrombotik (homeostaz) maddeler • Trombomodülin • Doku plazminojen aktivatör (t-PA) • Plazminojen aktivatör inhibitör tip I (PAI-1)
4- Büyüme modülatör / mediatörleri a) Büyüme promotörleri b) Büyüme inhibitörleri • PDGF • Heparin sülfat • FGF • TGF-β • IGF-1 • NO • IL-1 • Bradikinin • Endotelin • Prostaglandin
5- İnflamatuar mediatörler <i>Adezyon molekülleri;</i> • Endotelyal Lökosit Adezyon Molekülü (ELAM) • İntraselüler Adezyon Molekülü (ICAM) • Vasküler Hücre Adezyon Molekülleri (VCAM)

Endotel hücre hasarı, aktivasyonu veya disfonksiyonu, ateroskleroz, tromboz ve yarı-geçirgen membran özelliğinin kaybı gibi birçok patolojik olayın göstergesi sayılır. Endotel disfonksiyonu damar hastalıklarının gelişiminde ve ortaya çıkışında önemli bir faktör olarak kabul edilmektedir (11,21). Hipertansiyon, hiperkolesterolemi ve diabet gibi ateroskleroza zemin hazırlayan hastalıklarda endotele bağlı gevşeme cevabının yetersiz olduğu gösterilmiştir (22-28). Bu bağlamda, yapılan araştırmalar sağlıklı bir kalp damar sisteminin ilk şartının sağlıklı bir endotel olduğunu göstermektedir (29).

Tablo 4.2: Endotel disfonksiyonu ile birlikte olan bozukluklar (12)

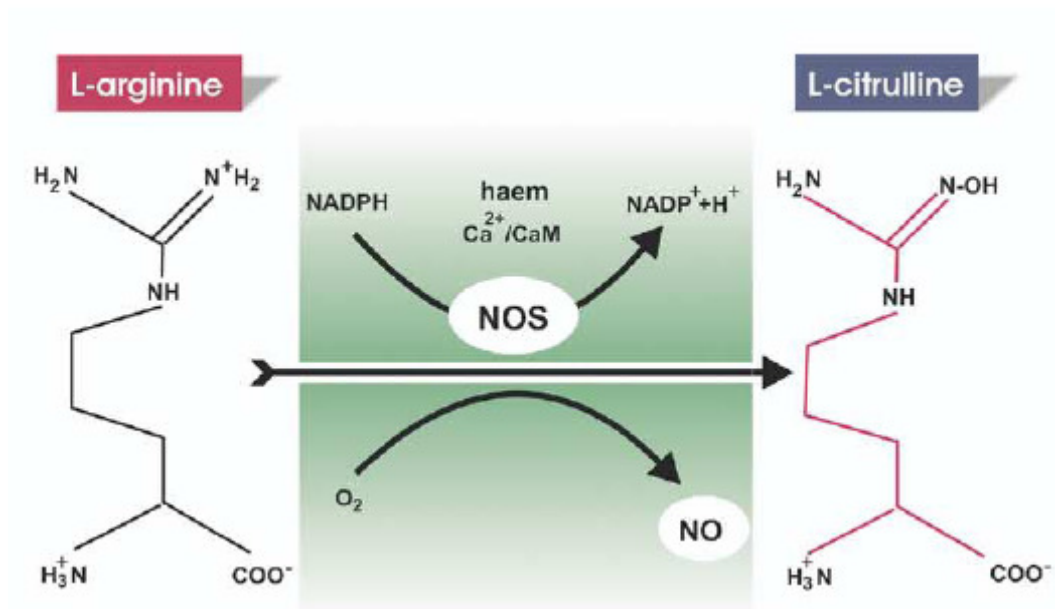
Endotel disfonksiyonu ile birlikte olan bozukluklar
• Ateroskleroz • Kalp yetmezliği • Posttransplantasyon (koroner) reperfüzyon • Hipertansiyon • Hiperkolesterolemi • Sigara içimi ve pasif içicilik • İnsülin rezistans sendromları / DM

Bu yüzden endotel hücre yapısı ve fonksiyonel bütünlüğü, damar duvarı sağlığı ve fonksiyonlarının devamlılığını korumada çok önemlidir (10).

4.2. Nitrik Oksit ve Nitrik Oksit Sentazlar:

Yarı ömrü, 5-10 saniye olan NO, hücre içi ve hücre dışında düzenleyici işlev gören küçük, reaktif bir serbest radikal moleküldür. İlk kez 1979'da siklik guanozin monofosfat (cGMP) üzerinden etki gösteren potent bir periferik vasküler düz kas gevşetici olarak tanımlanmıştır (30).

NO, kanda ve ekstrasellüler sıvıda yüksek oranda bulunan L-argininden sentezlenir (31). Reaksiyon nitrik oksit sentaz (NOS) enzimlerine spesifik yerlerden bağlanan birçok kofaktör (hem, FMN, FAD, BH₄) içeren bir redoks olayıdır. Farklı dokularda farklı enzimlerden salgılanan NO değişik etkilere sebep olur (33).



Şekil 4.3: NO biyosentezi (32)

Üç NOS izoformu vardır:

- Nöronal (nNOS veya NOS-1)
- İndüklenebilir (iNOS veya NOS-2)
- Endotelial (eNOS veya NOS-3)

Nöronal NOS, esas olarak sinir sisteminde bulunur. Sinir sisteminde nNOS tarafından sentezlenen NO sinapsların şekillenmesinde, koku alma, görme, ağrıyı algılama, hafıza

oluşması gibi işlevlerde rol oynar. Nonadrenerjik ve nonkolinerjik sistemde nörotransmitter olarak rol oynar. Merkezi ve periferik sinir sisteminde bir nörotransmitter gibi rol oynayarak sinirlerden impuls geçişini etkilemektedir.

İmmun sistem hücrelerinde bulunan iNOS tarafından üretilen NO kalsiyumdan bağımsız olarak sentezlenir. Uyarıcılar tarafından transkripsiyonel olarak (mRNA artışıyla) enzim indüklenir. Makrofajlardaki NO, tümör hücresi ve mikroorganizmalara antimikrobiyal ve antitümöral sitotoksik etki gösterir (33).

Vasküler endotel hücrelerinde ekspresse edilen eNOS tarafından üretilen NO damar sağlığı açısından çok önemli bir moleküldür. Düz kasların gevşemesini sağlayarak kan akış hızını regüle eden NO, vasküler düz kas hücreleri üzerinde antiproliferatif etkiye sahiptir. cGMP aracılığıyla trombositlerin hem aggregasyonunu hem de adezyonunu inhibe ederek trombus oluşumunu engeller. Endotel yüzeyindeki adezyon (yapışma) moleküllerinin ekspresyonunu inhibe ederek antiinflamatuvar etkiye sahiptir (33).

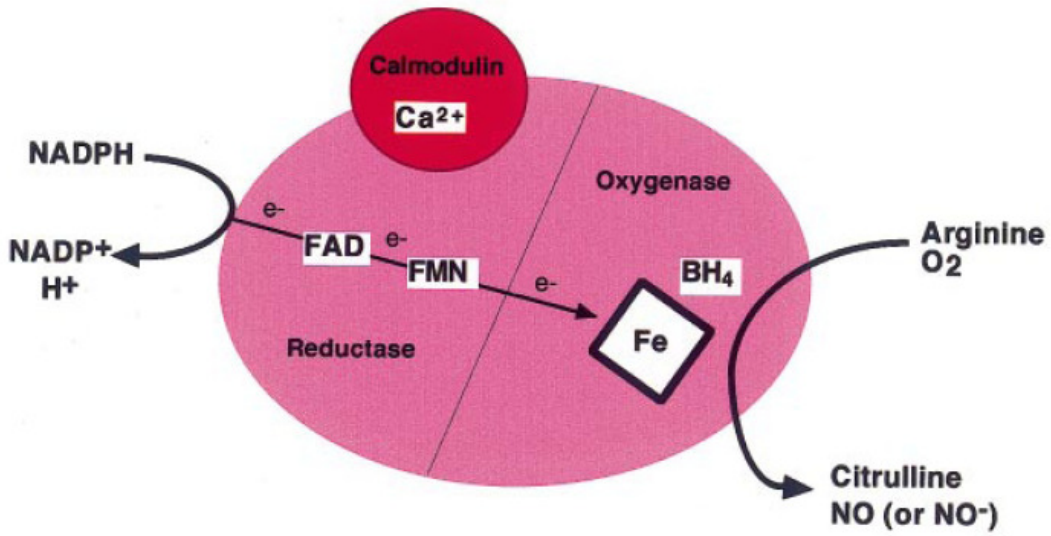
NOS enzimleri birbirinin aynı olan iki alt birimden oluşan homodimerik yapıda proteinlerdir. iNOS ve eNOS genleri 26'şar ekzondan; nNOS geni ise 29 ekzondan oluşur (34).

Bütün izoformlar primer aminoasit dizilişinde %51-%57 oranında bir homolojiye sahiptirler. Her üç izoformun karboksi-terminal bölgesi, sitokrom P450 ile %60 homolojiye sahiptir.

NOS enzimleri iki farklı bölge içerirler. Enzimin N-terminal bölgesi sitokrom P450 oksidaza yapı ve fonksiyon olarak benzer. Bu bölge oksidaz bölgesi diye adlandırılır. Bu bölge *hem*-grubu ve arjinin bağlanma bölgelerini içerir. Tetrahidrobiopterin ve oksijen bağlanma bölgeleri de bu bölge üzerindedir. Oksidaz bölgesi, ayrıca altbirimler arası etkileşimi sağladığından, dimerizasyondan da sorumludur (34).

NOS enzimlerinin karboksi terminal bölgeleri ise yapı ve işlev olarak P450 redüktaz enzimine benzer. Bu yüzden bu bölge ise redüktaz bölgesi diye adlandırılmıştır. Koenzimlerden NADPH, FAD, FMN bağlanma bölgeleri bu bölgede yer alır.

Kalmodulin veya Ca^{2+} /kalmodulin, NOS enzimlerine ortalarından bağlanır. Bu bölge redüktaz ve oksidaz bölgeleri arasında bulunur. Bu bağlanma ile redüktaz ve oksidaz bölgeleri uygun konformasyonları alarak enzimi aktive eder (34).



Şekil 4.4: NOS enziminde elektron akışı (35)

Endotelial NOS ve nNOS asetilkolin ve bradikinin gibi hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu arttıran ajanlarca aktiflenir. Makrofajlar ve diğer bağışıklık hücrelerinde bulunan iNOS ise sitokinlerce uyarılır, kalsiyum ve kalmoduline bağımlı değildir ve yeni protein sentezine ihtiyaç duyar. NOS'un üzerinde NADPH, FAD, FMN ve tetrahydrobiopterin gibi kofaktörleri ve prostetik grupları bağlamak için birçok düzenleyici bölümü vardır. Hücrede eNOS esas olarak hücre membranına bağlı bulunurken nNOS sitozolde bulunur. Üç NOS izoformu aminoasit dizilişi bakımından %50 benzerlik gösterir. NOS, N-metil-L-arginin, N-nitro-L-arginin ve N-amino-L-arginin gibi L-arginin analoglarınca inhibe edilebilir (36,37).

Endotelial NOS endotelden NO salgılanmasında rol oynayan, % 90 oranında zarsal fraksiyonda kaveollerde bulunan bir enzimdir. Endotelial NOS 134 kD'luk iki benzer monomerden oluşan bir dimerdir ve fonksiyonel olabilmesi için dimerik formda olması gerekir. Enzimin dimerik hale gelmesi *hem* molekülünün bağlanması ile başlar; *hem*'in yokluğunda enzim monomer halde kalır. Dimerik hale geçince enzime tetrahidrobiopterin (BH₄) bağlanması mümkün olur ve dimer kararlı hale gelir (38). Dimerin fonksiyonel aktivitesi, bağlanan BH₄ molekülünün sayısına bağlıdır. BH₄ bağlanmamış bir dimer süperoksit üretebilirken, BH₄ molekülü bağlanmış eNOS dimeri NO üretir. Ayrıca süperoksitin ne kadar üretilbileceği ortamdaki arjinin konsantrasyonuna da bağlıdır. Yüksek seviyede BH₄ varlığı ise doymuş bir dimer yaratarak sadece NO sentezleyen bir enzim oluşmasını sağlar. Arter ve ven endotel hücrelerinin yanı sıra, immünohistokimyasal teknikler kullanılarak, bu enzimin plasenta, böbrek tübül epitel hücreleri, kolon, hipokampus ve beyinin çeşitli bölgelerinde varlığı gösterilmiştir (34).

Kaveolada kaveolin adlı kaplayıcı proteinle sarılı olan eNOS inaktif haldedir. Hücre içi serbest kalsiyumun artması ile enzim bu proteinden sıyrılır ve aktif hale gelir ve serbest kalsiyum düzeyi düşene kadar aktif kalır. Her ne kadar eNOS enzimi bazal bir düzeyde üretilse de hipoksi, östrojen gibi hormonlar, okside olmuş düşük dansiteli lipoproteinler (oxLDL) ve mekanik güç gibi faktörler ekspresyonu artırabilir (38,39).

İn vitro çalışmalarda, hücre dışı Ca²⁺ yokluğunda veya kalmodulin antagonistlerinin varlığında NO sentezinin devam ettiği de gösterilmiştir. Ca²⁺/ kalmodulin bağımlı olmayan bu NO sentezi protein kinaz inhibitörleri tarafından regüle edilir. Özellikle tirozin kinaz inhibitörlerinin eNOS aktivitesini de azaltmaları ve fosfataz inhibitörlerinin aktiviteyi arttırmaları tirozin kinaz sisteminin de eNOS aktivitesinin kontrolünde rol aldığını gösterir (34).

Endotelial NOS'un zarsal veya sitoplazmik lokalizasyonu proteinin yağ asitleri ile kimyasal modifikasyonu tarafından belirlenir. eNOS enzimi, N-terminaline yakın glisin

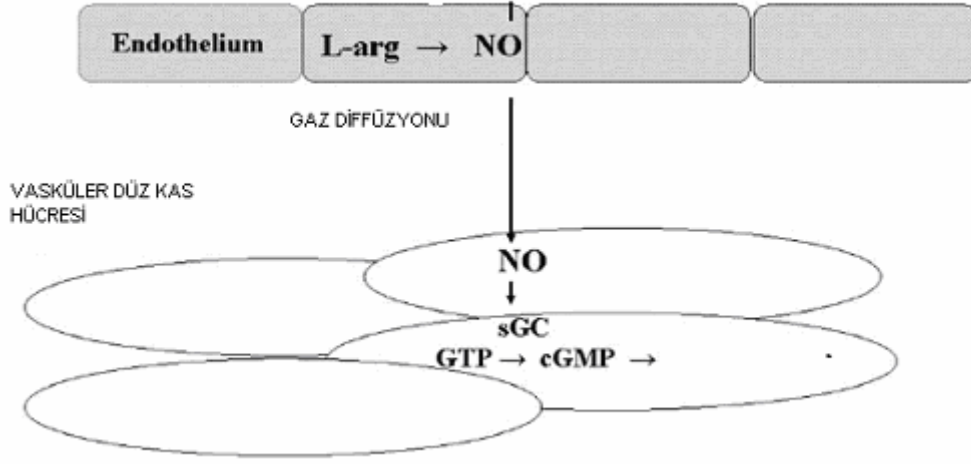
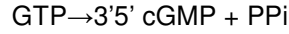
(Gly-2) miristoilasyona ve 2 sistein amino asitleri (Cys-15 ve Cys-26) palmitoilasyona uğrayabilir. G proteinlerinde olduğu gibi miristoilasyon, proteinin zara yönlendirilmesi için önemlidir ve tepkime N-miristoil transferaz enzimi tarafından katalizlenir. Endotelyal NOS enzimi ayrıca 2 sistein amino asidi üzerinden tiyoester bağı aracılığı ile palmitoilasyona da uğrar. Ancak yalnızca palmitoillenmiş enzim hücre zarına yerleşebilir. Yağ asitleri takılmış eNOS enzimi zarsal fraksiyona geçer (34). Enzimin sitoplazmik fraksiyona geçişi depalmitoilasyon ve serin/treonin fosforilasyonu ile hızlanır. Endotelyal NOS enziminin sitoplazmik fraksiyonunun aktivitesi çok düşüktür.

Nitrik oksit arjininden sentezi, nitrik oksit sentaz enzimi üzerinde iki basamakta gerçekleşir. Tepkimenin ilk basamağında arjininin guanido nitrojeni hidroksillenerek N-hidroksiarjinin oluşur. Bu ara ürün oldukça stabildir ve istenirse tepkime ortamından izole edilebilir. Enzime sıkı bağlı olan ara ürün ikinci aşamada sitrulin ve nitrik oksite çevrilir.

Nitrik oksit sentaz enzimi tarafından 1 mol arjininden 1 mol NO sentezi için, 2 mol oksijen ile 1.5 mol NADPH kullanılır. Kullanılan oksijenlerin 2 atomu suya indirgenirken, diğer 2 oksijen atomu NO ve sitrulin oluşumunda kullanılır.

NO'nin arjininden sentezi sırasında arjininin azot atomu 5 elektronluk bir oksidasyona uğrar. Arjininin N-hidroksi-arjinine çevrilmesi sırasında substratta iki elektronluk oksidasyon, N-hidroksi-arjininden NO ve sitrulin sentezi sırasında ise aynı azot atomunda üç elektronluk oksidasyon daha gerçekleşir (34). Sentezlenen NO hem damar lümenine hemde damar duvarına geçerek etki gösterir. Kısa ömürlü bir molekül olduğundan okside edilerek inaktif bileşikler olan nitrit ve nitrat gibi son ürünlere dönüşür. Hem'e yüksek affinitesi olan NO, hemoglobin tarafından inaktive edilir.

Etki Mekanizması: NO'nun en önemli fizyolojik hedefi, çözünebilir guanilat siklaz (sGC) enziminin *hem* grubudur. sGS enzimi GTP'den cGMP oluşumunu katalizleyen bir enzimdir. Düz kas hücresine diffüzyonla geçen NO, guanilat siklazı uyararak, guanozin trifosfatın cGMP'ye dönüşümünü sağlar.



Şekil 4.5: Endotelden düz kas hücreğine NO diffüzyonu (40).

Birçok hücreyel işlem endotel, trombosit, vasküler düz kas hücreleri, nöronlar ve NO üreten diğer hücrelerden salınan NO tarafından düzenlenmektedir. Dolaşım sistemi dikkate alındığında NO'nun vazodilatatör etki gösterdiği, bölgesel kan akımını ve sistemik kan basıncını düzenlediği, endotele yönelik olarak da ateroskleroza önleyici etki yaptığı bilinmektedir (41,42).

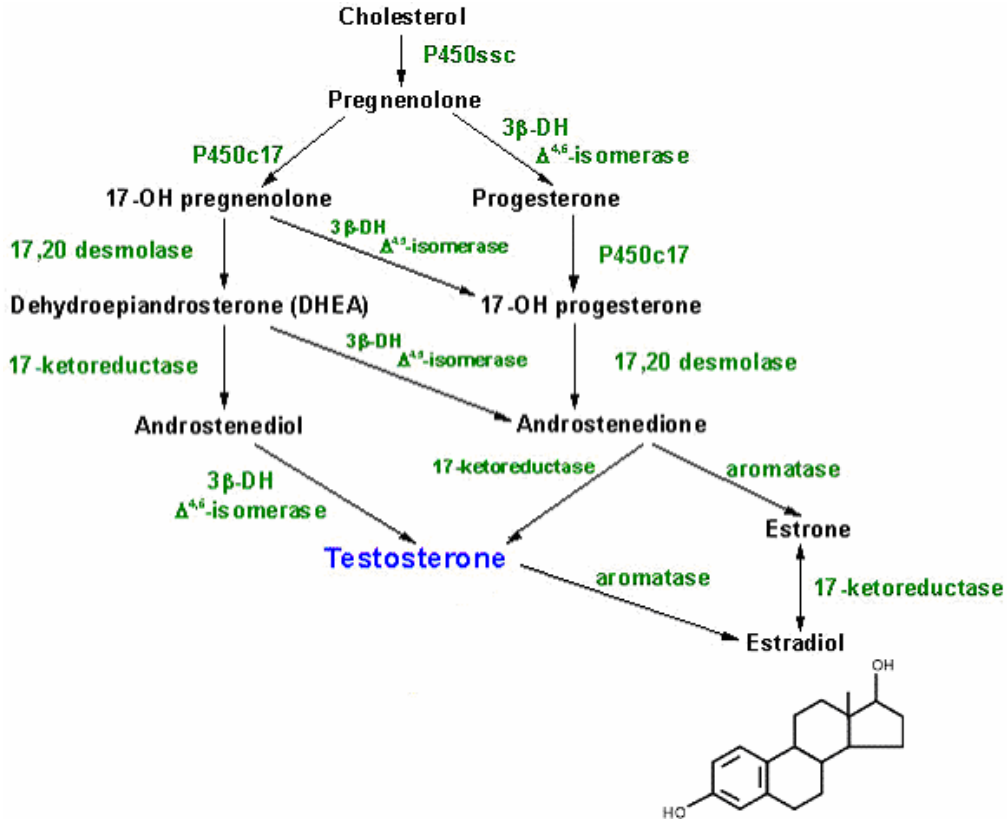
4.3. Östrojen:

Dişi seks hormonlarından olan ve hipofizin gonadotropik hormonlarının etkisiyle salgılanan östrojen, kadınlarda sekonder seks karakterlerinin oluşumuna yol açan, üreme siklusunu ve bununla ilgili organların büyüme ve gelişmesini sağlayan 18 karbonlu steroid yapıda bir hormondur.

Başlıca overlerde sentezlenen östrojenler, az miktarda da olsa plasenta, adrenal bezler ve testislerde de sentezlenir.

Kadınlarda östrojen foliküler fazda 100 pg/mL civarında olup ovulasyon dönemlerinde 600 pg/mL civarına kadar yükselir. Hamilelik boyunca ise bu oran 20.000 pg / mL'ya

kadar çıkabilir. Menopoz sonrası ise östradiol serum miktarı; aynı yaştaki erkeklerde olan seviyeye kadar inebilir (5-20 pg/mL) (43).



Şekil 4.6: Östrojen sentezinin şematik gösterilişi

Kadın ve erkeklerde görülen kardiovasküler hastalıkların insidansı risk faktörleri ve bulunan hormonların farklılığı sebebiyle farklılık gösterir (43). Aterosklerotik hastalıkların insidansı, menopoz öncesi kadınlarda düşük olup, menopoz sonrası kadınlarda artar. Östrojen takviye tedavisi alan menopoz sonrası kadınlarda ise östrojenin kandaki seviyesinin artmasına bağlı olarak aterosklerotik hastalıkların insidansında düşme görülür (43-45).

Östrojenin antiaterosklerotik etkileri kısmen hormonun serum lipoprotein düzeyleri üzerindeki olumlu etkilerine bağlıdır (45-47). Östrojenin damar duvarındaki etkileri, kardiovasküler koruyucu etkilerine de katkıda bulunur (46,47). Hem akut hemde kronik olarak vazodilatasyona sebep olan ve ateroskleroz gelişimine karşı koruyucu etki

sağlayan östrojenin, damar sisteminden başka kemik, karaciğer ve beyin gibi birçok dokuda reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir.

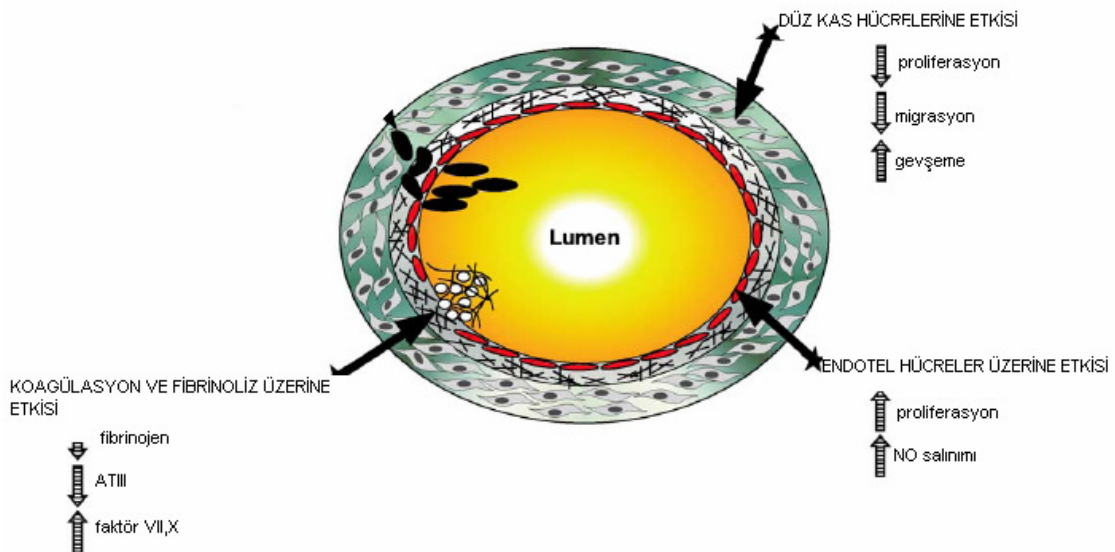
4.3.1. Östrojen ve östrojen reseptörleri:

Her ikisi de steroid hormon reseptör ailesine dahil olan iki tip östrojen reseptörü tanımlanmıştır; östrojen reseptör α ve östrojen reseptör β (48,49).

Östrojen reseptörü α ve β oldukça benzer yapıya sahip olmakla birlikte, farklı genlerle kodlanan, yapıları, ligand afiniteleri ve etkileri farklı olan steroid hormon reseptörleridir. Aktive olduklarında gen ekspresyonu aracılığı ile etki gösterirler (48-52). Dokular arası dağılımları farklı olmakla birlikte, prostat, uterus, over, testis, akciğer ve beyin gibi birçok farklı dokuda bu reseptörlerin varlığı gösterilmiştir (49). Vasküler endotel ve düz kas hücrelerini içeren duvarlara sahip olan kan damarları, östrojeni yüksek afiniteyle bağlayan östrojen reseptörleri bulundurlar (46,53).

4.3.2. Östrojenin damar sistemi üzerine etkileri:

Vasküler sistem fonksiyonları, endotel ve düz kas hücreleri tarafından modüle edilir (54). Kan damarlarının iç kısmına yerleşmiş olan endotel hücreler, düz kas hücrelerini gevşeten ve trombosit aktivasyonunu inhibe eden nitrik oksit sentezler ve salarlar (55). Östrojen, insan endotel hücre kültüründe eNOS ekspresyonunu, eNOS promotor aktivasyonu için gerekli olan, transkripsiyon faktörü Sp1'nin aktivitesini artırarak yapabilir (56).



Şekil 4.7: Damar duvarındaki östrojen etkileri (57).

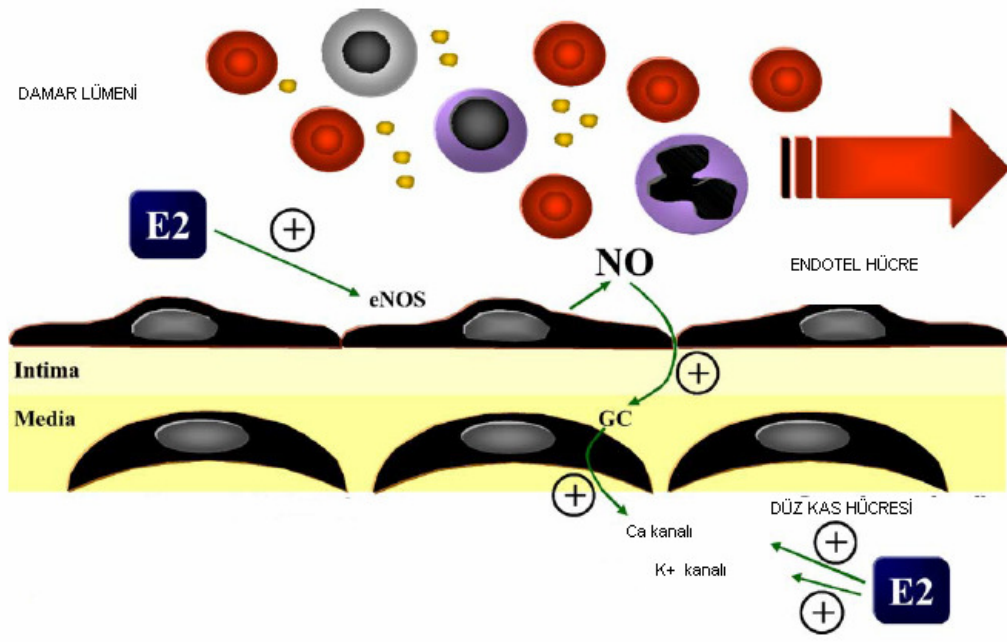
Düz kas hücrelerinde östrojen reseptörlerinin varlığı bu hücrelerin, östrojen için hedef doku olduğunun bir göstergesidir. Vasküler düz kas hücrelerinde östrojen kontraktileti, proliferasyonu, matriks bileşenlerini ve yapımını regüle eder (58). Yapılan in vitro çalışmalarda östrojenin düz kas hücrelerindeki hücre büyümesi üzerindeki düzenleyici etkilerini desteklemektedir.

4.3.2.1. Östrojenin direkt vasküler etkileri:

Östrojenin, östrojen reseptör aracılı direk vasküler etkileri gen ekspresyonunu etkilemeyen hızlı non-genomik etkiler ve klasik gen ekspresyonu aracılı uzun dönem genomik etkileri diye 2'ye ayırabiliriz.

Hızlı Etkileri: Genomik olmayan etkiler steroid hormonların ortak özelliklerinden biridir ve sıklıkla çeşitli protein kinaz kaskadlarının aktivasyonu ile alakalıdır (59,60).

Östrojenin en önemli akut etkisi endotel hücrelerdeki nitrik oksit sentazı aktive etme yoluyla hızlı bir şekilde arter vazodilatasyonuna sebep olmasıdır.



Şekil 4.8: Non genomik yolakla, endotel hücre üzerindeki östrojen kaynaklı vazodilatasyon (61)

Bu aktivasyonu sağlayan net mekanizma tam anlamıyla anlaşılmış değildir. Östrojenin fizyolojik konsantrasyonu vasküler düz kas hücrelerinin hücre membranında bulunan kalsiyum aktifli potasyum iyon kanallarının açılmasını stimüle eder (62,63). Bu da vasküler düz kas hücrelerinin gevşemesine katkıda bulunur (62,63).

Östrojenin rapor edilen diğer akut etkileri arasında; intrasellüler kalsiyum mobilizasyonu, adenilat siklaz aktivitesinin stimülasyonu ve cAMP üretimi yer alır (64-66). Ayrıca 17 β -östradiol tarafından MAP kinaz sinyal yolağının aktivasyonu, endotel, kemik ve nöroblastoma hücre tipleri gibi çeşitli hücrelerde gösterilmiştir (67-70) Yine 17 β -östradiol' ün Fosfoinozimid-3kinaz (PI 3-kinaz) sinyal yolağını aktive ettiği endotel hücrelerde meme kanser hücrelerinde ve böbrek hücrelerinde gösterilmiştir (67,71,72).

Genomik Etkileri: Östrojenin kalp-damar sistemindeki bazı etkileri, östrojen reseptörü aracılı ve gen ekspresyonundaki değişiklikleri içeren uzun dönem genomik etkileridir. Östrojenin kan damar duvarı üzerindeki bu etkileri östrojen reseptörü α ve β aracılı

olarak gerçekleşir (73,74). Vasküler dokularda tanımlanan birçok gen östrojen regülasyonu için potansiyel bir hedeftir. Bu genomik etkiler başta endotel nitrik oksit sentaz, prostasiklin sentaz, prostaglandin siklooksijenaz, kollajen ve elastin sentaz gibi birçok önemli vazodilatör enzimlerin ekspresyonundaki artışı içerir. Ayrıca östrojen endotel hücre büyümesini hızlandırır (62,75-78).

4.3.2.2. Östrojenin diğer vasküler etkileri:

Kardiovasküler fonksiyonlar üzerindeki etkilerinin yanı sıra östrojen, serum lipid konsantrasyonu, koagülasyon, fibrinolitik sistem, antioksidan etkileri ve diğer vazoaaktif maddeler üzerinde birçok etkilere sahiptir (62). Bu etkilerin bir çoğu, apoprotein, koagülasyon ve fibrinolitik enzim genleri gibi spesifik genlerin hepatik ekspresyonundaki reseptör aracılı etkilerini içerir. Östrojenin, serum HDL-kolesterolü, trigliserid seviyelerindeki artışı ve LDL-kolesterolü düşüşü ile serum total kolesterol düşüşünü içeren etkileri de mevcuttur (79,80). Östrojen hepatik lipaz enziminin etkisini azaltarak HDL moleküllerinin karaciğer tarafından daha kolay tanınmasını sağlar. Ayrıca LDL reseptörlerini upregule ederek zararlı lipidlerin temizlenmesine yardımcı olur (81).

Tablo 4.3: Östrojenin etkileri (82)

Östrojenin doğrudan ve dolaylı vasküler etkileri	
Direk Etkileri	İndirek Etkileri
<u>Hızlı non-genomik etkiler:</u>	<u>Serum lipoproteinlerine etkisi:</u>
↑ Arter vazodilatasyonu	↓ LDL-C
↑ Nitrik oksit sentezi	↑ HDL-C
	↑ Trigliserid
<u>Uzun dönem genomik etkiler:</u>	<u>Antioksidan Etkileri:</u>
↑ Vazodilatör enzimlerin ekspresyonu	↓ LDL-C oksidasyonu
↓ Vasküler hasar	
↑ Vasküler endotel hücre proliferasyonu	
↓ Vasküler düz kas hücre proliferasyonu	

Vasküler tonus anjiotensin II, endotelin ve noradrenalin gibi vazokonstratif maddeler ile prostasiklin ve nitrik oksit gibi vazodilatör maddeler tarafından düzenlenir. Ek olarak bu maddeler kardiyak fonksiyonlarına da etki ederler: anjiotensin II ve endotelin fibrosis ve hipertropiye sebep olup, kasılma gücünü artırırken; nitrik oksit ise kardiyak kasılmasını modüle eder (83).

İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan araştırmalar göstermiştir ki, östrojen replasman terapisi, sirkülasyondaki anjiotensin II miktarını azalttığı gibi anjiotensin çevirici enzim (ACE) ekspresyon ve aktivitesini de düşürür (84).

Kadınlardaki östrojen replasman terapisi, güçlü bir vazokonstratif madde olan anjiotensin II'nin seviyelerini düşüren ACE'nin sirkülasyondaki aktivite seviyelerindeki düşürür. Renin-anjiotensin sisteminin östrojenle inhibe edilmesi, vazodilatör natriüretik peptitlerin aktivitesini artırabilir. 17- β östradiol ile prostasiklin üretimi stimüle olurken, endotelin-1 salınımı inhibe edildiği gösterilmiştir (85). İnsan endotel hücre kültüründe 17- β östradiol uygulanması ile sirkülasyon ET-1'in ekspresyon ve salınımı düşürülür (86).

4.3.4. Östrojen ve Nitrik oksit:

Östrojenin dişi üreme sistemi üzerindeki etkileri çok iyi bilinmektedir. Östrojenin damar sistemi üzerindeki etkileri ile ilgili araştırmalar, östrojenin önemli vasküler etkilerinin büyük çoğunluğu nitrik oksit aracılığıyla gerçekleştiğini göstermektedir (62,87-91). Örneğin kadınların damarlarından salınan nitrik oksit miktarı erkeklerinkine kıyasla daha fazla olup, östrojenin NO üretimindeki rolünü desteklemektedir (92). Nitrik oksit miktarı hamilelik boyunca artmakta ve menstrüel döngüdeki, östrojen seviyesinin en yüksek seviyede olduğu ovulasyon öncesi fazda artmaktadır (75,93). Hangi mekanizma veya mekanizmalar ile östrojenin nitrik oksit üretimini arttırdığı tam olarak açıklanamamıştır. Östrojen vasküler hücrelerden nitrik oksit salınımını gen bağımlı veya gen bağımsız mekanizmalarla stimüle edebilir (94). Ayrıca östrojen insan aort endotel hücrelerinde eNOS aktivitesini artırır (95). Benzer bir şekilde kronik ve

akut östrojen uygulaması uterus arterlerindeki endotelyumda eNOS aktivasyonunu uyarmıştır (96).

Ayrıca östrojen yukarıda da anlatıldığı gibi, akut ve uzun dönem etkileriyle kan damarlarını hasarlar ve ateroskleroza karşı korur. Östrojen kaynaklı akut vazodilatasyon, saniyeler veya dakikalar içinde gerçekleşmekte olup, iyonik akış ve guanilil siklaz aktivasyonu sağlayarak düz kas hücrelerinde gevşemeyi tetikleyen NO salınımı sayesinde gerçekleşir. NO salınımı ayrıca vasküler düz kas hücre proliferasyonunu inhibe ederek, iskemi gibi mekanik hasarlara cevap olarak gelişen, endotel hücrelere lökosit yapışmasını engeller (97,98).

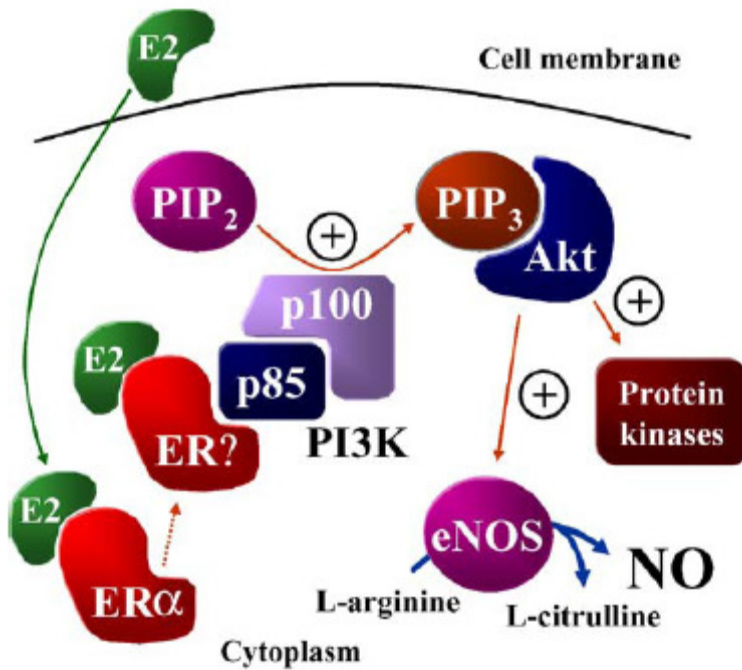
Koroner arterlere direk olarak östrojen uygulanması, endotelial nitrik oksit üretimini aktive ederek, hızlı bir şekilde vazodilatasyona sebep olur (62). Lantin-Hermoso ve arkadaşları ile Caulin-Glaser ve arkadaşları östrojen reseptörlerine özgü antagonistlerin, fizyolojik konsantrasyonda östrojene maruz bırakılmış kültür edilmiş endotel hücrelerden, nitrik oksit salınımını inhibe ettiğini göstermişlerdir (94,99).

Lantin-Hermoso ve grubu, 17 β -östradiol maruz bırakılmış koyun pulmoner arter endotel hücrelerinde, 5 dk içinde doz bağımlı olarak eNOS aktivitesinde meydana gelen artışı göstermişlerdir. Gene aynı çalışmada iyonik kalsiyumun tamamen ortadan kaldırılması 17 β -östradiol kaynaklı eNOS aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu da 17 β -östradiol'ün kalsiyum influx ını artırarak eNOS aktivitesini akut olarak stimüle ettiği hipotezini desteklemektedir. Gene aynı çalışmada, bir östrojen reseptörü antagonisti olan ICI-182,780, 17 β -östradiol kaynaklı eNOS aktivitesini tamamen inhibe etmiştir (94).

Caulin-Glaser ve grubu, insan göbek kordonundan elde edilen endotel hücrelerde, 17 β -östradiol uygulamasına cevap olarak gelişen hızlı nitrik oksit salınımını göstermişlerdir. Gene benzer şekilde östrojen reseptör antagonisti ICI-164,384'nin nitrik oksit salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir (99).

1999’ da Chen ve arkadaşları, ER α ‘nın östrojenin eNOS aktivitesi üzerindeki kısa dönemli etkilerine aracılık edebileceğini göstermişlerdir (67). 17 β -östradiolün hızlı bir şekilde, mitogen-activated protein kinazın (MAP kinaz)’ın ER bağımlı aktivasyonuna sebep olup ve sağlam endotel hücresinde, MAP kinaz inhibitörü olan PD-98059, 17 β -östradiolün eNOS aktivasyonunu bloke ettiği gösterilmiştir. Bu bulgular eNOS aktivasyonunun non-genomik bir yolakla ER α tarafından regüle edildiğini göstermektedir.

2000 yılında, iki ayrı çalışma eNOS aktivasyonunda ikinci bir yolak olduğuna dair kanıtlar bulmuşlardır; fosfotidilinositol (PI) 3-kinaz-Akt yolağı (100,101). PI 3-kinaz, bir lipid kinaz olup, p110 katalitik bölgesi ile p85 α regülatör bölgesinden oluşur. Ve fosfotidilinositol-3-fosfat oluşumunu sağlar (102). Haynes ve grubu, PI 3-kinazın birçok grup tarafından eNOS’u aktive ettiği gösterilen Akt (protein kinaz B)’nin aktivasyonuna yetenekli olduğunu göstermişlerdir (100).



Şekil 4.9: Östrojenin endotel hücrelerden non-genomik yolakla PI 3-kinaz/Akt yolağını aktive etmesi (103).

Simoncini ve arkadaşları ise, insan rekombinant ER α 'nın ligand bağımlı bir yolakla PI 3-kinazın p85 α regülatör bölgesine bağlandığını göstermiştir (101). Östrojen ile stimülasyon, ER α ilişkili PI 3-kinaz aktivitesini arttırmakta ve bu da Akt aktivasyonuna sonuç olarak ta eNOS aktivasyonuna sebep olmaktadır.

Bu bulgulara rağmen, ER-bağımlı eNOS aktivasyonunda, MAP kinaz ve PI 3-kinaz sinyal yolağının mekanizması tam olarak anlaşılabilmiş değildir (104).

4.4. Oksitosin:

Bir nonapeptid olan oksitosin, hipofizden salınan ve doğum süresince rahim kasılmasını, laktasyon boyunca süt salınımını sağlayan, hipotalamik bir nöropeptittir (105). Paraventriküler ve supraoptik çekirdeklerdeki, magnosellüler nörosekretuar hücreler, oksitosini büyük bir öncü molekül olan prepro-oksitosin-nörofizin I' in bir parçası olarak sentezlerler. Bu kompleks oksitosin vermek üzere kırpılır, daha sonra da hipofizin arka lobu tarafından kana salınır (106). OT'nin santral salınımının yanında kalbi de içeren, böbrek, timus, pankreas, adipositler, adrenal bezler, uterus, overler, testis gibi birçok periferik dokuda salgılandığı bulunmuştur (107).

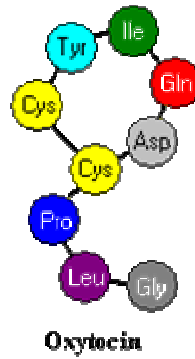
Bilinen en güçlü uterotonik madde olması, sıklıkla doğumu kolaylaştırmak amacıyla kullanılmasını sağlar. Son yıllarda, oksitosin reseptör geninin hipofiz, böbrek, yumurtalık, testis, timus, kalp, vasküler endotel, adiposit ve birçok tip kanser hücresi gibi birçok farklı yerde ekspresse edilmesinin bulunuşu, klasik oksitosin konseptinde gelişmelere sebep olmuştur (108).

Üreme ile ilgili fonksiyonlar üzerine olan etkisinin yanısıra oksitosin, kalp-damar sisteminin ve böbreğin endokrin ve nöroendokrin regülasyonuna katılır (108). Oksitosin, vasküler ve kardiyak gevşemede ve hidromineral dengede önemli bir regülatördür (109-113). Ayrıca seksüel, anneliğe ait davranışlarda, hafıza ve öğrenmede de rol oynar (114,115). Natriüretik özelliği sebebiyle, ANP salgılanmasını stimüle ederek kan basıncında ve hacminde modülatör olarak görev alır. İnsan umilikal ven endotel hücre kültüründe NO salınımını stimüle etmesi, oksitosinin vasküler fonksiyonlarda önemli bir mediatör olduğunun bir göstergesidir (112,116).

Artmış ozmotik basınç, hemoraji, beslenme gibi faktörler oksitosin salınımını hem erkeklerde hemde kadınlarda stimüle eder (117).

4.4.1. Oksitosin ve Oksitosin Reseptörü:

Oksitosin, 6 aminoasitlik bir halkasal yapı ve 3 aminoasitlik yan zincirden oluşan bir nonapeptidtir (118).

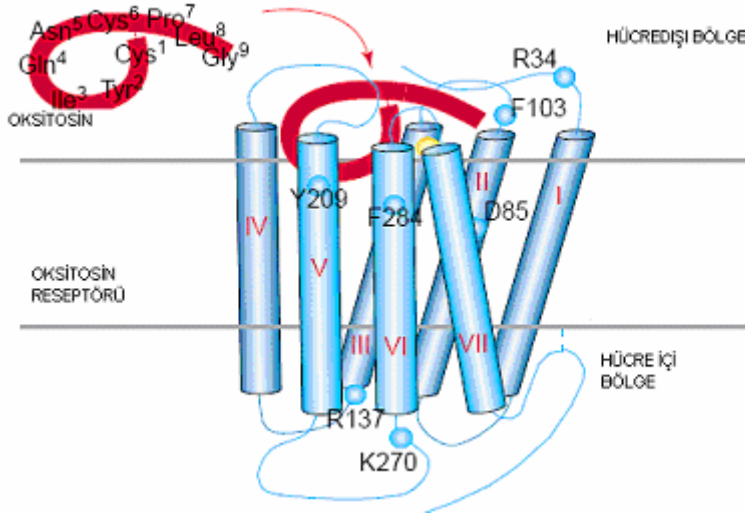


Şekil 4.10: Oksitosin hormonunun yapısı

Oksitosinin etkilerine tek tip oksitosin reseptörü aracılık eder. Bu reseptör, klassik I G-Protein Coupled Receptor ailesine dahil olup, 7 adet transmembran domain içeren 389 aminoasitlik bir polipeptidtir (108,119).

Moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak oksitosin ve oksitosin reseptörü genleri, rahim, amnion, kalp ve damar ve çeşitli dokularda tanımlanmıştır (120-125). Bu genler tek kopya olup, genetik yapıları yüksek oranda korunmuştur. İnsan oksitosin-nörofizin I geni kromozom 20p13 de lokalize olmuş olup, 2 intron ve 3 ekzon içerir (125). İlk ekzon oksitosini kodlarken, ikinci ekzon nörofizin I'i kodlar. İnsan oksitosin reseptör geni kromozom 3p26.2 de lokalize durumda olup, 3 intron ve 4 ekzon içerir (126).

Reseptörün yüksek afinitede OT bağlaması için iki önemli regülatöre ihtiyacı vardır: Mn^{2+} veya Mg^{2+} gibi divalent katyonlar ile kolesterol. Kolesterol, OTR'yi ısısal denaturasyona karşı stabilize eder. Aynı zamanda reseptör için allosterik bir modülatör gibi davranıp reseptörü agonist ve antagonistlere karşı yüksek afinitede stabilize eder. Mg^{2+} ise kolesterol benzeri etkiler göstererek reseptörün OT bağlanma kapasitesini ve ilgi durumunu artırır (108).



Şekil 4.11: OT ve OTR'nin etkileşimi (105)

OTR ekspresyonunun düzenlenmesi:

GPCR ailesine dahil diğer reseptörlerin aksine, oksitosin reseptörü hücrelere özgü bir şekilde regüle edilir. Örneğin rahimde hamilelik boyunca, oksitosin reseptörlerinin ekspresyonu 2-3 kat artmaktadır. Bu da rahimin oksitosine olan sensitivitesinin artmasına sebebiyet vermektedir (109). Doğumdan sonra ise rahimdeki oksitosin bağlanma bölgelerinde hızlı bir düşüş olurken, meme bezlerindeki oksitosin reseptör ekspresyonu laktasyon için artmaktadır (109,127). Dokuya özgü olan bu oksitosin

reseptör ekspresyonu, sirkülasyondaki OT'nin hedef dokusunu değiştirmesini, ve doğum boyunca rahim kasılması ile laktasyon boyunca süt salgılanmasını sağlar. Uterus, hipofiz, böbrek gibi dokularda OT reseptör ekspresyonu östrojen tarafından stimüle edilir (105).

Birçok çalışma östrojen ve glukokortikoidlerin myometrial ve kardiyak oksitosin reseptörlerinin ekspresyon artışı üzerindeki pozitif etkilerini, progesteronun ise oksitosin reseptörleri üzerindeki negatif etkilerini göstermiştir (128-130). İnsanlarda hamileliğin sonuna doğru östrojen artışı görülürken, progesteron konsantrasyonu düşüş gözükür. Bu artan östrojen konsantrasyonunun, damar, myometrium ve kardiyak dokularda oksitosin reseptör ekspresyonunu indüklediği kabul edilmektedir.

4.4.2. Sinyal Mekanizması:

Rahim myometrial hücreleri veya meme bezi myoepitel hücreleri gibi düz kas hücrelerine lokalize olmuş oksitosin reseptörlerinin aktivasyonu, fosfolipaz C aktivasyonu sağlar. Bunun sonucunda fosfatidilinozitol 4,5 bis fosfat'tan (PIP₂) inozitol trifosfat (IP₃) ve diasilgliserol (DAG) oluşur. IP₃ hücreiçi depolardan kalsiyum salınımını stimüle ederken, DAG protein kinaz C aktivasyonuna sebep olur. Sonuçta intrasellüler kalsiyumdaki artışa sebep olarak birçok hücreyel olay meydana gelir. Örneğin düz kaslarda, artan kalsiyumun kalmodilin tarafından bağlanması, miyozin hafif zincir kinaz aktivasyonu sağlayarak uterus veya meme bezi gibi düz kaslarda kasılmaya sebep olur. Fosfolipaz C üzerindeki oksitosin reseptörlerinin bu stimülasyonu cAMP tarafından inhibe edilir (131-133).

Oksitosinin reseptörü ile direk etkileşimi myometrial kasılmanın yanında kardiyak gevşemeye de sebep olur (134). Oksitosin, hızlı bir şekilde intrasellüler serbest kalsiyum konsantrasyonu artışını, MAP kinaz aktivasyonunu, prostaglandin E₂ sentezini stimüle eder (135-138). Ayrıca artan bu kalsiyum NO sentazı aktive eder. Vasküler ortamda oluşan bu NO, komşu düz kas hücrelerine geçerek, guanilat siklazı aktive ederek relaksasyona sebep olur (116).

Makula densa ve proksimal tübül hücrelerine lokalize olmuş OTR'lerinin bulunduğu böbrekte ise; guanilat siklaz aktivasyonu siklik GMP aracılığı ile Na ve K kanallarının kapanmasında işlev gördüğünü düşündürür (139). Kardiomyositlerde ise, cGMP OTR kaynaklı ANF salınımının olası aracısıdır (122).

4.4.3. Oksitosin ve Damar sistemi:

Jankowski ve ark. sıçanlarda oksitosinin ve oksitosin reseptörlerinin kalp ve büyük damarlarda sentezlendiğini, Thibonnier ve ark. ise insan endotel hücrelerinde bulunduğu göstermişlerdir (116,123).

Vasküler sistemde oksitosin reseptörünün yaygın olarak bulunması, kardiovasküler fonksiyonda otokrin ve parakrin olarak oksitosinin etkili olduğunu göstermektedir. Elde edilen bulgular, oksitosinin kan hacmi ve basıncında düzenleyici rolü olduğunu ifade etmektedir (122).

Oksitosin damar sistemi üzerindeki etkilerini NO'nin yanısıra ANP aracılığı ile gerçekleştirmektedir. ANP natriüretik peptidler ailesinin bir üyesidir. Bu peptidler renin-anjiyotensin-aldosteron sistemine zıt olarak çalışırlar ve bu sebeple diürez/natriürez düzenlenmesi, düz kas hücresi tonusu ve proliferasyonunda rol alırlar.

Potent bir natriüretik ve vazorelaksant olan ANP ilk olarak rat atriumundan izole edilmiştir, fakat beyin dahil diğer organlarda da bulunmuştur. OT hem akut hem de kronik uygulamadan sonra ANP salgılanmasına neden olduğu, natriüresisi uyardığı ve arteriyel basınçta düşüşe neden olduğu gösterilmiştir (122)

Oksitosin hem vasodilatasyonu hem de vasokonstriksiyonu indükleyebilmektedir. Oksitosinin bu özelliği, damar yatağının tipine ve tonus derecesine bağlıdır. Plasental umbilikal damarlarda, oksitosin vasopressine göre daha potent bir vasokonstriktördür. Dişi farelerde östrus sırasında oksitosin vasokonstriksiyonu indüklerken, diöstrus sırasında vasodilatasyona aracılık eder. Köpeklerde oksitosin kan basıncında azalmayla birlikte kalp hızında artışa neden olmaktadır, bu etkilerin oksitosinin vasodilatatör etkisiyle oluştuğu düşünülmektedir. İnsanlarda, oksitosinin en çok gözlenen etkisi kan

basıncında hafif ve kısa süreli (5-10 dakikalık) bir azalmadır. Bu azalma, hamile olmayan kadınlarda hamile olanlara göre daha belirgindir (117).

Oksitosinin farklı ve zıt yönlerdeki etkilerinin açıklaması; oksitosin reseptörlerinin her iki endotelial ve vasküler düz kas hücreleri üzerinde lokalize olmaları ve başka hormonlarla olan etkileşimi sonucu olabilir. Oksitosin reseptörlerinin endotelial hücrelerde NO üretimini stimüle ettiği ve vasodilatasyonu indüklediği; düz kas hücrelerinde ise vasokonstriksiyona aracılık ettikleri gösterilmiştir (116). Yüksek konsantrasyonda oksitosinin ise vazokonstriktör etkisi vazopressin V_1 reseptörlerinin oksitosin tarafından aktivasyonu ile açıklanabilir.

İnsanlarda kalp-damar sistemindeki OTR regülasyonu ile ilgili fazla bilgi mevcut değildir.

4.4.4. Oksitosin ve Nitrik Oksit:

Thibonnier ve arkadaşları insan endotelial hücrelerinde spesifik oksitosin reseptörlerinin varlığını göstermişlerdir. Aynı zamanda endotelial hücrelere oksitosin uygulanmasının intrasellüler kalsiyum mobilizasyonuna, NO üretimine ve artmış proliferasyona yol açtığını da göstermişlerdir (116). Vasküler oksitosin reseptörlerinin aktivasyonu damarlarda NO aracılı bir vasodilatasyona neden olmaktadır.

Endotelial oksitosin reseptörlerinin sinyal transdüksiyon yolları henüz tam olarak açıklanmış değildir. Bununla birlikte bu reseptörlerin intrasellüler kalsiyumu artırarak kalsiyum-kalmodülin bağımlı nitrik oksit sentazı aktive ettikleri ve bu yolla guanilat siklazı cGMP oluşturmak üzere indükledikleri bilinmektedir. Bu şekilde oksitosinin nitrik oksit aracılıklı bir mekanizmayla vasküler ortamda relaksasyona yol açtığı düşünülmektedir.

Gene Gutkowska ve arkadaşları endotelial oksitosin reseptörlerinin, NO yolağı üzerinde kalsiyum bağımlı bir stimülasyona ve kardiyak gevşemeye sebep olduğunu öne sürmüşlerdir (123). Aynı grup oksitosinin, cGMP üretimini sağlayarak kardiyak doku ve kan damarlarında gevşemeye sebep olan NO'ı ürettiğini öne savunmuşlardır (123).

Oksitosinin endotel aracılı damar etkileri ile ilgili çalışmalar çok kısıtlıdır ve bu konuda mekanizmaların aydınlanabilmesi için daha çok araştırmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

5.GEREÇ VE YÖNTEMLER

5.1. Kullanılan gereçler

Ters mikroskop, CK2 Olympus (Jp)

Laminar flow, Özge AŞ (Türkiye)

CO₂ İnkübatör, Forma Scientific (USA)

Distile su cihazı, Kotterman (FRG)

Buzdolabı, Arçelik (Türkiye)

Derin Dondurucu, - 20⁰ C, Philco (Türkiye)

Su saflaştırma cihazı, Milli Q.UF Millipore (USA)

Santrifüj, Heraeus Digifuj GL (Jp)

Su banyosu, Dedeoğlu (Türkiye)

pH metre, Corning (USA)

Hassas Terazi, Sartorius (Jp)

Manyetik karıştırıcı, Elektro-Mag (Türkiye)

Otoklav, Trans Medikal Aletler Sanayi (Türkiye)

Pasteur etüv, Elektro-Mag (Türkiye)

Vortex, Elektro-mag (Türkiye)

Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad)

NOA Sievers 280i, (USA)

Filtreler:

Millipore Millex (0.22um) (USA)

Kültür kabı ve steril tüpler:

50 mL ve 15 mL'lik polipropilen tüp TPP (İsviçre)

75 cm² hücre flaskı TPP (İsviçre)

Diğer gereçler:

21G pediatrik infüzyon seti

Steril enjektör

Bistüri ucu

Kordon klemp

Steril gazlı bez

Hemostatik forceps, Medical Instruments (Germany)

Protein Tayin Kiti:

BCA Compat-Able Protein Assay Kit (Pierce)

Kimyasal maddeler:

İnorganik kimyasallar: Merck

Fetal dana serumu: Sigma, Biological Industries

Diğer tüm kimyasal kültür malzemeleri: Sigma, Pierce

5.2. Kullanılan Çözeltiler

5.2.1. Hücre kültürü çözeltileri:

Fosfat tamponu (PBS)

%9 salinde (NaCl), 10 mM KH₂PO₄ ve 10 mM Na₂HPO₄ pH 7.4 olacak şekilde

karıştırılarak hazırlandı.

HEPES Tamponu (HBS)

137 mM NaCl, 4mM KCl , 10 mM Hepes, 11 mM Glukoz içeren solüsyon NaOH ile pH 7.4'e ayarlanarak hazırlandı.

Medyum

Hücre kültür çalışmalarında fenol kırmızısı içeren (M 2520, Sigma) ve içermeyen (M 3769, Sigma) olmak üzere iki farklı M 199 kullanıldı. M 199 hücre kültürüne uygun deiyonize suda çözüldü, prosedürüne uygun bir şekilde sodyum bikarbonat eklendi, pH 7.4 'e ayarlandı. % 30 fetal dana serumu (FCS), penisilin/streptomisin/amfoterisin B eklendikten sonra 0.22 µm por genişliğindeki tek kullanımlık steril filtreden geçirilerek steril edildi.

Dekstran ile kaplı aktif kömür (DCC: Dextran coated charcoal)

10 mM Tris, 1 mM EDTA ve % 10 gliserol içeren solüsyonun pH ' ı 8.0'e NaOH ile ayarlandı.Buna 0.25 g Dekstran T₇₀ ve 2.5 g aktif karbon ilave edilerek süspansiyon halindeyken kullanıldı.

Östrojensiz medyum

20 mL DCC 4500 RPM'de 10 dk santrifüj edilerek çöktürüldü.Üst faz atıldı. DCC çökeleği üzerine 20 mL fetal dana serumu ilave edildi (FCS) ve 4°C' de bir gece bekletildi. Ertesi gün DCC ile muamele edilmiş FCS 5000 RPM' de 4°C' de 10 dk boyunca 2 kez santrifüj edildi. Süpernatanta Medium 199 (Sigma #M3769) ilave edilerek 0.22µm millipore filtre ile sterilize edildi.

100 nM 17 β-östradiol içeren medyum

DCC ile muamele edilmiş FCS içeren M 3769'a son konsantrasyonu 100 nM olacak şekilde 17 β-östradiol eklendi.

100 nM oksitosin içeren medyum

DCC ile muamele edilmiş FCS içeren M 3769'a son konsantrasyonu 100 nM olacak şekilde oksitosin eklendi.

100 nM progesteron içeren medyum

DCC ile muamele edilmiş FCS içeren M 3769'a son konsantrasyonu 100 nM olacak şekilde progesteron eklendi.

100 nM 17 β -östradiol ve 100 nM oksitosin içeren medyum

DCC ile muamele edilmiş FCS içeren M 3769'a son konsantrasyonları 100 nM olacak şekilde 17 β -östradiol ve oksitosin eklendi.

100 nM 17 β -östradiol ve 100 nM progesteron içeren medyum

DCC ile muamele edilmiş FCS içeren M 3769'a son konsantrasyonları 100 nM olacak şekilde 17 β -östradiol ve progesteron eklendi.

100 nM progesteron ve 100 nM oksitosin içeren medyum

DCC ile muamele edilmiş FCS içeren M 3769'a son konsantrasyonları 100 nM olacak şekilde progesteron ve oksitosin eklendi.

100 nM 17 β -östradiol, 100 nM oksitosin ve 100nM progesteron içeren medyum

DCC ile muamele edilmiş FCS içeren M 3769'a son konsantrasyonları 100 nM olacak şekilde 17 β -östradiol, oksitosin, ve progesteron eklendi.

5.2.2. Protein İzolasyonu çözeltileri:

Hücre Patlatma Çözeltisi (10 mL) (50 mM Tris, 150 mM NaCl, %1 Triton X-100, 1 mM EDTA, buz soğukluğunda, pH=8.0):

5 mL 1M Tris HCl

0.88 mg NaCl

1 mL Triton X-100

1 mL 100 mM EDTA (ultrasaf su ile 100 mL'ye tamamlanır, pH 8.0 ayarlanır ve + 4° C'de saklanır.

Pepstatin (1mg/mL) : 10 mg Pepstatin tartılıp 10 mL metanol içinde çözülür.

Leupeptin (1mg/mL): 10 mg leupeptin tartılıp 10 mL ultrasaf su içinde çözülür.

PMSF (0.1 M): 0.174 g PMSF tartılıp 1 mL metanol içinde çözülür.

1 M Tris Çözeltisi (50 mL): 6.057 g Tris tartılarak 50 mL ultrasaf su içinde çözülür pH: 8.0 ayarlanır.

100 mM EDTA (100 mL): 3.72 g EDTA tartılıp 100 mL ultrasaf su içinde çözülür.

Ölçüm Çözeltileri:

BCA (Bicinchonic acid) Çözeltisi: Hazır halde alınan BCA çözeltisi kullanılır, BCA Protein Assay Reagent A, Kat No: 23228, Pierce, USA

Bakır Sülfat Çözeltisi: Hazır halde alınan bakır sülfat pentahidrat çözeltisi kullanılır, BCA Protein Assay Reagent B, Kat No: 1859078, Pierce, USA

5.2.3. SDS-PAGE elektroforez ve transfer çözeltileri:

%10' luk ammonium persülfat (APS)

2-merkaptoetanol

%30' luk Akrilamid-bisakrilamid

Asetik asit

Bromofenol Blue

Coomassie Brilliant Blue R 250

Gliserol

Glisin

Hidroklorik Asit

Izopropanol
N,N- metilen-bis-akrilamid
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)
Tetrametilendiamid (TEMED)
Tris

Protein Marker: Broad Range Markers Santa Cruz: sc-2361

Ayırma (Separating) Jeli % 12 (5 mL)

1.65 mL su
1.25 mL 4X ayırma jeli çözeltisi
2.0 mL %30 akrilamid-bisakrilamid
50µL %10 APS
5 µL TEMED

Yığınlama (Stacking) Jeli %4 (2.5 mL):

1.55 mL dd su
0.625 mL 4X yığınlama jel çözeltisi
0.335 mL %30 akrilamid-bis
25 µL APS (%10), 5 µL TEMED

4X Yığınlama Jeli Çözeltisi (50 mL) (0.5 M Tris, % 0.4 SDS pH: 6.8):

3.0275 g Tris baz, 0.2 g SDS tartılarak ultrasaf su ile 50 mL'ye tamamlanır ve pH 6.8'e ayarlanır.

4X Ayırma Jeli Çözeltisi (50 mL) (1.5 M Tris, % 0.4 SDS pH 8.8):

9.09 g Tris baz, 0.2 g SDS tartılarak ultrasaf su ile 50 mL'ye tamamlanır ve pH 8.8' e ayarlanır.

10X Elektroforez Yürütme Çözeltisi (Running Buffer, 50 mM Tris, 384 mM Glisin):

6.055 g Tris baz ve 28.82 g Glisin tartılarak ultrasaf su ile 200 mL' ye tamamlanır.

1X Elektroforez Yürütme Çözeltisi:

100 mL 10X Elektroforez Yürütme Çözeltisine 10 mL %10 SDS eklenir ve ultrasaf su ile 1 lt' ye tamamlanır.

Yükleme Tamponu (6X) (Sample Buffer) (10 mL):

7 mL 4X Tris-HCl (4X Yığınlama Jeli Çözeltisi), 3.0 mL gliserol, 1 g SDS, 10 mg Bromofenol mavisi ultrasaf su ile 10 ml' ye tamamlanır. Aligotlanarak – 20 °C' de saklanır.

Protein Yüklem Tamponu (6X):

100 µL tampon içine 2 µL β merkapt etanol eklenir.

%10'luk SDS çözeltisi: 10 g SDS 100 mL saf su içinde çözülür.

%10'luk Amonyum persülfat (APS): 0.5 g APS 5 mL saf su içinde çözülür.

Transfer Çözeltileri:

Transfer Çözeltisi (1 litre):

100 mL 10X Elektroforez Yürütme Çözeltisine 150 mL metanol eklenir ve ultrasaf su ile 1 lt' ye tamamlanır.

Coomassie Jel Çözeltisi (1 litre):

1 g Coomassie blue R-250 tartılarak 450 mL ultrasaf içinde çözünür. 450 mL metanol ve 100 mL glasiyel asetik asit eklenerek 1 lt'ye tamamlanır.

Boya giderme çözeltisi (Destaining) Çözeltisi (1 litre) (%10 glasiyel asetik asit, %10 metanol):

100 mL glasiyel asetik asit, 100 mL metanol, 800 mL ultrasaf su ile 1 litreye tamamlanır.

Ponceau S Çözeltisi (100 mL):

0.5 g Ponceau S %1 asetik asit içinde çözülür.

5.2.4. Western Blotting malzemeleri ve cözeltileri:

Antikorlar:

- Anti-Oxytocin Reseptor antikorü, Oxytocin- R(H-60), Kat No: sc-33209 Santa Cruz
- Anti-Actin, N-terminal antikor, Actin (H-300), Kat No: sc-10731 Santa Cruz

Membran: HiBind PVDF Membrane 0.45 µm, Kat No: 88518 Pierce

Western blot detection kit: SuperSignal West Pico Chemiluminescent Kat No: 34080, Pierce

X-ray filmi: Cl-Xposure Film Kat No: 34090, Pierce

Kodak X-Ray Developer and Fixer:

Röntgen Developer 40L, Kat No:5239322 Digi-Com

Röntgen Fikser 40L, Kat No: 5224381 Digi-Com

Blotlama Cözeltileri:

TBS (20 mM, 154 mM NaCl) (1 litre):

2.42 g Tris baz, 9 g NaCl tartılıp 1 lt ultrasaf su içinde cözünür. pH 7.4'e ayarlanır.

TBST (%1 Tween 20) (1 litre):

1 litre TBS içine 1 mL Twenn 20 eklenir ve karıştırılır.

Bloklama Cözeltisi (% 3 süttozu içeren TBST) (10 mL):

0.3 g süttozu tartılarak 10 mL TBST içinde cözünür.

%2 Sodyum Azid Cözeltisi:

0.2 g sodyum azid 10 mL ultrasaf su içinde cözünür.

5.3. Yöntemler

5.3.1 Endotel hücre kültürü:

Zeynep Kamil Doğum servisinden sezeryan ameliyatları sırasında alınan 20-50 cm

uzunluğundaki göbek kordonları steril %9 NaCl çözelti içeren şişelerin içine kondu. Ameliyat sırasında zedelenen veya mekonyumlu olan kordonlar çalışmaya alınmadı. Alınan kordonlar en geç 1-4 saat içerisinde çalışıldı.

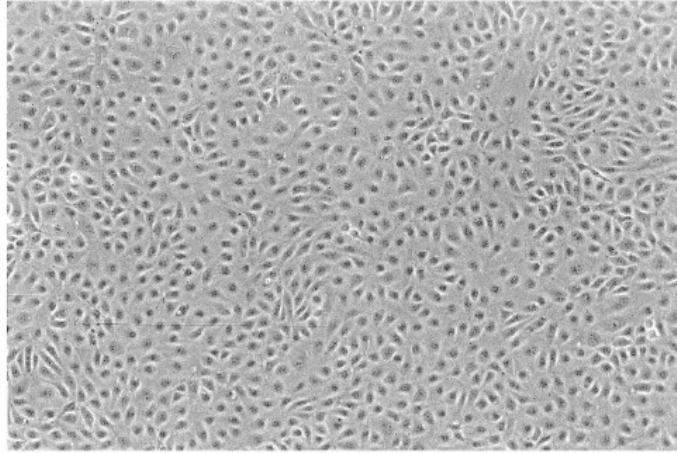
Kordon steril kaptan laminar flow altında çıkarıldıktan sonra uçları bistüri ucu ile disseke edildi ve venden 21 G pediatrik infüzyon seti takıldı. Önce kordonun bebek tarafındaki ucundan 50 mL 37 °C' de steril HBS ile damar lümeni 2 kez yıkandı. Sonra kordona anne tarafındaki ucundan da infüzyon seti takılarak aynı şekilde yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkanan kordonlar 37 °C' de 10 mL HBS içinde çözünmüş %0.1 kollagenaz (Tip IA) ile dolduruldu. 37 °C' lik su banyosu içinde PBS içeren beherde 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda damar yüzeyinden sökülen hücreler infüzyon setinin ucundan verilen 50 mL HBS yardımı ile steril tüpler içinde toplandı ve 1400 RPM (200g) de 20 °C' de 8 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dikkatle boşaltıldı. Endotel hücrelerden oluşan pellet 1 mL medyum içinde süspanse edildikten sonra aynı şekilde bir kez daha santrifüj edildi. Süpernatant tekrar atılıp kalan hücre pelleti üzerine % 30 FCS, penisilin/streptomisin/amfoterisin B içeren M-199 (M 2520) medyum eklendi. Yetmişbeş cm² lik flasklara ekim yapıldı. Flasklar 37 °C'lik % 5 'lik CO₂ inkübatörüne konuldu ve medyumları 2 günde bir değiştirildi. Bu şartlarda 2 gün sonrasında konfluent olan hücreler aşağıdaki şekilde pasajlanarak çoğaltıldı.

Pasajlama:

Kültür odası ve laminar flow 2 saat boyunca UV ışıktaki bekletildi. Cam pipetler metal kutu içerisinde 200 °C' de 2 saat bekletilerek steril edildi. Pasajlama sırasında kullanılacak olan Tripsin/EDTA, Tripsin nötralize edici solüsyon ve HEPES oda sıcaklığına getirildi. Hücre medyumunu ise 37°C' ye ısıtılmış su banyosunda 1 saat bekletildi. İlk olarak konfluent olan hücrelerin üzerlerindeki medyumlar uzaklaştırıldı. Her flask 5 mL HEPES solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra hücreleri flask tabanından ayırmak için 2.5 mL Tripsin/EDTA solüsyonu eklendi. Mikroskop yardımıyla hücrelerin tabandan ayrıldığı görüldükten sonra her bir flaskta Tripsin/EDTA' nın yaklaşık 3 katı kadar TNS (Tripsin Nötralize Solüsyonu) veya M-199 medyum) eklendi. Flasklardaki karışım steril falkon tüplerine aktarılıp ve 220xg' de (1400 RPM' de), 20°C' de 8 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak tüpe 45 mL medyum kondu ve

çalkalanarak hücrelerin homojen dağılması sağlandı. Ve 1:3 oranında pasajlama gerçekleştirildi.

Hücrelerin yeniden konfluent olması için 37°C'lik %5'lik CO₂ inkübatörüne kondu. Böylece 3. pasajlamaya kadar işleme devam edildi.



Şekil 5.1 : Konfluent endotel hücre kültürü (18).

Kültürler konfluent olduklarında kuyulardaki medyumlar steril pipetler yardımıyla alındı ve yerine % 10 FCS içeren östrojensiz medyum konularak 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra östrojensiz medyumlar tekrar steril pipetler ile alınarak her bir flaska; östrojensiz, 100 nM östrojen, 100 nM oksitosin, 100 nM progesteron, 100 nM 17 β-östradiol ve 100 nM oksitosin, 100 nM 17 β-östradiol ve 100 nM progesteron, 100 nM progesteron ve 100 nM oksitosin, ve 100 nM 17 β-östradiol, 100 nM oksitosin ve 100nM progesteron içeren medyumlarla 24 saat daha inkübe edildi. İnkübasyon sonunda medyumlar santrifüj tüplerine toplandı, hücreler ise protein tayinleri yapılmak üzere – 80 °C' e kaldırıldı.

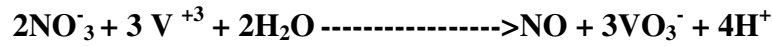
5.3.2. Nitrik oksit ölçümü:

Medyumlar toplandıktan sonra proteinlerinden uzaklaştırıldı. Bunun için soğuk ethanol veya çinko sülfat ile çöktürme yöntemlerinde biri kullanıldı. Ethanol ile çöktürme yönteminde 500 µL medyuma 1 mL 0 °C' de ethanol eklenip vortekslendi. 0 °C' de 30 dk inkübe edildikten sonra 14000 RPM' de 0 °C' de 5 dk santrifüj edildi. Diğer bir

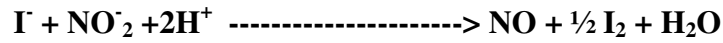
yöntem olan çinko sülfat ile çöktürme yönteminde 200 µL medyuma 400 µL 0.5 N NaOH ve 400 µL % 10 luk ZnSO₄ eklendi. 15 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 14000 RPM ' de 5 dk santrifüj edildi.

Çözeltilerde nitrik oksit moleküler oksijenle reaksiyona girer ve nitrit oluşturur. Oksihemoglobin ve süperoksit anyonu ile reaksiyona girdiği zaman ise nitrat oluşturur. NO ayrıca tiollerle reaksiyona girerek S-nitroso bileşiklerini, aminlerle nitrozaminleri, metallerle metrazonitrozil komplekslerini oluşturur. Gaz fazında ise yüksek konsantrasyonlardaki oksijen ile azot dioksiti oluşturur. Nitrat, nitrik oksitin bazı hücre kültür sistemleri, insan ve hayvan örneklerindeki ana oksidasyon ürünüdür.

Nitrati ölçmek için HCl içindeki vanadium (III) kloridin, nitrati nitrik oksite çevirmesinden yararlanılır.



Nitriti ölçmek için; glasiyel asetik asit içindeki KI (%1 wt/vol)' nın nitriti nitrik oksite çevirmesinden yararlanılır.



Nitrik oksit ölçümleri nitrik oksit ve ozon arasındaki reaksiyonu gaz faz kemilüminesana dayalı teknikle ölçen yüksek derecede sensitif detektöre sahip olan Sievers model 280i nitrik oksit analizörü (NOA)'den yararlanılır. Ozonun NO ile tepkimesinde uyarılmış durumdaki nitrojen dioksit oluşur. Uyarılmış NO₂ 'in normal formuna dönerken yaydığı foton kemilüminesans yöntemiyle ölçülür.



Elektron alarak uyarılmış nitrojen dioksitin emisyonu spektrumda infrared bölgenin yakınındadır. Termoelektrik olarak soğutulmuş kırmızıya hassas fotomultiplier tüp

tarafından tespit edilir. Sıvı örnekler için ise tespit aralığı yaklaşık olarak 1 pikomolardır.

5.3.3. Protein İzolasyonu:

1 mL hücre patlatma solüsyonu alınıp içine;

- 1µL pepstatin (1mg/mL) (son konsantrasyon 10µg/ml)
- 1µL leupeptin (1mg/mL) (son konsantrasyon 10µg/ml)
- 10µL PMSF (0.1M) (son konsantrasyon 1mM) eklenir.

-Hücre kültür ortamı çekilmiş ve PBS ile yıkanmış olan hücrelerin üzerine 200 µL proteaz inhibitörü içeren hücre patlatma solüsyonu eklendi.

-Hücreler buz içeren bir kabın üzerinde, kazıyıcı yardımı ile hücre kültür kabından kaldırılıp ve hücre lizatı buz üzerinde bekleyen bir eppendorf tüpe aktarıldı.

-Tüpler, 13000 RPM' de + 4° C'de 30 dk çevrilip ve süpernatant alınıp eppendorf tüplere paylaştırıldı ve kullanılacağı zamana kadar -80° C'ye kaldırıldı.

5.3.4. BCA Protein Tayin Yöntemi:

BCA(bicinchonic acid) protein tayin yönteminde Bakır Sülfat, BCA solüsyonuna eklendiğinde oluşan kompleks elma yeşili bir renk alır. Bu solüsyon protein solüsyonuna ilave edildiğinde, proteinin peptid bağları ile etkileştiğinde Cu^{++} iyonları Cu^+ iyonlarına dönüşür ve kompleksin rengini mora çevirir. Bu yöntem hızlı, hassas ve kesindir ancak deterjan ve organik solventlerle etkileşimlerine dikkat etmek gerekir. Bu yöntem kullanılarak 0.5-1200 µg/mL protein konsantrasyon aralığı ölçülebilir.

Mikroplate Yöntemi:

- Ölçüm için Pierce marka BCA Compat-Able Protein Assay Kit ve 96 kuyuluk mikroplate kullanıldı.

- Her bir kuyuya 25 µL standart (0µg/25µL, 5µg/25µL, 10µg/25µL, 15µg/25µL, 20µg/25µL, 25µg/25µL, 40µg/25µL, 50µg/25µL) veya bilinmeyen örnek pipetlendi.
- Kuyuların üzerine 200 µL çalışma ayırıcı (working reagent) pipetlenip ve plate karıştırıcıda 30 sn tutuldu.
- Plate 37°C hava ısıtmalı etüve, içinde yaklaşık 100 ml su bulunan bir kap içerisinde yerleştirilerek 30 dk inkübe edildi.
- 15 dk oda sıcaklığına ulaşması için beklenildi.
- A₅₄₀ nm’de okundu.

5.3.5. SDS-PAGE Yöntemi:

Proteinlerin, negatif yüklü SDS molekülleri ile kaplandıktan sonra molekül ağırlıklarına göre poliakrilamid jel ortamında elektrik alan içinde göç etmesi ve boya maddesi ile bandların görünür hale getirilmesi prensibine dayanır.

Poliakrilamid Jelin Dökülmesi:

- Jeller 8×10 cm (büyük cam) ve 10×7 cm (küçük cam) camların arasında polimerize edilmesiyle hazırlandı.
- Camlar, tarak ve spacer’lar fırça ile sabunla yıkanıp etanol ile silinerek kurutuldu.
- “Spacer” lar iki cam arasında yerleştirilip sıkıştırılarak jel sandviçi hazırlandı ve jel sandviçi “casting stand” a yerleştirildi. Herhangi bir sızıntı olup olmadığını iki cam arasına ultrapure su konularak kontrol edildi.
- Ayırma jeli birleşenleri bir behere konulup üzerine APS ve TEMED eklendi. Pastör pipeti yardımıyla henüz sıvı haldeki jel çözeltisi, hava kabarcıkları olmamasına dikkat edilerek, kuyuların diplerinden 1 cm aşağıdaki sınıra kadar döküldü.
- Jelin üst kısmını düzleştirmek için jelin hava ile temas eden kısmına dikkatlice bütanol eklendi.
- Jel polimerize olana kadar beklendi.
- Yığınlama jelinin çözeltileri ayrı bir kapta hazırlandı.
- Jelin üst kısmındaki bütanol boşaltılıp, birkaç kez ultrasaf su ile yıkandı.

- Tarak iki camın arasına yerleştirilip ve yığınlama jeli polimerize olmadan ayırma jelinin üst kısmına dikkatlice döküldü.
- Elektroforez işlemi:
 - 10 kere konsantre (10X) elektroforez yürütme çözeltisinden, yürütme çözeltisi (1X) yapıp ve anot katot boşluklarına konuldu.
 - Jel üzerindeki kuyular bir enjektör yardımıyla yürütme çözeltisi ile iyice yıkandı.
 - Örnekler istenen hacimlerde toplam protein miktarı BCA yöntemiyle belirlenerek eppendorf tüplere pipetlendi ve 5:1 oranında yükleme tamponu eklenip 5-8 dk kaynatıldı.
 - Daha sonra bu örnekler enjektör yardımıyla kuyulara 20 µl'lik miktarlarda yüklenip boş kuyulara aynı miktar yükleme tamponu eklendi.
 - Örnekler yığınlama jelinde 30 V'da ve ayırma jelinde 100 V'da yürütüldü.

5.3.6. Western Blotting Yöntemi:

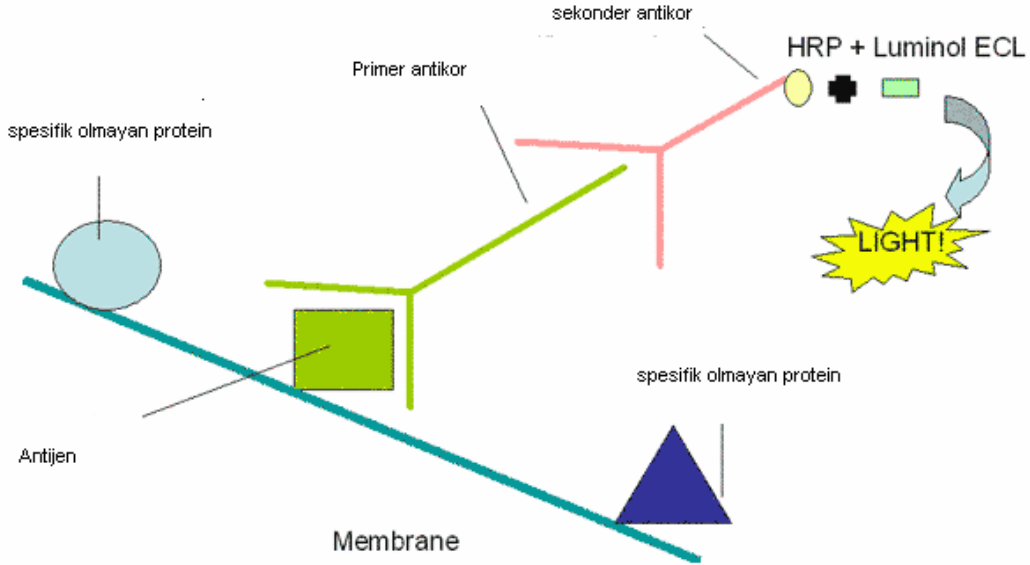
Western blotting; elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, destek membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immunolojik yöntemlerle tespitidir (140,141).

Blotlamadan önce, çalışılan numunedeki proteinler, elektriksel ortamda jel üzerinde göç ettirilmektedir. Proteinlerin elektroforezi SDS-PAGE gerçekleştirilmektedirler. SDS-PAGE, proteinlerin ayrıştırılması ve saflaştırılmasında kullanılan temel biyokimyasal yöntemlerden birisidir (142).

Çalışılan numundeki SDS-polipeptid kompleksleri, poliakrilamid jele yüklenip, elektrik akımına maruz bırakıldıkları zaman, proteinin molekül ağırlığıyla orantılı olarak, artı kutba (anot) doğru göç etmekte, jelde bulundukları yerde bandlar halinde yığılım göstermektedir. Yapılan bu işleme “elektroforez” denilmektedir (142).

Western blot tekniği, elektroforez işlemini takip eden 4 adımda gerçekleştirilir. Bunlar; jeldeki proteinlerin membrana transferi (blotlama), spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle

kaplanması (bloklama), özgül antikorlarla tepkime ve en son adımda ise proteinlerin görüntülenmesi aşamasıdır (140,141,143).



Şekil 5.2: Western Blotting yöntemi prensibi (144).

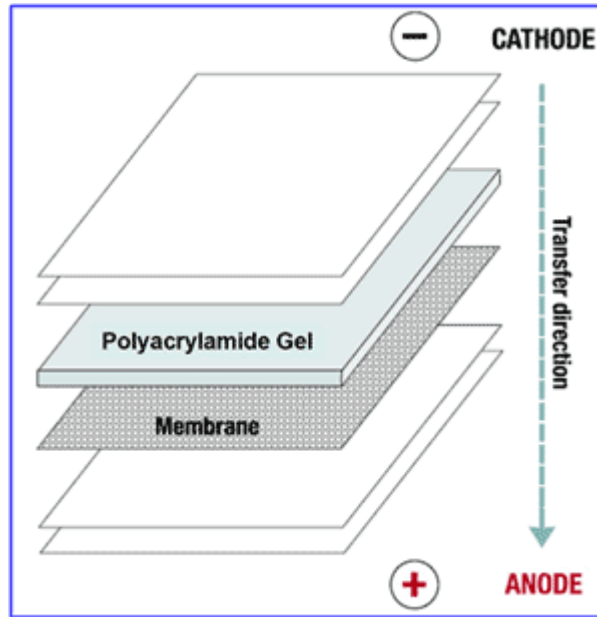
5.3.6.1 Western Transfer (Islak Transfer):

Jel ve membran tampon dolu bir tankın içine yerleştirilir ve akım uygulanır. Yavaş ancak etkili bir yöntemdir. Daha çok küçük jeller için kullanılır.

- 1 L transfer solüsyonu hazırlanıp soğutuldu.
- Jelin protein bulunmayan yığınlama kısmı kesilip atıldı.
- PVDF membran uygun boyutlarda kesilerek önce % 100 metanolde 15 sn, daha sonra transfer solüsyonu içinde yarım saat hidrate edildi.
- Jel transfer solüsyonu içinde yarım saat çalkalandı.
- Western sandviçi hazırlandı. Bir miktar transfer çözeltisi, derinliği fazla olmayan geniş bir kaba alındı. Kaset, içi transfer solüsyonu ile dolu bu kaba konularak siyah yüze (- taraf) sünger, 2 adet 3MM Whatman kağıdı ve jel konuldu. Jelin üzerine membran yerleştirilerek arada hava kabarcıkları kalmamasına dikkat edilerek membranın üzerine 2 adet daha 3MM Whatman

kağıdı ve sünger konuldu. Plastik klamp ile kaset kapatıldı. Kaset kapatıldığında alt tarafta siyah, üst kısımda kırmızı yüz olur.

- Kaset dikey olarak, renksiz yüzü elektrod modülünün kırmızı kısmına, siyah kısmı elektrod modülünün siyah kısmına bakacak şekilde yerleştirildi.
- Daha sonra tüm sistem tankın içine buz kalıbı da oturtularak tanka yerleştirildi ve tankın kapağı kapatıldı.
- Güç kaynağı açılarak 100 V' a ayarlandı. 2 saat kadar soğukta transfer edildi.
- Transfer işlemi sonlandığında güç kaynağı kapatılıp ve jel kaseti tankın içinden çıkarıldı.
- Jel kaseti dikkatlice açılıp, süngerler ve Whatman kağıtları ayrılıp jel ve membran birbirlerinden dikkatlice ayrıldı.
- Membran Ponceau S solüsyonuyla boyanarak proteinlerin transfer olup olmadıklarına bakıldı. Jel coomassie mavi solüsyonuna atılıp jelde protein kalıp kalmadığına bakıldı.



Resim 5.3: Western blotting transfer (145)

5.3.6.2 Western Blotlama:

- 1 saat TBST içinde hazırlanan %5'lik yağsız süttozu ile PVDF membranı bloklandı. Böylece spesifik olmayan bağlanmalar bu bloklama ile engellendi.
- Membran oksitosin primer antikoru (1/200 dilüsyon) ile gece boyu + 4⁰ C'de inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası membran 3×20 dk TBST ile yıkandı. Her 20 dk yıkamada TBST tazelendi.
- Yıkama sonrasında 2. primer antikor olan aktin antikoru (1/400 dilüsyon) ile membran 6 saat + 4⁰ C'de inkübasyon yapıldı.
- İnkübasyon sonrası membran yine 3×20 dk TBST ile yıkandı. Her 20 dk yıkamada TBST tazelendi.
- Membran, 1/2500 konsantrasyonlu sekonder antikor ile oda sıcaklığında inkübasyona tabi tutuldu.
- 2×20 dk TBST ile 1×20 dk TBS ile son yıkama yapıldı.

5.3.6.3. Karanlık Oda İşlemleri:

- Membran kaset içine yerleştirilmiş gergin ve buruşuk olmayan bir asetat üzerine konuldu.
- Marker işaretleri fosforlu etiketler ile işaretlendi. Böylece etiketler filmi yakacak ve film üzerinde markerların yerleri belli olacaktır.
- Solüsyon 1 ve 2, 1:1 oranında karıştırılıp 1 dk beklendi ve membranın üzerine döküldü. Membranın tüm alanını kapladığından emin olundu.
- Daha sonra ikinci bir asetat membranın üzerine kapatıldı ve kasetin içinde kayması engellendi.
- Işık kapatıldı ve kırmızı ışık açıldı. Filmler kutudan çıkartılarak membran üzerine yerleştirilip ve kasetin kapağı kapatıldı.
- 3-5 sn membran üzerinde tutulan film alınarak developer solüsyonu içine kondu burada 15 sn kadar yıkandı.

- Developer solüsyonundan çıkarılan film, fiksör solüsyonunda 10 sn kadar tutuldu.
- Film su ile durulandı ve oda ısısında kurutuldu.

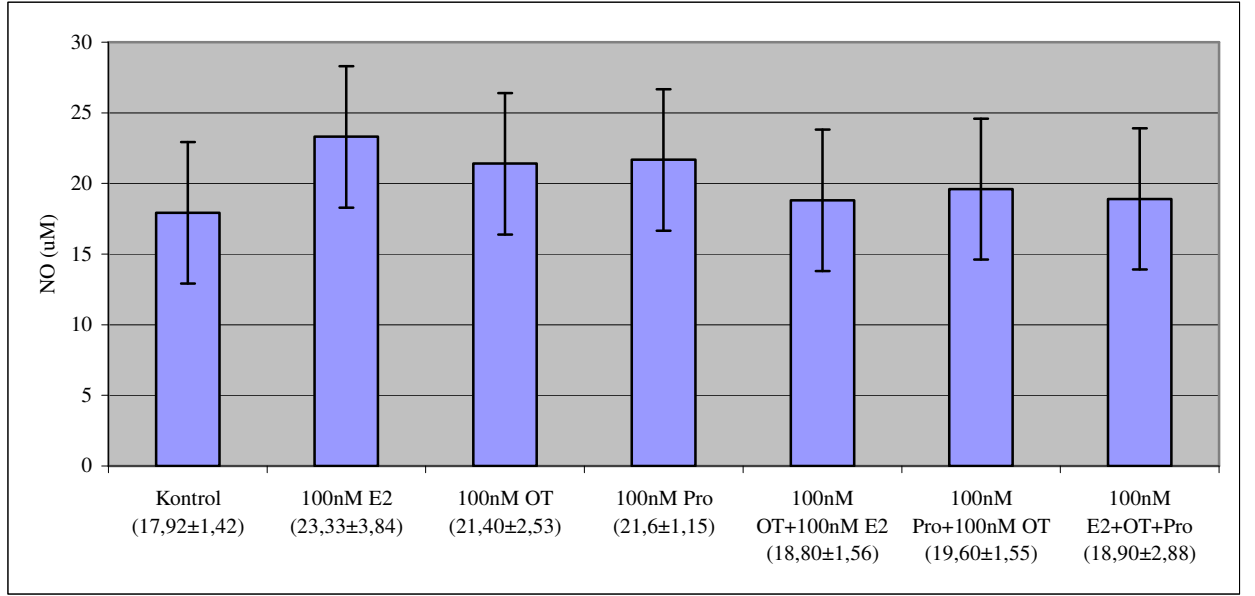
5.3.7. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler:

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri Graph Pad yazılımı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p<0,05$ olarak alınmıştır. Nitrik oksit miktarlarının ve oksitosin reseptör artışlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Paired Samples Student T-Test kullanılmıştır.

6.BULGULAR

6.1. Nitrik Oksit Ölçümü Sonuçları:

Üçüncü pasajlama işlemi sonunda elde edilen endotel hücrelerine, yöntemler kısmında anlatıldığı gibi, belirtilen miktarlarda hormonlu medyumlar ile 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücrelerin üzerlerinden elde edilen medyumların protein çöktürme işlemleri yapıldıktan sonra, nitrik oksit ölçümleri, Sievers Nitrik Oksit Analizörü 280i aletinde yapıldı.



Şekil 6.1: Endotel hücre kültüründen elde edilen nitrik oksit sonuçları (n=5)

Yaptığımız istatistiksel analiz sonucunda insan umbilikal ven endotelial hücrelerinin östradiol, oksitosin ve progesteron ile uyarılmasının NO miktarlarını anlamlı ölçüde arttırdığı tespit edildi. NO miktarlarının kontrole göre östrojen ile uyarılmış hücrelerde % 30 oranında, oksitosin ile uyarılan hücrelerde ise % 19 oranında anlamlı artış tespit edildi. Yine kontrole göre progesteronun % 20 oranında nitrik oksit miktarını anlamlı bir şekilde arttırdığı görülmüştür. Oksitosinin vasküler endoteldeki NO üretimi üzerine olan etkisine östrojen ve progesteronun katkılarına bakıldığında östrojenle birlikte oksitosinin verildiği hücrelerde NO üretiminde sadece oksitosin veya E2 verilen hücrelerdekine göre anlamlı bir düşüş görülmektedir. Progesteron ile birlikte oksitosinin verildiği hücrelerdeki NO üretimini ile sadece oksitosin verilen hücrelerdeki NO üretimi arasında azalma gözlemlenmedi istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemektedir.

Tablo 6.1: Nitrik oksit miktarlarına göre yapılan istatistiksel analiz sonucunda anlamlı çıkan parametrelerin t-testi p değerleri

		<i>t</i> -testinin <i>p</i> -Değerleri
kontrol	östrojen	0.027

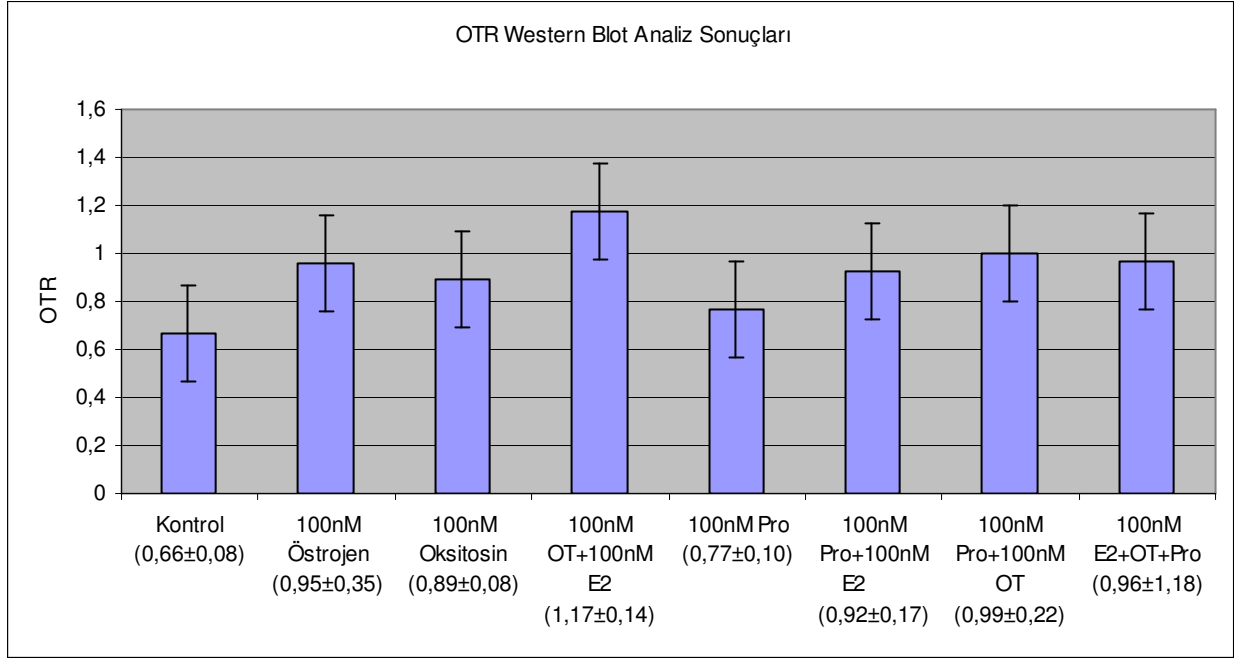
kontrol	oksitosin	0.028
kontrol	progesteron	0.017
oksitosin	Oksitosin+östrojen	0.029

6.2. Endotel Hücrelerde BCA Protein Yöntemi ile Protein Miktarlarının Tayini:

Nitrik oksit ölçümü sonrası yapılan elektroforez işlemi için, kuyulara uygun ve eşit miktarlarda protein yüklemek için endotel hücrelerde protein tayini yapıldı. Bunun için diğer protein tayin yöntemlerine göre daha hassas, hızlı ve kesin olan “BCA Protein Tayin Yöntemi” kullanıldı. Yöntemin basamakları “Yöntemler” kısmında anlatılmıştır.

6.3. Western Blot Analizi Sonuçları:

Western blotting yöntemi ile membrandan X-ray filme aktarım sonucunda elde ettiğimiz endotel hücrelerdeki oksitosin reseptör bandlarının analizi sonucunda aşağıdaki veriler elde edilmiştir.

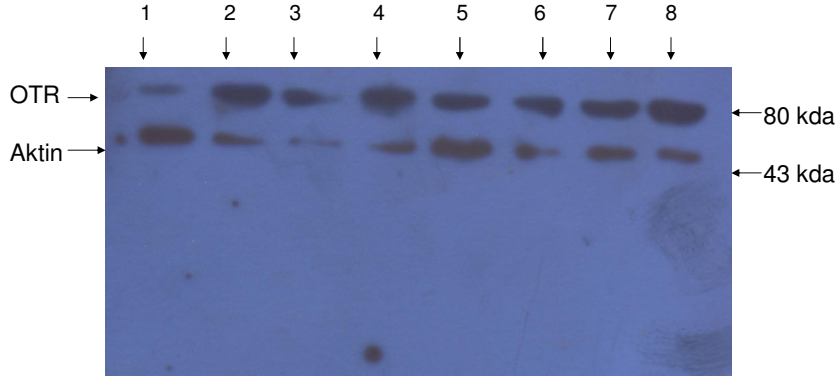


Şekil 6.2: Oksitosin reseptörü için Western Blotting analiz sonuçları (n=3)

Buna göre; her bir hormon uygulaması, endotel hücrelerde OTR sayısını kontrole göre arttırmıştır. Endotel hücrelere östrojen ve oksitosin uygulanmasıyla oksitosin reseptörleri kontrole göre sırasıyla % 49 ve % 35 artmıştır. Östrojen ve oksitosinin beraber verildiği hücrelerde ise % 79 oranında anlamlı bir artış gözlenmiştir.

Tablo 6.2: Oksitosin reseptör artışlarına göre yapılan istatistiksel analiz sonucunda anlamlı çıkan parameterelerin t testi p değerleri

		<i>t</i> -testinin <i>p</i> -Değerleri
kontrol	Östrojen+oksitosin	0.049
oksitosin	Östrojen+oksitosin	0.034



- | | |
|-----------------|-------------------|
| 1. Kontrol | 5. 100 nM OT+P |
| 2. 100 nM E2 | 6. 100 nM P+E2 |
| 3. 100 nM OT | 7. 100 nM P |
| 4. 100 nM E2+OT | 8. 100 nM E2+OT+P |

Şekil 6.3: X-Ray film üzerinde oksitosin reseptörler bandlarının görüntüsü

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda yapılan araştırmalar oksitosinin kardiovasküler sistem üzerinde önemli etkileri olan bir hormon olabileceğini göstermektedir. Kardiovasküler sistemde oksitosinin en önemli hedeflerinden biri endotelyumdur. Ancak oksitosinin endotel aracılı vasküler etkileri ve bu etkilerin düzenlenmesi ile ilgili bilgiler henüz çok kısıtlıdır. OT'nin kan basıncı, kan hacmi üzerindeki doğrudan ve aracılı etkilerinin mekanizması yoğun olarak araştırılmaktadır.

Bu çalışmada oksitosinin endotel hücrelerinde NO salgılanması üzerindeki etkileri ile östradiol ve progesteron gibi steroid hormonların oksitosinin etkilerinin düzenlenmesindeki rolü araştırılmaya çalışılmıştır.

Araştırmamızda, insan umbilikal ven endotelial hücrelerinin oksitosin ile inkübasyonun NO salgılanmasını anlamlı ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir. Östradiol veya progesteron ile inkübe edilen hücrelerde de NO salgılanmasında artış gözlenmiştir. Deneylerimizde en fazla NO artışına E2 neden olurken (% 30) OT ve P benzer miktarlarda (~% 20) artışa neden olmuştur. Östradiolün ve progesteronun NO sentezini artırdıkları uzun yıllardır bilinmektedir (67,146-151). Yapılan bir çalışma ise insan endotelial hücrelere oksitosin uygulanmasının intrasellüler kalsiyum mobilizasyonuna, NO üretimine ve artmış proliferasyona yol açtığını göstermiştir (116). Bizim sonuçlarımızda oksitosinin endotelden NO salgılatıldığını doğrulamaktadır.

Oksitosinin endotelden NO salgılatması damar sağlığı açısından önemli bir hormon olduğunu göstermektedir. Çünkü NO, kan akışı ve basıncının düzenlenmesinde rol alan güçlü bir antiaterosklerotik bir moleküldür. Bu bulgular OT'nin vasküler sistemde endotel aracılı olarak NO yolağı üzerinden koruyucu ve gevşetici etkilerinin olabileceği göstermektedir.

Östrojenlerinde damar koruyucu etkilerinin önemli bir kısmını NO aracılı gerçekleştirdikleri bilinmektedir (152). Ayrıca östrojenlerin OT sentezini regüle ettiği de kabul edilmektedir.

Ancak deneylerimizde, endotel hücreleri östradiol veya progesteronla beraber oksitosin ile inkübe edildiklerinde salgılanan NO miktarlarında anlamlı azalma saptanmıştır. Bu bulgu hem östradiolün hemde progesteronun varlığında OT'nin NO salgılatırıcı

etkisinin azaldığını veya başka bir deyişle OT'nin östrojen veya progesteronun etkilerini baskıladığını, yani hormonlar arasında bir etkileşim olduğunu göstermektedir.

Her ne kadar progesteronun uterusu OT'nin fonksiyonlarını, baskıladığı bilinsede östrojenlerin OT etkilerini baskılaması ile ilgili bilgi literatürde fazla yoktur (153,154). Ancak OT verilen kadınlarda görülen kan basıncı değişikliklerinin hormonal durum ile ilgili olması, örneğin kan basıncında azalmanın hamile olmayan kadınlarda hamilelerden fazla olması seks steroidlerinin OT damar etkileri üzerinde önemli rolü olduğunu göstermektedir (117).

Ayrıca oksitosinin sentezinin seks steroidleri kontrolü altında olduğunun kanıtı ise, plasma oksitosin düzeylerinin menstrüel siklus boyunca değişiklik göstermesidir. Bu çalışmaya göre foliküler ve ovulasyon fazında yüksek olan oksitosin, luteal fazda düşük bulunmuştur (155).

Oksitosin ve östradiol etkileşimi *in vitro* olarak ta gösterilmiştir. Örneğin MCF7 meme kanseri hücrelerinde oksitosin uygulanması östradiolün mitoz üzerindeki uyarıcı etkisini baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca OT'nin yine MCF7 kanser hücrelerinde ER α mRNA'sı üretiminde, bağlanma afinitesinde ve transkripsiyonal aktivitesinde değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir (156).

Gebelik boyunca OT düzeylerinin artmasına rağmen, artan uterine OTR'lerinin progesteron tarafından etkisiz tutulduğu ve doğumun başlaması ile progesteron düzeylerinin azalması ile aktif hale geldiği kabul edilmektedir. Progesteronun OTR'lerini etkisizleştirmesinin mekanizması halen çok net olarak bilinmese de önerilen çeşitli hipotezler vardır ve myometriumun birden OT'ye hassas hale gelerek kasılmaya başlamasının nedeni henüz bilinmemektedir (157). Dolayısı ile bizim deneylerimizde de endotel hücrelerinde de progesteron varlığında NO sentezinde azalma gözlenmesi progesteronun OT'nin endotel reseptörüne bağlanmasını inhibe etmesi ile açıklanabilir ancak östrojenin etkileri oldukça süprizdir ve bu konu daha fazla araştırmayı gerektirmektedir.

Çalışmamızın ikinci kısmında endotel hücre kültürlerinde, östrojenin ve progesteronun OTR sentezi ve miktarı üzerindeki etkisi Western Blot yöntemi ile araştırılmıştır. Deneylerimiz hem OT'nin hem de gonad steroid hormonlarının oksitosin reseptör sayısını artırdığı göstermiştir.

Gonadal steroidlerin uterine OTR reseptörlerinin sayısının ve aktivitesinin regülasyonunda önemli rol oynadığı bilinmektedir (158,159) Östrojenlerle progesteronun birbirine zıt etki yarattığı da kabul edilmektedir. Östrojenlerin gebelik boyunca uterusda OT reseptör sayısında artışa neden olurken progesteronun hem genomik hemde non-genomik yollar ile OTR sentezini ve ligandını bağlamasını engellediği birçok araştırma ile gösterilmiştir (153). Ancak Progesteronun OTR fonksiyonu ve ekspresyonu üzerindeki etkileri pek net değildir ve halen tartışmalıdır. (108,130).

Farelerde damar sisteminde ise östrojenik regülasyona hassas bir oksitosin sisteminin varlığı gösterilmiştir. Jankowski ve arkadaşları dietilstilbestrol uygulamasının olgunlaşmamış farelerde vena cava gibi bazı damarlarda OTR mRNA'sında artışa neden olurken aortada etkisiz olduğunu göstermişlerdir (123). Östrojen agonisti Genistein verilen overioktemize sıçanlarda aortada OT ve OTR sentezinin arttığı gösterilmiştir (160). Bizim deneylerimizde insan damar endotel hücrelerinde östrojen ve progesteron ile regüle edilebilen bir OTR sisteminin varlığını göstermektedir.

Progesteronun endotelde OTR miktarında artışa neden olması uterusda bilinen, daha çok azaltma yönünde olan etkileri ile çelişmektedir. Progesteronun vasküler OTR miktarına etkisi üzerinde başka araştırma yoktur. Bu konuda yorum yapabilmek için araştırmaların artırılması gerekmektedir.

Sonuç olarak araştırmamız, gonad steroidleri östradiol ve progesteronun OTR miktarında artışa neden olurken OT'nin NO salgılanması açısından etkilerini kontrol ettiğini, kısacası endotelde steroidler tarafından regüle edilen bir OT ve OTR sisteminin varlığını göstermektedir. Ancak oksitosinin endotelde OTR aracılı etkileri ve kardiyovasküler sistemdeki öneminin anlaşılması için daha çok araştırmaya gerek bulunmaktadır.

Çalışmamızın daha da aydınlatıcı olması için, yaptığımız endotel hücre kültüründe östrojenin OT düzeylerine etkisi bakılmalı idi. Hormon inkübasyonlarında ise farklı konsantrasyonlarda dozlar kullanılabilirdi.

8.KAYNAKLAR

1. Prof. Dr. Taner Onat, Prof. Dr. Kaya Emerk, Doç. Dr. Eser Sözmen. (Eds), (2002). İnsan Biyokimyası. s. 617-623. Palme Yayıncılık. Ankara.
2. Griffith, T.M., Anderson, A.H. (1984). Hughes, D., Lewis, M.J.: Isolated perfused coronary artery and aortic strip preparation: the role of endothelium-derived relaxant factor . J. Physiol., 35:13-24.
3. Martin , W., Furchgott, R.F., Villani, G.M. (1986). Jothianadan, D.: Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. J. Pharmacol . Exp. Ther., 237: 529-538.
4. Hogan, J.C., Lewis, M.J., Henderson , A.H. (1988). In vivo EDRF activity influences trombosit function. Br. J. Pharmacol., 94,1020- 1022.
5. Radomski, M.W., Palmer , R.M., Moncada , S. (1987). Endogenous nitric oxide inhibits human trombosit adhesion to vascular endothelium. Lancet, 2: 1057-1058.
6. Bath, P.M., Hassal, D.G., Gladwin, A.M., Palmer , R.M., Martin, J.F. (1991). Nitric oxide and prostacyclin: divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium invitro. Arterioscler. Tromb., 11: 254-260.
7. Grag U.C., Hassid, A. (1989). Nitric oxide generating vazodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. J. Clin . Invest., 83: 1774- 1777.
8. Hans H. Zingg and Stephane A. Laporte. (2003). The oxytocin receptor. Trends in Endocrinology and Metabolism Vol.14 No.5.
9. J.Gutkowska. (2000). Oxytocin is a Cardiovascular Hormone. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 33: 625-633.
10. Bauer E.Sumpio, J.Timothy Risey, Alan Dardik. (2002). Cells in Focus: endothelial cell. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 34 1508–1512.

11. Vane JR, Anggard EE. (1990). Botting RM. Regulatory functions on the vascular endothelium. *N Eng J Med* 323:27-36.
12. Edip Torun, Fahri Bayram. (2002). Endokrin bir organ olarak endotel ve endotelinin hipertansyondaki rolü. *Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal)* 26 (3) 126-131.
13. Fajardo L.F. (1989). The complexity of endothelial cells. *Am. J. Clin. Path.* 92 241-250.
14. Loscalzo J. (1995). Nitric oxide and vascular disease. *N Eng J Med* 333:251-253.
15. Lüscher TF. (1995). Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Myocard Ishcemia* 7, (suppl:1): 515-520.
16. B.E. Sumpio (Ed.). (1993). *Hemodynamic Forces and Vascular Cell Biology*, RG Landes Publishers, Austin, TX.
17. Dominik Behrendt ,MD and Peter Ganz MD. (2002). Endothelial Function:From vascular Biology to Clinical Applications. *Am J Cardiol*; 90(suppl):40L–48L.
18. Tiziana Bachetti and Lucia Morbidelli. (2000). Endothelial Cells in Culture: A Model for studying vascular functions. *Pharmacological Research*, Vol. 42, No. 1.
19. K.K. Griedling, R.W. Alexander. (1998). Cellular biology of blood vessels, in: R.W. Alexander, R.C. Schlant, V. Fuster, et al. (Eds.), *Hurst's the Heart, Arteries and Veins*, 9th Edition, McGraw-Hill, New York, pp. 125–141
20. Özlem Saygılı, Fusün Gültekin. (1999). Hücre Adezyon Molekülleri. *T Klin Tıp Bilimleri*, 19:362-365.
21. Dzau, V.J., Gibbons, G.H., Cooke, J.P. (1993). Omoigui, N,: Vascular biology and medicine in the 1990s: scope, concepts, potentials and perspectives. *Circulation*. 87:705-719.
22. Panza, J.A., Quyyumi, A.A., Brush, J.E. Jr., Epstein, S.E. (1990). Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patient with essential hypertension. *N. Engl. J. Med.*, 1990, 323:22-27.
23. Panza, J.A., Casino, P.R., Kilcoyne, C.M., Quyyumi, A.A. (1993). Role of endothelium –derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent

vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation*, 87: 1468-1474.

24. Ludmer, P.L., Selwyn, A.P., Shook, T.L. (1986). Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N. Engl. J. Med.*, 315:1046-1051.
25. Zeiher, A.M., Drexler, H., Wollschlager, H., Just, H. (1991). Modulation of coronary vasomotor tone in humans: progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation*, 83:391-401.
26. Creager, M.A., Gallegher, S.J., Girerd, X.J., Coleman, S.M., Dzau, V.J., Cooke, J.P. (1992). L-arginin improves endothelium- dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J. Clin. Invest.* 90: 1248-1253.
27. Casino, P.R., Kilcoyne, C.M., Quyyumi, A.A., Hoeng J.M., Panza, J.A. (1993). Role of nitric oxide in the endothelium-dependent vasodilation of hypercholesterolemic patients. *Circulation*, 88: 2541-2547.
28. Calver A., Collier, J., Vallance , P. (1992). Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J.Clin. Invest.*, 90: 2548-2554.
29. Cannon RO. (1998). Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clinical Chemistry*; 44:8(B) 1809-19.
30. Gruetter CA, Barry BK, McNamara DB. (1979). Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosamine.; *J Cyclic Nucleotide Res*; 5: 211-224.
31. Palmer, R.M., Rees, D.D., Ashton, D.S., Moncada, S. (1988). L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation.. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153, 1251–1256.
32. G. C. Panzica, C. Viglietti -Panzica, M. Sica ,S. Gotti, M. Martini, H. Pinos, B. Carrillo and P. Collado. (2006). Effects of Gonadal Hormones on Central Nitric Oxide Producing System. *Neuroscience* 138 987–995.
33. Nathan C, Xie QW. (1994). Nitric oxide synthases. Roles, tolls and controls. *Cell*; 78: 915-918.

34. Asuman Kılınç- Kamer Kılınç: Nitrik Oksit Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik etkileri. 1.Basım. Palme Yayıncılık, Ankara, 2003.
35. Wendy K. ALDERTON, Chris E. COOPER. and Richard G. KNOWLES. (2001). Nitric oxide synthases : structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357, 593-615.
36. Moncada S. (1992). The L-arginine-nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand.* 145: 201-227.
37. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW (1993). Structure and chromosomal localization of human constitutive endothelial nitric oxide synthases gene. *J Biol Chem.* 15:268 (23): 17478-17488.
38. Albecht E, Stagemen C, Heeringa P, Henning RH, Van Goor H (2003). Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol.* 199: 8-17.
39. Ziegler T, Silacci P, Harrison VJ. (1998). Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces. *Hypertension* 32: 351-355.
40. Richard Bruckdorfer. (2005). The basics about nitric oxide. *Molecular Aspects of Medicine* 26 3–31.
41. Dusting GJ. (1996). Nitric oxide in coronary artery disease, roles in atherosclerosis, myocardial infarction and heart failure. *EXS* 76: 33-35
42. Dusting GJ. (1995). Nitric oxide in cardiovascular disorders. *J Vasc Res.* May-June: 32 (3): 141-143.
43. Barret-Connor E. (1997). Sex differences in coronary heart disease: why are women so superior? The 1995 Ancel Keys Lecture. *Circulation* 95:252-264.
44. Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. (1991). Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease: ten-year follow up from the Nurses' Health Study. *N Engl J Med*; 325:756-762.
45. Grandy D, Rubin SM, Petitti DB, et al. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med* 1992;117:1016-1037.
46. Mendelson ME, Karas RH. (1994). Estrogen and blood vessel wall. *Curr Opin Cardiol* 9:619-626.
47. Bush TL, Barret-Connor E, Cowan LD. (1987). Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women: results from the Lipid Research Clinics Program Follow-up Study. *Circulation* 75:1102-1109.

48. Walter P, Green S, Grene G. (1995). Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7889-7893.
49. Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5925-5930.
50. Shibata H, Spencer TE, Onate SA. (1997). Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Prog Horm Res* 52:141-165.
51. Evans RM. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895.
52. Brown M. (1994). Estrogen receptor molecular biology. *Hematol Oncol Clin North Am* 8:101-112.
53. Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW. (1996). The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J*;10:615-624.
54. Barton M, Liischer TF. (1999). Estrogen and vascular resistance. *Cum Opin. Endocrinol. Diab.* 6: 218-24.
55. Tan E, Gurjar MV, Sharma RV, Bhalla RC. (1999). Estrogen receptor- α gene transfer into bovine aortic endothelial cells induces eNOS gene expression and inhibits cell migration. *Cardiovasc. Res.* 43: 788-97.
56. Kleinert H, Wallerath T, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Li H, Föhrstermann U. (1998). Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene. Analysis of the transcription factors involved. *Hypertension* 31: 582-8.
57. Koji Hisamoto, Jeffrey R. Bender. (2005). Vascular cell signaling by membrane estrogen receptors. *Steroids* 70 382–387.
58. Michel Y. Farhat, Mark C. Lavigne, Peter W. Ramwell. (2007). The vascular protective effects of estrogen. Georgetown University Medical Center, Washington D.C. USA.
59. Linda Björnström and Maria Sjöberg. (2005). Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Non-Genomic Actions on Target Genes.. *Molecular Endocrinology*. First published February 3, 10.1210/me.2004-0486.

60. Losel R, Wehling M .(2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:46-56.
61. Tommaso Simoncini, Paolo Mannella, Letizia Fornari, Antonella Caruso, Gaetano Varone, Andrea Riccardo Genazzani. (2004). Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids* 69 537–542.
62. Mendelsohn ME, Karas RH. (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 340:1801–1811.
63. Mendelsohn ME. (2000). Mechanisms of estrogen action in the cardiovascular system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74:337–343.
64. Improta-Brears T, Whorton AR, Codazzi F, York JD, Meyer T, McDonnell DP (1999). Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4686-4691.
65. Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. (1994). Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8517-8521.
66. Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER. (1999). Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 13:307-319.
67. Chen Z, Yuhanna IS Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. (1999). Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 103:401-406.
68. Endoh H, Sasaki H, Maruyama K, Takeyama K, Waga I, Shimizu T, Kato S, Kawashima H. (1997). Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 235:99-102.
69. Jessop HL, Sjoberg M, Cheng MZ, Zaman G, Wheeler-Jones CP, Lanyon LE. (2001). Mechanical strain and estrogen activate estrogen receptor alpha in bone cells. *J Bone Miner Res* 16:1045-1055.
70. Watters JJ, Campbell JS, Cunningham MJ, Krebs EG, Dorsa DM. (1997). Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* 138:4030-4033.

71. Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M, Fiorentino R, Varricchio L, Barone MV, Auricchio F. (2001). PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J* 20:6050-6059.
72. Marino M, Acconcia F, Bresciani F, Weisz A, Trentalance A. (2002). Distinct nongenomic signal transduction pathways controlled by 17beta-estradiol regulate DNA synthesis and cyclin D(1) gene transcription in HepG2 cells. *Mol Biol Cell* 13:3720-3729.
73. Iafrati MD, Karas RH, Aronovitz M, Kim S, Sullivan TR Jr, Lubahn DB, O'Donnell TF Jr, Korach KS, Mendelsohn ME. (1997). Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor -deficient mice. *Nat Med* 3:545–548.
74. Karas RH, Hodgin JB, Kwoun M, Kregge JH, Aronovitz M, Mackey W. Gustafsson JA, Korach KS, Smithies O, Mendelsohn ME. (1999). Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor -deficient female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:15133–15136.
75. Conrad, K. P., Joffe, C. M., Kruszyna, H., Kruszyna, R., Rochelle, L. C., Smith, K. P., Chavez, J. E., and Mosher, M. D. (1993). Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *FASEBJ.* 7, 566-571.
76. Chang, W. C., Nakao, J., Orimo, H., and Murota, S. I. (1980). Stimulation of prostaglandin cyclooxygenase and prostacyclin synthetase activities by estradiol in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Acta* 620, 472-482.
77. Cembrano, I., Lillo, M., Val, J., and Mardones, I. (1960). Influence of sex difference and hormones on elastin and collagen in aortas of chicken. *Circ. Res.* 8, 527-533.
78. Wolinsky, H. (1972). Effects of estrogen and progesterone treatment on the response of the aorta of male rats to hypertension. *Circ. Res.* 30, 341-349.
79. The Writing Group for the PEPI Trial. (1995). Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. *JAMA* 273:199–208.

80. Lobo RA, Bush T, Carr BR, Pickar JH. (2001). Effects of lower doses of conjugated equine estrogens and medroxyprogesterone acetate on plasma lipids and lipoproteins, coagulation factors, and carbohydrate metabolism. *Fertil Steril* 76:13–24.
81. Westerveld HE, Erkelens DW. (1998). Estrogens and lipid metabolism. *Curr. Opin. Endocrin. Diab.* 5: 261-7.
82. Michael E. Mendelsohn. (2002). Protective Effects of Estrogen on the Cardiovascular System. *Am J Cardiol* 89(suppl):12E–18E.
83. Vila-Petroff MG, Lakatta EG, Sollott SJ. (1998). Nitric oxide: A. multifaceted modulator of cardiac contractility. *Asia Pacific Heart J* 7: 3842.
84. Gallagher PE, Li I, Lenhart JR, Chappell MC, Brosnihan KB. (1999). Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension* 33: 3238.
85. Mikkola T, Ranta V, Orpana A, Ylikorkala O, Viinikka L. (1996). Effect of physiological concentrations of estradiol on PGI₂ and NO in endothelial cells. *Maturitas* 25: 141-7.
86. Bilsel AS, Moini H, Tetik E, Aksungar F, Kaynak B, Ozer A. (1996). 17 β -Estradiol modulates endothelin-1 expression and release in human endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 46: 579-84.
87. Richard E. White. (2002). Estrogen and vascular function. *Vascular Pharmacology* 38 73– 80.
88. Van Buren, G.A., Yang, D.S., Clark, K.E. (1992). Estrogen-induced uterine vasodilatation is antagonized by L-nitroarginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 167, 828– 833.
89. Rosenfeld, C.R., Cox, B.E., Roy, T., Magness, R.R. (1996). Nitric oxide contributes to estrogen-induced vasodilation of the ovine uterine circulation. *J. Clin. Invest.* 98, 2158– 2166.
90. Node, K., Kitakaze, M., Kosaka, H., Minamino, T., Funaya, H., Hori, M. (1997). Amelioration of ischemia- and reperfusion-induced myocardial injury by 17 beta-estradiol: role of nitric oxide and calcium-activated potassium channels. *Circulation* 96, 1953– 1963.

91. Geary, G.G., Krause, D.N., Duckles, S.P. (2000). Estrogen reduces mouse artery tone through endothelial NOS- and cyclooxygenase-dependent mechanisms. *Am. J. Physiol.: Heart Circ. Physiol.* 279, H511– H519.
92. Hayashi, T., Fukuto, J.M., Ignarro, L.J., Chaudhuri, G. (1992). Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 11259– 1126.
93. Kharitonov, S.A., Logan-Sinclair, R.B., Busset, C.M., Shinebourne, E.A. (1994). Peak expiratory nitric oxide differences in men and women: relation to the menstrual cycle. *Br. Heart J.* 72, 243–245.
94. Lantin-Hermoso, R.L., Rosenfeld, C.R., Yuhanna, I.S., German, Z., Chen, Z., Shaul, P.W. (1997). Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am. J. Physiol.* 273, L119– L126.
95. Hishikawa, K., Nakaki, T., Marumo, T., Suzuki, H., Kato, R., Saruta, T. (1995). Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS Lett.* 360, 291– 293.
96. Salhab W.A., Shaul P.W., Cox B.E., Rosenfeld C.R. (2000). Regulation of types I and III NOS in ovine uterine arteries by daily and acute estrogen exposure. *Am. J. Physiol.: Heart Circ. Physiol.* 278, H2134– H2142.
97. Dean P. Edwards. Regulation of Signal Transduction Pathways by Estrogen and Progesterone. *Annu. Rev. Physiol.* 2005.67:335-76.
98. Mendelsohn ME. (2002). Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature. *Am.J.Cardiol.* 90:F3-6.
99. Caulin-Glaser T, Garcí'a-Cardeña G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR. (1997). 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca^{2+} - mobilization. *Circ Res* 81:885–892.
100. Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, Sessa WC, Bender JR. (2000) Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res* 87:677–682.

101. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. (2000). Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol- 3-OH kinase. *Nature* 407:538–541.
102. Dean P. Edwards. (2005). Regulation of Signal Transduction Pathways by Estrogen and Progesterone. *Annu. Rev. Physiol.* 67:335-76.
103. Tommaso Simoncini, Paolo Mannella, Letizia Fornari, Antonella Caruso, Gaetano Varone, Andrea Riccardo Genazzani. (2004). Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids* 69 537–542.
104. Mendelsohn ME. (2000). Nongenomic, ER-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase: how does it work? What does it mean? *Circ Res* 87:956-960.
105. Hans H. Zingg and Stephane A. Laporte. (2003). The oxytocin receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism* Vol.14 No.5 .
106. Brownstein MJ, Russel JT, Gainer H. (1980). Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science* 207: 373–378.
107. Hossein Pournajafi-Nazarloo , Adam Perry, Leila Partoo, Eros Papademetriou, Fereidoun Azizi, C. Sue Carter, Bruce S. Cushing. (2007). Neonatal oxytocin treatment modulates oxytocin receptor, atrial natriuretic peptide, nitric oxide synthase and estrogen receptor mRNAs expression in rat heart. *peptides* 28 , 1170 – 1177.
108. Gimpl, G. and Fahrenholz, F. (2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 81, 629–683.
109. Soloff MS, Alexandrova M, Fernstrom MJ. (1979). Oxytocin receptors: Triggers for parturition and lactation? *Science* 204: 1313–1315.
110. Russell JA, Leng G. (1998). Sex, parturition and motherhood without oxytocin? *J Endocrinol* 157:343–359.
111. Gutkowska J, Jankowski M, Lambert C, Mukaddam-Daher S, Zingg HH, McCann SM. (1997). Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11704–11709.
112. Gutkowska J, Jankowski M, Mukaddam-Daher S, McCann SM. (1997). Oxytocin is a cardiovascular hormone. *Braz J Med Biol Res* 33:625–633.
113. Conrad KP, Gellai M, North WG, Valtin H. (1986). Influence of oxytocin

- on renal hemodynamics and electrolyte and water excretion. *Am J Physiol* 251:F290–F296.
114. Argiolas A. (1999). Neuropeptides and sexual behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* 23:1127–1142.
 115. Pedersen CA, Ascher JA, Monroe YL, Prange AJ. (1982). Oxytocin induces maternal behavior in virgin female rats. *Science* 216:648–650.
 116. Thibonnier M, Conarty DM, Preston JA, Plesnicher CL, Dweik RA, Erzurum SC. (1999). Human vascular endothelial cells express oxytocin receptors. *Endocrinology* 140:1301–9.
 117. Marria Petterson. (2002). Cardiovascular effects of oxytocin. *Progress in Brain Research*. Vol 139.
 118. Hideki Shojo and Yuji Kaneko. (2002). Characterization and Expression of Oxytocin and the Oxytocin Receptor. *Molecular Genetics and Metabolism* 71, 552–558.
 119. Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ, Okayama H. (1992). Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* 356:526–529.
 120. Lefebvre DL, Giaid A, Bennett H, Larivie´re R, Zingg HH. (1992). Oxytocin gene expression in rat uterus. *Science* 256:1553– 1555.
 121. Lefebvre DL, Lariviere R, Zingg HH. (1993). Rat amnion: A novel site of oxytocin production. *Biol Reprod* 48:632–639.
 122. Gutkowska J, Jankowski M, Lambert C, Mukaddam-Daher S, Zingg HH, McCann SM. (1997). Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11704–11709.
 123. Jankowski M, Wang D, Hajjar F, Mukaddam-Daher S, Mc- Cann SM, Gutkowska J. (2000). Oxytocin and its receptors are synthesized in the rat vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6207–6211.
 124. Jeng YJ, Lolait SJ, Strakova Z, Chen C, Copland JA, Mellman D, Hellmich MR, Soloff MS. (1996). Molecular cloning and functional characterization of the oxytocin receptor from a rat pancreatic cell line (RINm5F). *Neuropeptides* 30:557– 565.
 125. Sausville E, Carney D, Battey J. (1985). The human vasopressin gene is linked to the oxytocin gene and is selectively expressed in a cultured lung

cancer cell line. *J Biol Chem* 260:10236–10241.

126. Inoue T, Kimura T, Azuma C, Inazawa J, Takemura M, Kikuchi T, Kubota Y, Ogita K, Saji F. (1994). Structural organization of the human oxytocin receptor gene. *J Biol Chem.* 269:32451–32456.
127. Breton C., Scala-Guenot D Di., Zingg H.H .(2001). Oxytocin receptor gene expression in rat mammary gland: structural characterization and regulation. *J. Mol. Endocrinol.* 27, 175–189.
128. Cicutti NJ, Smyth CE, Rosaeg OP, Wilkinson M. (1999). Oxytocin receptor binding in rat and human heart. *Can J Cardiol* 15:1267–1273.
129. Engstrom T, Bratholm P, Christensen NJ, Vilhardt H. (1999). Upregulation of oxytocin receptors in non-pregnant rat myometrium by isoproterenol: Effects of steroids. *J Endocrinol* 161:403–411.
130. Zhang J, Weston PG, Hixon JE. (1992). Role of progesterone and estradiol in the regulation of uterine oxytocin receptor in ewes. *J Reprod Fertil* 94:395–404.
131. Sanborn, B.M., Dodge K, Monga M, Qian A, Wang W, Yue C. (1998). Molecular mechanisms regulating the effects of oxytocin on myometrial intracellular calcium. *Adv. Exp.Med. Biol.* 449, 277–286.
132. CY Ku, A Qian, Y Wen, K Anwer and BM Sanborn .(1995). Oxytocin stimulates myometrial guanosine triphosphatase and phospholipase-C activities via coupling to Ga q/11. *Endocrinology* 136, 1509–1515.
133. Dodge, K.L. and Sanborn, B.M. (1998). Evidence for inhibition by protein kinase A of receptor/G a(q)/phospholipase C (PLC) coupling by a mechanism not involving PLCb2. *Endocrinology* 139, 2265–2271.
134. Ku C-Y, Qian A, Wen Y, Anwer K, Sanborn BM. (1995). Oxytocin stimulates myometrial guanosine triphosphatase and phospholipase- C activities via coupling to Gaq/11. *Endocrinology* 136: 1509–1515.
135. Yazawa H, Hirasawa A, Horie K, Saita Y, Iida E, Handa K, Tsujimoto G. (1996). Oxytocin receptors expressed and coupled to Ca signalling in a human vascular smooth muscle cell line. *Br J Pharmacol* 117:799–804.
136. McKillen K, Thornton S, Taylor CW. (1999). Oxytocin increases the Ca sensitivity of human myometrium during the falling phase of phasic

contractions. *Am J Physiol* 276:E345–E351.

137. Ohmichi M, Koike K, Nohara A, Kanda Y, Sakamoto Y, Zhang ZX, Hirota K, Miyake A. (1995). Oxytocin stimulates mitogen- activated protein kinase activity in cultured human puerperal uterine myometrial cells. *Endocrinology* 136:2082–2087.
138. Guinn DA, Goepfert AR, Christine M, Owen J, Hauth JC. (2000). Extra-amniotic saline, laminaria, or prostaglandin E(2) gel for labor induction with unfavorable cervix: A randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 96:106–114.
139. T. J. Soares, T. M. Coimbra, A. R. Martins, A. G. F. Pereira, E. C. Carnio L. G. S. Branco W. I. C. Albuquerque-Araujo, G. de Nucci A. L. V. Favaretto, J. Gutkowska[¶], S. M. McCann, and J. Antunes-Rodrigues. (1999). Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*96,278–283.
140. Burnette WN. (1981). Western Blotting; Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radioiodinated Protein A. *Analytical Bioch* 112:195-203.
141. Harlow E. Lane D. (1988). Antibodies. Cold Spring Harbor Laboratory Press Newyork 471-504.
142. Harlow E. Lane D. (1988). Antibodies. Cold Spring Harbor Laboratory Press Newyork 635-56.
143. Harper DR, Coles BF. (1996). Western (immuno) blotting and radioimmunoprecipitation. In: Mahy BWJ, Kangro HO. (eds). *Virology Methods Manual*. Academic Press, San Diego 261-6
144. Biji T. Kurien, R. Hal Scofield. (2005). Western blotting. *Methods* 38 (2006) 283–293.
145. Rybicki, E.P. and M.B. von Wechmar. (1982). Enzyme-assisted immune detection of plant virus proteins electroblotted onto nitrocellulose paper. *Journal of Virological Methods* 5:267-278.
146. Lindsay Brown, Ian Hoong, and Sheila A. Doggrell. The Heart as a Target for estrogens. Department of Physiology and Pharmacology, The University of Queensland, Australia.

147. Philip W. Shaul. (1999). Rapid activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *Steroids* 64 28–34.
148. C.Tissa Kappagoda. (2000). Endothelial nitric oxide synthase and estrogen. *Cardiovascular Research* 47 9–10.
149. Juana Selles, Nélide Polini, Cristina Alvarez, Virginia Massheimer. (2001). Progesterone and 17b-estradiol acutely stimulate nitric oxide synthase activity in rat aorta and inhibit platelet aggregation. *Life Sciences* 69 815–827.
150. Hoi Yun Chan, Xiaoqiang Yao, Suk Ying Tsang, Franky Leung Chan, Chi Wai Lau, Yu Huang. (2001). Different role of endothelium/nitric oxide in 17b –estradiol- and progesterone-induced relaxation in rat arteries. *Life Sciences* 69 1609–1617.
151. Juana Selles, Nélide Polini, Cristina Alvarez, Virginia Massheimer. (2002). Nongenomic action of progesterone in rat aorta: Role of nitric oxide and prostaglandins. *Cellular Signalling* 14 431– 436.
152. Katalin Kauser, Gabor M. Rubanyi. (1995). Gender Difference in Endothelial Dysfunction in the Aorta of Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*. 25:517-523.
153. R. Nissenson, G. Flouret and O.Hechter. (1978). Opposing effects of estradiol and progesterone on oxytocin receptors in rabbit uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 75, No. 4, pp. 2044-2048.
154. Alan K. Goff, Ahmad A. Jamshidi, Aime Kombe. (2 0 0 6). Inhibition of prostaglandin F₂-synthesis and oxytocin receptor by progesterone antagonists in bovine endometrial cells in vitro. *Steroids* 7 1 785–791.
155. Solaria A, Nappi RE, Pantillo M, Daveris R, Smeraldi A, Fabbri F, Zanni G, Rigalti P, Montorsi F. (2005). Menstruel cycle related changes in plasma oxytocin are relevant to normal sexual function. *Hormones and Behavior* 47 164-69.
156. Cassoni P, Catalano MG, Sapino A, Marrocco T, Fazzari A, Bussolati G. (2002). Oxytocin modulates estrogen receptor alpha expression and function in MCF7 human breast cancer cells. *Int J Oncol*. 21:375–8.

157. Grazzini E, Guillon G, Mouillac B and Zingg HH. (1998). Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature* 392: 509-512.
158. Richard Ivell , Norbert Walther. (1999). The role of sex steroids in the oxytocin hormone system. *Molecular and Cellular Endocrinology* 151 95–101.
159. Michael Schumacher, Hector Coirini, Allan E. Johnson, Loretta M. Flanagan, Maya Frankfurt, Donald W. Pfaff and Bruce S. McEwen. (1993). The oxytocin receptor: a target for steroid hormones. *Regulatory Peptides*, 45 115-119.
160. Donghao Wang , Jolanta Gutkowska , Mieczyslaw Marcinkiewicz , Grazyna Rachelska, Marek Jankowski. (2003). Genistein supplementation stimulates the oxytocin system in the aorta of ovariectomized rats. *Cardiovascular Research* 57;186- 19.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hümeýra Turan
Doğum Tarihi : 24.04.1982
Doğum Yeri : İstanbul
e-mail Adresi : humeýra_turan@yahoo.com
Adresi : Kiptaş Konutları H:78 D:5 Dolayoba/Pendik

EĞİTİM DURUMU

Lise : Kadir Has Süper Lisesi (1996-2000)
Lisan Eğitimi : A.İ.B.Ü Fen Edebiyat Fakóltesi Kimya Bölümü (2000-2004)
Yüksek Lisans : Marmara Üniversitesi, Tıp Fakóltesi, Biyokimya ABD (2005-2008)

AKTİVİTELER

- Türkiye Biyokimya Derneđi HPLC ve Uygulama Alanları Workshop Haziran 2007

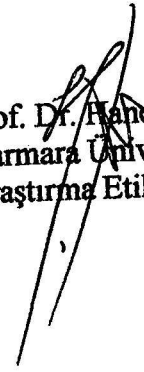
MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ARAŞTIRMA ETİK KURULU

Sayı : B.30.2.MAR.0.01.00.02/AEK-929
Konu:

02.03.2007

Sayın : Prof.Dr. Ayşe Serpil BİLSEL

MAR-YÇ-2007-0036 protokol nolu “Endotel hücrelerde oksitosinin nitrik oksit sentezi üzerindeki etkilerinin mekanizması ve östrojenin oksitosinin etkilerinin düzenlenmesindeki rolünün incelenmesi “ isimli projeniz Fakültemiz Araştırma Etik Kurulu tarafından incelenerek onaylanmıştır.


Prof. Dr. Haner DİRESKENELİ
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Araştırma Etik Kurul Başkanı



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TUTANAK

Enstitümüz Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Hümeysra TURAN ' ın ,
28.02.2008 tarihinde saat 12.00'da yapılan tez savunma sınavı 60... dakika sürmüş adı geçen
adayın tezinin Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği Hükümlerine göre **KABUL/ RED-1**
DÜZELTME olduğuna **oybirliği/oyçokluğu** ile karar verilmiştir.

Danışman

Prof. Dr. Serpil BİLSEL

Üye

Prof. Dr. Kaya EMERK

Üye

Prof. Dr. Ayşe ÖZER

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Yavuz TAGA



Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

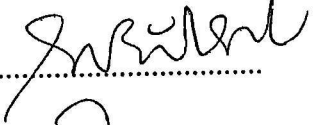
Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı** çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 28 / 02 / 2008

İMZA

Tez Danışmanı
Üniversitesi

Prof. Dr. Serpil BİLSEL
: Marmara



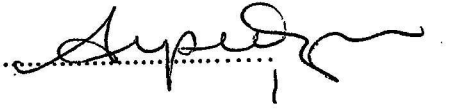
Üye
Üniversitesi

: Prof. Dr. Kaya EMERK
: Marmara



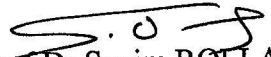
Üye
Üniversitesi

: Prof. Dr. Ayşe ÖZER
: M.Ü. Tıbbi Biyoloji A.Dalı



ONAY

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 06 / 03 / 2008 tarih ve 01. sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Sevim ROLLAS
Müdür