

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

**SEREBRAL İSKEMİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA EGF, TNF- α
DÜZEYLERİNİN VE TİYOREDOKSİN SİSTEMİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Melike EROL DEMİRBİLEK

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nedret KILIÇ

ANKARA
Eylül 2007

İÇİNDEKİLER

Kabul ve onay	i
İçindekiler	ii
Şekiller, Tablo ve Grafik Listeleri	iv
Kısaltmalar	v
Önsöz	vi
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Serbest Radikaller ve ROS	2
2.1.1. Süperoksit ($O_2^{\cdot}$)	3
2.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	4
2.1.3. Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$)	4
2.1.4. Nitrik Oksit ($NO^{\cdot}$)	5
2.1.5. ROS'ların Fizyolojik Fonksiyonları	6
2.1.6. ROS'un Neden Olduğu Oksidatif Hasar	6
2.2. Tioredoksin Sisteme İlave Olarak Hücreyel	
Antioksidan Enzimler	7
2.2.1 Süperoksit Dismutaz (SOD)	7
2.2.2. Süperoksit Redüktaz (SOR)	7
2.2.3. Katalaz	8
2.2.4. Peroksiredoksinler (Prx)	8
2.2.5 Glutayon peroksidazlar (GPx)	9
2.2.6. Glutayon ile İlgili Diğer Sistemler	10
2.2.7. Düşük Molekül Ağırlıklı Antioksidan Bileşikleri	10
2.3. Tioredoksin Sistem	10
2.3.1. Tioredoksin Redüktaz ve Yapısı	12
2.3.2. Tioredoksin Redüktazın Katalitik Mekanizması ve	
Substrat Spesifitesi	14
2.3.3. Tioredoksin	19
2.3.4. Tioredoksin Sistemin Fonksiyonları	20
2.3.4.1. Tioredoksin Sistem, İmmün Sistem ve Hücre Büyümesi	21
2.3.4.2. Oksidan Strese Karşı Koruma	22
2.3.4.3. Redoks Regülasyonu	24
2.3.4.4. Oksidatif Stres ve Apoptozis	25
2.3.4.5. Apoptozis sinyal-regüle edici kinaz 1 (ASK1)	27
2.3.4.6. Deoksiribonükleotidlerin Sentezi	28
2.3.5. Medikal Yönden Tioredoksin Sistem	29
2.3.6. Sinir Sistemi ve Tioredoksin Sistem	31
2.3.6.1. Merkezi Sinir Sistemi (SSS)'de Trx İndüksiyonu	32
2.3.6.2. Trx1 ve TrxR'nin Sekresyonu	32
2.3.6.3. Transgenik Trx1 Ekspresyonunun Nöron Koruyucu Etkileri	33
2.3.6.4. Nörotrofik Kofaktör Olarak Trx1	33
2.3.6.5. Selenyum, TrxR'ler ve Beyin Fonksiyonları	34

2.3.6.6. Alzheimer Hastalığında (AD) TrxR ve Trx	34
2.3.6.7. Prx'lerin Nöron Koruyucu Fonksiyonu	35
2.4. Epidermal Growth Faktör (EGF) ve Etkileri	35
2.5. Tümör Nekroz Faktör (TNF- α) ve Etkileri	37
2.6. Beyin İskemisi	39
2.6.1. İskemide Serbest Radikaller	42
3. MATERYAL – YÖNTEM	43
3.1. Deney Grupları	43
3.2. Kullanılan Aletler	44
3.3. Yöntemlerin Uygulanması	44
3.3.1. Beyin Dokusu Tiyoredoksin Redüktaz Aktivitesi Ölçümü	44
3.3.2. Lowry Doku Protein Tayini	46
3.3.3. ELISA Yöntemi ile Dokuda EGF ve TNF- α Tayini	47
3.3.3.1 Dokuda EGF Tayini	47
3.3.3.2 Dokuda TNF- α Tayini	47
3.4. İstatistiksel Analiz	48
4. BULGULAR	49
4.1. Beyin Dokusu Tiyoredoksin Redüktaz Aktivitesi	49
4.2. Beyin Dokusu EGF Düzeyleri	51
4.3. Beyin Dokusu TNF- α Düzeyleri	53
4.4. Spearman Korelasyon Analizi	54
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ	63
7. ÖZET	64
8. SUMMARY	65
9. KAYNAKLAR	66
10. ÖZGEÇMİŞ	87

Şekil Listesi

Şekil 1: Hücrede oksidatif ve antioksidatif sistemlerin basit bir şeması	4
Şekil 2: Glutatyonla ilişkili olan önemli antioksidan sistemleri	10
Şekil 3: Tioredoksin sistem	11
Şekil 4: Küçük ve büyük TrxR'lerin bölge organizasyonunun karşılaştırılması	12
Şekil 5: <i>E.coli</i> TrxR'sinin katalitik mekanizması	15
Şekil 6: İnsan ve diğer büyük TrxR'lerin katalitik mekanizmaları	18
Şekil 7: Okside hTrx-1'in yapısı	20
Şekil 8: Memeli tioredoksin sisteminin fizyolojik fonksiyonlarının özeti	21
Şekil 9: Oksidatif stres, ER stresi ve mitokondrial apoptozis arasındaki ilişki	27
Şekil 10: Apoptozisin regülasyonunda Trx sisteminin ve ilgili moleküllerin rolü	28
Şekil 11: Metilselenol siklusu	30

Tablo Listesi

Tablo 1: Başlıca ROS'lar ve metabolizmaları	3
Tablo 2: Disülfid redüktazlar arasındaki sekans benzerlikleri	13
Tablo 3: Küçük ve büyük TrxR'lerin özellikleri	14
Tablo 4: Deney Grupları	44
Tablo 5: Gruplara ait doku TrxR aktivitesi (Ü/ mg protein), EGF (pg/ml) ve TNF- α (pg/ml) düzeylerinin istatistiksel sonuçları	49
Tablo 6: Tüm gruplara ait tioredoksin redüktaz aktivitesinin istatistiksel sonuçları	51
Tablo 7: Tüm gruplara ait EGF düzeylerinin istatistiksel sonuçları	52
Tablo 8: Tüm gruplara ait TNF- α düzeylerinin istatistiksel sonuçları	54
Tablo 9: Spearman korelasyon analizi sonuçları	55

Grafik Listesi

Grafik 1: Sol beyin tioredoksin redüktaz aktiviteleri (Ü/mg protein) ortalama değer olarak verilmiştir	50
Grafik 2: Sol beyin EGF düzeyleri (pg/ml) ortalama değer olarak verilmiştir	52
Grafik 3: Sol beyin TNF- α düzeyleri (pg/ml) ortalama değer olarak verilmiştir	53
Grafik 4: İskemik bölgede TNF- α ile EGF düzeyleri arasındaki Korelasyon	55

Kısaltmalar

Trx: tiyoredoksin
TrxR: tiyoredoksin redüktaz
NADPH: nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
ROS: reaktif oksijen türleri
EGF: epidermal büyüme faktörü
TNF- α : tümör nekroz faktör- α
RNS: reaktif nitrojen türleri
SOD: süperoksit dismutaz
GPx: glutatyon peroksidaz
Prx: peroksiredoksin, tiyoredoksin peroksidaz
GSNO: s-nitrozo-glutatyon
NOS: nitrik oksit sentaz
NF- κ B: nükleer faktör- κ B
AP-1: aktivatör protein-1
Grx: glutaredoksin
GSH: glutatyon (redükte)
GSSG: okside glutatyon, glutatyon disülfid
GST: glutatyon s-transferaz
GR: glutatyon redüktaz
FAD: flavin adenin dinükleotid
DTNB: 5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit)
PDI: Protein disülfid izomeraz
ASK-1: apoptozis sinyal regüle edici kinaz-1
IL: interlökin
Ref-1: redoks faktör-1
TMX: Transmembran tiyoredoksin-bağımlı molekül
JNK: c-Jun N-terminal kinaz
MAPK: mitojenle aktive olmuş protein (MAP) kinaz
EBV: Epstein-Barr virüsü
HTLV-1: insan T-lenfotropik virüs tip 1
CNS: merkezi sinir sistemi
NGF: sinir büyüme faktörü
PC12: feokromositoma hücreleri
bFGF: bazik fibroblast büyüme faktörü
TRAF2: TNF reseptör ilişkili faktör
CSF: serebrospinal sıvı
BBB: kan beyin bariyeri
MCAO: orta serebral arter oklüzyon

ÖNSÖZ

Bu tezin konusu, 2004 yılında Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nedret Kılıç tarafından belirlenmiştir. Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 11/2004-7 proje numarası ile desteklenmiştir

Uzun doktora eğitimim süresince, bilgi ve deneyimleriyle desteğini her zaman yanımda hissettiğim, tez çalışmalarım boyunca tecrübesi ile daima örnek aldığım, tezimin hazırlanmasında emeği geçen çok değerli hocam Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nedret Kılıç'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hatice Paşaoğlu başta olmak üzere değerli öğretim üyelerine ve tez izleme jürimde bulunan sayın Prof. Dr. Nurten Türközkan ve Sayın Prof. Dr. Aydan Babül'e değerli katkılarından dolayı teşekkür eder saygılarımı sunarım. Uzun yıllar boyunca bilgi ve tecrübesi ile desteğini hissettiğim, titizliğini her zaman örnek aldığım Bayındır Hastanesi Laboratuvar Bölüm Başkanı Dr. Necati Bingöl'e katkılarından dolayı saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Deney hayvanlarının sağlanmasındaki katkı ve emekleri için GATA öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Serdar Kahraman'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Lisans ve lisan üstü eğitimlerimde her zaman beraber olduğum, desteğini hep hissettiğim, ELISA çalışmalarımda yardımcı olan canım arkadaşım Uzm. Biyolog Dr. Ebru Ofluoğlu'na, istatistik analizlerinde emeği geçen Yrd. Doç. Dr. Cengizhan Açikel ve Uzm. Biyolog Dr. Adem Ünal'a, Doç. Dr. Şeref Kömürcü'ye ve doktora eğitimim boyunca beraber çalıştığım Uzm. Dr. H. Ferhan Kömürcü'ye yaptıkları katkılardan dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Canım dostlarım Nilgün, Gülderen, Zeynep, Seda, Fikret ve Yaşar'a her zaman yanımda olup beni her konuda destekledikleri için sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Daima yanımda olup bana her konuda yardımcı olan sevgili eşim Murat'a emekleri ve desteği için çok teşekkür ederim. Ayrıca beni bu yaşa getiren, maddi manevi desteklerini her an hissettiğim canım anneme, babama ve kardeşlerime sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Melike Erol Demirbilek
Ankara, 2007

1. GİRİŞ

Tiyoredoksin sistem iki antioksidan protein olan tiyoredoksin (Trx), tiyoredoksin redüktaz (TrxR) ve NADPH'den oluşur. TrxR, NADPH'yi kullanarak Trx yapısındaki aktif bölge disüflitlerinin redüksiyonunu katalizler. Birçok fonksiyonu yanında redükte Trx, genel protein disüflit indirgeyicisidir¹. TrxR hücre büyümesi ve oksidatif strese karşı koruma gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlar sahiptir, bu rollerinin çoğunu Trx'i redükleyerek yapar². Trx sistemin iskemik streste koruyucu etkisi vardır ve bu etkisi antioksidan ve antiapoptotik fonksiyonlarıyla ilgilidir^{3,4}.

Merkezi sinir sistemi vücutta, kısıtlı anaerobik metabolizması ve glikojen depoları nedeniyle iskekiye en duyarlı dokulardan biridir. İskemik bölgesinin çevresinde kollaterallerce sağlanan kalan kan akımının olması, nöronların kısa bir süre için olsa da morfolojik ve biyokimyasal bütünlüğünü korur. İskemi sonucunu belirleyen en önemli iki faktör iskeminin derinliği ve iskeminin süresidir. Sadece postiskemik reperfüzyonun değil aynı zamanda iskemik hasarın da oksidatif stres oluşturabileceği söylenmiştir⁵. Serbest radikallerin uzun süreli iskemide önemli olduğu düşünülür⁶.

Tiyoredoksin redüktaz bir selenoenzimdir. Beyin travmalarında ve beyin iskemisinde görülen beyin hasarında selenoproteinlerin varlığıyla, redoks durum dengede tutulmaya çalışılır. TrxR'nin ekspresyonunun artması nöroprotektiftir⁷. TrxR'nin inhibisyonu, oksidatif strese karşı antioksidan savunma sistemini zayıflatır ve mitokondrial kaynaklardan reaktif oksijen türleri (ROS) birikimi görülebilir⁸.

Çalışmamızda, sıçan beyinde iskemik hasarla oluşturulan oksidatif stres ile antioksidan ve nöroprotektif olan TrxR enzim düzeyi arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık. Aynı zamanda redoks sistemle ilişkili nöroprotektif ve nörotrofik bir faktör olan epidermal büyüme faktörü (EGF)'nin ve nörotoksik etkili tümör nekroz faktör- α (TNF- α)'nın iskemik hasarla ne şekilde etkilendiklerini ve beyin iskemisindeki düzeylerini araştırmayı amaçladık. Ayrıca aynı yönde çalışan Trx sistem ve EGF ile zıt yönde fonksiyon gösteren TNF- α düzeylerini karşılaştırarak incelemeyi amaçladık.

Serebral iskemi oluşturulan ve taklit operasyonu yapılan sıçanlarda iskemik bölgede ve periiskemik normal dokuda TrxR aktivitesini, EGF ve TNF- α düzeylerini araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller ve ROS

Serbest radikaller, orbitalinde bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron bulunduran atom veya atom gruplarıdır. Bu yapılarıyla kimyasal olarak reaktif moleküllerdir. Serbest radikaller; normal bir molekülün kovalent bağının homolitik bölünmesiyle, normal bir molekülden tek bir elektron kaybı veya molekülün heterolitik bölünmesiyle ve normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesiyle oluşur. Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (=ROS) ve reaktif nitrojen türleri (=RNS) konsantrasyonlarının, hassas redoks dengeyi bozacak şekilde artması sonucu meydana gelir⁹.

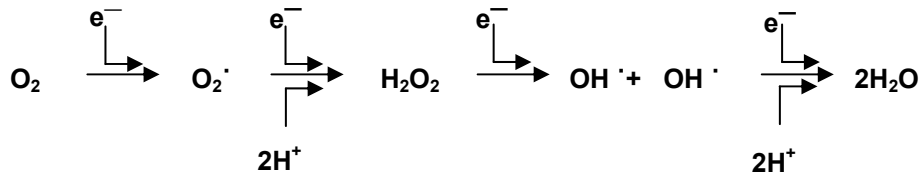
ROS'lar proteinler, lipoproteinler, lipitler ve DNA dahil çeşitli biyomoleküllerin bütünlüğünü tehdit eder¹. ROS'ların hücre içi sinyal sisteminde aracı olduğu bilinmektedir. Çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri, hormon ve nörotransmitterler, ROS'ları hücre içi sinyal iletiminde ikincil mesajcı olarak kullanırlar¹⁰. ROS'ların fazla üretimi oksidatif strese, hücrenin fonksiyon kaybına ve sonunda apoptozise veya nekroza neden olur¹. ROS'lar ya DNA'ya oksidatif hasar vermek suretiyle promotor bölgelere bağlanmayı azaltarak, ya transkripsiyon faktör aktivitesinin redoks regülasyonunu direk etkileyerek, ya da transkripsiyon faktör proteinlerinin redoks-nedenli modifikasyonu üzerinden DNA bağlanmalarını etkileyerek, transkripsiyon faktör değişim mekanizmalarını kontrol edebilir^{11,12}. Tablo 1'de en çok bilinen ROS'lar özetlenmiştir.

Serbest radikaller ve ROS, kolaylıkla serbest radikal oluşumu zincir reaksiyonunu başlatırlar. Bu reaksiyonu durdurmak için, yeni oluşmuş bir radikal, başka bir serbest radikalle veya bir serbest radikal temizleyicisi (zincir kırıcı veya antioksidan) ile reaksiyona girer, böylece eşleşmemiş elektronlar elimine edilmiş olur¹.

Tablo 1: Başlıca ROS'lar ve metabolizmaları¹

ROS Molekülü	Ana Kaynakları	Enzimatik Savunma Sistemleri	Ürünler
Süperoksit ($O_2^{\cdot -}$)	Elektron transport zincirinden elektron sızıntıları Aktive olmuş fagositler Ksantin oksidaz Flavoenzimler	Süperoksit dismutaz (SOD) Süperoksit redüktaz (bazı bakterilerde)	$H_2O_2 + O_2$ H_2O_2
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	SOD yoluyla $O_2^{\cdot -}$ den NADPH-oksidaz (nötrofiller) Glukoz oksidaz Ksantin oksidaz	Glutasyon peroksidaz (GPx) Katalaz Peroksiredoksinler (Prx)	$H_2O + GSSG$ $H_2O + O_2$ H_2O
Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$)	Geçiş metalleri aracılığıyla (Fe veya Cu) H_2O_2 ve $O_2^{\cdot -}$ den		
Nitrik oksit ($NO^{\cdot}$)	Nitrik oksit sentazlar	Glutasyon/tiyoredoksin redüktaz (TrxR)	S-nitrozo-glutasyon (GSNO)

Bir elektron transferiyle moleküler oksijenin adım adım redüksiyonu, oluşan ürünler ve ROS molekülleri arasındaki bağ şu şekilde gösterilebilir:

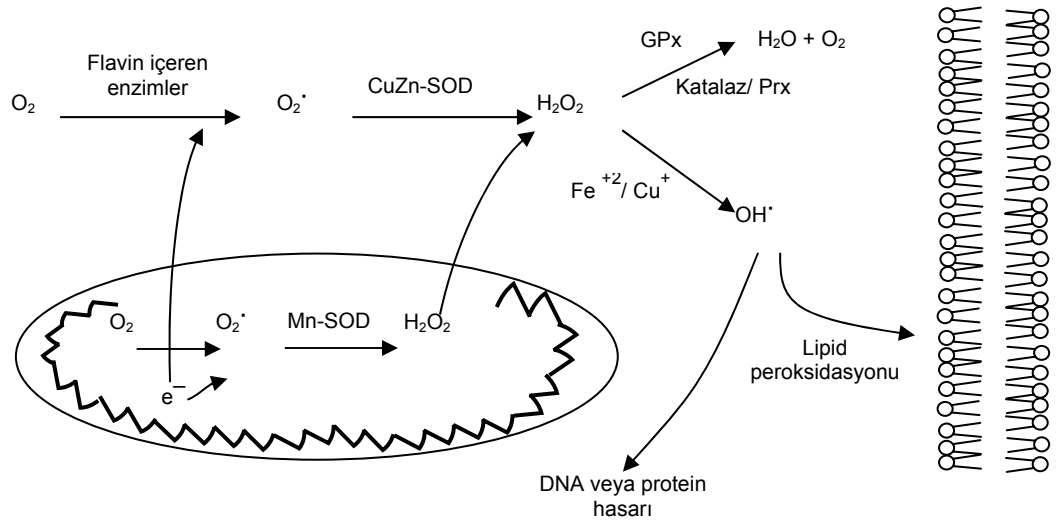


(Reaksiyon 1)

2.1.1. Süperoksit ($O_2^{\cdot -}$)

Süperoksit iyonları moleküler oksijene bir elektron ilavesiyle oluşur. Serbest radikal olmasına rağmen yüksek reaktivitesi yoktur. Lipit membrandan geçemezler, bu nedenle oluştukları kompartmanda kalırlar. Spontan olarak oluşan süperoksit özellikle mitokondri iç zarındaki solunum zincirinde, elektronlarca zengin aerobik bölgelerde meydana gelir (şekil 1).

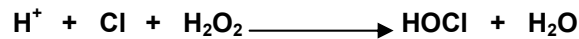
Süperoksit ve hidrojen peroksit, aynı zamanda endojen olarak flavoenzimler (örneğin iskemi-reperfüzyon ile aktive edilmiş ksantin oksidaz¹³) aracılığıyla da oluşabilir. Diğer süperoksit oluşturan enzimler lipoksijenaz ve siklooksijenazdır. Membran ilişkili bir enzim kompleksi olan fagositik hücrelerdeki NADPH bağımlı oksidaz da yüksek düzeyde $O_2^{\cdot -}$ oluşturur¹⁰. Süperoksit hızlıca hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşür. Bu reaksiyon SOD tarafından hızlandırılır.



Şekil 1: Hücrede oksidatif ve antioksidatif sistemlerin basit bir şeması. Süperoksit, mitokondride ve flavin içeren enzimler aracılığıyla sitozolde önemli miktarlarda üretilir. İki molekül süperoksit, kendiliğinden veya SOD ile, dioksijene ve hidrojen peroksit'e dönüşür. Hidrojen peroksit farklı enzim sistemleri tarafından enzimatik olarak dioksijene ve suya metabolize edilir veya oldukça reaktif olan hidroksil radikaline dönüştürülür. Bu kimyasal reaksiyon geçiş metalleri tarafından katalize edilir¹.

2.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

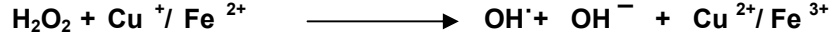
Hidrojen peroksit bir serbest radikal değildir fakat biyolojik membranları geçme özelliğinden dolayı çok önemlidir. Myeloperoksidaz etkisiyle hipoklorik asitin de ($HOCl$) dahil olduğu (reaksiyon 2) ROS moleküllerinin oluşum reaksiyonlarında bir aracı gibi rol oynar. En önemlisi geçiş metallerinin oksidasyonu ile $OH^{\cdot}$ radikalini oluşturur (reaksiyon 3). Hidrojen peroksit hücre içi sinyal molekülü olarak da çalışır¹⁴. H_2O_2 katalaz, peroksiredoksinler (Prx) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzim sistemleri tarafından uzaklaştırılır (şekil 1).



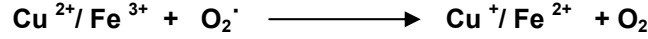
(Reaksiyon 2)

2.1.3. Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$)

Biyomoleküller ile güçlü reaktivitesinden dolayı $OH^{\cdot}$, biyolojik sistemlere diğer ROS'lardan daha fazla zarar verir. Farklı proteinlere ve moleküllere bağlanabilir. Metal iyonlarının (Fe^{2+} , Cu^{+}) katalizlediği bir reaksiyonla hidrojen peroksitten meydana gelir. Bu, Fenton reaksiyonu olarak bilinir:



(Reaksiyon 3)

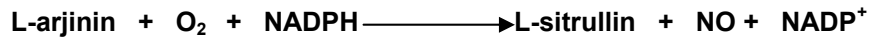


(Reaksiyon 4)

Reaksiyon 3 ve 4, Haber-Weiss reaksiyonları olarak özetlenir, hidroksil radikalının oluşumunda geçiş metalleri önemli rol oynar¹⁵. $\text{O}_2^\cdot$ ile reaksiyon sonucunda ferritin ve [4Fe-4S] merkezli proteinlerden geçiş metalleri salınabilir.

2.1.4. Nitrik Oksit ($\text{NO}^\cdot$)

Nitrik oksit serbest radikaller arasında gösterilir. Eşlenmemiş elektronlarına rağmen bir çok biyolojik molekül ile reaksiyon vermez. Diğer yandan serbest radikallerle, örneğin peroksil ve alkil radikallerle kolayca reaksiyon verir. Daha az reaktif moleküller olduklarından, serbest radikal temizleyicisi gibi davranırlar, örneğin NO 'nun hücre membranlarında lipit peroksidasyonunu engellediği gösterilmiştir¹⁶. $\text{O}_2^\cdot$ ve NO 'nun fazla üretimi sonunda, birbirleri ile reaksiyona girerler ve çok toksin olan peroksinitrit (ONOO^-) meydana gelir¹⁷. Peroksinitritin reaksiyonları pH, sıcaklık ve ortamda bulunan moleküllere bağlıdır. Peroksinitrit, reaksiyon ürünleriyle veya direk olarak LDL'yi oksitleyebilir, seruloplazmini tahrip edip bakırın serbest kalmasını sağlayabilir, farklı proteinlerdeki tirozin kalıntılarına saldırabilir. NO , NO sentaz (NOS) ile L-arjinin'den sentezlenir (reaksiyon 5). Bu enzimin üç ana izoformu vardır; nöronal NOS (nNOS), indüklenebilir NOS (iNOS) ve endotelial NOS (eNOS). İzoenzimler işlevlerine ve fonksiyonlarına göre farklılıklar gösterirler¹⁸.

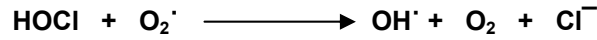


(Reaksiyon 5)

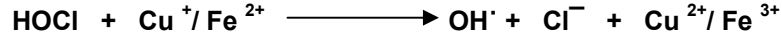
Fizyolojik konsantrasyonlarda NO , hücre içi bir mesajcı olarak guanilat siklaz ve protein kinazları uyarır. Kan damarlarında düz kasların gevşemesini sağlar. NO hücre membranından geçebildiği için diğer hücrelere sinyal iletebilir. NO , hücresel fonksiyonun redoks kontrolünde önemli bir faktördür. Fazla üretilmiş NO , glutatyon (GSH) ile reaksiyona girer ve S-nitroso-glutatyon (GSNO) oluşur. GSNO, memeli TrxR yada tiyoredoksin sistem tarafından parçalanır, NADPH'nın tüketimi ile GSH ve NO tekrar serbest kalır¹⁹.

2.1.5. ROS'ların Fizyolojik Fonksiyonları

Aktive olmuş fagositler enfeksiyöz bakterileri öldürmek için yeterli miktarda ROS üretir. NADPH oksidaz kompleksi ile $O_2^{\cdot -}$ oluşur²⁰. Süperoksitler fagozomlarda SOD tarafından H_2O_2 'ye redüklenir. H_2O_2 , myeloperoksidaz tarafından hipoklorik asite (HOCl) dönüştürülür (reaksiyon 2). Hipoklorik asit daha sonra kendiliğinden $OH^{\cdot}$ 'ye dönüşür (reaksiyon 6-7). Reaksiyon 7 ile Fenton reaksiyonu (reaksiyon 3) benzerdir. Fakat H_2O_2 'nin yerini HOCl almıştır.



(Reaksiyon 6)



(Reaksiyon 7)

Fagozomlarda meydana gelen çok reaktif bu iki ROS molekülü (HOCl ve $OH^{\cdot}$), fagositlerce yutulmuş bakteriler için oldukça toksindir. Aynı zamanda myeloperoksidaz reaksiyonu sırasında meydana gelen hipoklorik asit, bakteri membranına sıkıca bağlanıp DNA'yı kırarak replikasyonu engeller, böylece antimikrobiyal savunmanın önemli bir parçasını oluşturur²¹.

ROS tiyol gruplarını okside etmek yoluyla, GSH veya proteinler gibi sülfidril içeren moleküllerin aktivitelerine ve konformasyonuna direk etkilidir. Bu tip bir redoks regülasyon pek çok enzimi, membran reseptörlerini, tirozin kinaz, kollajenaz, Ca^{2+} -ATPaz ve protein kinaz C gibi karsinogeneze ve sinyal iletiminde önemli birçok proteini etkiler²². Çeşitli transkripsiyon faktörleri için ROS'un fonksiyonu, transkripsiyon kontrolünün fizyolojik aracısı olmaktadır^{18,22}. En iyi bilinen redoksa hassas transkripsiyon faktörler Nüklear Faktör- κB (NF- κB) ve Aktivatör Protein-1'dir (AP-1)^{22,23}. Redükte tiyoredoksin (Trx), AP-1'in DNA'ya bağlanmasını artırır. NF- κB , redoks mekanizmalarla regüle edilir.

2.1.6. ROS'un Neden Olduğu Oksidatif Hasar

ROS'un mutajenik etkisi olduğu gösterilmiştir. ROS (özellikle $OH^{\cdot}$) ile reaksiyon sonucu DNA ayrılmaları, DNA-protein çapraz bağların kırılması, pürinlerin oksidasyonu gibi olaylar görülür. Eğer DNA-tamir sistemi yapıyı hemen onarmazsa, replikasyon sırasında hatalı baz çifti ile sonuçlanan bir mutasyon meydana gelir. Bu mekanizma oksidatif stresin neden olduğu kanseri kısmen açıklayabilir¹⁵. ROS'un neden olduğu apoptoziste ROS-nedenli DNA hasarı, mitokondriyal permeabilitenin artışı,

sitokrom c salınması, hücre içi Ca^{2+} artışı gibi etkiler görülür²⁴. ROS, bütün organizmalarda mitokondriyal DNA hasarıyla oluşan yaşlanmadan dolayı önemli ve ilginç bir hücrel faktördür²⁵.

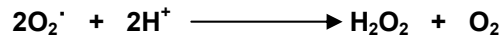
ROS'ların keşfi ile lipid peroksidasyonu önemli hale gelmiştir. Çoklu doymamış yağ asitleri birçok çift bağları olduğu için, serbest radikaller için hedefler. Bu asitlerin hasarı sonucu, membran akışkanlığını azalır²⁶.

ROS'lar birçok amino asitle reaksiyona girer. Proteinleri modifiye ve denature ederek enzimlerin aktivitesini düşürürler. Hassas proteinlerin bir çoğu sülfür veya selenyum içerir. Trx, glutaredoksin (Grx) ve glutatyon (GSH) gibi genel antioksidant sistemler veya metiyonin sülfoksit redüktazlar gibi özel sistemler, Trx için elektron donörü olarak çalışırlar²⁷, bu sistemler proteinleri modifikasyondan korur.

2.2. Tiyoredoksin Sisteme İlave Olarak Hücrel Antioksidan Enzimler

2.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

ROS'ları metabolize eden ilk gerçek enzim olarak SOD bulunmuştur²⁸. Ökaryotik hücrelerde, iki metal içeren SOD izoenzimleri (mitokondrial 80-kDa tetramirik Mn-SOD ve sitozolik 32-kDa dimerik Cu/Zn-SOD) ile $O_2^{\cdot -}$, hidrojen peroksit metabolize edilir. SOD'un katalizlediği reaksiyonda iki molekül süperoksit, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene metabolize olur, bu da hücrel hidrojen peroksit kaynağını oluşturur (reaksiyon 8).



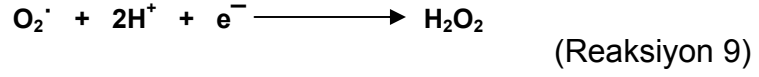
(Reaksiyon 8)

Mn-SOD eksikliği olan fareler doğumdan hemen sonra öldükleri veya şiddetli nörodejenerasyona uğradıkları için mitokondrial Mn-SOD mutlaka gereklidir²⁹. Mn-SOD'un ekspresyonu Cu,Zn-SOD'un aksine oksidatif stresle ve Trx'le indüklenir³⁰. Sitosolik Cu,Zn-SOD, Mn-SOD'dan daha az önemli gibi görünür²⁸.

2.2.2. Süperoksit Redüktaz (SOR)

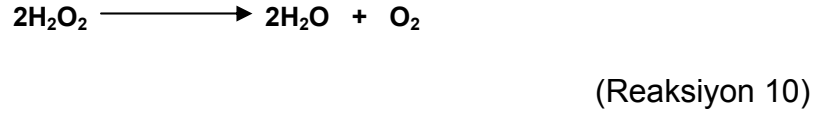
Süperoksitlerin redüklenmesini katalizleyen enzimlerdir. Süperoksit redüktazlar demir içeren enzimlerdir, sülfatı indirgeyen anaerobik bakterilerde bulunmuştur ve desülfoferrodoksin olarak adlandırılmıştır³¹. Daha ileri organizmalarda süperoksitlerin ortadan

kaldırılması için SOD yetersizliğinde, SOR kullanılıyor olabilir. Henüz memelilerde SOR'un bulunduğu dair hiçbir kanıt yoktur.

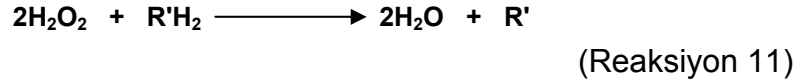


2.2.3. Katalaz

Katalaz birçok organizmada bulunur ve hem içerir³². Memelilerde baskın olarak peroksizomlarda bulunur. Hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalizler.



Aynı zamanda katalaz, hidrojen peroksitin redüksiyonu üzerinden, fenoller ve alkoller gibi farklı substratların detoksifikasyonunda görev alır.



Katalazın antioksidatif rollerinden biri de, Cu ve Fe iyonlarının katalizlediği Fenton Reaksiyonları yolu ile H_2O_2 'ten oluşan hidroksil radikallerinin riskini azaltmaktır¹⁵ (reaksiyon 3). Katalaz NADPH'ye bağlanır, bu durum enzimi inaktivasyondan korur ve aktivitesini artırır. NADPH'in olgun eritrositlerde düşük olduğu glukoz 6-fosfat dehidrojenaz eksikliği hastalığında hemoliz, düşük glutatyon redüktaz (GR)/glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesinden ziyade katalazın inhibisyonu sonucudur³³.

2.2.4. Peroksiredoksin (Prx)

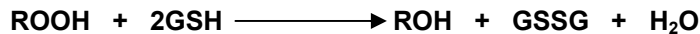
Peroksiredoksinler (Prx; tiyoredoksin peroksidazlar), peroksitleri (örneğin, hidrojen peroksit ve çeşitli alkil hidroperoksitleri), direk olarak redükleme yeteneğinde olan hücresel redükleyici ortamdan sorumlu enzimlerdir³⁴. Memeli mitokondriyal tiyoredoksin sistemi, Prx'in spesifik indirgeyicisidir³⁵. Peroksiredoksinlerin, p53 ve hidrojen peroksitin neden olduğu apoptozisi inhibe ettiği gösterilmiştir³⁶. Genel peroksit temizleyici aktivitelerinin yanı sıra her bir Prx hücre farklılaşması, çoğalması ve gen ekspresyonu dahil çeşitli biyolojik süreçlerle ilişkili farklı fonksiyonlar gösterirler³⁷.

Katalaz sadece peroksizomlarda bulunurken, Prx'ler peroksizomlar ve mitokondri dahil çeşitli subselüler kompartmanlardan eksprese edilmiştir. Prx1 ve 2 sitoplazmik proteinlerdir ama Prx3 özellikle mitokondride eksprese edilir. Memeli Prx4, endoplazmik retikulum ve lizozomlarda bulunur ve ayrıca hücre dışına salgılanır. Prx5, peroksizomlarda ve mitokondride lokalize iken, Prx6 sitoplazma ve mitokondride bulunur. Tip 3 dışında tüm Prx'ler, ayrıca nükleusta da bulunurlar³⁴. Prx1-5 izoformları, katalitik olarak aktif iki sistein (Cys) içerir, Prx6 sadece bir Cys'e sahip olmasına rağmen peroksidatif olarak aktiftir³⁸. Prx'ler, hücreleri apoptotik uyarılara karşı korurlar³⁹. Prx1 ve 2'den yetersiz farelerde hemolitik anemi görülmüştür, bu durum eritrositlerin oksidatif strese kolay etkilendiğini gösterir³⁸. En az 13 memeli peroksiredoksin olduğu bilinmektedir.

Prx3'ün tükenmesi, tümör nekroz faktör- α (TNF- α) kaynaklı apoptozisin indüksiyonuna karşı HeLa hücrelerinde hücre içi hidrojen peroksit seviyesini artırmış ve hücreleri hassaslaştırmıştır⁴⁰. Bu çalışmada, HeLa mitokondrilerinde Prx3'ün GPx1'den yaklaşık 30 kat daha fazla olduğu, bu nedenle bu organelde hidrojen peroksit detoksifikasyonunda Prx3'ün çok önemli bir enzim olduğu gösterilmiştir.

2.2.5. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Memelilerde hepsi selenosistein içeren en az 4 farklı GPx (GPx1-4) vardır. GPx1 ve GPx4 (veya fosfolipit-hidroperoksit GPx) sitozolik enzimlerdir ve birçok dokuda bol bulunurlar⁴¹. GPx4'ün sperm hücrelerinde çift fonksiyonu bulunmuştur; spermatidlerde enzimatik olarak aktif bir şekilde bulunurken, olgun spermatozoada yapısal protein olarak fonksiyon gösterirler. GPx2 (gastrointestinal GPx) başlıca gastrointestinal sistemde ve GPx3 (plazma GPx) böbreklerde eksprese edilir. GPx3, Trx sistemi tarafından katalitik olarak yenilenebilir ve tiyoredoksin redüktaz, böbrekte yüksek oranda GPx3 benzeri bir ekspresyon modeline sahip gibi görünmektedir⁴². Bütün glutasyon peroksidazlar, glutasyonun substrat olarak kullanıldığı hidrojen peroksitin indirgenmesi reaksiyonunu katalizleyebilir. Aynı zamanda diğer peroksitleri (mesela hücre membranlarındaki lipid peroksitlerini) alkollere indirgeyebilir (reaksiyon 12).



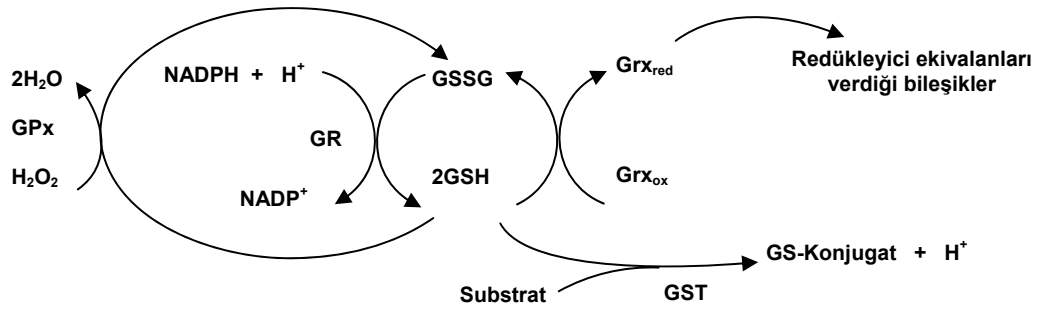
(Reaksiyon 12)

GPx tarafından hidroperoksitlerin redüksiyonu için düşünülen katalitik mekanizma, aynı zamanda aktif bölge selenolatın (Se^-), selenenik asite (SeOH) oksidasyonunu da kapsar. GPx'in fizyolojik koşullarda önemli bir antioksidan olduğu gösterilmiştir⁴³.

2.2.6. Glutasyon ile İlgili Diğer Sistemler

Glutasyon (GSH) hücre içi ortamda en çok bulunan tiyol-bazlı antioksidandır, hücrelerde milimolar konsantrasyonlarda bulunur. Başlıca sülfidril tamponu olarak çalışır, fakat glutasyon S-transferazın katalizlediği konjugasyon reaksiyonları üzerinden veya direk GPx katalizli reaksiyon (reaksiyon 12) üzerinden detoksifiye elemanı gibi de çalışır.

Okside glutasyon (GSSG) NADPH bağımlı flavoenzim glutasyon redüktaz (GR) tarafından redüklenir. GSSG aynı zamanda *E.coli*, *Plasmodium falciparum* ve insan kökenli tiyoredoksin tarafından da etkili biçimde redüklenebilir. Bunlardan başka *Drosophila melanogaster* GR'ce fakirdir ve GSSG'yi indirgemek için selenyumdan bağımsız tiyoredoksin sistemini kullanır^{44,45}. Şekil 2'de GSH ile ilgili antioksidan sistemleri özetlenmiştir.



Şekil 2: Glutasyonla ilişkili olan önemli antioksidan sistemleri. Hidrojen peroksit glutasyon peroksidazlar (GPx) ile redüklenirken, iki molekül glutasyon (GSH), glutasyon disülfite (GSSG) okside olur ve GSSG, NADPH kontrolünde glutasyon redüktaz (GR) tarafından indirgenebilir. Glutasyon aynı zamanda glutaredoksinleri redükler, glutaredoksinler de bir çok substratı indirger. Glutasyon S-transferazlar (GST), diğer moleküller ile glutasyonun konjugasyonunu katalizler, bu nedenle çeşitli toksik maddelerin detoksifikasyonunda bir ara basamak olarak fonksiyon gösterir¹.

2.2.7. Düşük Molekül Ağırlıklı Antioksidan Bileşikleri

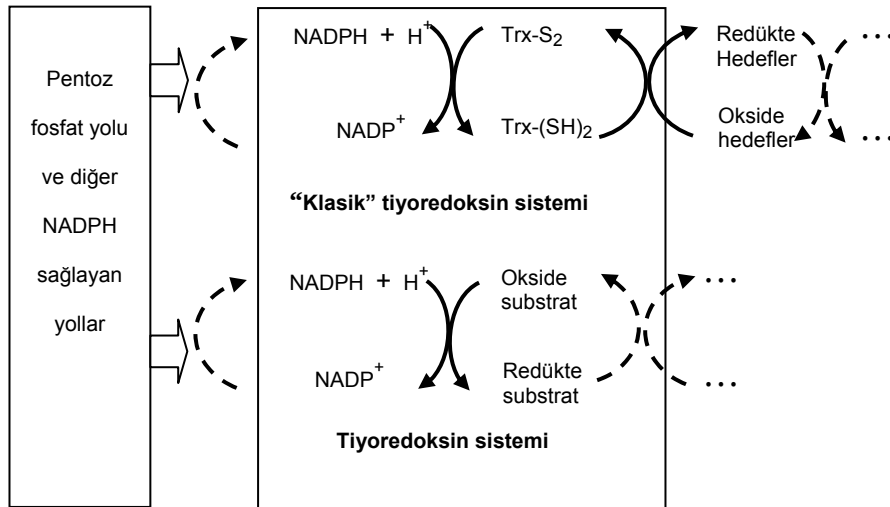
Birçok düşük molekül ağırlıklı bileşik biyolojik sistemde antioksidan olarak kabul edilebilir. Örneğin vitamin C ve E, çeşitli selenyum bileşikleri, lipoik asit ve ubikinonlar. Bunların tamamı memeli tiyoredoksin sistemi ile ilişkilidir¹.

2.3. Tiyoredoksin Sistem

HücreSEL redoks çevre (metabolik, düzenleyici ve antioksidatif bakımdan) çoğunlukla 2 enzime dayalı sistemle sürdürülür ve düzenlenir: glutasyon ve **tiyoredoksin sistem**⁴⁶⁻⁴⁸. Glutasyon, sistein

içeren bir tripeptittir (γ-glutamil-sisteinil-glisin) ve sitozolik antioksidanların ana komponentidir. Trx, aktif merkezinde iki redoks-aktif sistein bulunan küçük bir proteindir⁴⁹. Bu iki sistem, NADPH bağımlı birer flavoenzim içerir⁴⁷ (glutatyon redüktaz GR, (1.6.4.2); tiyoredoksin redüktaz TrxR, (1.6.4.5)). Bu enzimler lipoamid dehidrojenazın da dahil olduğu homodimerik piridin nükleotid-disülfid oksidoredüktazlar ailesine aittir⁵⁰. Her bir monomerde bir FAD prostetik grubu, NADPH bağlanma bölgesi ve redoks aktif disülfitleri içeren bir aktif bölge vardır. Elektronlar FAD aracılığıyla NADPH'dan TrxR'nin aktif-bölge disülfitlerine transfer edilir, substrat redüklenmiş olur. Karakteristik substratı olan redoks aktif protein tiyoredoksin (Trx), hedef moleküllere redükleyici ekivalanları verirken, kendisi reoksidize forma dönüşür (şekil 3).

PFY-enzimler ve diğerleri	TrxR	Enzimler ve/ya spontan olarak	Enzimler ve/ya spontan olarak
---------------------------	------	-------------------------------	-------------------------------



Şekil 3: Tiyoredoksin sistem⁵¹

Tiyoredoksin sistemin keşfi 1960'larda olmuştur⁵², başlangıç çalışmalarının çoğu bakteriyel sistemlerde odaklanmıştır. Stadtman ve ark 1966'da memeli TrxR'lerin selenoenzimler olduğunu keşfetmiştir⁵³.

Miktar olarak Trx (mikromolar konsantrasyon) GSH'dan (milimolar konsantrasyon) daha azdır. Trx ve GSH hücrel ortamın korunmasında farklı roller oynarlar. Trx, transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını GSH'dan daha etkili bir şekilde artırır. Trx sistem komponentleri sadece ROS'ları temizlemekle kalmayıp, aynı zamanda protein-protein interaksyonu yoluyla çeşitli hücrel fonksiyonlarda

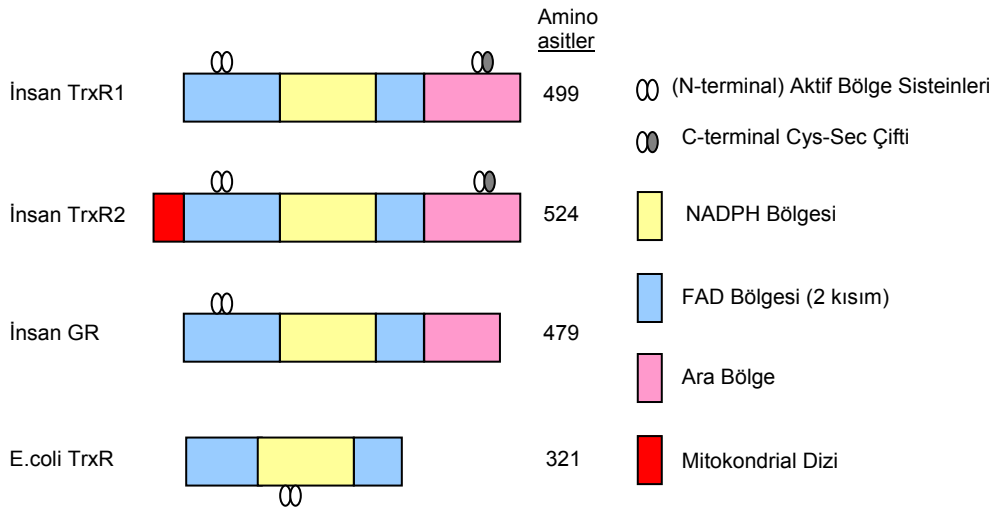
düzenleyici rol oynarlar⁵⁴.

Hücrelerdeki bir başka tiyol redoks sistemi, TrxR/Trx sistemine benzer olan glutatyon redüktaz/glutatyon sistemidir. Bu sistem de redükleyici ekivalanların kaynağı olarak NADPH'ı kullanır. Glutatyon sistem hücrel makromolekülleri, reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu hasardan korumada anahtar rolü oynar.

TrxR ve glutatyon redüktaz sistemlerinin ortak özellikleri: (1) piridin nükleotid-disülfid oksidoredüktazlar ailesine ait enzimler olmaları, (2) Trx ve glutatyonun küçük redoks-aktif peptit olmaları ve (3) tiyol-disülfid dönüşümlerine yatkın olmalarıdır. Farklılıkları ise: (1) glutatyon redüktaz sadece glutatyonu redüklediği için substrat spesifitesinin sınırlı olması ve (2) redükte glutatyonun hücre içi seviyesinin yüksek olmasıdır ki böylece spontan olarak ve glutatyon transferaz-katalizli mekanizmalar aracılığıyla toksik moleküller uzaklaştırılır².

2.3.1. Tiyoredoksin Redüktaz Ve Yapısı

TrxR, ilk olarak *Escherichia coli*'de (*E.coli*) çalışıldı^{55,56}. Bakteriyel TrxR'nin ailenin diğer üyelerinden bir çok yönden farklı olduğu, en belirgin farkın subünite boyutu olduğu belirtildi. GR ve lipoamid dehidrojenazın subünite kütlesi ortalama 55 kDa civarında iken, bakteriyel TrxR'lerde, subünite başına ortalama moleküler ağırlık 35 kDa'dur⁵⁰. NADPH ve FAD bağlanma bölgeleri gibi ortak yapısal ünitelerinin bakteriyel TrxR'de varolmasına rağmen (şekil 4), düzen özdeşlikleri (tablo 2) fark edilir derecede azdır. *E.coli* TrxR'nin 3 boyutlu yapısının, ilgili flavoenzimlerden anlamlı derecede farklı olduğu görülmüştür.



Şekil 4: Küçük ve büyük TrxR'lerin bölge organizasyonunun karşılaştırılması⁵⁷

İlk sınıflandırma girişimleri, 'bakteriyel TrxR' ve 'memeli TrxR' terimleri şeklinde olmuştur. Fakat bakteriyel TrxR sadece bakteride değil, aynı zamanda bitkilerde⁵⁸, mantarlarda⁵⁹ ve bazı protozoalarda da bulunmuştur. Böylece küçük TrxR'ler (subünite kütlesi yaklaşık 35 kDa) ve büyük TrxR'ler (subünite kütlesi yaklaşık 55 kDa) terimleri kullanılmıştır (tablo 3).

Tablo 2: Disülfid redüktazlar arasındaki sekans benzerlikleri. Bu bilgiye göre GR'ler ve büyük TrxR'ler arasındaki yakın ilişki, küçük TrxR'lerle karşılaştırılmıştır⁶⁰.

	İnsan TrxR (Büyük TrxR)	<i>P. falciparum</i> TrxR (Büyük TrxR)	<i>E. coli</i> TrxR (Küçük TrxR)	İnsan GR (TrxR değil)
İnsan TrxR (hTrxR-1)	%100	%46	%25	%35
<i>P. falciparum</i> TrxR	%46	%100	%23	%29
<i>E. coli</i> TrxR	%25	%23	%100	%26
İnsan GR	%35	%29	%26	%100

Ortak yapısal özellik dışında büyük TrxR'lerin, ilave bir C-terminal redoks merkezi vardır. Bu merkez, flavin yakınındaki sisteinlerden indirgeyici akivalanları alır ve final substrata transfer eder. İnsan TrxR'sinde bulunan bu redoks-aktif bölgenin glutatyon redüktazda olmadığı gösterilmiştir⁶¹. TrxR1, C-terminalinde Sec rezidüsüne (Sec=selenosistein) sahiptir, bu rezidü katalitik aktivite için gereklidir. Bütün diğer memeli selenoproteinleri, aktif merkezlerinde Sec bulunan redoks enzimlerdir^{53,62}. Katalitik olarak gerekli redoks aktif sekans kısmı - Gly-Cys-Sec-Gly dir (GCUG; U:selenosistein). Memeli TrxR'leri Sec varlığında peroksinitrit ve lipid hidroperoksitleri redükleme kapasitesine sahiptir⁶³.

Tablo 3: Küçük ve büyük TrxR'lerin özellikleri⁶⁴

	Küçük TrxR	Büyük TrxR
Tiyoredoksini redükleme	Evet	
Glutasyon disülfiti redükleme	Hayır	
Subünite başına FAD içeriği	1	
Subünite başına molekül ağırlığı	Yaklaşık 35 kDa	Yaklaşık 55 kDa
DTNB redüksiyonu	Tiyoredoksin aracılığıyla	Direk
Substrat spektrumu	Çok sınırlı	Çok geniş
Kataliz sırasında konformasyonel değişim	Güçlü (<i>E. coli</i> TrxR'de 60°'lik domain rotasyonu)	Minimal varsayım

İnsan TrxR'sinin N-terminalindeki -Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys- katalitik bölgesinin, insan glutasyon redüktazında da olduğu ve bu bölgenin enzimin FAD bölgesinde lokalize olduğu gösterildi. Fakat *E.coli* TrxR'sinde katalitik bölge -Cys-Ala-Thr-Cys- şeklinde olup, NADPH bölgesinde bulunur⁶⁵.

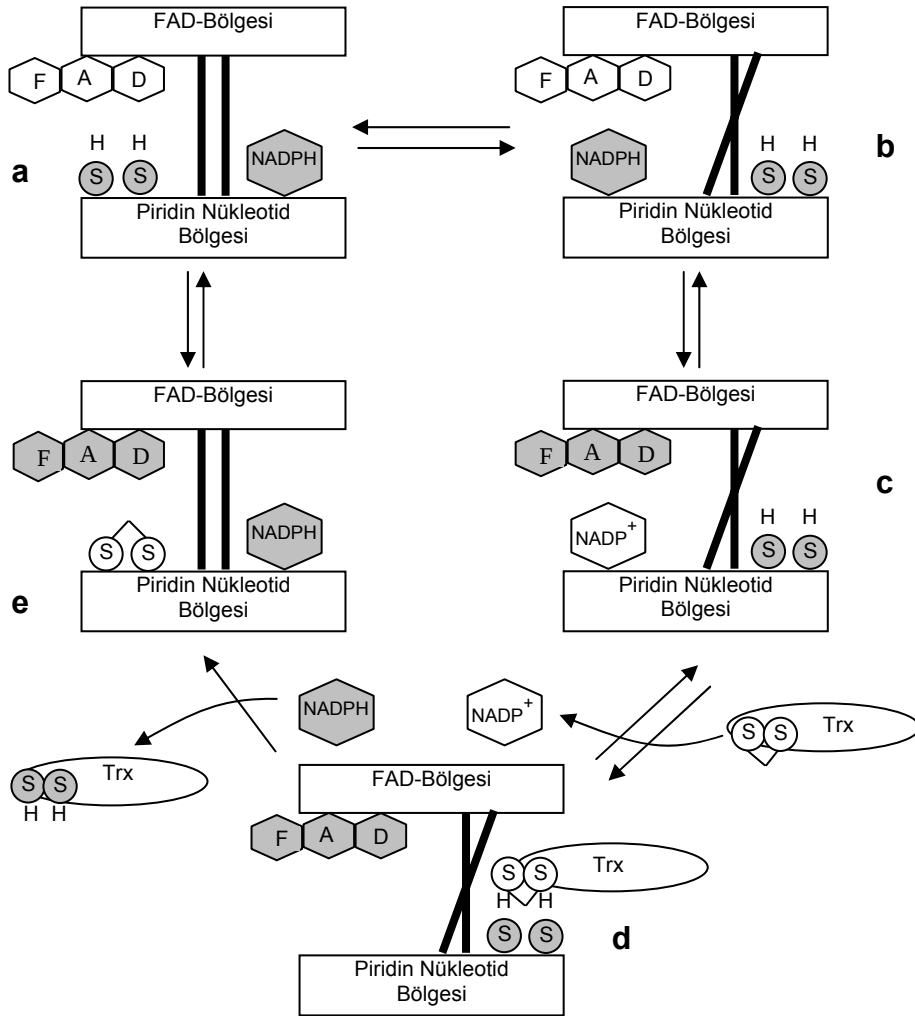
Bugüne kadar memeli hücrelerinde üç tip TrxR tanımlanmıştır. TrxR1 başlıca sitozolde eksprese edilir, monomeri 54.6 kDa molekül ağırlığındadır^{65,66} ve prokaryotik TrxR'lerle %31 , ökaryotik ve prokaryotik glutasyon redüktaz ile %41 sekans benzerliği görülmüştür (şekil 4). İkinci insan TrxR'si olan TrxR2, monomeri 56,2 kDa molekül ağırlığında olan, TrxR1'e % 84'lük benzerlik gösteren mitokondriye spesifik bir proteindir. N-terminal ucunda mitokondrial sekans ilave bölgesi vardır⁶⁷⁻⁶⁹. Mitokondride lokalizedir ve bu lokalizasyon N-terminalindeki uzantısı çıkarıldığında son bulur⁶⁷. TrxR2'nin, mitokondri aracılı oksidatif strese karşı hücreleri koruduğu düşünülür⁷⁰. TRG veya TrxR3 yüksek derecede testislerde eksprese edilen, GSSG ve okside Trx'i nadir olarak indirgeme kapasitesine sahip bir TrxR'dir⁷¹.

2.3.2. Tiyoredoksin Redüktaz'ın Katalitik Mekanizması Ve Substrat Spesifitesi

Küçük TrxR'lerin katalitik mekanizması araştırılmış ve büyük TrxR'lerden çok farklar olduğu gösterilmiştir. En önemlisi, büyük TrxR'lerde 66°'lik bir bölge rotasyonu bulunmamasıdır (şekil 5)⁶⁴.

E.coli'nin TrxR'sinin mekanizması kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır (şekil 5)^{61,72,73}. *E. coli* TrxR'sinin FAD ve NADPH bölgelerinin

uzaysal oriyantasyonu şöyledir; diğer piridin nükleotid-disülfid oksidoredüktazlar ailesi üyelerinde olduğu gibi, enzime bağlı NADPH'ın nikotinamid halkası, FAD'nin izoalloksazin halkası ile yakın temas halinde değildir⁷². Fakat *E.coli* TrxR'sinin FAD'si sabit kalırken NADPH bölgesi 66° dönerse, o zaman yapıya bağlı NADPH izoalloksazin halkası ile yakın temas etmek için hareket etmiş olur, bu da elektronların FAD'ye ve sonra aktif bölge disülfitlerine geçmesine izin verir.



Şekil 5: *E.coli* TrxR'sinin katalitik mekanizması⁷⁴. Gri gölgeli yapılar, redüklenmiş durumları gösterir.

Memeli TrxR'ler, *E.coli* TrxR'ye göre glutatyon redüktaz ile mekanistik benzerlik ve sekans özdeşlik anlamında daha yakındır^{61,65,75}. Glutatyon redüktazdaki aktif-bölge Cys rezidüleri, FAD'nin izoalloksazin halkasına yakındırlar. Bu durum, FAD'nin izoalloksazin halkası ve aktif-

bölge disülfid aracılığıyla, enzimde majör konformasyonel değişim olmadan, NADPH'den glutatyonu elektronların akışına izin verir⁷⁶.

Küçük ve büyük TrxR'lerin substrat spektrumu farklılık gösterir. Küçük TrxR'ler, tiyoredoksin ile çok sınırlı bir spektrum sergilerken (hemen hemen tek substrat), büyük TrxR'ler omnivor tavır gösterirler. Trx'lere ek olarak memeli TrxR substratlarına lipoik asit⁷⁷, lipit hidroperoksitler⁷⁸, vitamin K₃⁷⁹, dehidroaskorbik asit⁸⁰, askorbil serbest radikali⁸¹, 5,5'dithiobis-(2-nitrobenzoik asit)⁸², alloksan⁸³, L-sistin⁸⁴, selenodiglutasyon^{85,86}, ebselen⁶³, S-nitrozo-glutasyon (GSNO)¹⁹, alkilhidroperoksitler, metilseleninat⁸⁷, tümör supresör protein p53⁸⁸, sitotoksik peptit NK-lizin⁸⁹, protein disülfid izomerazlar⁸¹, plazma glutasyon peroksidaz⁹⁰, kalsiyum-binding protein 1&2⁹¹ ve daha birçokları örnek verilebilir.

NK-lizin, 9 kDa'luk bir peptittir ve katil hücrelerden salgılanır. TrxR tarafından etkili bir şekilde redüklenir ve inaktive edilir⁸⁹. Lipoik asit (lipoat disülfid), fizyolojik bir bileşiktir ve farmakolojide kullanılır. Lipoat disüfit, in vivo TrxR ile metabolik olarak aktif formuna redüklenir⁹².

5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit) (Ellman's ayıracı;DTNB), spesifik olmayan tiyol ayıracıdır. Yapısında bir disülfid ile bağlanmış iki nitrobenzen halkası vardır. Proteinler ve peptitlerde disülfidlerin redüksiyonu sonrası serbest tiyollerin saptanmasında kullanılır. Memeli TrxR'si spesifik olarak, NADPH aracılığıyla DTNB'deki disülfidi redükler ve serbestleşen TNB⁻ anyonunun verdiği yüksek absorbanans yoluyla reaksiyon kolaylıkla spektrofotometrik olarak ölçülür⁹³.

Protein disülfid izomerazlar (PDI), hücresel proteinlerin oluşum süreçleri ve post-translasyonel kırılmalar için önemli olan bir protein ailesini oluştururlar. Yapısal olarak PDI proteinleri bir veya birkaç Trx bölgesi içerirler, yapıda bulunan bazı bölgeler ayrıca redoks aktif ditiyol-disülfid motifine sahiptir⁹⁴. PDI'da mevcut olan Trx benzeri aktif bölge motifleri, memeli TrxR ile (direk olarak veya redükte Trx üzerinden) redüklenirler.

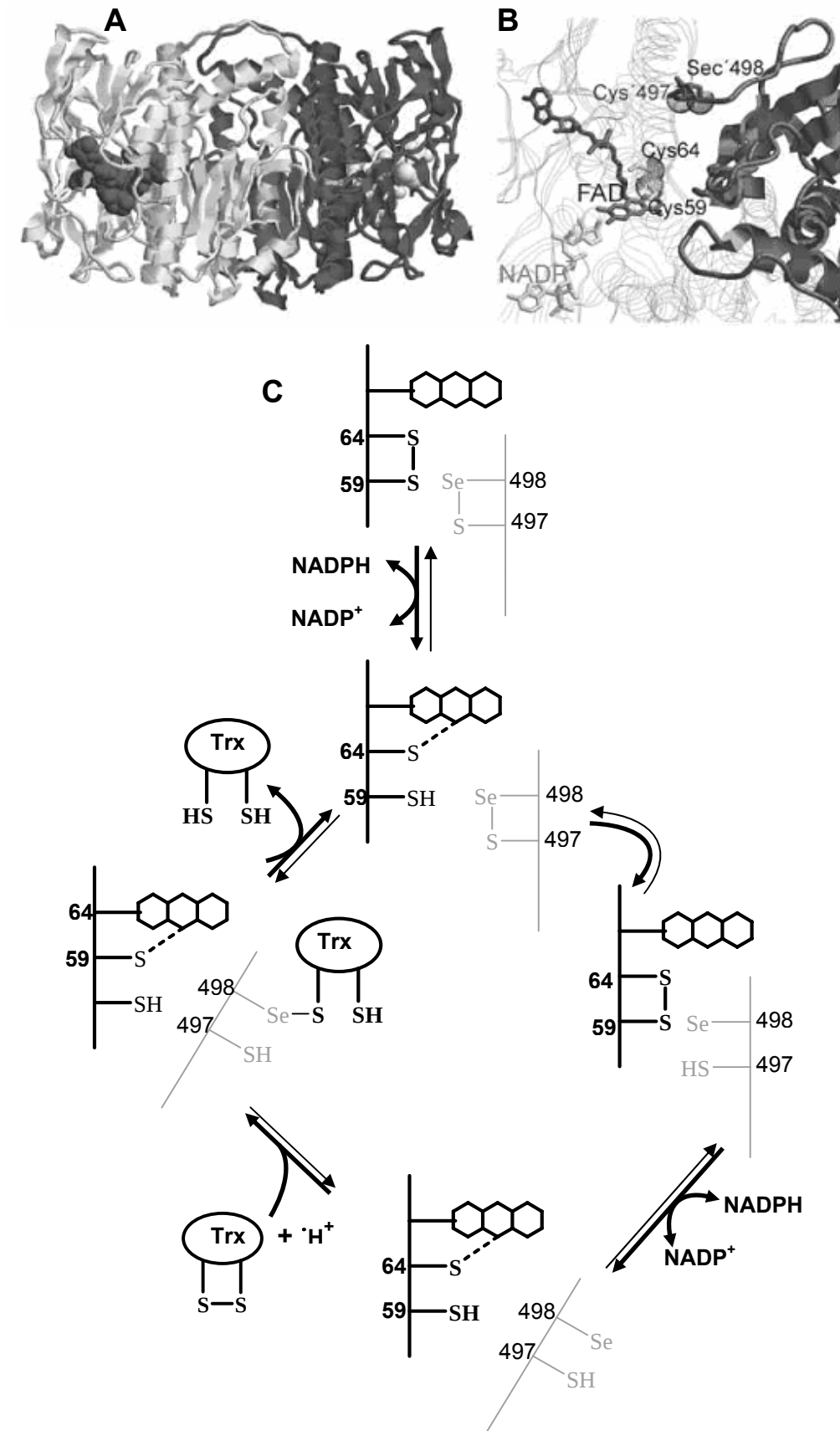
Askorbat (vit C) suda çözünen, hücre membranlarını geçen ve plazmada bulunan önemli bir antioksidandır. Süperoksit gibi ROS'ları, peroksitleri ve α -tokoferolu (vit E) redükler. Plazma lipoproteinlerinde lipit hidroperoksit oluşumunu engeller. Tiyoredoksin sistem, askorbil serbest radikallerini ve dehidroaskorbik asiti, askorbik asite redükler⁹⁵.

Vit E, biyolojik membranlarda bulunan yağda çözünen bir vitamindir. Bir hidroksil grubu vardır, bu grubu ile eşleşmemiş elektronlarla reaksiyona girer ve onları redükler (örneğin peroksil radikali). TrxR'nin vit E'nin antioksidan fonksiyonunda önemli rol oynadığı düşünülür. Çünkü,

TrxR aracılı dehidroaskorbik asit siklusunun, vit E ile bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir⁹⁶.

TrxR'ler arasında küçük farklar olmasına rağmen, insan tiyoredoksin redüktazının katalitik mekanizması için kabul gören bir taslak hazırlanmıştır (şekil 6)⁹⁷. Bu hipotez, bütün büyük TrxR'ler için uygulanabilir bir prensibe sahiptir.

Bu mekanizmanın anahtar özelliği, C-terminalin oldukça esnek bir uç olmasıdır. Bu bölgenin önemi, yapıya gömülü olan redoks-merkezi yakınındaki flavinden yüzeydeki hacimli substratlara elektron transportundan sorumlu olmasıdır. Redüklenmiş C-terminalin daha açık pozisyonu, substratın daha geniş alanının redüklenmesine olanak verir; fakat küçük moleküller N-terminal aktif bölgesinden redükleyici ekivalanları üzerine alır (şekil 6). Mekanizmanın kilit aracı molekülü özellikle selenenilsulfit-köprüsüdür⁹⁸.



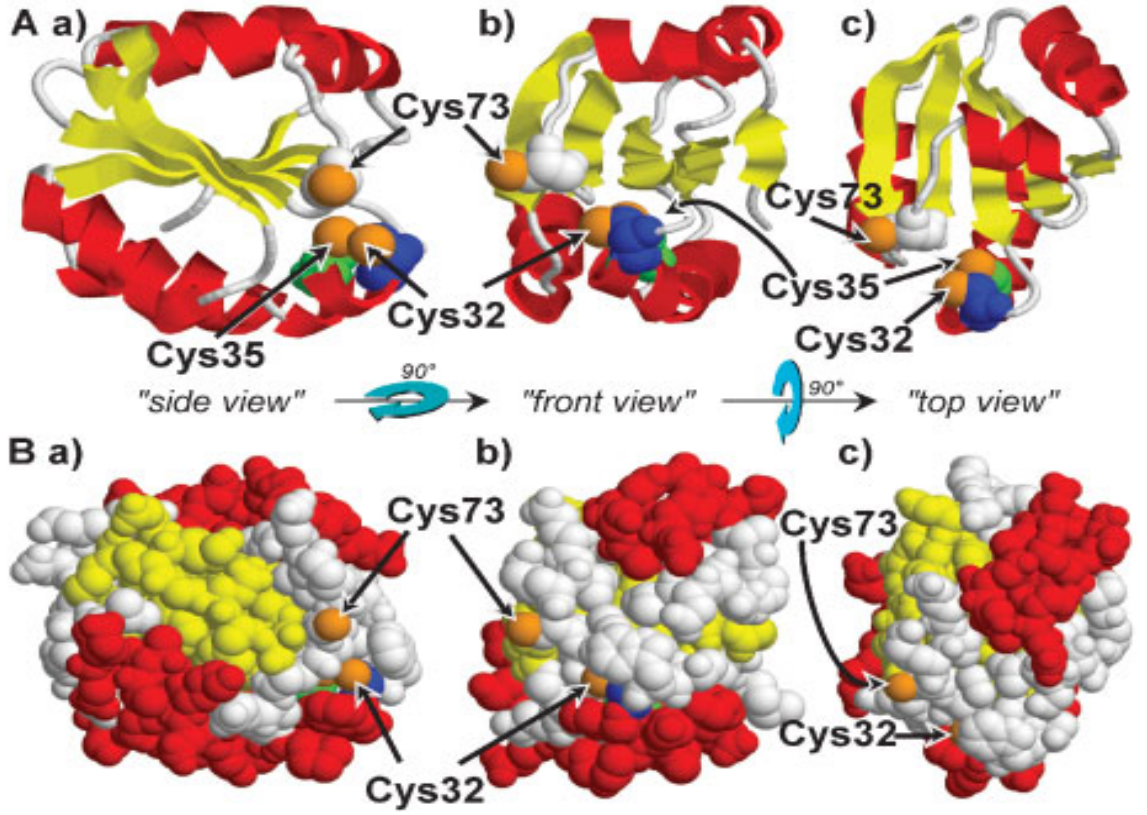
Şekil 6

Şekil 6: İnsan ve diğer büyük TrxR'lerin katalitik mekanizmaları. A: Memeli tiyoredoksin redüktazın homodimerik modeli. Protein omurgası, şerit olarak gösterilmiştir, her bir subünite farklı bir renktedir. Yapıya bağlı iki FAD molekülü, dolgu şeklinde gösterilmiştir. B: İki subüniteden oluşan bir katalitik reaksiyon merkezi. Birinin omurgası iplik şeklinde, diğerinin omurgası ise şerit şeklinde gösterilmiştir. Bağlı FAD (gri) ve NADP⁺ (açık gri), çubuk şeklinde temsil edilmiştir. Flavın yakınındaki N-terminal redoks aktif bölge (Cys 59 ve Cys 64) bir subünitede, aynı reaksiyon merkezinin C-terminal redoks aktif bölgesi (Cys' 497 ve Sec' 498) diğer subünitede bulunur. Her bir dimer formu, katalitik olarak iki bağımsız aktif merkeze sahiptir. C: Büyük TrxR'lerle, Trx redüksiyonu için varsayılan taslak. Her iki subünite (biri siyah, diğeri gri ile belirtilmiş) tarafından oluşturulan, yalnızca bir reaksiyon merkezi gösterilmiştir. Okside enzim, yüksek NADPH:NADP⁺ oranına bağlı olarak NADPH ile redüklenebilir. NADPH, TrxR'nin NADPH-bağlama bölgesine bağlanır. TrxR'nin katalitik bölgesi olan –Cys(59)-Xaa-Xaa-Cys(64)-disülfid bağını redüklemek için, elektronlar NADPH'dan FAD'ye aktarılır. C-terminal bu anda okside durumdadır. Tiyol-disülfid değişimi sonucu –Cys(59)-Xaa-Xaa-Cys(64)- oksitlenir ve C-terminal –Cys(497)-SeCys(498)- redüklenir. Redükte C-terminal ucu hareket eder, okside Trx redükte C-terminal ucunun selenolatı ile reaksiyona girer, elektronlar substrata transfer edilmiş olur⁶⁴.

2.3.3. Tiyoredoksin

TrxR'ler okside tiyoredoksinleri redükleme becerilerinden dolayı bu ismi almışlardır. Tiyoredoksinler yaklaşık olarak 10-12 kDa'luk redoks-aktif proteinler olarak tanımlanmıştır. Bütün memeli ve prokaryotik hücrelerde bol bulunurlar. Aktif bölge –Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys-((W)CGPC(K)) sekansı (tiyoredoksin motifi) içerir. Triptofan (W) ve lizin (K), genellikle tiyoredoksin motif oluşumu için gerekli değildir. Disülfid oluşturan bu aktif bölge sisteinleri, TrxR tarafından redüklenir (şekil 3,5). Bu redükte protein, klasik olarak redükleyici ekivalanları ribonükleotid redüktaza transfer etme eğilimindedir. Katalitik bölgenin redoks aktivitesi, Trx'in biyolojik aktivitesi için gereklidir. Farklı tiyoredoksinler bir organizma içinde çeşitli fonksiyonlara hizmet edebilirler^{52,99}.

Tipik tiyoredoksin yapısı (şekil 7A), beş merkezi β -ipliklerinden dışarı kıvrılmış β -tabakalar düzlemi, bunları çevreleyen dört α -heliksten oluşur¹⁰⁰. Katalitik olarak iki redoks aktif sistein rezidüsünden (insan Trx-1'deki cys 32 ve cys 35) biri (cys 35), yapıya gömülü iken diğeri açıktadır (cys 32, şekil 7B). Bazı memeli tiyoredoksinleri ilave sisteinler içerir (örn, insan Trx'deki cys 73, şekil 7), bunlar tiyoredoksin-dimer oluşumuyla ve diğer düzenleyici yollarla ilişkili olabilir. Fakat, memelilerde ilave sisteinlerden yoksun olan tiyoredoksinler de -mitokondrial hTrx2-vardır. Mitokondrial hTrx2, bakteriyel tiyoredoksine, sitozolik izoform olan hTrx1'den daha çok benzerdir¹⁰¹.



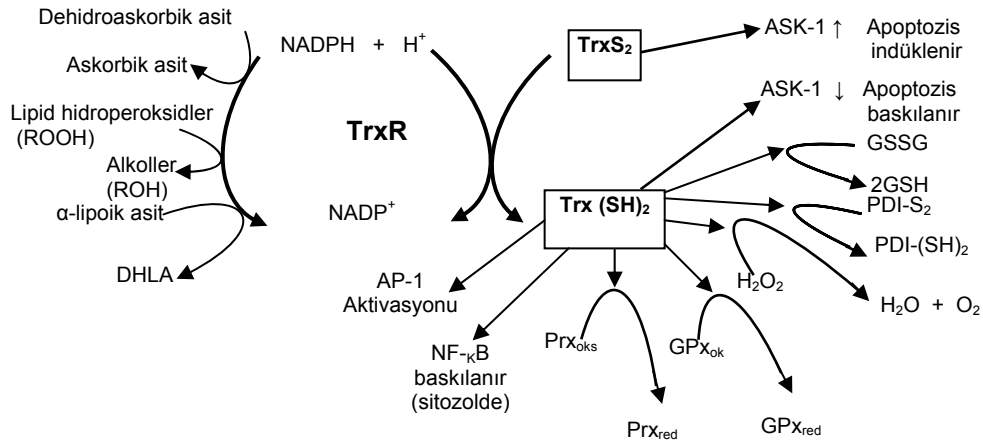
Şekil 7: Okside hTrx-1'in yapısı. A) Şerit modeli. B) Dolgu modeli. α -heliks yapılar kırmızı, β -tabakalar sarı ile gösterilmiştir. Aktif bölge cys 32 mavi, cys 35 yeşil; regülatör cys olarak kabul edilen cys 73 açık gri ile gösterilmiştir. Sülfür atomları koyu turuncu ile belirtilmiştir. Protein üç farklı perspektif ile gösterilmiştir: a'nın saat yönünde 90° dönmesiyle b oluşur, b'nin aşağı doğru 90° dönmesiyle c oluşur¹⁰².

2.3.4. Tioredoksin Sistemin Fonksiyonları

Memeli tioredoksin sistemin başlıca fonksiyonlarından bazıları, ribonükleotid redüktaz ve tioredoksin peroksidaz gibi enzimlere (tiyol-disülfüt değişimiyle) redükleyici ekivalanları sağlamak, bazı transkripsiyon faktörlerinde anahtar cys rezidülerini redükleyerek DNA'ya bağlanmalarını artırmak ve gen transkripsiyonlarında değişiklik yapmaktır^{52,103} (şekil 8).

Memeli hücrelerinde Trx sisteminin pek çok hücre içi olayla da ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ör, glukokortikoid reseptörü gibi çeşitli steroid reseptörlerinin, androjen reseptörlerinin, ornitin dekarboksilaz gibi enzimlerin, NFkB ve AP1 gibi transkripsiyon faktörlerinin, Trx'in disülfid redükleyici aktivitesi üzerinden aktive edildiği bulunmuştur. Üstelik Trx, güçlü bir büyümeyi teşvik edici/ilerletici faktör gibidir¹⁰⁴.

Trx ekspresyonu farklı hücre populasyonlarında çeşitli tip uyarıcılarla indüklenebilir; örneğin oksidatif stresle, viral enfeksiyonlarla, mitojen stimülasyonu, hidrojen peroksit maruz kalmayla, UV ışığa maruz kalmayla, malignan transformasyonla⁴⁶. Bazı çalışmalar, çeşitli iskemi-reperfüzyon organlarına dışardan Trx ilavesinin koruyucu etkisi olduğuna dikkati çekmiştir. Trx'in membran lokalizasyonunun, hücre adezyonları ve hücre-hücre interaksiyonları için önemli rolü olabilir¹⁰⁵.



Şekil 8: Memeli tiyoredoksin sisteminin fizyolojik fonksiyonlarının özeti. Glutasyon peroksidazın aktif bölgesinin rejenerasyonu ve hidrojen peroksitin redüksiyonu, direk olarak TrxR tarafından katalizlenebilir. Glutasyon peroksidazlar ve peroksiredoksinler Trx ile aktive olur ve hidrojen peroksit tiyoredoksine bağlı olarak indirgenir¹.

2.3.4.1. Trx Sistemi, İmmün Sistem ve Hücre Büyümesi

Trx hücrenin devamlılığı/apoptozisi, hücrenin gelişimi, farklılaşması ve çoğalması dahil birçok fizyolojik işlemin kontrolüne katılır¹. Redükte Trx, aynı zamanda çeşitli hücrelerden salgılanarak, hücre dışı fonksiyonlara da sahiptir¹⁰⁶. Hücre dışı Trx'in otokrin büyüme faktörü ve ko-sitokin olarak fonksiyon gösterdiği düşünülmektedir^{107,108}. Örneğin hücre dışı Trx, tümör hücrelerinin büyümesinin ve lenfositlerin proliferasyonunun stimülasyonunu aktive eden büyüme faktörü benzeri etkiler gösterir¹⁰⁹. Diğer sitokinlerin sentezi (TNF, IL-1, IL-2, IL-6 ve IL-8) Trx tarafından regüle edilir ve hücre dışı Trx nötrofilik granüllerin, monositlerin ve T-hücrelerinin kemotaksisini indükler¹¹⁰. Periferik kan hücreleri, bakteri enfeksiyonlarına benzeyen çeşitli durumlarda Trx salgılarlar. Yüksek Trx düzeyleri bakteri savunma sistemini inhibe eder¹¹¹. Romatoid artritli hastalarda, hem inflamasyon bölgesinde hem de serumda Trx düzeyleri yükselmiştir.

TrxR'nin fizyolojik bir substratı olan Trx, hücre büyümesini

regüle etmede ve apoptozisi inhibe etmede önemli rol oynar. Trx'in bu etkilerini göstermesi için redükte halde bulunması gerekir. Okside durumda hücre büyümesini uyaramaz ve apoptozisi inhibe edemez⁴⁶. Trx'in redüksiyonu için bilinen tek mekanizma TrxR ile NADPH-bağımlı redüksiyondur. Bu yüzden, TrxR'nin hücre büyümesini regüle etmede bir rolü olduğu söylenebilir. Fakat kültür hücrelerinde TrxR aktivitesinin, hücrelerin büyüme oranlarında çarpıcı bir etkisi olmaksızın, Se bulunan büyüme ortamında birkaç kat yükselmiştir. Meme kanseri MCF-7 hücrelerinin TrxR1 ile transfeksiyonu, TrxR aktivitesinde 3 kattan daha fazla artışla sonuçlanmıştır, fakat hücre büyümesinin uyarımı % 50'den daha az olmuştur¹¹².

Hücre büyümesi üzerine artmış TrxR aktivitesinin önemli bir etkisi olmamakla beraber, inhibe edilmiş TrxR aktivitesi azalmış hücre büyümesi ile ilişkilendirilmiştir. TrxR, sitozolik NADPH konsantrasyonları varlığında baskın olarak redükte formdadır^{2,61}.

2.3.4.2. Oksidan Strese Karşı Koruma

Normal O₂ metabolizmasının bir kısmı olarak düşük miktarlarda sürekli bir ROS oluşumu vardır. ROS üretiminin artması veya hücrede var olan bir ya da daha fazla koruyucu sistemin fonksiyonlarının azalması makromoleküllerin hasarına yol açabilir. Örneğin protein tiyollerin oksidasyonu görülebilir ve bu durum apoptozisin de dahil olduğu patolojik süreçlere neden olabilir¹¹³.

Hücreleri, oksidatif stresten korumak başlıca redükte glutatyonunun (GSH) görevidir. Birçok hücrede milimolar konsantrasyonlarda bulunur. Fonksiyonelliğin devamlı sürdürülmesi için, okside glutatyon (glutatyon disülfid, GSSG), başlıca flavoenzim glutatyon redüktaz ile enzimatik olarak GSH'a redüklenir (şekil 2). GSH'dan başka, diğer birçok (daha az konsantrasyonlu) düşük molekül ağırlıklı bileşik (örneğin askorbik asit, vitamin E, ubikinol, ürik asit), benzer korumayı sağlar. Hücresel redoks tamponun ana bileşeni protein sisteinleridir ve tiyollerini oluştururlar. Bu proteinler sulfenatlara veya disüflitlere okside olduğunda GSH tarafından ya da antioksidan oyunda bir diğer anahtar oyuncu olan **redükte tiyoredoksin** tarafından reaktif edilir⁴⁷. Glutaredoksin ve glutatyon gibi tiyoredoksin sistem de oksidatif stresle inaktif olmuş proteinleri yenileme yeteneğindedir, bu fonksiyona katkısı % 50 den fazladır¹¹⁴. Örneğin, ROS ile inaktif olmuş gliseralehid-3-fosfat dehidrojenaz enziminin tiyol gruplarını yenileyebilir¹⁰⁵. Memeli TrxR'leri, dehidroaskorbatı askorbata dönüştürebilirler⁸⁰, selenosisteinin varlığına bağlı olarak ubikinonun ubikinole in vitro redüksiyonunu sağlarlar.

Farklı özelliklerinden ve singlet oksijeni baskılama ve

hidroksil radikallerini temizleme kapasitesinden dolayı Trx'ler önemli antioksidan proteinler olarak kabul edilir^{115,116}. Trx1 hücre içinde hem sitoplazmada hem de çekirdekte bulunur. Diğer bir izoform olan Trx2'nin, oksidatif strese karşı koruyucu olduğu desteklenmiştir. Trx2'nin ekspresyonu, beyindeki yüksek düzey ROS üretimi ile ilişkili gibi görünmektedir¹¹⁷.

Trx hücre yaşamının devamlılığında ve erken gelişimde önemlidir¹¹⁸. Trx transgenik farelerde iskemik hasara¹¹⁹, akut akciğer yetmezliğine¹²⁰, diabetes mellitusa¹²¹ ve çevresel streslerden kaynaklanan toksisiteye karşı koruma¹²² ve uzamış hayat süresi¹²³ gibi çeşitli fenotipler görülmüştür. Oksidatif stres bu durumlarla ilişkilidir ve Trx oksidatif strese bağlı hastalıklara karşı korumada önemli bir rol oynuyor gibi görünmektedir.

TrxR'nin selenosistein grubu, mutajenik hidrojen peroksit için primer bir sensör gibi de fonksiyon yapar ve antioksidatif proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonu için sinyal kaskadının başlamasına neden olur¹²⁴.

Mantarlarla ilgili yapılan çalışmalarda mitokondriyal veya sitozolik TrxR'yi kodlayan genlerden yoksun soyların yaşayabildiği fakat hidrojen peroksitin sebep olduğu oksidatif strese karşı daha duyarlı hale geldiği bulunmuştur¹²⁵.

Trx'in, ROS oluşturulmuş hücrelerde apoptozisi engellediği görülmüştür. TrxR1 mRNA'sı ve Trx mRNA'sının düzeyleri, oksijene maruz kalmış yeni doğan babunların akciğerinde artmıştır¹²⁶. TrxR1 ve Trx'in gen ekspresyonlarındaki bu artış memeli akciğerinde O₂ solunumuna karşı koruyucu rol oynar. TrxR'nin insan yüzey keratinositlerinde ve melanositlerinde yüksek derecede eksprese edildiği gösterilmiştir. TrxR, UV ışığının sonucu olarak oluşmuş olan serbest radikallere karşı ilk savunma hattını sağlar¹²⁷.

Yüksek TrxR2'nin aktivitesinin insan embriyonik böbrek hücrelerini (HEK-293), mitokondriyal kompleks III'ün antimitisin A tarafından inhibisyonu ile oluşan sitotoksisiteye karşı koruduğu saptanmıştır. Bu etki TrxR2 ve/ya Trx2'nin aşırı eksprese edildiği fare, maymun ve diğer insan hücrelerinde gözlenmemiştir¹²⁸.

2.3.4.3. Redoks Regölasyonu

Hücreyel fonksiyonlar, defosforilasyon - tersinir fosforilasyon ve redoks regölasyon ile sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir¹²⁹. Enzim ve proteinlerin aktif bölgesindeki tersinir modifikasyonlar için gerekli olan sisteinler, aktivite verimi için zorunludur.

Genellikle redükleyici sitozolik çevreye rağmen, redoks regölasyonunda okside türler de var olabilirler. Normal şartlar altında, hücreyel tiyoredoksinin yaklaşık % 11'i okside formda bulunur. Enzimlerin aktivasyon - deaktivasyonu ve bazı transkripsiyon faktörleri, regüle olmuş redoks oluşumlarına örnektir. Bu faktörlerden çoğunun tiyoredoksin ile regüle edildiği gösterilmiştir¹³⁰.

'Nüklear faktör-kappaB' (NF-κB), tiyoredoksin redoks regölasyonuna örnek olarak çok sık çalışılmıştır. 1986'da keşfedilmiştir, indüklenabilir transkripsiyon faktörleri ailesinin yaygın bir üyesidir. NF-κB, çoğunlukla inflamatuvar sitokinler, enfeksiyonlar, karsinogenler, ROS, hücreyel stresler ve apoptozis indükleyicilerinin sonucunda aktive olur. NF-κB'nin eksikliği immun defektlere yol açar. Aktivitesi için redükte formunda spesifik bir sistein rezidüsü (cys 62) gerektirir. Cys 62 redüksiyonu tiyoredoksin ile gerçekleştirir¹³¹.

Hücre içinde tiyoredoksin, NF-κB ve glukokortikoid reseptörü gibi çeşitli transkripsiyon faktörler için redükleyici bir ajan gibi davranır. Fakat redüksiyonun etkisi faktörden faktöre değişiklik gösterir: glukokortikoid reseptörünün tiyoredoksin-aracılı redüksiyonu, reseptörlerin hormona bağlanma yeteneğini artırırken; NF-κB'nin Trx-bağımlı redüksiyonu, artmış DNA bağlayıcılığının devamını sağlar¹³². Deiyodinaz enzimi ile iyodotriyinin 5'-deiyodinasyon için tiyoredoksin sistem gereklidir: redükte tiyoredoksin bir enzim aktivatörü gibi davranır¹³³.

P53, tümör baskılayıcı bir protein ve transkripsiyon faktördür. P53'ün DNA'ya bağlanma yeteneği okside ortamlarda inhibe edilir. p53 ekspresyonu birçok redoks genin ekspresyonunda değişikliğe neden olur; örneğin TrxR ekspresyonundaki azalma¹³⁴. P53'ün aktif formu, apoptozisi indükler¹³⁵. Aktif p53'ün, TrxR transkripsiyonunu ve ekspresyonunu bastırdığı belirtilmiştir¹³⁶.

Ca²⁺ iyonları sitozolik konsantrasyonda, hTrxR aktivitesi üzerine doza bağımlı bir inhibitör etki sergiler fakat Mg²⁺ bunu yapmaz. Okside hücreyel tiyoredoksin ve kalsiyum konsantrasyonlarında paralel bir artış gösterilmiştir¹³⁷. İnsan ve *E.coli* TrxR'de iki α-heliks arasında çok negatif yüklü bir halka içinde kalsiyum-bağlayıcı bölgenin varlığı gösterilmiştir. Fakat büyük ve küçük TrxR'lerin kalmodulinlerle

müştereklikleri çok azdır ve kalmodulinlerdeki zorunlu kalsiyum bağlayıcı rezidülerden yoksundur¹³⁸.

Oksidatif stresle Trx ekspresyonu artar. Artmış Trx ekspresyonu antioksidan savunmanın bir parçası olan diğer biyomoleküllerin ve hücre dışı proteinlerin redüksiyonunu artırır. Genel olarak Trx, ROS'un sinyal aktarımı özelliklerini (ROS'un oluşturduğu hücre içi disüflitlerini redüklemeye çalışarak ve ROS miktarlarını direk olarak düşürmeye çalışarak) modüle eder^{46,139}.

Hücreler bir oksidatif strese maruz kaldığında Trx nükleusa doğru yer değiştirir. Redoks aktif sistein rezidüleri aracılığıyla nükleus içi yerleşimi üzerinden regülatör fonksiyonlarını kullanır¹²⁵, örneğin p53 ve NF-κB'nin DNA'ya bağlanmasını regüle eder¹⁴⁰. Trx ayrıca nükleusta redoks faktör-1 (Ref-1) aracılığıyla AP-1'in de DNA'ya bağlanma aktivitesini artırır^{140,141}.

Memeli hücrelerinde sitozolik TrxR'nin transfeksiyonu, iyonize radyasyona cevap olarak AP-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin ve tümör nekroz faktör alfa'ya (TNF-α) cevap olarak NF-κB'nin DNA'ya bağlanma aktivitelerini artmıştır^{142,143}. İnsan TrxR1 ve TrxR2 sitokrom-c'yi redükleme kapasitesine sahiptir.

2.3.4.4. Oksidatif Stres ve Apoptozis

Tiyol oksitleyici ajanlar hücre ölümünü indükler. Bu ajanlar, apoptozis veya nekrozis demeden mitokondrial sitokrom c'nin sitoplazmaya serbestleşmesine neden olur. Her kaspazın aktif bölgesinde sistein rezidüsü olduğu için, kaspaz aktivitesi redoks hal ile (özellikle Trx sistemle) regüle edilir. Kaspaz aktivitesinin oksidatif stres sebebiyle aksaması, apoptozisten nekroza dönüşen bir değişimle sonuçlanır. Oksidatif stresle indüklenen hücre ölümü, hücre içi redükleyici ortam Trx sistemle korunduğu sürece apoptozis gibi görünmektedir¹⁴⁴.

Oksidatif stresin de dahil olduğu proapoptotik sinyal, mitokondri dışı membranın permeabilizasyonuna neden olur, bu durum öldürücüdür çünkü proapoptotik kaspaz-aktive edici moleküllerin ve kaspazlardan bağımsız ölüm efektörlerinin serbestleşmesine ve mitokondride metabolik yetmezliğe neden olur¹⁴⁵.

Mitokondri birçok stres-nedenli apoptotik sinyal yollarının merkezi olduğu için çeşitli koruyucu mekanizmalara sahiptir. Mitokondride büyük miktarda GSH vardır, GSH oksidatif strese karşı bir tampon gibi hizmet eder. Trx2, özellikle mitokondride eksprese edilmiştir ve hücre devamlılığı için şarttır¹⁴⁶. Trx2'nin N-terminalinde mitokondrial sinyal

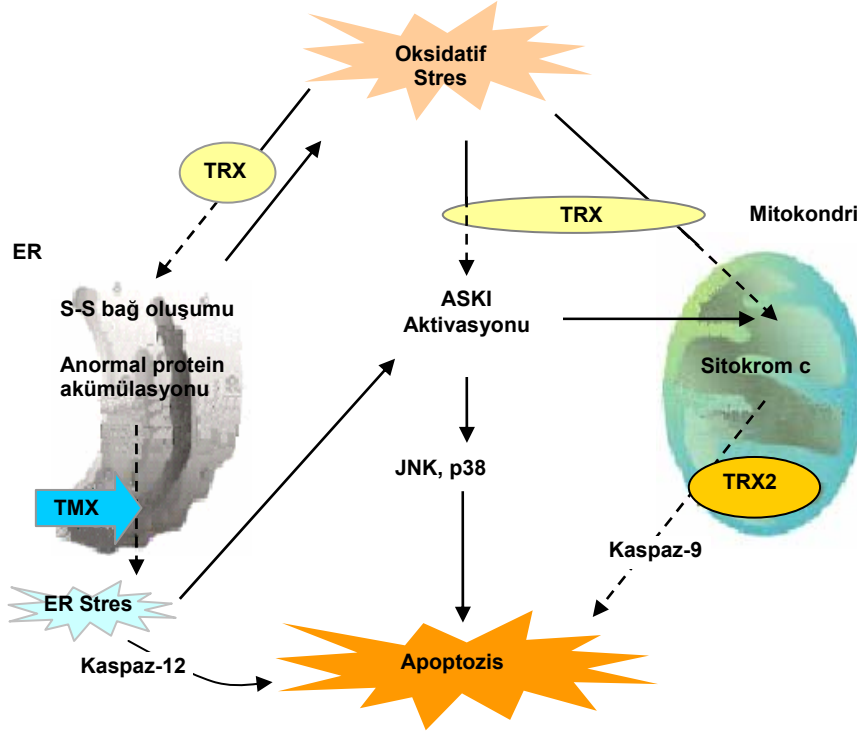
peptidi bulunur. Sitozolik Trx sistemini sitozolik peroksiredoksin (başlıca peroksiredoksin 1 ve 2), Trx ve sitozolik TrxR oluştururken; mitokondrideki Trx sistemini mitokondrial peroksiredoksin 3, Trx2 ve TrxR2 oluşturur. Trx2 yetersiz olan tavuk B-hücresinde (DT-40), hücre içi ROS birikmiş ve sitokrom c serbestleşmiş ve sonuçta apoptozis görülmüştür¹⁴⁶.

Trx2, mitokondride üretilmiş ROS'ları temizleyerek mitokondri aracılı hücre ölümünü engeller. Patolojik şartlarda ve solunum sırasında ROS'ların başlıca fizyolojik kaynağı mitokondridir.

Trx2 mitokondride sitokrom c'yi sıkıca bağlı tutarak apoptotik sinyali inhibe edebilir. Trx2 in vitro ve in vivo olarak sitokrom c ile veya mitokondrideki diğer moleküllerle direk olarak etkileşim içindedir¹⁴⁶. Transmembran tiyoredoksin-bağımlı molekül (TMX) de endoplazmik retikulumda (ER) stres nedenli apoptozisde koruyucu bir role sahiptir (şekil 9). Transmembran tiyoredoksin-bağımlı protein (TMX), aktif bölgesinde -Cys-Pro-Ala-Cys- sekansı bulunan ve N-terminalinde bir sinyal peptiti olan Trx benzeri yeni keşfedilmiş bir proteindir. TMX, ER'de lokalizedir ve stres-aracılı apoptozisde önemli bir rolü olduğu düşünülür³⁴.

Trx2'nin aşırı ekspresyonu, mitokondrial membran potansiyelinde bir artışa ve hücre ölümüne karşı bir dirence neden olur¹⁴⁷. Mitokondrial tiyoredoksin redüktazdan yoksun fareler, miyokardial fonksiyonların azalması ve karaciğerde bozulmuş hematopoezden dolayı embriyonik aşamada ölmüşlerdir¹⁴⁴.

Trx, aktif bölgesindeki ditiyolları aracılığıyla hücre içi ROS temizlemesiyle antiapoptotik etki gösterir. Sistein 69'daki S-nitrozilasyon, redükleyici aktivite ve antiapoptotik fonksiyon için gereklidir¹⁴⁸.



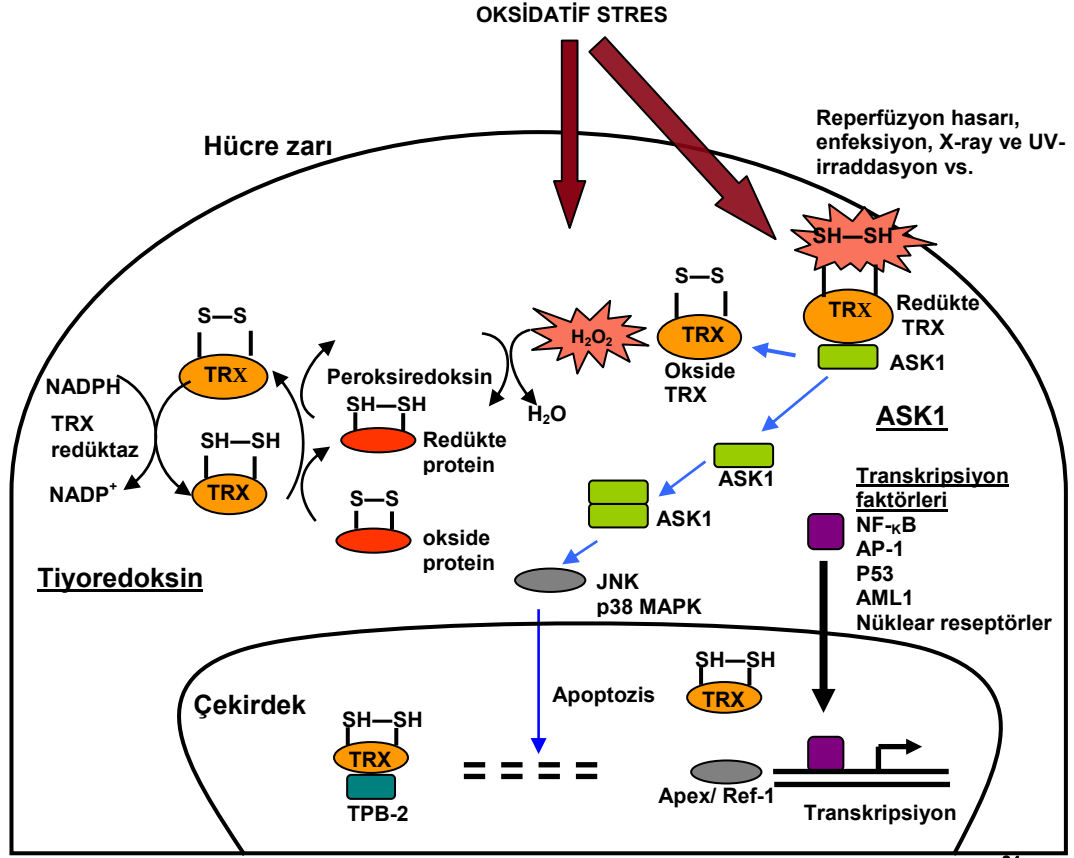
Şekil 9: Oksidatif stres, ER stresi ve mitokondrial apoptozis arasındaki ilişki³⁴.

2.3.4.5. Apoptozis sinyal-regüle edici kinaz 1 (ASK1)

ASK1 ilk olarak Ichijo ve ark. tarafından¹⁴⁹, mitojenle aktive olmuş protein (MAP) kinaz kinaz kinazlardan biri olarak tanımlanmıştır. MAP kinaz kinaz kinazlar, c-Jun N-terminal kinazı (JNK) ve p38 MAP kinazı aktive ederler ve stres-aracılı apoptotik sinyali indüklerler. Trx, oksidatif stres bağımlı ASK1 aktivasyonunun bir sensörü gibi rol oynar. Redükte Trx ASK1'i bağlayarak, ASK1 aktivitesini ve apoptozisi inhibe eder. Oksidatif stres koşulları altında Trx okside edilir ve ASK1'den ayrı durur, ASK1 aktivasyonu ve apoptozis görülür (şekil 8)¹⁵⁰.

ASK1 ayrıca TNF- α uygulanmış hücrelerde aktive edilir, bu durum ASK1'in stres-sebepli apoptozisle ilişkili olduğunu gösterir¹⁵⁰. Aktive olmuş ASK1, sitokrom c serbestleşmesini ve kaspaz aktivasyonu aracılığıyla apoptozisi indükler.

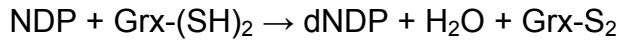
ASK1'in aktivasyonunun doğru moleküler mekanizması ve fizyolojik koşullarda Trx'in ASK1'i nasıl regüle ettiği daha fazla aydınlatılmalıdır. Apoptozisin regülasyonunda Trx sistemi ve ilgili moleküller şekil 10'da gösterilmiştir.



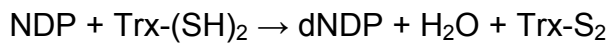
Şekil 10: Apoptozisin regülasyonunda Trx sisteminin ve ilgili moleküllerin rolü³⁴.

2.3.4.6. Deoksiribonükleotidlerin Sentezi

Çoğalan tüm hücrelerin özdeş DNA kopyalarının hazırlanması için deoksiribonükleotidlerin varlığı gerekir. Deoksiribonükleotidler, ribonükleotidlerin ribozunun ikinci karbonundaki hidroksil grubunun redüklenmesiyle oluşurlar. Bu reaksiyon, ribonükleotid redüktaz ile yerine getirilir ve redükleyici ekivalanları gerektirir. Bu ekivalanlar normal olarak glutaredoksinler (Grx) ya da tiyoredoksinlerden sağlanır¹⁵¹:



Veya



2.3.5. Medikal Yönden Tioredoksin Sistem

Bulaşıcı hastalıklar bakteri, mantar, parazit, virüs ve prion gibi patojenlerin bulaşması sonucu oluşur. Tioredoksin sistem antioksidatif sistemlerde anahtar bir oyuncudur. Metabolizmada solunum patlamasına karşı, immün sistem savunmasının ilk hattının bir parçasını oluşturur. İn vitro tioredoksinler, kendi inaktivasyonuna neden olan immünglobülinleri redüklemeye yeteneğindedirler.

Tioredoksin ve glutaredoksinde eksik bakterinin hayatta kaldığı ve çoğalabildiği, fakat büyüme hızının çok düşük olduğu ve bakterinin hayatta kalmak için besleyici bir ortama ihtiyaç duyduğu belirtilmiştir⁶⁴.

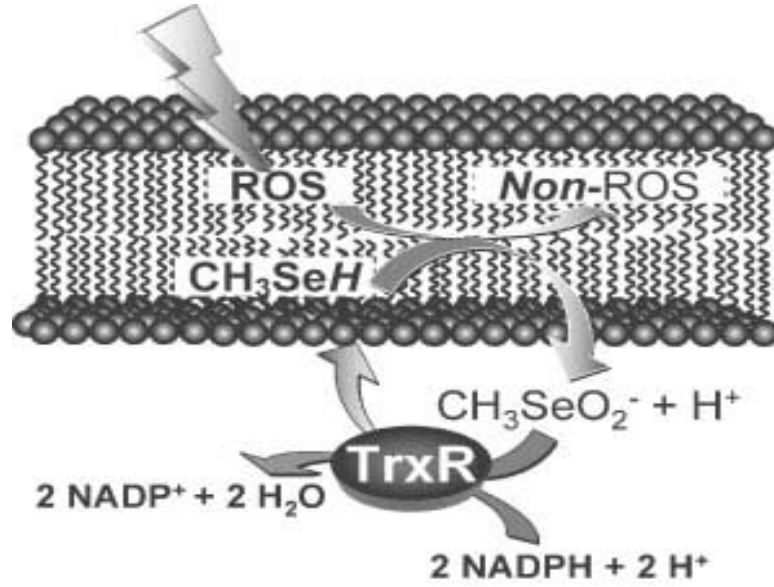
Bazı viral hastalıklar oksidatif stresin bir belirtisi olan artmış plazma tioredoksin düzeyleriyle ilişkilidir. Epstein-Barr virüsü (EBV) ve insan T-lenfotropik virüs tip 1 (HTLV-1) en iyi bilinen örneklerdir. Hepatit C virüsü (HCV) ile ilişkili hastalıklar -hepatoselüler karsinoma, karaciğer sirozu, taşıyıcılar, kronik hepatitler- artmış serum tioredoksin düzeyleriyle ilişkilidir¹⁵². Bazı araştırmacılar, hepatoselüler karsinoma dışında HCV-ilişkili diğer karaciğer hastalarında serum Trx düzeylerini yüksek bulmadılar¹⁵³. Tümörün cerrahi olarak çıkarılmasından sonra Trx düzeyleri düşmüştür. Kimyasal olarak oluşturulan neoplastik karaciğer nodülleri olan hayvan modellerinde, sağlıklı karaciğer dokusuna göre mitokondrial TrxR aktivitesi yaklaşık % 60 düşerken, sitozolik TrxR aktivitesi % 350 artmıştır¹⁵⁴. Sitozolik TrxR aktivitesindeki bu yükselme, artmış hücrel direnişin net bir sonucudur. Mitokondrial TrxR aktivitesindeki düşüş çok iyi anlaşılamamıştır.

Ayrıca HIV-bulaşmış kişilerde, serum tioredoksin düzeyleri yüksek bulunmuştur. Bu düzeyler, hastalığın ilerleme süreci ve aşamasıyla çok yakından ilişkilidir¹⁵⁴.

Bir tümörün akışında olayların düzeni, sıklıkla beş aşamaya ayrılır: başlama, ilerleme, lokal istila, uzağa metastaz, ve terapiye dayanma. Bütün aşamalarda tioredoksin sistem rol oynayabilir. Birçok karsinogen, reaktif oksijen türleri gibi radikallerin formasyonu aracılığıyla direk veya indirek olarak hareket eder. Tioredoksin sistem antioksidatif özellikleriyle bu potansiyel zararlı ajanların zararını azaltabilir.

Selenyum ilavesi, bazı tümör oluşum oranlarını azaltır¹⁵⁵: glutatyon peroksidaz ve tioredoksin redüktaz aktivitelerini artırır, bu aktivite artışı metilselenolun formasyonu ve sürekliliğini sağlayan dönüşüme neden olur. Metilselenol (CH_3SeH), selenyumun tümör engelleyici etkilerinde anahtar metabolit olduğu düşünülen bir bileşiktir¹⁵⁶.

Metilselenol, membrana kolaylıkla nüfuz edebilen ve ROS'larla reaksiyona girebilen ve onları detoksifiye edebilen küçük bir bileşiktir. Okside olmuş ürünler -metilseleninat veya metilselenenat-, metilselenol siklusunda TrxR tarafından kolaylıkla metilselenola redüklenirler (şekil 11)⁸⁷. Böylece metilselenolün membranları potansiyel zararlı ajanlardan temizlediği düşünülür.



Şekil 11: Metilselenol siklusunu. Membranın içinde veya kenarında yapılanmış ROS, metilselenol tarafından, reaktif olmayan ürünlere (non-ROS) detoksifiye edilir. Oluşan oksidasyon ürünleri, metilseleninat ve metilselenenat, membrandan sitozole geçer. Burada tiyoredoksin redüktaz (veya redükte glutatyon) tarafından metilselenol yeniden oluşturulur ve böylece metilselenol-siklusunu tamamlanır⁸⁷.

Birçok tümör çalışmasında, TrxR ve Trx düzeylerinin birkaç kat arttığı görülmüştür^{136,157}. Tiyoredoksin sistem, transforme olmuş hücreleri, hidrojen peroksit ve birkaç nitrik oksit türünden ve immun sistem ataklarından korur^{46,158}.

Trx/TrxR sisteminin sağladığı redükte hücre dışı tiyoredoksin, hücre dışında büyüme faktörü gibi görev yaparak tümör hücrelerini NK-lizinden ve TNF- α 'dan korur^{2,89,159}. Bu yüzden tümör hücrelerinde TrxR düzeyleri birkaç kat yüksek bulunmuştur.

Plazma membranı veya hücre dışı sıvıda aktif TrxR'nin varlığı, NADPH ile sağlanan indirgeyici ekivalanlara bağlıdır. TrxR'nin membranla ilişkili olarak ve hücrelerden salgılanabilen bir ürün olarak tanımlanmasına rağmen hücre içi indirgeyici ekivalanlar, TrxR ve hücre dışı substratlar arasında direk bir iletişim şimdiye kadar gösterilmemiştir.

Salgılanan redükte Trx, bu redükleyici görevi yerine getiriyor olabilir⁶⁴.

Trx göz merceğini oksidatif stresten ve katarakt oluşumundan korur¹⁶⁰, sıçan kalbinde reperfüzyon nedenli aritmileri önler¹⁶¹, akut iskemik kalp hastalığında koruyucu etki gösterir. Hepatoselüler karsinoma¹⁶², AIDS^{111,163}, Sjögrens Sendromu¹⁶⁴ ve romatoid artritlerde¹⁶⁵ Trx düzeyleri yüksek bulunmuştur.

2.3.6. Sinir Sistemi ve Tioredoksin Sistem

Merkezi sinir sistemi ve nöronlar, oksidatif hasar ve oksidatif stres kaynaklı hücre ölümlerine hassastır¹⁶⁶. Nöronlar yüksek derecede aerobik hücrelerdir ve oksidatif strese karşı direnme kapasiteleri şu özelliklerinden dolayı sınırlıdır;

(i) katalaminler ve doymamış yağ asitleri gibi kolay okside olabilen substrat içeriği yüksektir, bu da lipid peroksidasyonu için hedef oluşturur,

(ii) nispeten glutatyon (GSH)¹⁶⁷ ve glutatyon peroksidaz¹⁶⁸ (GPx) seviyelerinin düşük düzeylerinin bir yansıması olarak, düşük antioksidan kapasiteye sahiptir; karaciğer ve böbreğe göre beyin daha düşük koruyucu antioksidan sistemlere sahiptir,

(iii) vücutta tüketilen oksijenin % 20'si insan beyin hücrelerine aittir fakat beyin vücut ağırlığının sadece % 2'sini oluşturur, bu da beyin diğer organlara göre daha çok serbest radikal ürettiğine işaret eder,

(iv) beyin çeşitli bölgeleri yüksek konsantrasyonlarda demir ihtiva eder, bu da serbest radikal üretimini katalizleyebilir¹⁶⁹.

Beynin antioksidan savunması, düşük molekül ağırlıklı redoks bileşikler ve birkaç antioksidan enzim ailesinden oluşur¹⁷⁰. Redoks bileşikler; GSH, nikotinamid adenin dinükleotidler (NADPH, NADH), tokoferoller (Vit E), askorbik asit (Vit C), ubikinon (Q10) ve lipoik asitten oluşur. Antioksidan enzimler ise süperoksiti ($O_2^{\cdot -}$) dismutate eden sitozolik (Cu/Zn-SOD veya SOD-1) ve mitokondriyal (MnSOD veya SOD-2) süperoksit dismutazlar, hidrojen peroksiti (örneğin SOD'larla oluşan hidrojen peroksitleri) redükleyen katalaz ve peroksidazlar, yağ asitleri ve lipid hidroperoksitleri indirgeyen peroksidazlar, ve tioredoksin izoenzimleri¹⁰⁷ ve glutaredoksinler gibi çeşitli disülfid redüktazlardır.

Merkezi sinir sisteminde peroksit redüklenmesinin, çoğunlukla fosfolipit-hidroperoksit glutatyon peroksidaz (GPx4) ve GSH

peroksidaz (GPx1)^{171,172} ile GSH sistemine dayandığı varsayılsa da, aynı zamanda bu redükleme peroksiredoksinler (Prx) olarak adlandırılan Trx peroksidazlar aracılığı ile de yapılabilir. Nörodejeneratif hastalıklı hayvan modelleri ve hücre kültürü deneylerinde, spesifik antioksidan enzimlerin ekspresyonlarının genetik işleyişi, çeşitli nörodejeneratif durumlardaki oksidatif stres ve mitokondrilerin ilişkisi hakkında indirek kanıtlar sağlar³⁸.

Enerji üretiminde mitokondrinin rolü ve SSS'de hücre devamlılığının regülasyonu, mitokondriyal Trx izoenzimlerinin fonksiyonlarına olan ilgiyi artırmaktadır. Bu konu ile yapılan bir çok çalışmada SSS'de nörotrofik ve nöroprotektif etkileri dahil Trx enzimlerinin önemli fonksiyonlarına dikkat çekilmiştir^{1,37,107,173}.

2.3.6.1. Merkezi Sinir Sistemi (SSS)'de Trx İndüksiyonu

Çeşitli hormonlar, toksik olmayan kimyasallar ve enfeksiyon ajanları dahil stres koşulları Trx1 ekspresyonuna neden olur¹⁷⁴. Mekaniksel sinir hasarı ve geçici beyin iskemisi, çeşitli beyin bölgelerinde ve hücre tiplerinde Trx1'i indükler. Bu durum oksidatif stresin ve belirtilen beyin hasarlarının yenilenmesinde veya korunmasında Trx1'in fonksiyonunu belirtmektedir¹⁷⁵⁻¹⁸⁰. İskemik strese cevapta, Trx1'in up-regülasyonu ile nöronların canlılığının devamlılığı ilişkilendirilmiştir^{178,179}. Neonatal farelerde hipoksi-iskemi uygulanması, Trx'in reaktivitesinin redüksiyonuna ve infarkt beyin bölgelerinde nöronal hasarla ilişkili olan peroksinitrit ürünlerinin uyarılmasına neden olmuştur. Bununla birlikte infarkt bölgesinin dışındaki korteks nöronları Trx1 indüksiyonu göstermiştir. Bu da Trx'in nöron koruyucu fonksiyonuna işaret edebilir¹⁸¹.

2.3.6.2. Trx1 ve TrxR'nin Sekresyonu

Astroglial hücreleri iskemi sırasında Trx1 ekspresyonuna neden olan başlıca hücre tipidir¹⁷⁷. Düşük konsantrasyonda hidrojen peroksite maruz kalmış astrositoma (U251) hücreleri, kültür ortamında Trx1 salarlar¹⁸². Bu durum glial hücrelerinin, nöronlar için antioksidan desteğini ve nörotrofik etkisini göstermektedir³⁸.

SSS'de TrxR izoformlarının ekspresyonu hakkında sınırlı bilgi vardır³⁸. Schwann hücreleri ve Ranvier nodülleri¹⁷⁵ gibi nöronal sıçan hücrelerinin sitoplazmalarında yoğun Trx1 ve TrxR immunoreaktivitesi görülmüştür. Beyin, üç TrxR izoformlarının en düşük eksprese edildiği organlardan biri olmasına rağmen, TrxR1 beyinde diğerlerine göre en yüksek olan izoformdur⁷³.

2.3.6.3. Transgenik Trx1 Ekspresyonunun Nöron Koruyucu Etkileri

Beyin dahil birçok dokuda, insan Trx1'inin (hTrx1) aşırı ekspresyonu ile transgenik fareler oluşturulabilir (5 kat artış)¹¹⁹. hTrx1 ekspresyonu glial ve vasküler endotelial hücrelerinde, kortekste, hipokampusta ve piramidal nöronlarda lokalize olmuştur. Transgenik farelerin yaşam süresi uzamıştır, bu durum memelilerde antioksidan enzimlerin ekspresyonunun uzun yaşam süresiyle ilişkisini göstermektedir. Bunun yanı sıra, bu fareler doğal tiplerine göre, focal beyin iskemisine ve eksitotoksik strese karşı daha dayanıklıdır¹²⁰.

Bir saatlik focal iskemiden sonra, protein oksidasyonu belirteci olan protein karbonil içeriklerinin artışı Trx1 transgenik fare beyinde baskılanmıştır, bu Trx1'in nöron koruyucu antioksidan rolünün göstergesidir¹¹⁹. Bununla birlikte, iskemik hasarın azalmasında etkili olan *c-fos*'un indüksiyonu, transgenik olmayan hayvanlarla karşılaştırıldığında daha fazladır. Üstelik iskeminin neden olduğu nörolojik hasarlar, doğal tiplere oranla daha fazla düzelme gösterir^{119,120}. Bütün bunlar Trx1'in SSS'deki antioksidan nöroprotektif fonksiyonlarını göstermektedir.

Farelerde, rekombinat insan Trx1'in (rhTrx1) damardan verilmesinin geçici serebral iskemiyi izleyen beyin hasarını azalttığı gösterilmiştir. rhTrx, protein karbonil içeriğini ve iskemiye cevapta MAPK p38 aracılı stresin aktivasyonunu azaltmıştır¹⁸³.

2.3.6.4. Nörotrofik Kofaktör Olarak Trx1

Sinir büyüme faktörü (NGF) SSS'nin fonksiyonlarında, devamlılığında ve gelişmesinde temel rolü oynayan prototip bir nörotrofik faktördür¹⁸⁴. NGF, nöronal fonksiyonlar için gerekli olan *c-fos* gibi kritik genlerin transkripsiyonal aktivasyonu gibi birçok sinyal yolunu aktive eder¹⁸⁵. Trx1'in, NGF sinyal yollarında önemli bir oyuncu olduğu ileri sürülür. Trx1, feokromositoma hücre (PC12) aksonlarının doğal gelişimi ile ilişkilidir. PC12 hücrelerinin NGF kaynaklı farklılaşması, aktif Trx1'e bağlıdır. NGF Trx1'in ekspresyonunu etkinleştirir, ayrıca Trx1'in nüklear translokasyonuna neden olur¹⁸⁶. Trx1, AP-1 ve Ref-1 gibi ko-aktivatörlerin ve çeşitli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunun devamını sağlar. AP-1 ve Ref-1, Trx1 ile redoks-regüle edilirler ve farklılaşma sürecinde rol alırlar.

SSS malignansilerinde Trx1'in potansiyel rolü hakkında çok az şey bilinmektedir. Trx1 ve TrxR1 seviyeleri astrositomalarda yükselmiştir^{187,38}.

2.3.6.5. Selenyum, TrxR'ler ve Beyin Fonksiyonları

Selenyum insan sağlığı ve beyin fonksiyonları için nemlidir⁷. Selenyum, TrxR aktivitesi için gereklidir ve kültür hücrelerine 1 μM Se ilavesiyle TrxR aktivitesinin 40 kat arttığı gzlenmiřtir¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Selenyum diyetindeki değişiklikler TrxR aktivitesini etkiler.

Biyolojik olarak aktif selenosistein (Sec) şeklinde proteinlere katılır. Anahtar antioksidan enzimlerden GPx ve TrxR izoformlarının da dahil olduğu 25-30 selenoprotein fonksiyonu ve enzimatik aktiviteleri için Se gereklidir¹⁹¹. Selenyumun kimyasal özellikleri, selenoproteinlere redoks aktivite kazandırır¹⁹². Selenyum yönünden eksik beslenildiğinde beyin, selenyum eksikliğinin görüldüğü en son organdır¹⁹³. Bu da sinir sisteminde selenoproteinlerin kritik minimal seviyelerinin korunmasının önemine işaret eder.

Memeli beyinde karakterize edilmiş başlıca selenoproteinler TrxR1, TrxR2, GPx1, GPx4, iyodotironin deiyodinaz 2 ve 3 ve selenoprotein P'dir. Selenoprotein P, beyinde selenyum dağılımından sorumludur ve antioksidan aktiviteye sahiptir¹⁹⁴. Selenyum takviyesi, özellikle çeşitli TrxR ve GPx izoformları gibi değişik selenoproteinlerin sentezini up-regüle eder³⁸. Selenoprotein P, TrxR ve GPx izoformları gibi önemli antioksidan selenoproteinlerin sentezi için gerekli olan Se'nin, beyinde yeterli seviyesinin korunması için gereklidir¹⁹⁵.

2.3.6.6. Alzheimer Hastalığında (AD) TrxR ve Trx

Düşük Trx1 protein seviyesinin aksine, AD beyinlerinin serebellum ve amigdala bölgelerinde TrxR aktivitesi dikkate değer şekilde daha yksektir¹⁹⁶. TrxR aktivitesi ile birlikte SOD1, katalaz, GPx, GSSG redüktaz gibi diğer ana antioksidan enzim aktiviteleri de lipit peroksidasyonunun güçlü olduğu farklı AD'li beyin bölgelerinde artmıřtır¹⁹⁷. Antioksidan enzimlerin bu yükselişi, artmış oksidatif stresi gidermek için telafi edici bir cevabın yansımasıdır^{197,198}. Aynı zamanda, primer rat hipokampal hücre kültürüne *E.coli*'den izole edilmiş eksojen Trx ve TrxR'nin uygulanması, bu hücrelerin β -amiloid sitotoksitesine karşı hayatta kalmasını artırmıřtır¹⁹⁸. Bu da Trx'in AD'de koruyucu bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Trx1'de yetersizlik, oksidatif stresin artmasına ve sonuçta AD'de nörodejenerasyona sebep olabilir. Muhtemelen Trx enzimlerinin ekspresyonu, optimal beyin hücre fonksiyonlarını korumak ve strese karşı cevapta uygun savunmaları oluşturmak için sıkı bir şekilde regüle edilmektedir³⁸.

2.3.6.7. Prx'lerin Nöron Koruyucu Fonksiyonu

SSS'de Prx izoformlarının nöron koruyucu fonksiyonlarını gösteren ve beyinde çeşitli hasarlara cevap olarak Prx izoformlarına rastlandığını ifade eden bir çok çalışma yapılmıştır³⁸. Prx2'nin aşırı ekspresyonunun, nöronal kültür hücrelerini büyüme faktörü eksikliğinin neden olduğu hücre ölümlerinden koruduğu gösterilmiştir¹⁹⁹.

2.4. Epidermal Growth Faktör (EGF) ve Etkileri

EGF, ilk kez 1962 yılında Dr. Stanley Cohen tarafından erkek fare çene altı tükürük bezinden izole edilmiştir²⁰⁰. 53 aminoasitten oluşan mitojenik bir polipeptittir²⁰¹. Etkisini, yüksek ve düşük affiniteli bağlanma bölgeleri olan spesifik reseptörü (EGF-R) aracılığı ile yapar. EGF'nin reseptörüne bağlanması reseptörün tirozin kinaz aktivitesini uyarır, fosforilasyon reaksiyonlarını başlar ve bunun sonucu olarak DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi uyarılır²⁰². EGF ve reseptörünün birçok dokuda bulunmasının yanı sıra, gelişmekte olan ve olgun beyinde ve serebrospinal sıvıda da tespit edilmiştir²⁰³. EGF-R, beyin tümörlerinde yüksek derecede artmıştır²⁰⁴.

Epidermal büyüme faktörünü sinir sistemi kaynaklı çeşitli hücre morfolojisi değişikliklerinin²⁰⁵ ve fosforilasyon reaksiyonlarının²⁰⁶ oluşumunu sağlar, sinir sistemi destek dokusu hücreleri üzerinde mitojenik aktiviteye sahiptir ayrıca çeşitli peptitlerle paralellik sağlayarak, nörotransmitter ve nörotrofik molekül gibi görev yapar²⁰⁶. EGF-R'ler insan sinir sisteminin gelişmesi ve olgunlaşması boyunca fonksiyon gösterir²⁰⁷.

EGF yeni doğan beyinde nörotrofik etki gösterir. Bir nöromodulator olarak da en az üç nöronal enzimi indükleyebilir: kolin asetiltransferaz, glutamik asit dekarboksilaz, tirozin hidrosilaz²⁰⁸.

Sinyal molekülleri olan polipeptit büyüme faktörlerinin genel etki mekanizmaları: sentezlendikleri bölgelerden salınmaları, kendi hedef hücre yüzeyindeki membran-bağlı spesifik reseptörlerine bağlanmaları, bu reseptörlerin fosforilasyonu ve dimerizasyonunu sağlamalarıdır. Sırayla, reseptörler hücre içi ikincil mesajcıların kaskadını aktive ederler ve bu da gen ekspresyonunun modifikasyonu ve birçok selüler cevabın oluşturulması (hücre bölünmesi, farklılaşması, göçü) ile sonuçlanır²⁰⁹.

EGF, hücreler arası iletişim mekanizmalarında en iyi çalışılan sinyallerden biridir. Hayvan organizmada yaygın bir şekilde iş görür, hücre proliferasyonunu stimüle eder, farklılaşmayı regüle eder ve morfogenezisde hücre kararlılığının akıbetini belirler.

H₂O₂ ve O₂[•] anyonu gibi ROS'lar, solunumda oksidatif fosforilasyon sırasında oluşan yan ürünlerle ve birçok toksik reaksiyonla oluşur. Bu reaktif türlerin makromoleküller üzerine zararlı etkisi olduğu bilinse de hücre sinyal sisteminde önemli bir rol oynarlar²¹⁰. Bu süreçte inflamasyona, hücre proliferasyonuna, angiogeneze, apoptozise ve yaşlanmaya da neden olurlar²¹¹. Birçok sitokin ve büyüme faktör kaynaklı sinyal aktarım mekanizmaları redoks hassastır ve ligant ile uyarılmış ROS üretimi, bu kompleks sinyal reaksiyonlarında önemli rol oynar. EGF sinyaline cevap olarak ROS'un oluşumu, sitozolik Trx1'in oksidasyonuna sebep olur²¹².

Hücre içi oksidatif stres, baskın bir şekilde tiyol-redükleyici sistemlerle (tiyoredoksin/peroksiredoksin sistem veya glutatyon/glutatyon bağımlı peroksidaz sistem) kontrol edilir. Bu sistemler (i) hücre içi redoks olaylarını, (ii) regüle olmuş aktivasyon ve transkripsiyon faktörleri ile hücre ölümü ve hücre büyümesini regülasyonunu, (iii) hücrelerin sitokinlere duyarlılığını ve (iv) apoptozis yolundaki komponentleri kontrol eder. Bu sistemler proteinin sistein sülfidril (-SH) gruplarının oksidasyon ve redüksiyonu üzerinden fonksiyon gösterirler. Proteinin sistein rezidülerindeki SH'ların oksidasyonu konformasyonel değişikliklere neden olur. Özellikle molekül içi ya da dışı sistein formlarının disülfid bağları, sinyal yolunun modülasyonu için çok önemli olabilir²¹³. GSH ve Trx sistemleri gibi antioksidan sisteme sahip hücreler bir büyüme faktörü gibi, antioksidan gibi, ve/ya oksidatif stresin zararlı düzeylerine karşı korumada enzim kofaktörü gibi rol oynarlar²¹⁴.

EGF'nin SSS nöronlarının ölümünü engellediği düşünülür ve SSS nöronlarında EGF reseptörünün ekspresyonu olduğu bildirilmiştir, bu da EGF'nin nöronları çeşitli hasarlardan koruyucu rol oynadığına işaret edebilir²¹⁵.

Birçok polipeptid büyüme faktörünün, in vivo ve in vitro olarak iskemik hasarda veya eksitotoksisteye karşı belli derecelerde koruyucu olduğu gösterilmiştir. Bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve EGF'nin beraber uygulandığı kültürlerde, eksitotoksisteye karşı çok yüksek ve çok önemli bir koruma sağlanmıştır²¹⁶.

EGF'nin nöron morfolojisi üzerine etkisi yoktur. Kurtarıcı etkisini, EGF-aracılı artmış hücre proliferasyonu oranı üzerinden yapıyor olabilir²¹⁵.

Nörotrofik faktörler, nöronal hücrelerde oksijen sebepli apoptozisi önlerler. EGF ve bFGF, çeşitli nöronal hücrelerin yaşama oranını ve farklılaşmasını artırır. EGF nörotrofik faktördür ve nöronları oksidatif hasardan koruyucu rolleri vardır²¹⁵.

EGF'nin nöroprotektif etkileri, protein sentezi inhibitörleri varlığında durmuştur. Hippokampal nöronal kültürde, büyüme faktörü uygulanmasının önemli detoksifiye ajan olan glutasyon redüktaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerinin ekspresyonunu artırdığına işaret edilmiştir. Nöroprotektif etkinin neden olduğu başka bir muhtemel yol kalsiyum bağlayıcı proteinlerin up-regülasyonudur. Büyüme faktörleri, nitrik oksit aracılı hücre ölümlerini redükleyebilme eğilimindedirler. Birçok çalışma, büyüme ve nörotrofik faktörlerinin nöral progenitör hücrelerin proliferasyonuna ve farklılaşmasına neden olduğunu göstermiştir^{217,218}.

2.5. Tümör Nekroz Faktör (TNF- α) ve Etkileri

Tümör nekroz faktör (TNF- α), peptit sinyalizasyon moleküller ailesinin bir üyesidir. Biyolojik aktivitesini yüksek-affiniteli reseptörleriyle etkileşime girerek gösterirler. İnsan TNF- α 'sı, membran-bağlı polipeptit prekürsörü (26 kDa) olarak sentezlenir. Proteolitik parçalanmayla çözünür form olan aktif trimer polipeptite (17 kDa) dönüşür. Bu proinflatuvar sitokin monositler, makrofajlar, T ve B lenfositler, nötrofiller ve mast hücrelerinin uyarılması sonucu üretilirler. Buna ilaveten iskemik ve travmatik beyin hasarı, TNF- α 'nın prekürsör peptidi olan proTNF α 'nın sentezini indükler, membran-bağlı proTNF α 'yı hidroliz eden proteolitik enzimleri aktive eder ve çözünür TNF- α 'nın hücre dışına geçmesini sağlar.

Hücre bölünmesini engelleyen sitokinler, büyüme faktörlerinin hücre bölünmesi için aktive ettiği mekanizmaları inhibe ederler. TNF- α , reseptörlerin inaktive edilmesini sağlayarak veya hücre bölünmesi sağlayacak sinyallerin iletilmesini engelleyerek büyüme faktörlerini down-regüle edebilir. Hatta otokrin büyüme faktörlerinin üretiminde düzensizliklere yol açarlar. Alternatif olarak tümör supresör genlerinin (ör p53 geni) veya onların düzenleyicisi olan protein kinaz veya fosfatazların üzerinden etki göstererek hücre bölünmesine yol açan mekanizmalara ket vurabilirler²¹⁹.

TNF- α normal hücrelerin proliferasyonunu stimüle eder. Tümör hücrelerine karşı, hücre gelişimini ve çoğalmasını önleyen ve hücreyi dejenere eden bir aktivite sergiler. Birçok sinyal yolunu aktive eder, inflamatuvar, antiviral ve immünoregülator etkilere sebep olur. İki tane ayrı hücre yüzey reseptörü ile etkisini gösterir. Reseptörlerin hücre dışı kısımları homoloji gösterirken, sitoplazmik kısımları farklı yapıdadır. TNFR1 ölüm bölgesi içerirken, TNFR2 içermez. Bu yüzden TNFR1, hücrenin yaşaması ve ölmesi ile ilgili sinyal bildirirken, TNFR2, sadece hücrenin yaşaması ile ilgili sinyal bildirir²²⁰. Yaşlanma sırasında, TNF- α üretimi yükselir^{221,222}.

TNF- α apoptozise neden olur, ASK1'i aktive eder. TNF- α , sitokrom c serbestleşmesinin ardından, mitokondrial solunum zincirinde kompleks1'i inhibe eder ve mitokondrial membran permeabilite geçişlerini indükler. Glutasyon (GSH) yetersizliği, mitokondriden sitozole sitokrom c salınımına sebep olur. TNF- α , GSH yetersizliğine neden olur, üstelik TNF- α 'ya cevap olarak, ROS üretiminin arttığı durumlar ispatlanmıştır^{223,224}.

Klinik çalışmalar, HIV ensefalitis²²⁵ ve menenjit²²⁶ gibi SSS'nin inflamatuvar hastalıklarında yüksek TNF- α miktarlarını ispatlamıştır.

TNF- α , TNFR'lerle ve EGFR transaktivasyonu ile NF- κ B'yi aktive eder. TNF-nedenli NF- κ B aktivasyon sinyal yolunda, ROS'ların önemli rolleri vardır²²⁷. Hücre içi üretilmiş olan ROS'lar sinyal yolunda ikincil mesajcı gibi rol oynarlar²²⁸. ROS'ların bu sürece nasıl dahil olduğu çok açık değilse de akla yatkın bir mekanizma, protein-tirozin fosfatazların geri dönüşümlü inaktivasyonu olabilir. Yani ROS, EGF reseptörünün redoks aktivasyonunu modüle edebilir²²⁹. Çünkü bütün protein-tirozin fosfatazların, reaktif sistein rezidüleri içeren katalitik bölgeleri vardır. Kataliz süresince tiyol-fosfataz formunda olup, bu rezidülerin oksidasyonu protein-tirozin fosfatazların inaktivasyonuna neden olur. Glutasyon ve Trx sistemleri gibi tiyol-aracılı redoks sistemlerin bu oluşumlarda yer aldığı gösterilmiştir^{140,46}.

Trx'in aşırı ekspresyonu, TNF-nedenli EGFR fosforilasyonunu baskılamıştır; Liu ve ark.²³⁰, sadece TNF'nin değil aynı zamanda TRAF2'nin (TNF reseptör-ilişkili faktör) aşırı ekspresyonunun da ROS üretimini beslediğini ve Trx yüksek ekspresyonunun veya antioksidanların uygulanmasının bu sinyal kaskadının akışını baskıladığını göstermişlerdir.

2.6. Beyin İskemisi

İskemi, kan akımının hücresel fonksiyonları karşılamak için gerekli olan düzeyin altında olması durumudur. Aerobik koşullarda yaşayan biyolojik organizmalar, temel yaşam kaynakları olan oksijen ve metabolik substratlar ortamda bulunmadığı zaman canlılıklarını belirli bir süre devam ettirebilmektedirler. Merkezi sinir sistemi vücutta, kısıtlı anaerobik metabolizması ve glikojen depoları nedeniyle iskemiye en duyarlı dokulardan biridir. İskemik bölgesinin çevresinde kollaterallerce sağlanan kalan kan akımının olması, nöronların kısa bir süre için olsa da morfolojik ve biyokimyasal bütünlüğünü korur. İskemi sonucunu belirleyen en önemli iki faktör iskeminin derinliği ve iskeminin süresidir.

İskemide, oksijen olmadığı için mitokondrial elektron transportu ve oksidatif fosforilasyon kapasitesi giderek azalır. Beyinde ATP sentezi durmasına karşın ATP kullanımı sürer. ATP hidrolizi sonucunda adenozin difosfat (ADP) konsantrasyonu artar. Fosfokreatinin depoları tükeninceye kadar kreatin kinaz reaksiyonu ile ATP yapımı bir süre daha devam eder. Daha sonra ATP tamamen tükenir.

İskemide enerji eksikliği, asidoz, makromolekül sentezinin durması, eksitotoksikite, iyon dengesinin bozulması, serbest radikal aracılı toksisite ve ATP yıkım ürünlerinin birikmesi görülür⁶.

İskemi sonrası meydana gelen ve nöronal ölüme katkıda bulunan enerji eksikliği ve sonrasında gelişen olaylar, birbirinden bağımsız olarak ele alınır fakat bunlar birbiriyle derin ilişkiler içindedirler. Örneğin, yükselmiş kalsiyum ard arda meydana gelen reaksiyonlara yol açar ve serbest radikal üretimine neden olur. Serbest radikaller ve iyon homeostazis kaybı, enerji eksikliğine, glutamat aracılı eksitotoksikiteye ve yüksek kalsiyuma katkıda bulunur, yüksek kalsiyum eksitotoksikiteyi artırır.

Normalde, ATP bağımlı pompalar ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPaz}$, $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPaz}$), sodyum ve kalsiyumu nöronların dışına, potasyumu nöron içine pompalarlar (Na 10:1; Ca 10000:1; dış:iç). Bu aktif pompalar, nöronal ATPnin % 50 sinden fazlasını tüketir²³¹. Ayrıca pasif iyon sızıntıları da vardır. Sodyum ve kalsiyum pasif olarak, konsantrasyon gradiyentine bağlı bir şekilde nöronların içine geçer. Pasif iyon çatlakları, iskemi sırasında nöronların depolarizasyonu ile ve membran permeabilitesindeki artış ile fazlaşır. ATP kaybı ile pompalar hasar görür, bozulmuş pompalarla ve sızıntıların artmasıyla Na ve Ca içeri, K dışarı yönelir. Bu durum, hücre membranını depolarize eder, kalsiyum artışı olur ve glutamat serbestlenir. Üstelik, hücre dışı K artışı yükselir ve Na ve Cl^- nin içeri alımıyla oluşan ozmotik gradiyenti takiben nöronlarda su birikmeye başlar. Bu da nöronal şişme veya sitotoksik ödem ile sonuçlanır⁶.

Sinaptik membranların yükselmiş Ca ile depolarizasyonu, nörotransmitterlerin salınımını da içeren birçok hücre içi olay için fizyolojik sinyal aktarım mekanizması oluşturur. Dopamin, gama amino bütirik asit, asetilkolin ve aspartat gibi diğer nörotransmitterlerin serbestleşmesi de bu durum karşısında etkilenmiştir²³². Nörotransmitterlerin sentezi için ATP, oksijen ve Krebs siklusu fonksiyonu gereklidir ve bu fonksiyonlar iskemiden dolayı düşüktür⁶.

Glutamat beyinde majör uyarıcıdır ve iskemi araştırmalarında en çok dikkate alınan ve çalışılan nörotransmitterdir. İlk olarak 1969'da Olney ve Sharpe, eksitatör aminoasit olan glutamatın fazla miktarlarının nöronlara toksik olabileceğini saptamışlar ve eksitotoksisite kavramını tanımlamışlardır²³³. İskemide glutamat ve aspartatın hücre dışı seviyelerinin yüksek bulunması iskemide eksitotoksisitenin önemli olduğunu düşündürmüştür²³⁴.

Eksitotoksinlere maruz kalındığında mitokondri aşırı miktarlarda kalsiyum ile yüklenir. Mitokondrilerin kalsiyumla yüklenmesi; hasarlanmış mitokondriyal membranını daha da bozar, enerji yoksunluğuna, sitokrom c salınımına ve artmış süperoksit oluşumuna neden olarak eksitotoksik nöron ölümünü tetikler²³⁵.

Redoks sinyalizasyonda biyokimyasal olarak hücre içi, serbest sülfidril gruplarıyla redükte bir durumda tutulurken hücre dışı, stabilize olmuş disülfidlerle okside durumda tutulmalıdır. Redükte durumda, hücre içi çevrenin sürdürülmesinden sorumlu disülfid redüktazlar olan tiyoredoksinlerin oksidatif stres ile indüklendiği belirtilmiştir^{236,237}.

Tiyoredoksin, iskemi/reperfüzyon esnasında ROS sinyalizasyonunun redoks regülasyonunda çok önemli bir rol oynuyor gibi görünmektedir²³⁸. Trx oksidasyonunun bir sonucu olarak Trx ekspresyonunun redüksiyonu, oksidatif stresin gelişimine yol açar ve apoptotik hücre ölümüne neden olur¹⁵⁰.

Son zamanlarda yapılan araştırmalar, sinir sisteminde Trx'in rolü ve önemini göstermiştir. Kısmi tek taraflı kesip çıkarma¹⁷⁹ ya da iskemi-reperfüzyon¹⁷⁶ şeklinde beyin dokusuna yapılan direk travma, hasarlı bölge içinde ve çevresindeki nöronal hücrelerde ve glial hücrelerde Trx ekspresyonunu up-regüle edebilir. Bu durum nöronal popülasyon çevresinde bir bakıma koruyucu etki sağlıyor olabilir^{179,182,239,24}.

Trx'in, bir antioksidan olmasının yanında potansiyel strese yanıt aracı olduğu da in vitro ve in vivo olarak çeşitli hücrelerde ve dokularda gösterilmiştir.

Normal durumda Trx immünoaktivitesi, nöronal ve glial hücrelerinin çekirdeğinde olduğu kadar sitozolünde de tespit edilmiştir. Nüklear kompartmanda sitoplazmaya göre daha güçlü bir reaktivite vardır. Normal durumda Trx, nüklear kompartmanda çok daha önemli roller oynar. Fakat sinir hasarını takiben, sitozolik kompartmandaki reaktivite artışı daha hızlıdır. Trx, sinir hasarıyla birlikte transkripsiyon faktörlerinin aktivatörü olmak gibi bir fonksiyona da sahiptir^{140,241}.

TNF- α düzeyleri serebral iskemi dahil birçok SSS hastalıklarında beyin dokusunda, plazmada ve serebrospinal sıvıda (CSF) artmıştır²⁴². TNF- α mRNA'sının ekspresyonu, sıçanlarda fokal serebral iskemi sonrasında 30. dk'dan 5. güne kadar yükselmiştir. TNF- α , fokal iskemik beyin hasarını şiddetlendirir ve bloke edilmiş endojen TNF- α 'nın, nöroprotektif olduğu düşünülür²⁴³.

Farelerde geçici fokal serebral iskemi sonrasında TNF- α ekspresyonu kan beyin bariyeri (BBB) geçirgenliğini artırmıştır. Geçici iskemik fare modellerinde TNF- α ekspresyonu ile BBB bozukluğu arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir²⁴⁴.

Serebral iskemi protein sentezini ve baskın olarak translasyonu azaltır⁶. İskemi sonrası bazı gen gruplarının transkripsiyonu ve translasyonu artar. Bunlar early genleri (c-fos, fos-B, c-jun, jun-B...) ²⁴⁵, stres genleri (heat şok proteinleri, hemoksijenaz...) ²⁴⁶ ve büyüme faktörlerini kodlayan genler ve reseptörleridir. Bazı büyüme faktörleri ratlarda kalıcı fokal iskemiyeye karşı koruyucu gibi görünmektedir²⁴⁷.

Nöronlar iskeminin ardından nekrozis veya apoptozis ile ölürler. Nekrotik hücre ölümü, erken mitokondri ve hücre şişmesi, plazma membranının yırtılmasıyla hücre içeriğinin serbest bırakılması ve inflamasyon ile karakterizedir. Zıt olarak apoptozis, spesifik genlerin transkripsiyonu ve daha sonraki protein sentezleri ile belirlenmiş olan hücre ölümüdür. İnflamasyon yoktur. Hücre ölür ve makrofajlar tarafından fagosite edilir⁶.

2.6.1. İskemide Serbest Radikaller

Normal beyin dokusunda süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, ve peroksinitrit anyonu gibi reaktif oksijen türlerinin üretimi, endojen enzimatik (örneğin SOD, GPX ve katalaz) ve nonenzimatik (örneğin glutatyon, ürik asit, α - tokoferol, Vit C ve Vit E) savunma sistemleri ile dengededir.

Oksidatif stresin özellikle postiskemik reperfüzyon aşamasında radikal üretimi ile oluştuğu hipotezi olsa da, 1980'lerin ortasında ilk defa, iskemik hasarın da oksidatif stres oluşturabileceği söylenmiştir⁵.

Serbest radikaller hücresel toksindir. Serbest radikal çöpçüleri hücre içinde bulunurlar, çünkü elektron transportu, eikosanoid sentezi, purin metabolizması, katekolamin otooksidasyonu ve sitokrom P450 redüktaz gibi enzimlerin fonksiyonu gibi çeşitli normal hücre reaksiyonları serbest radikaller oluşturur. İskemi sonrası reperfüzyon, artmış serbest radikal üretimiyle ilişkilidir. Reperfüzyonla oluşan oksijenin istilası süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil serbest radikallerinin üretimine neden olur. Reperfüzyon, serbest radikal üretiminin artması için şart değildir, serbest radikaller iskemi sırasında da oluşabilirler. Serbest radikallerin uzun süreli iskemide önemli olduğu düşünülür⁶.

Mitokondride elektron transport zinciri boyunca elektronların geçişi, süperoksit radikallerini ve hidrojen peroksit radikalini üretir. İskemi süresince, bu reaktif oksijen türlerinin sızıntısının artması, onların diğer reaksiyonlara katılmasına izin verir. SOD beyin iskemisinde serbest radikal reaksiyonlarını başlatarak, süperoksitin hidrojen peroksite parçalanmasını kataliz eder, hidrojen peroksit katalaz veya glutatyon peroksidaz ile oksijen ve suya metabolize olur. Süperoksit anyonu, patolojik iskemik beyin hasarının ve beyin ödeminin başlangıcında pivotal rol oynar²⁴⁸. Diğer bir reaksiyonda ksantin oksidaz hipoksantin ve ksantin, süperoksit ve hidrojen peroksitin oluşumu ile beraber ksantin ve ürik asite dönüşümünü kataliz eder. Bu oksijen türlerinin daha reaktif olan hidroksil radikal formlarına olan reaksiyonu demir varlığında katalizlenir. Demir, iskemi sırasında görülen asidozis ve diğer ileri reaksiyonlar ile, hücre içi depo transferrinden serbestleşir. İskemi sırasında serbest radikallerin üretiminin artması, normal hücre savunmasını bastırabilir. Nöronlarda NO, serbest radikal üretimine neden olan iskemi süresince reaksiyonlara katılabilir. İskemi sırasında aşırı üretilmiş süperoksit radikali, NO ile peroksinitrit oluşturmak için reaksiyona girebilir. Hücre içi serbest demir, iskemiden sonra hücre içi depolardan salındığı için artabilir. Artan demir, NO ile ve oksijenden-türemiş serbest radikaller ile serbest radikal reaksiyonlarına katkıda bulunabilir⁶.

3. MATERYAL-YÖNTEM

Bu çalışma; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Deney Grupları

Deney hayvanları, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Araştırma Laboratuvarından sağlanmıştır. Bilimsel araştırma için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi ve GATA Hayvan Etik Kurul'undan izin alınmıştır.

Çalışmada ortalama ağırlıkları 200 gram olan 47 adet Sprague Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlarda kalıcı fokal serebral iske mi modeli oluşturuldu²⁴⁹⁻²⁵¹. 100 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg xylazine anestezisi altında sıçanın sol gözü ve sol kulağı arasındaki orta hatta 0,5 cm'lik vertikal cilt insizyonu yapıldı. Temporal kas ekarte edilip zigomatik arkla squamöz kemik birleşme yerinden drillenerek 2 mm'lik bir burr hol açıldı. Sol MCA bulunduktan sonra bipolar koter yardımı ile arter koterize edilerek mikro makasla kesildi. MCA oklüzyonu mikroskobik inspeksiyon ile teyid edildi. Hayvanlar, GATA hayvan araştırma laboratuvarında hazırlandı. Tüm grupların sağ (periiskemik) ve sol (iske mik) beyin bölgeleri ayrı ayrı incelendi. Fokal serebral iske miyi izleyen 16., 48. ve 96. saatlerde sıçanlar feda edilip beyinleri çıkartıldı, serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra alüminyum folyoya sarılarak sıvı azot içinde donduruldu. Analiz gününe kadar -80°C'de saklandı. Beyin dokularında tiyoredoksin redüktaz aktivitesi, EGF ve TNF- α düzeyleri ölçüldü. Deney grupları tablo 4'te gösterilmiştir.

Çalışmada hayvanlar 3 gruba ayrıldı:

Grup 1: kontrol grubu. Bu hayvanlara hiçbir uygulama yapılmadan anestezisi altında feda edildi.

Grup 2: taklit grubu. Bu hayvanlarda orta serebral arter gösterilip, sütür konmadı. Derisi kapatıldı. Anesteziden sonra hayvanlar kafeslerine konarak, serbest hareketlerine ve yemelerine izin verildi.

a-) 16. saatte sıçanlar feda edildi.

b-) 48. saatte sıçanlar feda edildi.

c-) 96. saatte sıçanlar feda edildi.

Grup 3: MCAO grubu. Hayvanlarda fokal serebral iske mi modeli oluşturmak için orta serebral arter oklüzyonu (MCAO) yapıldı.

a-) İskeminin 16. saatinde sıçanlar feda edildi.

b-) İskeminin 48. saatinde sıçanlar feda edildi.

c-) İskeminin 96. saatinde sıçanlar feda edildi.

Tablo 4: Deney Grupları

	TrxR		EGF		TNF- α	
	periiskemik	iskemik	periiskemik	iskemik	periiskemik	iskemik
Grup 1: kontrol (n=6)	sağ beyin	sol beyin	sağ beyin	sol beyin	sağ beyin	sol beyin
Grup 2a: 16. saat taklit opr. (n=6)	sağ beyin	sol beyin taklit opr.	sağ beyin	sol beyin taklit opr.	sağ beyin	sol beyin taklit opr.
Grup 2b: 48. saat taklit opr. (n=6)	sağ beyin	sol beyin taklit opr.	sağ beyin	sol beyin taklit opr.	sağ beyin	sol beyin taklit opr.
Grup 2c: 96. saat taklit opr. (n=8)	sağ beyin	sol beyin taklit opr.	sağ beyin	sol beyin taklit opr.	sağ beyin	sol beyin taklit opr.
Grup 3a: 16. saat MCAO (n=7)	sağ beyin	sol beyin MCAO	sağ beyin	sol beyin MCAO	sağ beyin	sol beyin MCAO
Grup 3b: 48. saat MCAO (n=7)	sağ beyin	sol beyin MCAO	sağ beyin	sol beyin MCAO	sağ beyin	sol beyin MCAO
Grup 3c: 96. saat MCAO (n=7)	sağ beyin	sol beyin MCAO	sağ beyin	sol beyin MCAO	sağ beyin	sol beyin MCAO

3.2. Kullanılan Aletler

Hassas terazi (Schimadzu, Libror, AEG 220)

Homojenizatör (Virtis-Virtisheur)

Vorteks (Heidolf Reax 200)

Benmari (Heto)

Santrifuj (Hermle Z 380K)

Soğutmalı santrifuj (Damon IEC, B-20A soğutmalı, Hermle Z 323K)

Spektrofotometre (Schimadzu, UV1601)

Tecan Eliza okuyucu ve yıkayıcı

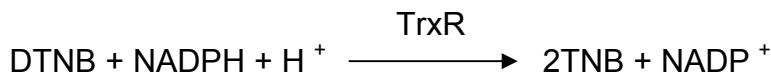
pH metre (Jenway)

Mikrofiltre (Amicon millipore ultrafiltration membrans, filter code: YM3, Dia:14 mm NMWL:3,000)

3.3.Yöntemlerin Uygulanması

3.3.1. Beyin Dokusu Tioredoksin Redüktaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Memeli tioredoksin redüktazın, NADPH aracılığıyla 5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB)'yi redüklemesi prensibine dayanır⁹³. Reaksiyonun ürünü olan TNB⁻ (5'-tiyonitrobenzoik asit) sarı renklidir ve 13,600 M⁻¹ cm⁻¹ molar absorpsiyon katsayısı ile 412 nm'de maksimum absorbans verir.



Ölçüm İçin Hazırlık Aşaması

Başlıca redükte glutatyon ve diğer düşük molekül ağırlıklı tiyoller olmak üzere analiz sisteminde interferans veren bileşikler, ilk basamaklarda uzaklaştırıldı^{100,252}.

Kullanılan Reaktifler

- * 50 mM Tris-HCL, pH 7.5, 1mM EDTA (TE Tamponu)
- * 1.0 M Asetik asit
- * 1.0 M NH₄OH
- * Amonyum sülfat

Deneyin Yapılışı

Dokular 1/10 oranında 50 mM Tris-HCL, pH 7.5 1mM EDTA (TE Tamponu) ile soğuk ortamda (buz içinde) homojenize edildi. Homojenatlar 13,000xg'de +4 °C'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant buzda soğutulmuş 1.0 M asetik asitin damla damla ilavesiyle pH 5.0'a ayarlanır. Oluşan çökeltiyi uzaklaştırmak için numuneler 13,000xg'de +4 °C'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant 1.0 M NH₄OH ile pH 7.5'e ayarlandı. Süpernatant benmaride 60 °C'ye ısıtıldı. Solusyon hızlı bir şekilde +4 °C'ye soğutuldu. Oluşan çökelti 13,000xg'de +4 °C'de 20 dakika santrifüj ile uzaklaştırıldı. % 85 doygunluğa kadar karıştırarak amonyum sülfat ilave edildi ve tekrar 13,000xg'de +4 °C'de 20 dakika santrifüj edilerek çökelti elde edildi. Çökelti 300 µl TE tamponu ile çözülerek vortekslendi. Elde edilen numune delik büyüklüğü 3000 olan mikrofiltre ile 2000xg'de 5 dakika santrifüj edildi ve mikrofiltrenin üstünde kalan kısım ayrıldı.

Tiyoredoksin Redüktaz Aktivitesi Tayini için Kullanılan Reaktifler

- * NADPH, 40 mg/ml su içinde
- * EDTA, 0.2 M
- * Potasyum fosfat tamponu, 1.0 M, pH 7.0
- * DTNB, 25 mg/ml %99.5 etanol içinde
- * BSA (bovin serum albümin), 20 mg/ml

Reaktif karışımı : 50 µl NADPH, 0.5 ml EDTA, 1.0 ml potasyum fosfat tamponu, 0.8 ml DTNB ve 100 µl BSA karıştırıldı ve 10 ml'ye tamamlandı.

Aktivite Tayini

Reaktif karışımından hem kör hem de numune için küvetlere 500 µl kondu. Köre 100 µl potasyum fosfat tamponu eklenirken, numune küvetine 100 µl mikrofiltrasyon ile üstte elde edilen örnekten eklendi. Reaksiyon 412 nm'de 5 dakika boyunca izlendi.

Aktivite Hesaplanması

1 dakikada 1 µmol TNB açığa çıkaran tiyoredoksin redüktaz aktivitesi 1Ü'dir. TNB için molar absorpsiyon katsayısı $13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak hesap yapıldı ve sonuçlar Ü/mg protein olarak verildi.

3.3.2. Lowry Doku Protein Tayini²⁵³

Kullanılan Reaktifler

- * % 2'lik Na_2CO_3 içinde 0,1 N'lik NaOH (A1)
- * %2'lik Na-K tartarat (B1)
- * %1'lik CuSO_4 (B2)
- * Folin ciocalteu's fenol reaktifi

Standart olarak 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA) kullanıldı.

C solüsyonu : 0,5 ml B₁ + 0,5 ml B₂ + 16,5 ml A

Folin reaktifi (F.c) : 1 hacim F.c. + 1 hacim distile su

Deneyin yapılışı :

	BSA	Distile su	C solüsyonu
Kör	-	100 µl	2 ml
Standart-1	20 µl	80 µl	2 ml
Standart-2	40 µl	60 µl	2 ml
Numune	20 µl	80 µl	2 ml

Numuneler vortekslendi ve 15 dakika bekletildi. Daha sonra numunelere 200 µl folin reaktifi eklenerek iyice vortekslendi ve 1 saat karanlıkta bekletildi. Tüpler 750 nm'de köre karşı okundu. Sonuçlar mg/ml olarak hesaplandı.

Hesaplama:

$$\text{Protein miktarı} = \frac{\text{Numune Abs}}{\text{Standart Abs}} \times \text{Standart konsantrasyonu}$$

3.3.3. ELISA Yöntemi ile Dokuda EGF ve TNF- α Tayini

ELISA ('enzyme-linked immunosorbent assay' enzim-bağılı immünosorbent yöntemi), örnekteki antijenin varlığının hızlı bir şekilde gösterilmesini ve ölçülmesini sağlar. Bir antikorun antijeniyle özgül tepkimesi karışık bir örnekteki özgül bir proteini tanımlar.

Dokular 1/10 oranında 50 mM Tris-HCL, pH 7.5 1mM EDTA (TE Tamponu) ile soğuk ortamda (buz içinde) homojenize edildi. Homojenatlar 13,000xg'de +4 °C'de 30 dakika santrifüj edildi. Analiz gününe kadar -80°C'de saklandı. Homojenattan EGF ve TNF- α çalışıldı. Sonuçlar Lowry ile belirlenen protein miktarlarına bölünerek pg/mg protein olarak verildi.

3.3.3.1. Dokuda EGF Tayini

EGF tayini, Biosource Elisa kiti ile çalışıldı.

- Sıfır doz kuyucuğuna 100 μ l Standart Diluent Tamponu koyuldu. Kromojen blank için ayrılmış kuyucuk boş bırakıldı.
- Kuyulara 100 μ l standartlar ve örnekler koyuldu. Plate iki saat oda ısısında inkübe edildi.
- Kuyular dört kere 400 μ l yıkama tamponuyla yıkandı. Her bir kuyuya - kromojen blank kuyusu hariç- 100 μ l Biotinli anti-EGF (biotin konjugat) eklendi. Plate bir saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
- Kuyular dört kere 400 μ l yıkama tamponuyla yıkandı. Her bir kuyuya – kromojen blank kuyusu hariç- 100 μ l Streptavidin-Peroksidaz (HRP) solusyonu eklendi. Plate yarım saat oda ısısında inkübe edildi.
- Kuyular dört kere 400 μ l yıkama tamponuyla yıkandı. Bütün kuyulara 100 μ l Stabilize Kromojen eklendi. Plate yarım saat oda ısısında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
- Bütün kuyulara 100 μ l Stop Solusyonu koyuldu. Mavi renk sarıya dönüştü. 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

3.3.3.2. Dokuda TNF- α Tayini

TNF- α tayini CytElisa kiti ile çalışıldı.

- Sıfır doz kuyucuğuna 100 μ l Assay Diluent ve koyuldu.
- Kuyulara 100 μ l standartlar ve örnekler koyuldu.
- Bütün kuyulara 25 μ l Rabbit anti-Human TNF α Polyclonal Antibody eklendi. Plate üç saat oda ısısında inkübe edildi.

- Kuyular dört kere 250 µl yıkama tamponuyla yıkandı. Her kuyuya 50 µl Goat anti-Rabbit Alkaline Fosfataz eklendi. Plate 45 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- Kuyular dört kere 250 µl yıkama tamponuyla yıkandı. Her bir kuyuya 200 µl Color Reagent Solusyonu ilave edildi. Oda ısısında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.
- Bütün kuyulara 50 µl Stop Solusyonu koyuldu. 490 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

3.4. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 11.5 istatistik paket programı ile yapılmıştır. Değerlendirmede gruplar arası karşılaştırmada Kruskal-Wallis varyans analizi ve fark saptandığında ikili karşılaştırma için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. $P < 0.001$, $p < 0,005$ ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Gruplara ait doku TrxR aktivitesi (Ü/ mg protein), EGF (pg/mg protein) ve TNF- α (pg/mg protein) düzeylerinin istatistiksel sonuçları (ortalama $\pm$ standart sapma) tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5: Gruplara ait doku TrxR aktivitesi (Ü/ mg protein), EGF (pg/mg protein) ve TNF- α (pg/mg protein) düzeylerinin istatistiksel sonuçları.

	TrxR (Ü/ mg protein)		EGF (pg/mg protein)		TNF- α (pg/mg protein)	
	Sağ beyin	Sol beyin	Sağ beyin	Sol beyin	Sağ beyin	Sol beyin
Grup 1	0,046 $\pm$ 0,019	0,051 $\pm$ 0,019	2,92 $\pm$ 0,67	2,19 $\pm$ 0,35	39,57 $\pm$ 22,86	30,51 $\pm$ 20,85
Grup 2a	0,035 $\pm$ 0,019	0,035 $\pm$ 0,023	2,50 $\pm$ 0,75	2,55 $\pm$ 0,94	32,37 $\pm$ 12,18	23,12 $\pm$ 10,55
Grup 2b	0,045 $\pm$ 0,008	0,041 $\pm$ 0,015	2,19 $\pm$ 0,91	1,94 $\pm$ 0,56	34,03 $\pm$ 17,72	45,61 $\pm$ 13,65
Grup 2c	0,033 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,02	1,50 $\pm$ 0,18	2,13 $\pm$ 0,64	28,60 $\pm$ 19,94	42,27 $\pm$ 18,18
Grup 3a	0,031 $\pm$ 0,018	0,033 $\pm$ 0,013	2,68 $\pm$ 0,59	2,24 $\pm$ 0,87	42,48 $\pm$ 12,05	37,03 $\pm$ 21,77
Grup 3b	0,029 $\pm$ 0,011	0,023 $\pm$ 0,011	2,87 $\pm$ 1,06	2,37 $\pm$ 0,46	38,38 $\pm$ 12,69	32,31 $\pm$ 8,44
Grup 3c	0,029 $\pm$ 0,011	0,04 $\pm$ 0,012	2,97 $\pm$ 1,11	5,28 $\pm$ 4,85	39,49 $\pm$ 8,45	53,69 $\pm$ 14,17

grup 1: kontrol

grup 2a: 16. saat taklit

grup 2b: 48. saat taklit

grup 2c: 96. saat taklit

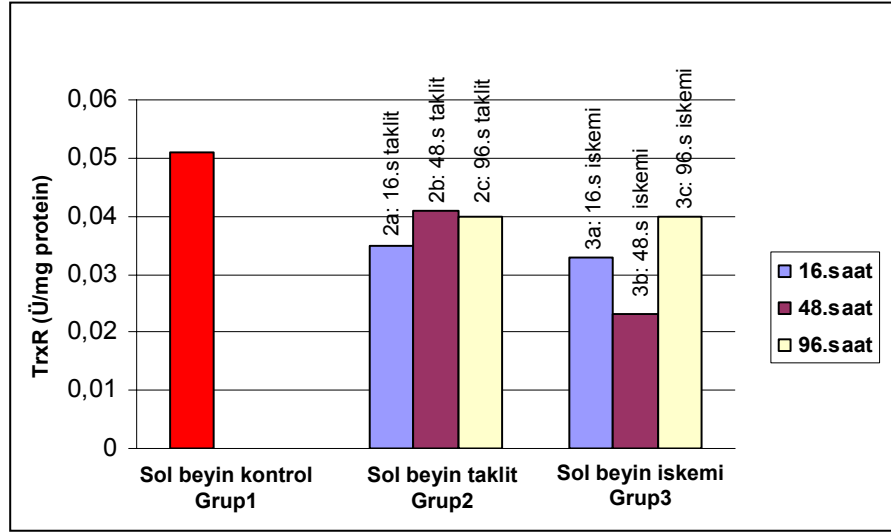
grup 3a: 16. saat MCAO

grup 3b: 48. saat MCAO

grup 3c: 96. saat MCAO

4.1. Beyin Dokusu Tioredoksin Redüktaz Aktivitesi

Beyin tioredoksin redüktaz aktivitesi için sol beyin kontrol grubu (grup 1) ile sol beyin taklit grubu (grup 2) (16., 48. ve 96. saatler için ayrı ayrı) karşılaştırıldığında aralarında anlamlı istatistiksel fark bulunamadı. Sol beyin grup 2a, 2b ve 2c kendi aralarında karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Sol beyin grup 3b (48. saat iskemi) sol beyin kontrol grubu (grup 1) ile, sol beyin grup 2b (48. saat taklit) ile ve sol beyin grup 3c (96. saat iskemi) ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$) (grafik 1 ve tablo 6).



Grafik 1: Sol beyin tiyoredoksin redüktaz aktiviteleri (Ü/mg protein) ortalama değer olarak verilmiştir

Sağ beyin grup 2b (48. saat taklit), sağ beyin grup 3b (48. saat iskemi) ile ve sağ beyin grup 3c (96. saat iskemi) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$) (tablo 6).

Her grup için, aynı hayvana ait sağ beyin ve sol beyin (örneğin sağ 2b ile sol 2b gibi) tiyoredoksin redüktaz aktiviteleri birbirleriyle karşılaştırıldığında aralarında anlamlı istatistiksel fark bulunamadı (tablo 6).

Tablo 6: Tüm gruplara ait tiyoredoksin redüktaz aktivitesinin istatistiksel sonuçları

	TrxR (Ü/ mg protein)	
	Sağ beyin	Sol beyin
Grup 1 (kontrol)	0,046±0,019	0,051±0,019 ^A
Grup 2a (16. saat taklit)	0,035±0,019	0,035±0,023
Grup 2b (48. saat taklit)	0,045±0,008 ^E	0,041±0,015 ^B
Grup 2c (96. saat taklit)	0,033±0,02	0,04±0,02
Grup 3a (16. saat iskemi)	0,031±0,018	0,033±0,013
Grup 3b (48. saat iskemi)	0,029±0,011 ^F	0,023±0,011 ^C
Grup 3c (96. saat iskemi)	0,029±0,011 ^G	0,04±0,012 ^D

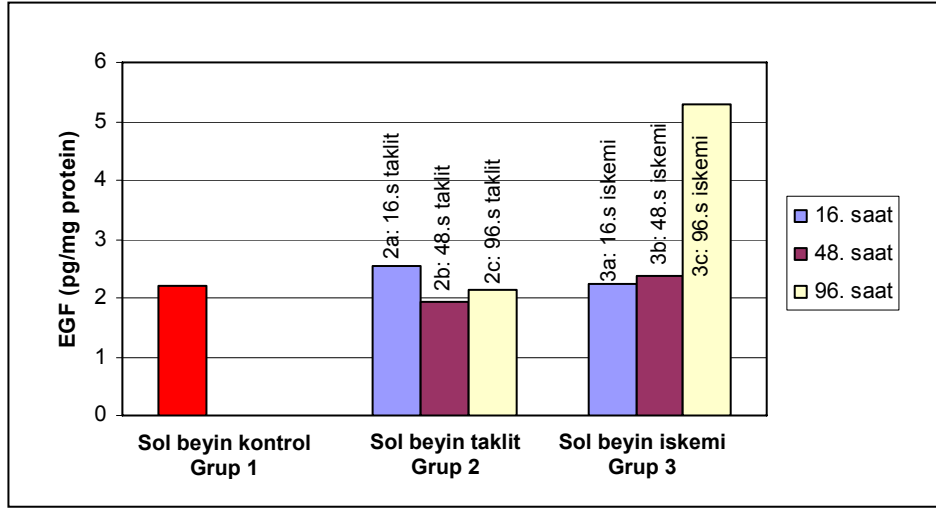
^C : ^A , ^B ve ^D ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı (p<0,05), (sırasıyla; p=0,022, p=0,021, p=0,026).

^E : ^F , ^G ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı (p<0,05), (p=0,021, p=0,014).

^G : ^A ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı (p<0,05), (p=0,014).

4.2. Beyin Dokusu EGF Düzeyleri

Beyin EGF düzeyleri için sol beyin kontrol grubu (grup 1) ile sol beyin taklit grubu (grup 2) (16., 48. ve 96. saatler için ayrı ayrı) karşılaştırıldığında aralarında anlamlı istatistiksel fark bulunamadı. Sol beyin grup 2a, 2b ve 2c kendi aralarında karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Sol beyin grup 3c (96. saat iskemi) sol beyin kontrol grubu (grup 1) ile, sol beyin grup 2b (48. saat taklit) ile, sol beyin grup 2c (96. saat taklit) ile, sol beyin grup 3a (16. saat iskemi) ve sol beyin grup 3b (48. saat iskemi) karşılaştırıldığında aralarında anlamlı istatistiksel fark bulundu (p<0,05) (grafik 2 ve tablo 7).



Grafik 2: Sol beyin EGF düzeyleri (pg/mg protein) ortalama değer olarak verilmiştir

Sağ beyin grup 2c (96. saat taklit) sağ beyin kontrol grubu (grup 1) ile, sağ beyin grup 2a (16. saat taklit) ile, sağ beyin grup 3a (16. saat iskemi) ile, sağ beyin grup 3b (48. saat iskemi) ve sağ beyin grup 3c (96. saat iskemi) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ($p<0,05$) (tablo 7).

Tablo 7: Tüm gruplara ait EGF düzeylerinin istatistiksel sonuçları

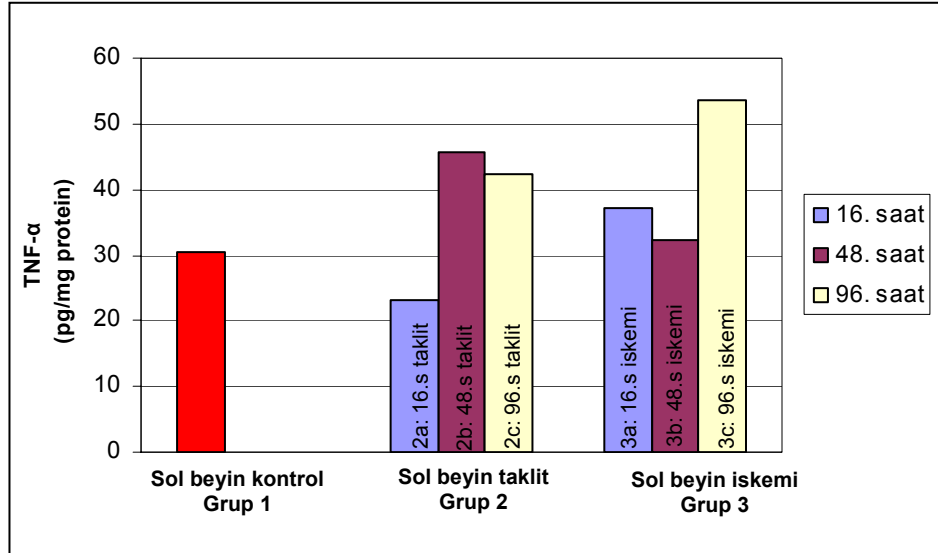
	EGF (pg/mg protein)	
	Sağ beyin	Sol beyin
Grup 1 (kontrol)	2,92±0,67 ^G	2,19±0,35 ^A
Grup 2a (16. saat taklit)	2,50±0,75 ^H	2,55±0,94
Grup 2b (48. saat taklit)	2,19±0,91	1,94±0,56 ^B
Grup 2c (96. saat taklit)	1,50±0,18 ^I	2,13±0,64 ^C
Grup 3a (16. saat iskemi)	2,68±0,59 ^J	2,24±0,87 ^D
Grup 3b (48. saat iskemi)	2,87±1,06 ^K	2,37±0,46 ^E
Grup 3c (96. saat iskemi)	2,97±1,11 ^L	5,28±4,85 ^F

^F : ^A , ^B , ^C , ^D ve ^E ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$), (sırasıyla; $p=0,014$, $p=0,007$, $p=0,007$, $p=0,022$, $p=0,017$).

^I : ^G , ^H , ^J , ^K ve ^L ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$), (sırasıyla; $p=0,001$, $p=0,002$, $p=0,001$, $p=0,004$, $p=0,001$).

4.3. Beyin Dokusu TNF- α Düzeyleri

Beyin TNF- α düzeyleri için sol beyin kontrol grubu (grup 1) ile sol beyin taklit grubu (grup 2) (16., 48. ve 96. saatler için ayrı ayrı) karşılaştırıldığında aralarında anlamlı istatistiksel fark bulunamadı. Yine sol beyin kontrol grubu ile sol beyin iskemi grubu (grup 3) arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamadık. Sol beyin grup 2a (16. saat taklit) sol beyin grup 2b (48. saat taklit) ile ve sol beyin grup 3c (96. saat iskemi) ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı istatistiksel fark bulundu ($p<0,05$). Sol beyin grup 3b (48. saat iskemi) sol beyin 3c (96. saat iskemi) ile karşılaştırıldığında da aralarında anlamlı istatistiksel fark bulundu ($p<0,05$) (grafik 3, tablo 8).



Grafik 3: Sol beyin TNF- α düzeyleri (pg/mg protein) ortalama değer olarak verilmiştir.

Tablo 8: Tüm gruplara ait TNF- α düzeylerinin istatistiksel sonuçları

	TNF- α (pg/mg protein)	
	Sağ beyin	Sol beyin
Grup 1 (kontrol)	39,57 $\pm$ 22,86	30,51 $\pm$ 20,85
Grup 2a (16. saat taklit)	32,37 $\pm$ 12,18	23,12 $\pm$ 10,55 ^A
Grup 2b (48. saat taklit)	34,03 $\pm$ 17,72	45,61 $\pm$ 13,65 ^B
Grup 2c (96. saat taklit)	28,60 $\pm$ 19,94	42,27 $\pm$ 18,18
Grup 3a (16. saat iskemi)	42,48 $\pm$ 12,05	37,03 $\pm$ 21,77
Grup 3b (48. saat iskemi)	38,38 $\pm$ 12,69	32,31 $\pm$ 8,44 ^C
Grup 3c (96. saat iskemi)	39,49 $\pm$ 8,45	53,69 $\pm$ 14,17 ^D

^A : ^B ve ^D ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$), (sırasıyla; $p = 0,008$, $p = 0,002$).

^C : ^D ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) ($p = 0,009$).

4.4. Spearman Korelasyon Analizi

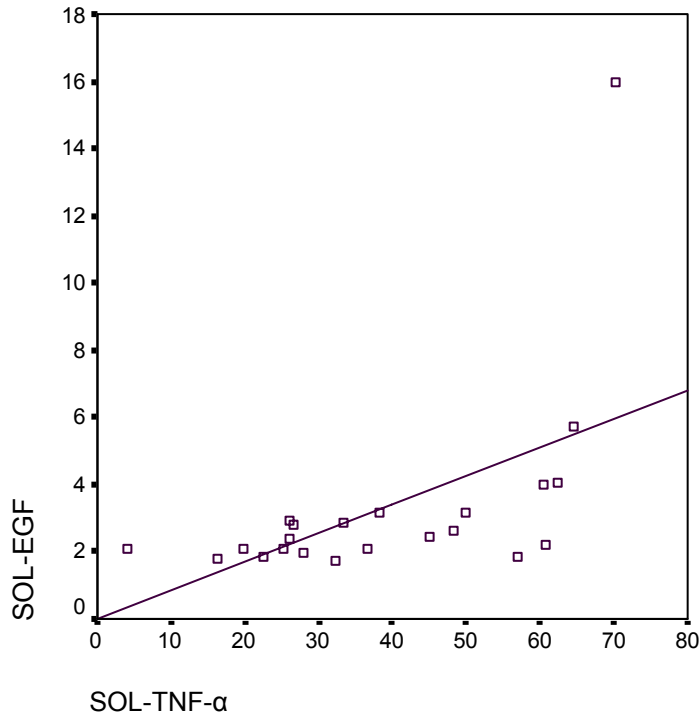
Tüm gruplar için çalışılan parametreler arasında korelasyonu incelemek amacıyla yaptığımız spearman korelasyon analizine göre hiçbir grup arasında korelasyona rastlamadık. Taklit grupları olmaksızın sadece kontrol grubu ve iskemi grubu esas alınarak parametreler arasındaki korelasyonu incelemek için yaptığımız spearman korelasyon analizi sonuçları tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9: Spearman korelasyon analizi sonuçları

	Sağ EGF	Sol EGF	Sağ TNF- α	Sol TNF- α	Sağ TrxR	Sol TrxR
Sağ EGF		r: 0,172 P: 0,443	r: -0,095 P: 0,673	r: 0,316 P: 0,152	r: 0,120 P: 0,596	r: 0,046 P: 0,840
Sol EGF	r: 0,172 P: 0,443		r: -0,034 P: 0,879	r: 0,618 ** P: 0,002	r: -0,016 P: 0,942	r: 0,015 P: 0,946
Sağ TNF- α	r: -0,095 P: 0,673	r: -0,034 P: 0,879		r: 0,145 P: 0,519	r: -0,104 P: 0,644	r: -0,319 P: 0,148
Sol TNF- α	r: 0,316 P: 0,152	r: 0,618 ** P: 0,002	r: 0,145 P: 0,519		r: -0,086 P: 0,702	r: 0,012 P: 0,958
Sağ TrxR	r: 0,120 P: 0,596	r: -0,016 P: 0,942	r: -0,104 P: 0,644	r: -0,086 P: 0,702		r: 0,418 P: 0,053
Sol TrxR	r: 0,046 P: 0,840	r: 0,015 P: 0,946	r: -0,319 P: 0,148	r: 0,012 P: 0,958	r: 0,418 P: 0,053	

** güçlü korelasyon

Spearman korelasyon analizi sonuçlarına göre iskemi uygulanan grupta TNF- α ile EGF düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. TNF- α düzeyleri artarken EGF düzeyleri de korele bir şekilde artmıştır.



Grafik 4: İskemik bölgede TNF- α ile EGF düzeyleri arasındaki korelasyon

5. TARTIŞMA

İskemiye bağlı değişiklikler iskeminin derecesi ve süresi ile ilişkilidir. Bunlar sırasıyla enerji yetersizliği, hücrelerde iyon homeostazisinin kaybı, hücre içi Ca^{+2} kalsiyumun artması, eksitotoksosite ve serbest radikal toksisitesi şeklinde gelişir.

Beyinde serebral kan akımı 16-18 ml/100gr/dk'ya düştüğünde elektriksel aktivite kaybı görülür. İskemi vardır fakat bu kan akımı devamlı değilse ölüm yoktur²⁵⁴. Kan akımı 10-12 ml/100gr/dk olduğunda enerji eksikliği (ATP yoksunluğu) ortaya çıkar ve hücrede K^{+} çıkışı, Ca^{+2} girişi olur. Bu, 1-3 saat içinde hücreyi ölüme götürür²⁵⁵.

Mekanik sinir hasarı ve geçici fokal beyin iskemisi, çeşitli beyin bölgeleri ve çeşitli hücre tiplerinde Trx1'i indüklemiştir. Bu da oksidatif stres veya beyin hasarı sonrasında beyin rejenerasyonu ve nöroproteksiyonunda Trx sistemin fonksiyonlarının bir göstergesidir¹⁷⁵⁻¹⁸¹.

Hattori ve ark.¹⁸¹ yaptıkları çalışmada, hipoksi-iskemi uygulanmış neonatal ratlarda, nöronal hasarla ilişkili olarak Trx immunoreaktivitesinin düştüğünü, peroksinitrit üretiminin stimüle olduğunu ve peri-infarkt kortekste yaşayan canlı nöronların Trx1 indüksiyonu gösterdiğini belirtmişler, bu sonuçlara göre Trx'in nöroprotektif etkili olduğunu bildirmişlerdir.

İskemiden 4 saat sonra kan akımının en fazla bozulduğu yer olan lateral striatumda Trx ve Trx mRNA'sı kaybolmuş, periferel bölgede ise 4. saatten itibaren indüklenmiş ve 24. saate kadar artış görülmüştür¹⁷⁹. Fakat deneyimizde ölçülen parametreler için kontrollerde sağ ve sol beyin arasında fark olmadığı saptandı. Deney grupları olan taklit grubu ve iskemi grubunda da ölçülen parametrelerde iskemik (sol beyin bölgeleri) ve periiskemik (sağ beyin bölgeleri) alanlar arasında fark bulunamadı.

SSS'nin maruz kaldığı iskemi ve reperfüzyon, iskeminin şiddet ve süresine bağlı olarak endonöronal ödem, demiyelinizasyon, ileti kaybı ve sinir dejenerasyonu gibi bozukluklara yol açar¹⁷⁹.

İskemi ATP, kreatin fosfat (CP) gibi enerji substratlarının tükenmesine, hücre içi Ca^{+2} artışına ve inflamatuvar değişikliklere sebep olur⁶. Artan kalsiyumun postiskemik dokuda fosfolipazı aktive ederek araşidonik asit metabolitlerini ve ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaza dönüşümünü katalizleyerek ROS yapımını artırır²⁵⁶.

Sinir dokusu yüksek miktarda uzun zincirli doymamış yağ asitleri içermeleri nedeniyle ROS'a duyarlıdır. Reperfüzyonda artan ROS

kan-beyin bariyerini harap ederek endonöronal ödem ve iskemik dejenerasyonun gelişimine yol açar.

Serbest radikal oluşumunun, sadece reperfüzyonda değil iskemi süresince de olduğu ve serbest radikallerin uzun süreli iskemide önemli olduğu bildirilmiştir⁶. İskemi esnasında serbest radikal üretiminin artması, normal hücre savunmasını bastırır. Sitozolik kalsiyumun, hem peroksit patlamasını aktive ettiği hem de Trx oksidasyonunu indüklediği açıklanmıştır. Kalsiyumun hücre içinde sürekli bulunmasının, oksidatif strese ve apoptoza neden olduğu belirtilmiştir¹³⁷.

Schallreuter ve ark.²⁵⁷, TrxR aktivitesinin kalsiyumla inhibe edildiğini rapor ettiler. Fakat Oblong ve ark.²⁵⁸ TrxR aktivitesinin kalsiyum konsantrasyonundan etkilenmediğini gösterdiler.

Kalsiyumun direk olarak TrxR ile etkileşimi üzerinden bu inhibisyonun olup olmadığı tam olarak bilinmese de, kalsiyumun TrxR aktivitesine inhibitör etkisi kanıtlanmıştır¹³⁷.

Turoczi ve ark.²⁵⁹ iskemi-reperfüzyon yapılmış fare kalbinde Trx1'in down-regüle olduğunu göstermişlerdir. Trx hücre içi antioksidandır. Trx sistemin inhibe edildiği zaman kalpte MDA miktarının artması bu sonucu desteklemiştir.

Saito ve ark.¹⁵⁰ da benzer bir çalışma yaparak Trx ekspresyonundaki bu azalmanın, oksidatif stresin oluşumu sebebiyle tiyoredoksinin oksitlenmesi ve apoptotik hücre ölümünün indüklenmesi yüzünden olduğunu açıklamışlardır.

Uemura ve ark.²⁶⁰ nın çalışmasında, ratlarda 30-60 dakika kalıcı iskemi yapılmış ve oksidatif stres oluşturulmuştur. Redükte glutatyon, vit C, vit E ve ubikinol-10 konsantrasyonlarında düşüş, MDA düzeylerinde artış gözlenmiştir. Sıçanlarda kalıcı iskeminin birinci saatinde beyinde ürik asit düzeylerinin yükseldiğini buna bağlı olarak ksantin düzeylerinin düştüğünü ve sonuç olarak süperoksit anyon üretimi olduğunu bildirmişlerdir.

Takagi ve ark.²⁴⁸ hücrel hasarın SOD, CAT, GPx gibi antioksidan enzimleri baskıladığını bildirmişlerdir. Ratlarda fokal serebral iskemi oluşturmak için sol orta serebral arter kalıcı olarak oklüze edilmiştir. Hayvanlar 30. dakika, 4., 24., ve 48. saatlerde feda edilmiş ve SOD aktivitesi düşük bulunmuştur.

Kondo ve ark.²⁶¹ CuZn-SOD'dan yoksun farelerle yaptıkları çalışmada, kısa süreli fokal iskemi sonrası infarkt hacminde yükselme

görülmüştür. Mikawa ve ark.²⁶² da benzer sonuçlara Manganez-SOD'dan yoksun farelerde rastlamışlardır.

Sıçanlarla yapılan çalışmalarla ilgili olarak araştırılan literatürlerde iskemi-reperfüzyon çalışmalarına bolca rastlanmış, fakat kalıcı iskemi çalışmalarına yeterince rastlanmamıştır.

Bu çalışmada da yukarıdaki çalışmalarla paralel olarak, kalıcı iskemi yapılan sol beyinlerde bir antioksidan enzim olan TrxR enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre, iskemi uygulanan gruplarda (16., 48. ve 96. saat) azalmalar gösterdiği tespit edildi. İskeminin 48. saatinde bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu sonuç, iskemi ile oluşturulan oksidatif stresin, antioksidan enzim aktivitesini baskıladığını göstermektedir.

Serbest radikal üretimi kalıcı iskemiden sonraki birkaç saatte devam edebildiği^{5,263}, hatta 21. güne kadar sürdüğü açıklanmıştır²⁶⁰. Yapılan birçok çalışmada iskemide, antioksidan moleküllerin başlangıç saatlerinden itibaren 48. saate kadar baskılandığı bulunmuştur. Fakat kalıcı iskeminin 96. saati için bu moleküllerin düzeylerinin araştırıldığı çalışmalara pek rastlamadık.

Çalışmamızda iskeminin 96. saatinde, 48. saate göre enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı. Bu yükselme kontrol grubunda ölçülen aktiviteden daha düşük bulundu. İskemide uzak günlerde olan değişiklikleri de araştırmayı amaçladığımız için bu sonuç uzun dönem iskemide nöronal iyileşmenin bir sonucu olabilir. Nöroprotektif etkiler bu saatlerde yükseliyor olabilir. Bu durum ileri çalışmalarla desteklenmelidir.

Tiyoredoksin sistemin inhibisyonu, antioksidan moleküllerin fonksiyonlarını azaltır ve ROS artışına neden olur. Hücre EGF hücre içinde H₂O₂ üretiminde bir patlama ve hücre içi kalsiyum miktarında artış görülür^{137,264}. Bu patlama geçicidir, 1-2 dakikada maksimum düzeye ulaşır ve sonra hızlıca düşer. Bu durum tiyoredoksin sistemi inhibe edebilir, böylece oksidatif stres artışı olur ve sinyal transdüksiyonunda önemli rolü olduğu düşünülen hücresel tiyol proteinlerinde geçici redoks değişimleri görülür¹³⁷. Örneğin GSH düşer, GSSH (okside) artar^{265,266}. Trx oksidasyonu, sitozolik kalsiyum artışına da bağlıdır. Hücre ekstratlarında TrxR mikromolar kalsiyum düzeyleriyle inhibe olur. Hücre içi kalsiyum artışı, büyüme faktörünün reseptöre bağlanması ile indüklenir. Ayrıca hücre içi depolardan salınan kalsiyumun da TrxR'nin inhibisyonuna ve Trx'in oksidasyonuna sebep olduğu açıklanmıştır^{212,137}. Bu durumu TNF- α 'nın körüklediği düşünülmüştür. Bir süre sonra Trx, TrxR tarafından redüklenmiş ve durum normale dönmüştür.

Birçok hücre tipi, peptit büyüme faktörleri gibi çeşitli hücre dışı uyarıcılara yanıt olarak ROS üretirler. ROS burada ikincil mesajcı olarak rol oynar. ROS üretiminin spesifik inhibisyonu, protein tirozin fosforilasyonu, MAP kinaz aktivasyonu ve hücre proliferasyonu gibi büyüme faktörü-nedenli sinyal olaylarını tamamen bloke eder^{267,268}.

Kim ve ark.²⁶⁹ H₂O₂ birikiminin mitokondrial TrxR2'nin inhibisyonuna neden olduğunu ve hücre proliferasyonu mekanizmasını aktive ettiğini açıklamışlardır.

EGF, nörotrofik bir ajan ve nörohormondur²⁷⁰. SSS'de TNF- α sentezinin artması ve EGF sentezinin düşmesi sonucu miyelinolitik lezyonlar gözlenmiştir²⁷¹. Bazı insan tümörlerinde EGF ile EGFR'nin aktivasyonu, TNF- α 'nın sitotoksik etkisini azaltmıştır. Zıt olarak EGF reseptörlerinin inhibisyonu bu hücrelerde TNF- α toksisitesini artırmıştır²⁷².

Sauer ve ark.²⁷³ na göre, hem EGF hem de TNF- α uygulanması hücre içi ROS düzeylerini artırmıştır.

Abe ve Saito²⁷⁴, birçok polipeptit büyüme faktörünün in vivo ve in vitro iskemik hasar ve eksitoksisiteye karşı bazı kademelerde koruyucu rol oynadığını ve EGF'nin de serebral nöronlar üzerinde koruyucu etkilerinin olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Dhodda ve ark.²⁷⁵ ratlara 1 saat MCAO yapmışlar ve nöroprotektif ajan olan EGF'nin ekspresyonunun uyarıldığını bildirmişlerdir.

Ninomiya ve ark.²⁷⁶ beyinde MCAO'dan sonra EGFR ekspresyonu olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada 30 dakika MCAO sonrasında reperfüzyon yapılmıştır. Reperfüzyonun 7. gününde EGFR pozitif hücrelere rastlanmış, 14. günde normale dönmüştür. Başka bir çalışmada EGFR pikine daha erken rastlanmış. Bu farkın oklüzyon süresine bağlı olarak değişebileceği düşünülmüştür.

Naylor ve ark.²⁷⁷ nın yaptıkları çalışmada ratlara 1 saat geçici MCAO uygulanmış ve EGF'nin ekspresyonunun iskemi sonrasındaki 24. ve 72. saatler arası arttığı görülmüştür. EGF düzeyleri reperfüzyonun 7. gününde normal düzeylerine düşmüştür. Bizim çalışmamızda da bu çalışmayla uyumlu olarak kalıcı iskemi yapılan sol beyinlerde EGF düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulundu. Bu yükselme iskeminin 96. saatinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Kalıcı iskeminin uzun döneminde beyin rejenerasyonu ile ilgili net bir bilgi yoktur. 96. saatteki bu çok belirgin yükseklik EGF'nin nöroproteksiyonu ile ilgili olabilir. EGF düzeylerinin 48. saat ve 96. saatleri arasında daha kısa

zaman dilimleri açısından incelenmesi uzun dönem iskemi açısından faydalı olacaktır.

Çalışmamızda aynı doğrultuda çalışan TrxR ile EGF'nin, iskeminin 96. saatinde anlamlı bir şekilde artması kalıcı iskeminin uzak günleri için anlamlı olabilir. İki parametrenin de bu saatte yükselmesi (TrxR'nin kontrole göre değil 48. saate göre yükselmesi) nöroproteksiyonun kalıcı iskeminin uzun döneminde önemli olabileceğini düşündürmüştür. Hayvan sayısı artırılarak iskeminin daha ileri saatlerinde bu parametreleri birlikte incelemek faydalı olabilir.

Büyüme faktörlerinin nöroprotektif etkilerinin mekanizması çok açık değildir. Büyüme faktörlerinin toksisiteye maruz kalmadan önce verilmesi daha etkili yarar sağlayabilir, bu durum korumada gerekli olan bazı moleküllerin (antioksidan enzimler, kalsiyum bağlayıcı proteinler..) de novo sentezini indükleyebilir²¹⁶.

EGF'nin nöron morfolojisi üzerine etkisinin olmadığı, kurtarıcı etkisini EGF-aracılı artmış hücre proliferasyonu oranı üzerinden yapıyor olabileceği düşünülmektedir²¹⁵. Beyin oksidatif strese maruz kaldığında EGF, nöronları bu stresten korumak için hücrel farklılaşmayı ve olgunlaşmayı indükler²⁷⁸.

Teramoto ve ark.²⁷⁹ nın çalışmasına göre, iskemik beyine EGF infüzyonu yapılmış, infüzyonun bırakılmasından sonraki birkaç haftada hasarlı bölgede yeni nöron sayılarını artırmıştır.

Mattson ve ark.²⁸⁰ hipokampal nöronal kültür hücrelerine EGF uygulanmasının SOD, glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimlerin ve önemli detoksifiye ajanların ekspresyonlarının artışı indüklediğini bildirmişlerdir. Yine Mattson ve ark.²⁸¹ başka bir nöroprotektif etkisi ile ilgili muhtemel yolun, kalsiyum bağlayıcı proteinlerin up-regülasyonuna neden olması olduğunu açıklamışlardır.

Hicks ve ark.²¹⁶ glutamik asite maruz kalmış nöronal hücrelerde kayıp gözlemişlerdir. Fakat bu hücrelere toksisite öncesi EGF uygulamasının nöronların yaşama şansı yüzdesini anlamlı düzeyde artırdığını bildirmişlerdir

İskemik ve travmatik beyin hasarı TNF- α 'nın sentezini indükler, hücre dışına geçmesini sağlar²⁸². TNF- α düzeylerinin, serebral iskemi dahil birçok SSS hastalığında beyin dokusunda, plazmada ve CSF'de arttığı bildirilmiştir²⁴²⁻²⁴⁴. TNF- α 'nın, fokal iskemik beyin hasarını şiddetlendirdiği ve bloke edilmiş endojen TNF'nin nöroprotektif olduğu belirtilmiştir²⁴⁴.

TNF- α , beyin iskemisi süresince up-regüle edilen proinflamatuvar sitokinlerden ve anahtar immunomodulatorlerden biridir. Bir iskemik beyin hasarı sırasında, TNF- α 'nın bu hasarı daha da artırdığı gösterilmiştir²⁴³.

Yang ve ark.nın²⁴⁴ yaptığı çalışmaya göre, farelere 1 saat MCAO yapılmış, reperfüzyonun 2., 6., 12., 24. ve 48. saatinde TNF- α düzeyleri izlenmiş. TNF- α 1 saat MCAO ile reperfüzyonun 2. saati arasındaki zamanda belirgin bir şekilde artmış, 6. ve 12. saatte pik yapıp, reperfüzyonun 24. saatinde düşmeye başlamıştır. TNF- α ekspresyonu, kan beyin bariyeri (BBB) geçirgenliğini artırmıştır.

Caso ve ark.nın²⁸³ yaptığı çalışmaya göre, serebral iskemide oluşturulan ratlarda kalıcı MCAO yapılmış ve ratlar 24. saatte feda edilmiş. İskemide oluşan stres üzerine TNF- α nın rolü araştırılmış. Beyin dokusunda lipid peroksidasyon belirteçlerinin biriktiği tespit edilmiş. TNF- α ekspresyonu, serbestleşmesi ve TNFR1 ekspresyonu stres sonrası artmıştır. TNF- α 'nın bloke edilmesi sonucu, infarkt alanında azalma ve iskemide görülen oksidatif ve nitrozatif biyokimyasal parametrelerinde düşme görülmüştür. TNF- α , iskemide maruz kalan beyin dokusunda MCAO ile sonuçlanan olayları daha da kötüleştirmiştir. Rat beyine uygulanan kalıcı MCAO, lipid peroksidasyonunu ve TNF- α düzeylerini artırmıştır. Proinflamatuvar sitokin olan TNF- α 'nın stres ve iskemide doku hasarının bir cevabı olarak beyinde çok hızlı bir şekilde üretildiği gösterilmiştir.

Saito ve ark.²⁸⁴ TNF- α 'nın, kısa süreli veya kalıcı fokal iskemide başlangıç saatleri içinde yükseldiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda TNF- α düzeyleri için, sol beyin kontrol grubu (grup 1) ile sol beyin taklit grubunu (grup 2) (16., 48. ve 96. saatler için ayrı ayrı) karşılaştırdığımızda aralarında anlamlı istatistiksel fark bulunamadı. Yine sol beyin kontrol grubu ile sol beyin iskemide grubu (grup 3) arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Kısıtlı olan hayvan sayısı sebebiyle kontrol grubu ile deney grupları arasında fark bulamamış olabiliriz.

Liu ve ark.²⁸⁵ iskemik hasarda beyin inflamatuvar yanıtını araştırmak için ratlarda kalıcı MCAO modelinde TNF- α 'nın serebral kortikal düzeylerini incelemişlerdir. TNF- α mRNA'sının oklüzyondan 1 saat sonra artmaya başladığını, 12. saatte pik yaptığını ve 5. güne kadar yüksekliğini devam ettiğini bulmuşlardır. Meirstrell ve ark.²⁸⁶ TNF- α yüksekliğine kalıcı MCAO'nun başlangıcından 24 saat sonra rastlamışlardır.

Szafarski ve ark.²⁸⁷ ratlarda benzer bir çalışma yaparak TNF- α mRNA'sının geçici olarak yükseldiğini, 4. saatte artıp 24. saatte normale döndüğünü göstermişlerdir. Buttini ve ark.²⁸⁸ benzer bir çalışmada MCAO'nun 30. dakikasında TNF- α mRNA pozitif hücreler tespit etmişler.

Barone ve ark.²⁴³ erken TNF- α üretiminin sekonder hasarın oluşumunda rolü olup olmadığını araştırmak için, geçici ve kalıcı MCAO modellerinde iskemi indüksiyonundan önce eksojen TNF- α vermişlerdir. Sitokinin dozuna bağlı olarak, nörolojik yetersizlik ve infarkt alanı daha da ağırlaşmıştır. Bu da TNF- α 'nın iskemik beyin hasarında pivotal bir aracı olarak rol aldığını gösterir.

Bazı araştırmacılar²⁸⁹⁻²⁹¹, beyin hasarında TNF- α ekspresyonunun hasar sonrası 4. veya 6. günde arttığını bulmuşlardır.

Bu çalışmada yukarıda belirtilen çalışmalarla uyumlu olarak iskeminin 96. saatinde, iskeminin 48. saatine göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi. İskemik hasara cevap olarak TNF- α 'nın, iskeminin 2. gününden sonra artmaya başladığı ve bu artışın 4. güne kadar devam ettiği tespit edildi.

Liu ve ark.²³⁰ na göre TNF- α , transfekte hücrelerde ROS üretimini beslemiştir ve bu hücrelere Trx ekspresyonu veya antioksidan uygulanması sinyal kaskadın akışını kısmen baskılamıştır.

Bütün bunlara karşın TNF- α 'nın iskemide koruyucu olabileceği düşünülen bazı çalışmalar yapılmıştır^{282,292,293}.

Barger ve ark.²⁹⁴ TNF- α 'nın demire ve amiloid- β peptidine karşı koruyucu olduğunu savunmuşlardır.

Mattson ve ark.²⁹⁵ glukoz yokluğunda ve glutamat toksisitesinde TNF- α 'nın koruyucu olduğunu ve artmış hücre içi kalsiyumun baskılanmasında TNF- α -uygulanmış hücrelerde kalbindinin up-regülasyonunu göstermişlerdiler.

6. SONUÇ

Çalışmamızın sonuçlarına göre, ölçülen parametreler için kontrol ve deney gruplarında sağ (periiskemik) ve sol (iskemik) beyin bölgeleri arasında fark olmadığı saptandı. İskemik bölgedeki sonuçlar için, tiyoredoksin redüktaz aktivitesinin, iskeminin 48. saatinde baskılandığı, fakat 96. saatte artmaya başladığı tespit edildi. Beyin iskemisi ile EGF'nin 96. saatte önemli bir artış gösterdiği saptandı. TNF- α 'nın kontrol grubuna göre anlamlı olmamakla beraber iskeminin 96. saatinde 48. saatine göre anlamlı olarak arttığı tespit edildi.

Tiyoredoksin redüktaz enzim aktivitesinin oluşan oksidatif stres ile azaldığını, EGF'nin nörotrofik ve nöroprotektif etki göstermek amacıyla arttığını, TNF- α 'nın iskemik strese cevap olarak iskeminin uzak döneminde artmaya başladığını düşünmekteyiz.

7. ÖZET

SEREBRAL İSKEMİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA EGF, TNF- α DÜZEYLERİNİN VE TİYOREDOKSİN SİSTEMİNİN İNCELENMESİ

Serebral iskemi enerji substratlarının tükenmesine, hücre içi kalsiyum artışına ve inflamatuvar değişikliklere sebep olur. İskeminin şiddet ve süresine bağlı olarak endonöronal ödem, demiyelinizasyon, sinaptik membranların depolarizasyonu ve sinir dejenerasyonu gibi bozukluklar görülür.

Bu çalışmada, kalıcı serebral iskemi oluşturulan ve taklit operasyonu yapılan sıçanlarda iskemik bölgede ve periiskemik normal dokuda TrxR (tiyoredoksin redüktaz) aktivitesi, EGF (epidermal büyüme faktörü) ve TNF- α Tümör nekrozis faktör- α) düzeylerini inceledik. Ayrıca aynı yönde çalışan Trx (tiyoredoksin) sistem ve EGF ile zıt yönde etki gösteren TNF- α düzeylerini iskeminin uzak saatlerinde karşılaştırarak incelemeyi amaçladık.

Çalışmamızda, iskemik hasarla oluşturulan oksidatif stres ile TrxR aktivitesinde kontrol grubuna göre, iskeminin 48. saatinde istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edildi. İskeminin 96. saatinde, 48. saate göre anlamlı bir istatistiksel artış gözlemlendi. Sol beyinlerde EGF düzeyleri kontrol grubuna göre, iskeminin 96. saatinde istatistiksel olarak yüksek bulundu. TNF- α düzeyleri için, iskemi grubu kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. Fakat iskeminin 96. saatinde 48. saate göre anlamlı bir artış tespit edildi.

Sonuç olarak çalışmamız, beyin iskemisi ile oluşturulan oksidatif stresin TrxR'yi azalttığını göstermektedir. EGF düzeyleri artmış ve TNF- α düzeyleri değişmemiştir. TrxR enzim aktivitesinin oluşan oksidatif stres ile azaldığını, diğer yandan EGF'nin nörotrofik ve nöroprotektif etki göstermek amacıyla arttığını düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: tiyoredoksin redüktaz, EGF, TNF- α , beyin iskemisi

8. SUMMARY

AN INVESTIGATION INTO THE EGF AND TNF- α LEVELS AND THE THIOREDOXIN SYSTEM IN RATS EXPOSED TO CEREBRAL ISCHEMIA

Cerebral ischemia induces the consumption of the energy substrates and the inflammatory alterations, and the increases the intracellular calcium. Depending on the duration and the intensity of ischemia, endoneuronal edema, demyelination, depolarization of synaptic membranes and neuronal degeneration are produced.

In this study, TrxR activity, EGF and TNF- α in cerebral ischemic, periischemic normal and sham operated rat brains were investigated. Furthermore, it was aimed to compare the parallel effects in Trx system and EGF function, as well as adverse effects of TNF- α in prolonged ischemia.

Brain tissue TrxR activity in ischemic region of one group (48th h ischemia) decreased significantly compared with the control group. However there was a statistically significant increase at 96th h ischemia compared to 48th h ischemia. The EGF levels of ischemic brain tissue increased significantly in a group (96th h ischemia) in comparison with the control group. There was no statistical significance in the TNF- α levels between the ischemic groups and the control group, but there was a statistically significant increase at 96th h ischemia compared to 48th h ischemia.

In conclusion; present study showed that TrxR activity decreased in ischemia-induced oxidative stress. EGF levels increased significantly whereas TNF- α levels did not change in ischemic brain regions as compared to the control group. As a result it could be said that, TrxR activity was reduced by oxidative stress. On the other hand EGF levels increased to exhibit neurotrophic and neuroprotective effects.

Key words: thioredoxin reductase, EGF, TNF- α , cerebral ischemia

9. KAYNAKLAR

1. Nordberg J, Arnér ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol and Medicine* 2001; 31: 1287-312.
2. Mustacich D, Powis G. Thioredoxine reductase. *Biochem J* 2000; 346: 1-8.
3. Yost FJJ, Fridovich I. An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1973; 248: 4905-8.
4. Wilson AC, Thompson HJ, Schedin PJ, Gibson NW, Ganther HE. Effect of methylated forms of selenium on cell viability and the induction of DNA strand breakage. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 1137-41.
5. Flamm ES, Demopoulos HB, Seligman ML, Poser RG, Ransohoff J. Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke* 1978; 9: 445-7.
6. McDonald RL, Stoodley M. Pathophysiology of cerebral ischemia. *Neurol Med Chir* 1998; 38: 1-11.
7. Schweizer U, Bräuer AU, Köhrle J, Nitsch R, Savaksan NE. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Res* 2004; 45: 164-78.
8. Fang J, Jun L, Holmgren A. Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin. *J Biol Chem* 2005; 280: 25284-90.
9. Maher P, Schubert D. Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 1287-305.
10. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L1005-28.
11. Ghosh R, Mitchell DL. Effect of oxidative DNA damage in promoter elements on transcription factor binding. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 3213-8.
12. Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 463-99.
13. Kuppusamy P, Zweier JL. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J Biol Chem* 1989; 264: 9880-4.
14. Rhee SG. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med* 1999; 31: 53-9.
15. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (end of beginning). *Free Radic Res* 1999; 31: 261-72.
16. Rubbo H, Radi R, Anselmi D, Kirk M, Barnes S, Butler J, et al. Nitric oxide reaction with lipid peroxyl radicals spares alpha-tocopherol during lipid peroxidation. Greater oxidant protection from the pair nitric oxide/alpha-tocopherol than alpha-tocopherol/ascorbate. *J Biol Chem* 2000; 275: 10812-8.
17. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: C1424-37.

18. Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999; 15: 521-31.
19. Nikitovic D, Holmgren AS. S-nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. *J Biol Chem* 1996; 271: 19180-5.
20. Nauseef WM. The NADPH-dependent oxidase of phagocytes. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111: 373-82.
21. Rosen H, Orman J, Rakita RM, Michel BR, Vandevanter DR. Loss of DNA-membrane interactions and cessation of DNA synthesis in myeloperoxidase-treated *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 10048-52.
22. Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 67-101.
23. Marshall HE, Merchant K, Stamler JS. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *FASEB J* 2000; 13: 1889-990.
24. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 619-42.
25. Cortopassi GA, Wong A. Mitochondria in organismal aging and degeneration. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1410: 183-93.
26. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997; 272: 20963-6.
27. Lowther WT, Brot N, Weissbach H, Honek JF, Matthews BW. Thiol-disulfide exchange is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 6463-8.
28. Mccord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-55.
29. Melov S, Schnedider JA, Day BJ, Hinerfeld D, Coskun P, Mirra SS, et al. A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet* 1998; 18: 159-63.
30. Das KC, Lewis-Molock Y, White CW. Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 713-26.
31. Lombard M, Fontecave M, Touati D, Niviere V. Reaction of the desulfoferrodoxin from *Desulfoarculus baarsii* with superoxide anion. Evidence for a superoxide reductase activity. *J Biol Chem* 2000; 275: 115-21.
32. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer H, editor. *Methods of enzymatic analyses*. New York: Academic Pres; 1974. p. 673-83.
33. Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, Gaetani GF. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem* 1999; 274: 13908-14.
34. Masutani H, Ueda S, Yodoi J. The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis. *Cell Death Differ* 2005; 12: 991-8.

35. Miranda-Vizuite A, Spyrou G. The mitochondrial thioredoxin system. *Antioxid Redox Signal* 2000; 4: 801-10.
36. Zhou Y, Kok KH, Chun AC, Wong CM, Wu HM, Lin MC, et al. Mouse peroxiredoxin V is a thioredoxin peroxidase that inhibits p53-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268: 921-7.
37. Wood ZA, Schroder E, Robin HJ, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 3-40.
38. Patenaude A, Murthy MRV, Mirault ME. Emerging roles of thioredoxin cycle enzymes in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 1063-80.
39. Kim H, Lee TH, Park ES, Suh JM, Park SJ, Chung HK, et al. Role of peroxiredoxins in regulating intracellular hydrogen peroxide and peroxide-induced apoptosis in thyroid cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 18266-70.
40. Chang TS, Cho CS, Park S, Yu S, Kang SW, Rhee SG. Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria. *J Biol Chem* 2004; 279: 41975-84.
41. Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohe L. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 1995; 252: 38-53.
42. Rundlöf AK, Carlsten M, Giacobini MM, Arnér ESJ. Prominent expression of the selenoprotein thioredoxin reductase in the medullary rays of the rat kidney and thioredoxin reductase mRNA variants differing at the 5'untranslated region. *Biochem J* 2000; 347: 661-8.
43. Kelner MJ, Bagnell R. Alteration of endogenous glutathione peroxidase, manganese superoxide dismutase, and glutathione transferase activity in cells transfected with a copper-zinc superoxide dismutase expression vector. Explanation for variations in paraquat resistance. *J Biol Chem* 1990; 265: 10872-5.
44. Kanzok SM, Schirmer RH, Turbachova I, Iozef R, Becker K. The thioredoxin system of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Glutathione reduction revisited. *J Biol Chem* 2000; 275: 40180-6.
45. Kanzok SM, Fechner A, Bauer H, Ulschmid JK, Muller HM, Botella-Munoz J, et al. Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 2001; 291: 643-6.
46. Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J. Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 351-369.
47. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 1191-212.
48. Holmgren A, Arnér ESJ, Aslund F, Björnstedt M, Zhong L, Nakamura H, Nikitovic D, editors. Redox regulation by the thioredoxin and glutaredoxin system. New York: MarcelDekker Inc;1998.p.229-46.
49. Holmgren A, Björnstedt M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 1995; 252: 199-208.
50. Williams CHJ. Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase,

thioredoxin reductase, and mercuric ion reductase-A family of flavoenzyme transhydrogenases. In: Müller F, editor. Chemistry and biochemistry of flavoenzymes. Boca Raton: CRC Press; 1992. p. 121-211.

51. Minard KI, Jennings GT, Loftus TM, Xuan D, McAlister-Henn L. Sources of NADPH and expression of mammalian NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 1998; 273: 31486-93.

52. Laurent TC, Moore EC, Reichard P. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides VI. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli*. J Biol Chem 1964; 239: 3436-44.

53. Tamura T, Stadtman TC. A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: Purification, properties, and thioredoxin reductase activity. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 1006-11.

54. Masutani H, Yodoi J. Overview: thioredoxin. In: Packer L, editor. Methods Enzymol. San Diego: Academic Press; 2002. p. 279-86.

55. Thelander L. Thioredoxin reductase. Characterization of a homogenous preparation from *Escherichia coli* B. J Biol Chem 1967; 242: 852-9.

56. Zanetti G, Williams CHJ. Characterization of the active center of thioredoxin reductase. J Biol Chem 1967; 242: 5232-6.

57. Gromer S, Schirmer RH, Becker K. News and views on thioredoxin reductases. Redox Report 1999; 4: 221-8.

58. Florencio FJ, Yee BC, Johnson TC, Buchanan BB. An NADP/thioredoxin system in leaves: Purification and characterization of NADP-thioredoxin reductase and thioredoxin h from spinach. Arch Biochem Biophys 1988; 266: 496-507.

59. Speranza ML, Ronchi S, Minchiotti L. Purification and characterization of yeast thioredoxin reductase. Biochim Biophys Acta 1973; 327: 274-81.

60. Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 2444-8.

61. Arscott LD, Gromer S, Schirmer RH, Becker K, Williams CHJ. The mechanism of thioredoxin reductase from human placenta is similar to the mechanisms of lipoamide dehydrogenase and glutathione reductase and is distinct from the mechanism of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 3621-6.

62. Zhong L, Arnér ES, Ljung J, Åslund F, Holmgren A. Rat and calf thioredoxin reductase are homologous to glutathione reductase with a carboxyl-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate selenocysteine residue. J Biol Chem 1998; 273: 8581-91.

63. Arteel GE, Briviba K, Sies H. Function of thioredoxin reductase as a peroxynitrite reductase using selenocystine or ebselen. Chem Res Toxicol 1999; 12: 264-9.

64. Gromer S, Urig S, Becker K. The Thioredoxin System-From Science to Clinic. Med Res Rev 2004; 24: 40-89.

65. Gasdaska PY, Gasdaska JR, Cochran S, Powis G. Cloning and

sequencing of a human thioredoxin reductase. *FEBS Lett* 1995; 373: 5-9.

66. Oberley TD, Verwiebe E, Zhong W, Kang SW, Rhee SG. Localization of the thioredoxin system in normal rat kidney. *Free Radic Biol Med* 2001;30:412-424.

67. Miranda-Vizuete A, Damdimopoulos AE, Pedrajas JR, Gustafsson JA, Spyrou G. Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expression and genomic organization. *Eur J Biochem* 1999; 261: 405-12.

68. Lee SR, Kim JR, Kwon KS, Yoon HW, Levine RL, Ginsburg A, et al. Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredoxin reductase from rat liver. *J Biol Chem* 1999; 274: 4722-34.

69. Watabe S, Makino Y, Ogawa K, Hiroi T, Yamamoto Y, Takahashi SY. Mitochondrial thioredoxin reductase in bovine adrenal cortex its purification, properties, nucleotide/amino acid sequences, and identification of selenocysteine. *Eur J Biochem* 1999; 264: 74-84.

70. Spyrou G, Enmark E, Miranda-Vizuete A, Gustafsson J. Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J Biol Chem* 1997; 272: 2936-41.

71. Jurado J, Prieto-Alamo MJ, Madrid-Risquez J, Pueyo C. Absolute gene expression patterns of thioredoxin and glutaredoxin redox system in Mouse. *J Biol Chem* 2003; 278: 45546-54.

72. Waksman G, Krishna TS, Williams CHJ, Kuriyan J. Crystal structure of Escherichiacolithioredoxin reductase refined at 2 Å resolution. Implications for a large conformational change during catalysis. *J Mol Biol* 1994; 236: 800-16.

73. Lennon BW, Williams CHJ. Reductive half-reaction of thioredoxin reductase from Escherichia coli. *Biochemistry* 1997; 36: 9464-77.

74. Veine DM, Ohnishi K, Williams CHJ. Thioredoxin reductase from Escherichiacoli:Evidence of restriction to a single conformation upon formation of a crosslink between engineered cysteines. *Protein Sci* 1998; 7: 369-75.

75. Gladyshev VN, Jeang KT, Stadtman TC. Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 6146-51.

76. Rietveld P, Arscott LD, Berry A, Scrutton NS, Deonarain MP, Perham RN, et al. Reductive and oxidative half-reactions of glutathione reductase from Escherichia coli. *Biochemistry* 1994; 33: 13888-95.

77. Arnér ESJ, Nordberg J, Holmgren A. Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase. *Biochem Biophys Res* 1996; 225: 268-74.

78. Björnstedt M, Hamberg M, Kumar S, Xue J, Holmgren A. Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. *J Biol Chem* 1995; 270: 11761-4.

79. Holmgren A. Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action *J Biol Chem* 1979; 254: 9113-9.
80. May JM, Mendiratta S, Hill KE, Burk RF. Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 1997; 272: 22607-10.
81. May JM, Cobb CE, Mendiratta S, Hill KE, Burk RF. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 1998; 273: 23039-45.
82. Arnér ESJ, Zhong L, Holmgren A. Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 1999; 300: 226-39.
83. Holmgren A, Lyckeberg C. Enzymatic reduction of alloxan by thioredoxin and NADPH-thioredoxin reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 5149-52.
84. Luthman M, Holmgren A. Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. *Biochemistry* 1982; 21: 6628-33.
85. Björnstedt M, Kumar S, Holmgren A. Selenodiglutathione is a highly efficient oxidant of reduced thioredoxin and a substrate for mammalian thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 1992; 267: 8030-4.
86. Björnstedt M, Kumar S, Holmgren A. Selenite and selenodiglutathione: Reactions with thioredoxin systems. *Methods Enzymol* 1995; 252: 209-19.
87. Gromer S, Gross JH. Methylseleninate is a substrate rather than an inhibitor of mammalian thioredoxin reductase. Implications for the antitumor effects of selenium. *J Biol Chem* 2002; 277: 9701-6.
88. Casso D, Beach D. A mutation in a thioredoxin reductase homolog suppresses p53-induced growth inhibition in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* *Mol Gen Genet* 1996; 252: 518-29.
89. Andersson M, Holmgren A, Spyrou G. NK-lysin, a disulfide-containing effector peptide of T-lymphocytes, is reduced and inactivated by human thioredoxin reductase. Implication for a protective mechanism against NK-lysin cytotoxicity. *J Biol Chem* 1996; 271: 10116-20.
90. Björnstedt M, Xue J, Huang W, Akesson B, Holmgren A. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1994; 269: 29382-4.
91. Lundström-Ljung J, Birnbach U, Rupp K, Soling HD, Holmgren A. Two resident ER-proteins, CaBP1 and CaBP2, with thioredoxin domains, are substrates for thioredoxin reductase: Comparison with protein disulfide isomerase. *FEBS Lett* 1995; 357: 305-8.
92. Becker K, Gromer S, Schirmer RH, Müller S. Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6118-25.
93. Holmgren A. Bovine thioredoxin system. Purification of thioredoxin reductase from calf liver and thymus and studies of its function in disulfide

reduction. *J Biol Chem* 1977; 252: 4600-6.

94. Ferrari DM, Söling HD. The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem* 1999; 339: 1-10.

95. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993; 300: 535-543.

96. Tamura T, Gladyshev V, Liu SY, Stadtman TC. The mutual sparing effects of selenium and vitamin E in animal nutrition may be further explained by the discovery that mammalian thioredoxin reductase is a selenoenzyme. *Biofactors* 1996; 5: 99-102.

97. Gromer S, Wissing J, Behne D, Ashman K, Schirmer RH, Flohé L, Becker K. A hypothesis on the catalytic mechanism of the selenoenzyme thioredoxin reductase. *Biochem J* 1998; 332: 591-2.

98. Zhong L, Arnér ESJ, Holmgren A. Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: The active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5854-9.

99. Holmgren A. The function of thioredoxin and glutathione in deoxyribonucleic acid synthesis. *Biochem Soc Trans* 1977; 5: 611-2.

100. Holmgren A. Thioredoxin structure and mechanism: Conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* 1995; 3: 239-43.

101. Bodenstein J, Follmann H. Characterization of two thioredoxins in pig heart including a new mitochondrial protein. *Z Naturforsch* 1991; 46: 270-9.

102. Andersen JF, Sanders DA, Gasdaska JR, Weichsel A, Powis G, Montfort WR. Human thioredoxin homodimers: Regulation by pH, role of aspartate 60, and crystal structure of the aspartate 60 → asparagine mutant. *Biochemistry* 1997; 36: 13979-88.

103. Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* 1994; 269: 27670-8.

104. Oblong JE, Berggren M, Powis G. Biochemical structural, and biological properties of human thioredoxin active site peptides. *FEBS Lett* 1994; 343: 81-4.

105. Nakamura H, Matsuda M, Furuke Y, Kitaoka S, Iwata K, Toda T, et al. Adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin protects endothelial F-2 cell injury caused by activated neutrophils or hydrogen peroxide. *Immunol Lett* 1994; 42: 75-80.

106. Rubartelli A, Bajetto A, Allavena G, Wollman E, Sitia R. Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway. *J Biol Chem* 1992; 267: 24161-4.

107. Arnér ESJ, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6102-9.

108. Powis G, Mustacich D, Coon A. The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 312-

22.

109. Wakasugi N, Tagaya Y, Wakasugi H, Mitsui A, Maeda M, Yodoi J, et al. Adult T-cell leukemia-derived factor/thioredoxin, produced by both human T-lymphotropic virus type I-and Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes, acts as an autocrine growth factor and synergizes with interleukin 1 and interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 8282-6.

110. Miller LA, Usachenko J, McDonald RJ, Hyde DM. Trafficking of neutrophils across airway epithelium is dependent upon both thioredoxin- and pertussis toxin-sensitive signaling mechanism. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 201-8.

111. Nakamura H, De Rosa SC, Yodoi J, Holmgren A, Ghezzi P, Herzenberg LA. Chronic elevation of plasma thioredoxin: inhibition of chemotaxis and curtailment of life expectancy in AIDS. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 2688-93.

112. Hofman ER, Boyanapalli M, Lindner DJ, Weihua X, Hassel BA, Jagus R, et al. Thioredoxin reductase mediates cell death effects of the combination of beta interferon and retinoic acid. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 6493-504.

113. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado A, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 175: 1129-32.

114. Fernando MR, Nanri H, Yoshitake S, Nagata-Kuno K, Minakami S. Thioredoxin regenerates proteins inactivated by oxidative stress in endothelial cells. *Eur J Biochem* 1992; 209: 917-22.

115. Mitsui A, Hirawaka T, Yodoi J. Reactive oxygen-reducing and protein-refolding activities of adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186: 1220-6.

116. Das KC, Das CK. Thioredoxin, a singket oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: redox independent functions. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277: 443-7

117. Chen Y, Cai J, Murphy TJ, Jones DP. Overexpressed human mitochondrial thioredoxin confers resistance to oxidant-induced apoptosis in human osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 2000; 277: 33242-8.

118. Matsui M, Oshima M, Oshima H, Takaku K, Maruyama T, Yodoi J. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the Mouse thioredoxin gene. *Dev Biol* 1996; 178: 179-85.

119. Tagaki Y, Mitsui A, Nishiyama A, Nozaki K, Sono H, Gon Y, et al. Overexpression of thioredoxin in transgenic mice attenuates focal ischemic brain damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4131-6.

120. Hoshino T, Nakamura H, Okamoto M, Kato S, Araya S, Nomiya K, et al. Redox-active protein thioredoxin prevents proinflammatory cytokine- or bleomycin-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 1075-83.

121. Hotta M, Tashiro F, Ikegami H, Niwa H, Ogihara T, Yodoi J et al. Pancreatic beta cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative

and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes. *J Exp Med* 1998; 188: 1445-51.

122. Yoon BI, Hirabayashi Y, Kaneko T, Kodama Y, Kanno J, Yodoi J, et al. Transgene expression of thioredoxin (TRX/ADF) protects against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced hematotoxicity. *Arch Environ Contam Toxicol* 2001; 41: 232-6.

123. Mitsui A, Hamuro J, Nakamura H, Kondo N, Hirabayashi Y, Ishizaki-Koizumi S, et al. Overexpression of human thioredoxin in transgenic mice controls oxidative stress and life span. *Antioxi. Redox Signal* 2002; 4: 693-6.

124. Sun QA, Wu Y, Zappacosta F, Jeang KT, Lee BJ, Hatfield DL, Gladyshev VN. Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. *J Biol Chem* 1999; 274: 24522-30.

125. Wei SJ, Botero A, Hirota K, Bradbury CM, Markovina S, Laszlo A, et al. Thioredoxin nucleae translocation and interaction with redox factor-1 activates the activator protein-1 transcription factor in response to ionizing radiation. *Cancer Res* 2000; 60: 6688-95.

126. Das KC, Guo X, White CW. Induction of thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in lungs of newborn primates by oxygen. *Am J Physiol* 1999; 276: L530-9.

127. Schallreuter KU, Wood JM. Azelaic acid as a competitive inhibitor of thioredoxin reductase in human melanoma cells. *Cancer Lett* 1987; 36: 297-305.

128. Nalvarte I, Damdimopoulos AE, Spyrou G. Human mitochondrial thioredoxin reductase reduces cytochrome c and confers resistance to complex III inhibition. *Free Radic Biol Med* 2004; 36:1270-8.

129. Cooper CE, Patel RP, Brookes PS, Darley-Usmar VM. Nanotransducers in cellular redox signaling: Modification of thiols by reactive oxygen and nitrogen species. *Trends Biochem Sci* 2002; 27: 489-92.

130. Hirota K, Matsui M, Murata M, Takashima Y, Cheng FS, Itoh T, Fukuda K, et al. Nucleoredoxin, glutaredoxin, and thioredoxin differentially regulate NF-kB, AP-1, and CREB activation in HEK293 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 274: 177-82.

131. Matthews JR, Wakasugi N, Virelizier JL, Yodoi J, Hay RT. Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kB by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 3821-30.

132. Grippo JF, Holmgren A, Pratt WB. Proof that the endogenous, heat-stable glucocorticoid receptor-activating factor is thioredoxin. *J Biol Chem* 1985; 260: 93-7.

133. Das AK, Hummel BC, Gleason FK, Holmgren A, Walfish PG. Bacterial and mammalian thioredoxin systems activate iodothyronine 5'-deiodination. *Biochem Cell Biol* 1988; 66: 460-4.

134. Hainaut P, Milner J. Redox modulation of p53 conformation and

- sequence-specific DNA binding in vitro *Cancer Res* 1993; 53: 4469-73.
135. Bargonetti J, Manfredi JJ. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr Opin Oncol* 2002; 14: 86-91.
 136. Gladyshev VN, Factor VM, Housseau F, Hatfield DL. Contrasting patterns of regulation of the antioxidant selenoproteins, thioredoxin reductase, and glutathione peroxidase, in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 488-93.
 137. Gitler C, Zarmi B, Kalef E, Meller R, Zor U, Goldman R. Calcium-dependent oxidation of thioredoxin during cellular growth initiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 624-8.
 138. Chattopadhyaya R, Meador WE, Means AR, Quijcho FA. Calmodulin structure refined at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol* 1992; 228: 1177-92.
 139. Sen CK. Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr Top Cell Regul* 2000; 36: 1-30.
 140. Hirota K, Matsui M, Iwata S, Nishiyama A, Mori K, Yodoi J. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3633-8.
 141. Ueno M, Masutani H, Arai RJ, Yamauchi A, Hirota K, Sakai T, et al. Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. *J Biol Chem* 1999; 274: 35809-15.
 142. Karimpour S, Lou J, Lin LL, Rene LM, Lagunas L, Ma X, et al. Thioredoxin reductase regulated AP-1 activity as well as thioredoxin nuclear localization via active cysteines in response to ionizing radiation. *Oncogene* 2002; 21: 6317-27.
 143. Sakurai A, Yuasa K, Shoji Y, Himeno S, Tsujimoto M, Kunimoto M, et al. Overexpression of thioredoxin reductase 1 regulates NF-kappa B activation. *J Cell Physiol* 2004; 198: 22-30.
 144. Ueda S, Nakamura H, Masutani H, Sasada T, Yonehara S, Takabayashi A, et al. Redox regulation of caspase-3(-like) protease activity: regulatory roles of thioredoxin and cytochrome c. *J Immunol* 1998; 161: 6689-95.
 145. Vieira HL, Haouzi D, El Hamel C, Jacotot E, Belzacq AS, Brenner C, et al. Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell Death Differ* 2000; 7: 1146-54.
 146. Tanaka T, Hosoi F, Yamaguchi-Iwai Y, Nakamura H, Masutani H, Ueda S, et al. Thioredoxin-2 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis. *EMBO J* 2002; 21: 1695-703.
 147. Damdimopoulos AE, Miranda-Vizuete A, Pelto-Huikko M, Gustafsson JA, Spyrou G. Human mitochondrial thioredoxin. Involvement in mitochondrial membrane potential and cell death. *J Biol Chem* 2002; 277: 33249-57.
 148. Haendeler J, Hoffmann J, Tischler V, Berk BC, Zeiher AM, Dimmeler S. Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 743-9.

149. Ichijo H, Nishida E, Irie K, Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, et al. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 1997; 275: 90-4.
150. Saito M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, et al. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* 1998; 17: 2596-606.
151. Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 1989;264:13963–13966.
152. Sumida Y, Nakashima T, Yoh T, Nakajima Y, Ishikawa H, Mitsuyoshi H, et al. Serum thioredoxin levels as an indicator of oxidative stress in patients with hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2000; 33: 616-22.
153. Miyazaki K, Noda N, Okada S, Hagiwara Y, Miyata M, Sakurabayashi I, et al. Elevated serum level of thioredoxin in patients with hepatocellular carcinoma. *Biotherapy* 1998; 11: 277-88.
154. Björkhem L, Teclebrhan H, Kesen E, Olsson JM, Eriksson LC, Björnstedt M. Increased levels of cytosolic thioredoxin reductase activity and mRNA in rat liver nodules. *J Hepatol* 2001; 35: 259-64.
155. Clark LC, Combs GFJ, Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK, Chow J, et al. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA* 1996; 276: 1957-63.
156. Sinha R, Unni E, Ganther HE, Medina D. Methylseleninic acid, a potent growth inhibitor of synchronized mouse mammary epithelial tumor cells in vitro. *Biochem Pharmacol* 2001; 61: 311-7.
157. Kahlos K, Soini Y, Saily M, Koistinen P, Kakko S, Paakko P, et al. Up-regulation of thioredoxin and thioredoxin reductase in human malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer* 2001; 95: 198-204.
158. Ferret PJ, Soum E, Negre O, Wollman EE, Fradelizi D. Protective effect of thioredoxin upon NO-mediated cell injury in THP1 monocytic human cells. *Biochem J* 2000; 346: 759-65.
159. Matsuda M, Masutani H, Nakamura H, Miyajima S, Yamauchi A, Yonehara S, et al. Protective activity of adult T cell leukemia-derived factor (ADF) against tumor necrosis factor-dependent cytotoxicity on U937 cells. *J Immunol* 1991; 147: 3837-41.
160. Reddy PG, Bhuyan DK, Bhuyan KC. Lens-specific regulation of the thioredoxin-1 gene, but not thioredoxin-2, upon in vivo photochemical oxidative stress in the Emory Mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265: 345-9.
161. Aota M, Matsuda K, Isowa N, Wada H, Yodoi J, Ban T. Protection against reperfusion-induced arrhythmias by human thioredoxin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27: 727-32.
162. Rubartelli A, Bonifaci N, Sitia R. High rates of thioredoxin secretion correlate with growth arrest in hepatoma cells. *Cancer Res* 1995; 55: 675-80.

163. Nakamura H, De Rosa S, Roederer M, Anderson MT, Dubs JG, Yodoi J, et al. Elevation of plasma thioredoxin levels in HIV-infected individuals. *Int Immunol* 1996; 8: 603-11.
164. Saito I, Shimuta M, Terauchi K, Tsubota K, Yodoi J, Miyasaka N. Increased expression of human thioredoxin/adult T cell leukemia-derived factor in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 773-82.
165. Yoshida S, Katoh T, Tetsuka T, Uno K, Matsui N, Okamoto T. Involvement of thioredoxin in rheumatoid arthritis: its costimulatory roles in the TNF-alpha-induced production of IL-6 and IL-8 from cultured synovial fibroblasts. *J Immunol* 1999; 163: 531-8.
166. Ischiropoulos H, Beckman JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effects or association?. *J Clin Invest* 2003; 111: 163-9.
167. Sagara JI, Miura K, Bannai S. Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. *J Neurochem* 1993; 61: 1672-6.
168. Damier P, Hirsch EC, Zhang P, Agid Y, Javoy-Agid F. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* 1993; 52: 1-6.
169. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999; 79: 1431-568.
170. Sies H. Strategies of antioxidant defence. *Eur J Biochem* 1993; 215: 213-9.
171. Mirault ME, Tremblay A, Furling D, Trépanier G, Dugré F, Puymirat J, et al. Transgenic glutathione peroxidase mouse models for neuroprotection studies. *Ann NY Acad Sci* 1994; 738: 104-15.174.
172. Ishibashi N, Prokopenko O, Weisbrodt-Lefkowitz M, Reuhl KR, Mironchitschenko O. Glutathione peroxidase inhibits cell death and glial activation following experimental stroke. *Brain Res Mol Brain Res* 2002; 109: 34-44.
173. Holmgren A. Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* 1985; 54: 237-71.
174. Hirota K, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. Thioredoxin superfamily and thioredoxin-inducing agents. *Ann NY Acad Sci* 2002; 957: 189-99.
175. Stemme S, Hansson HA, Holmgren A, Rozell B. Axoplasmic transport of thioredoxin and thioredoxin reductase in rat sciatic nerve. *Brain Res* 1985; 359: 140-6.
176. Lippoldt A, Padilla CA, Gerst H, Andbjør B, Richter E, Holmgren A, et al. Localization of thioredoxin in the rat brain and functional implications. *J Neurosci* 1995; 15: 6747-56.
177. Tomimoto H, Akiguchi I, Wakita H, Kimura J, Hori K, Yodoi J. Astroglial expression of ATL-derived factor, a human thioredoxin homologue, in the gerbil brain after transient global ischemia. *Brain Res* 1993; 625: 1-8.
178. Takagi Y, Horikawa F, Nozaki K, Sugino T, Hashimoto N, Yodoi J. Expression and distribution of redox regulatory protein, thioredoxin during transient focal brain ischemia in the rat. *Neurosci Lett* 1998; 251: 25-8.

179. Takagi Y, Tokime T, Nozaki K, Gon Y, Kikuchi H, Yodoi J. Redox control of neuronal damage during brain ischemia after middle cerebral artery occlusion in the rat: immunohistochemical and hybridization studies of thioredoxin. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 206-14.
180. Mansur K, Iwahashi Y, Kiryu-Seo S, Su Q, Namikawa K, Yodoi J. Up-regulation of thioredoxin expression in motor neurons after nerve injury. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 62: 86-91.
181. Hattori I, Takagi Y, Nozaki K, Kondo N, Bai J, Nakamura H, et al. Hypoxia-ischemia induces thioredoxin expression and nitrotyrosine formation in new-born rat brain. *Redox Rep* 2002; 7: 256-9.
182. Hori K, Katayama M, Sato N, Ishii K, Waga S, Yodoi J. Neuroprotection by glial cells through adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin. *Brain Res* 1994; 652: 304-10.
183. Hattori I, Takagi Y, Nakamura H, Nozaki K, Bai J, Kondo N, et al. Intravenous administration of thioredoxin decreases brain damage following transient focal cerebral ischemia in mice. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6: 81-7.
184. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 677-736.
185. Greenberg ME, Greene LA, Ziff EB. Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. *J Biol Chem* 1985; 260: 14101-10.
186. Bai J, Nakamura H, Kwon YW, Hattori I, Yamaguchi Y, Kim YC, et al. Critical roles of thioredoxin in nerve growth factor-mediated signal transduction and neurite outgrowth in PC12 cells. *J Neurosci* 2003; 23: 503-9.
187. Haapasalo H, Kylaniemi M, Paunul N, Kinnula VL, Soini Y. Expression of antioxidant enzymes in astrocytic brain tumors. *Brain Pathol* 2003; 13: 155-64.
188. Hori K, Hatfield D, Maldarelli F, Lee BJ, Clouse KA. Selenium supplementation suppresses tumor necrosis factor alpha-induced human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997; 13: 1325-30.
189. Berggren M, Gallegos A, Gasdaska J, Powis G. Cellular thioredoxin reductase activity is regulated by selenium. *Anticancer Res* 1997; 17: 3377-80.
190. Marcocci L, Flohe L, Packer L. Evidence for a functional relevance of the selenocysteine residue in mammalian thioredoxin reductase. *Biofactors* 1997; 6: 351-8.
191. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 2003; 300: 1439-43.
192. Stadtman TC. Selenocysteine. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 83-100.
193. Chen J, Berry MJ. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J Neurochem* 2003; 86: 1-12.

194. Burk RF, Hill KE, Motley AK. Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P. *J Nutr* 2003; 133: 1517S-20S.
195. Hill KE, Zhou J, McMahan WJ, Motley AK, Atkins JF, Gesteland RF, et al. Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the Mouse. *J Biol Chem* 2003; 278: 136440-6.
196. Krapfenbauer K, Engidawork E, Cairns N, Fountoulakis M, Lubec G. Abberant expression of peroxiredoxin subtypes in neurodegenerative disorders. *Brain Res* 2003; 967: 152-60.
197. Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant anzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* 1995; 45: 1594-601.
198. Lovell MA, Xie C, Gabbita SP, Markesbery WR. Decreased thioredoxin and thioredoxin reductase levels in Alzheimer's disease brain. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 418-27.
199. Ichimiya S, Davis JG, O'Rourke DM, Katsumata M, Grene MI. Murine thioredoxin peroxidase delays neuronal apoptosis and is expressed in areas of the brain most susceptible to hypoxic and ischemic injury. *DNA Cell Biol* 1997; 443: 311-21.
200. Cohen S. Isolation of a Mouse submaxillary gland protein accelerating incision eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem* 1962; 237: 1555-62.
201. Dibias MD, Rhodes CT. The design of analytical methods for use in topical epidermal growth factor product development. *J Pharm Pharmacol* 1991; 43: 553-8.
202. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1990; 265: 7709-12.
203. Fallon JH, Seroogy KB, Loughlin SE, Morrison RS, Bradshaw RA, Knaver DJ, et al. Epidermal growth factor immunoreactive material in the central nervous system: location and development. *Science* 1984; 224: 1107-9.
204. Libermann TA, Razon N, Bartal AD, Yardin Y, Schlessinger J, Soreq H. Expression of epidermal growth factor receptors in human brain tumors. *Can Res* 1984; 44: 753-60.
205. Huff KR, Guroff G. Nerve growth factor-induced reduction in epidermal growth factor responsiveness and epidermal growth factor receptors in PC12 cells: an aspect of cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 89: 175-80.
206. Morrison RS, Keating RF, Muskall JR. Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor exert different trophic effects on SSS neurons. *J Neurosci* 1988; 21: 71-9.
207. Birecree E, King LEJ, Nanney LB. Epidermal growth factor and its receptor in the developing human nervous system. *Dev Brain Res* 1991; 60: 145-54.
208. Honegger P, Guentert-Lauber B. Epidermal growth factor (EGF)

stimulation of cultured brain cells. Enhancement of the developmental increase in glial enzymatic activity. *Dev Brain Res* 1983; 11: 245-52.

209. Schlessinger J, Ulrich A. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 1992; 9: 383-91.

210. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15:247-54.

211. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.

212. Halvey PJ, Watson WH, Hansen MH, Go YM, Samali A, Jones DP. Compartmental oxidation of thiol-disulphide redox couples during epidermal growth factor signaling. *J Biochem* 2005; 386: 215-9.

213. Nakashima I, Kato M, Akhand AA, Suzuki H, Takeda K, Hossain K, et al. Redox-linked signal transduction pathways for protein tyrosine kinase activation. *Antioxid Redox Signaling* 2002; 4: 517-31.

214. Watson WH, Yang X, Choi YE, Jones DP, Kehrer JP. Thioredoxin and its role in toxicology. *Toxicol Sci* 2004; 78: 3-14.

215. Satoh T, Enokido Y, Kubo T, Yamada M, Hatanaka H. Oxygen toxicity induces apoptosis in neuronal cells. *Cell Mol Neurobiol* 1998;18: 649-66.

216. Hicks D, Heidinger V, Mohan-Said S, Sahel J, Dreyfus H. Growth factors and gangliosides as neuroprotective agents in excitotoxicity and ischemia. *Gen Pharmac* 1998; 30: 265-73.

217. Breitling R, Hoeller D. Current challenges in quantitative modeling of epidermal growth factor signaling. *FEBS Lett* 2005; 579: 6289-94.

218. Wiley HS, Shvartsman SY, Lauffenburger DA. Computational modeling of the EGF-receptor system: a paradigm for system biology. *Trends Cell Biol* 2003; 13: 43-50.

219. Güneş H. Sitokinlerin hücre döngüsü üzerinde etkileri. *Tr J Biol* 1999; 23: 283-92.

220. Gupta S. A decision between life and death during TNF-induced signaling. *J Clin Immunol* 2002; 22: 185-94.

221. Gupta S. Molecular steps of TNF receptor-mediated apoptosis. *Curr Mol Med* 2001; 1: 299–306.

222. Fagiola U, Cossarizza A, Scala E, Fanales-Belasio E, Ortolani C, Cozzi E, et al. Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur J Immunol* 1993; 23: 2375–8.

223. Ichijo H, Nishida E, Irie K, Ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, et al. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 1997; 275: 90-4.

224. Higuchi M, Proske RJ, Yeh ET. Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis. *Oncogene* 1998; 17: 2515-24.

225. Grimaldi LM, Martino GV, Franciotta DM, Brustia R, Castagna A, Pristera R, et al. Elevated tumor necrosis factor-alpha levels on spinal fluid

from HIV-1 infected patients with central nervous system involvement. *Annals of Neurology* 1991; 29: 21-5.

226. Leist TP, Frei K, Kam-Hansen S, Zinkernagel RM, Fontana A. Tumor necrosis factor α in cerebrospinal fluid during bacterial, but not viral, meningitis: evaluation in murine model infections and in patients. *Journal of Experimental Medicine* 1988; 167: 1743-58.

227. Hirota K, Murata M, Itoh T, Yodoi J, Fukuda K. Redox-sensitive transactivation of epidermal growth factor receptor by tumor necrosis factor confers the NF- κ B activation. *J Biol Chem* 2001; 276: 25953-8.

228. Finkel T. Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett* 2000; 476: 52-4.

229. Lee SR, Kwon KS, Kim SR, Rhee SG. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1998; 273: 15366-72.

230. Liu H, Nishitoh H, Ichijo H, Kyriakis JM. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 2198-208.

231. Astrup J, Sørensen PM, Sørensen HR. Oxygen and glucose consumption related to Na⁺-K⁺ transport in the canine brain. *Stroke* 1981; 12: 726-30.

232. Globus MYT, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Vladev I, Ginsberg MD. Effect of ischemia on the in vivo release of striatal dopamine, glutamate and GABA studied by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 1988; 51: 1455-64.

233. Olney JW, Sharpe LG. Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science* 1969; 1166: 386-8.

234. Small DL, Buchan AM. NMDA antagonists: their role in neuroprotection. *Int Rev Neurobiol* 1997; 40: 137-71.

235. Luetjens MC, Bui NT, Sengpiel B, Münstermann G, Poppe M, Krohn AJ, et al. Mitochondrial dysfunction in excitotoxic neuron death: cytochrome c release and secondary increase in superoxide production. *J Neurosci* 2000; 20: 5715-23.

236. Prieto-alamo MJ, Jurado J, Gallardo-madueno R, Monje-casas F, Holmgren A, Pueyo C. Transcriptional regulation of glutaredoxin and thioredoxin pathways and related enzymes in response to oxidative stress. *J Biol Chem* 2000; 275: 13398-405.

237. Tanaka T, Nishiyama Y, Okada K, Hirota K, Matsui M, Yodoi J, et al. Induction and nuclear translocation of thioredoxin by oxidative damage in the mouse kidney: independence of tubular necrosis and sulfhydryl depletion. *Lab Invest* 1997; 77: 145-55.

238. Yagi K, Liu C, Bando T, Yokomise H, Inui K, Hitomi S, et al. Inhibition of reperfusion injury by human thioredoxin (adult T-cell leukemia-derived factor) in canine lung transplantation. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 1994; 108: 913-21.

239. Endoh M, Kunishita T, Tabira T. Thioredoxin from activated macrophages as a trophic factor for central cholinergic neurons in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192: 760-5.
240. Fukuse T, Hirata T, Yokomise S, Hasegawa K, Inui A, Mitsui T, et al. Attenuation of ischemia reperfusion injury by human thioredoxin. *Thorax* 1995; 50: 387-91.
241. Schenk H, Klein M, Erdbrugger W, Droge W, Schulze-Osthoff K. Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1672-6.
242. Uno H, Matsuyama T, Akita H, Nishimura H, Sugita M. Induction of tumor necrosis factor-alpha in the mouse hippocampus following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1977; 17: 491-9.
243. Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, et al. Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 1997; 28: 1233-44.
244. Yang GY, Gong C, Qin Z, Liu XH, Betz AL. Tumor necrosis factor alpha expression produces increased blood-brain barrier permeability following temporary focal cerebral ischemia in mice. *Mol Brain Res* 1999; 69: 135-43.
245. Akins PT, Liu PK, Hsu CY. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia. Friend or foe? *Stroke* 1996; 27: 1682-7.
246. Massa SM, Swanson RA, Sharp FR. The stress gene response in brain. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1996; 8: 95-158.
247. Fisher M, Meadows ME, Do T, Weise J, Trubetskoy V, Charette M, et al. Delayed treatment with intravenous basic fibroblast growth factor reduces infarct size following permanent focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15: 953-9.
248. Takagi K, Kanemitsu H, Kohno M, Mitsuda K, Tomukai N, Oka H, et al. Temporal profile of the superoxide dismutase and the ascorbic acid in focal cerebral ischemia. *No To Shinkei* 1991; 43: 1075-80.
249. Majid A, He YY, Gidday JM, Kaplan SS, Gonzales ER, Park TS, et al. Differences in vulnerability to permanent focal cerebral ischemia among 3 common mouse strains. *Stroke* 2000; 31: 2707-14.
250. Shichinoke H, Kuroda S, Yasuda H, Ishikawa T, Iwai M, Horiuchi M, et al. Neuroprotective effects of the free radical scavenger Edavarone (MCI-186) in mice permanent focal brain ischemia. *Brain Res* 2004; 1029: 200-6.
251. Shichinoke H, Kuroda S, Abumiya T, Ikeda J, Kobayashi T, Yoshimoto, et al. FK506 reduces infarct volume due to permanent focal cerebral ischemia by maintaining BAD turnover and inhibiting cytochrome c release. *Brain Res* 2004; 1001: 51-9.
252. Hill KE, Mc Collum GW, Boeglin ME. Thioredoxin reductase activity is decreased by selenium deficiency, *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234: 293-5.

253. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
254. Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: pathophysiology. *J Neurosurg* 1992; 77: 169-84.
255. Branston NM, Hope DT, Symon L. Barbiturates in focal ischemia of primate cortex: Effects on blood flow distribution, evoked potential and extracellular potassium. *Stroke* 1979; 10: 647-53.
256. Garcia JH, Anderson ML. Physiopathology of cerebral ischemia. *Rev Neurobiol* 1989; 4: 303-24.
257. Schallreuter KU, Pittelkow MR, Wood JM. EF-hands calcium binding regulates the thioredoxin reductase/ thioredoxin electron transfer in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 162: 1311-6.
258. Oblong JE, Powis G. A comment on the absence of calcium regulation of human thioredoxin reductase. *FEBS Lett* 1993; 334: 1-2.
259. Turocz T, Chang VWH, Engelman RM, Maulik N, Ho YS, Das DK. Thioredoxin redox signaling insight with transgenic mice overexpressing Trx1. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35:695-704.
260. Uemura Y, Miller JM, Matson WR, Beal MF. Neurochemical analysis of focal ischemia in rats. *Stroke* 1991; 22: 1548-53.
261. Kondo T, Reaume AG, Huang TT, Carlson E, Murakami K, Chen SF, et al. Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 1997; 17: 4180-9.
262. Mikawa S, Li Y, Huang TT, Carlson E, Chen S, Kondo T, et al. Cerebral infarction is exacerbated in mitochondrial manganese superoxide dismutase (SOD-2) knockout mutant mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Soc Neurosci Abstr* 1995; 21: 1268.
263. Mizui T, Kinouchi H, Chan PH. Depletion of brain glutathione by buthione sulfoximine enhances cerebral ischemic injury in rats. *Am J Physiol* 1992; 262: H313-7.
264. Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1997; 272: 217-21.
265. Scheid MP, Woodgett JR. Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett* 2003; 546:108-12.
266. Martin D, Salinas M, Fujita N, Tsuruo T, Cuadrado A. Ceramide and reactive oxygen species generated by H₂O₂ induce caspase-3-independent degradation of Akt/protein kinase. *B J Biol Chem* 2002; 277: 42943-52.
267. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani T, Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995; 270: 296-9.

268. Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, et al. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide, role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1997; 272: 217-21.
269. Kim MR, Chang HS, Kim BH, Kim S, Baek SH, Kim JH, et al. Involvements of mitochondrial thioredoxin reductase (TrxR2) in cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 119-24.
270. Yamada M, Ikeuchi T, Hatanak H. The neurotrophic action and signaling of epidermal growth factor. *Prog Neurobiol* 1997; 51: 19-37.
271. Bucellato FR, Miloso M, Braga M, Nicolini G, Morabito A, Pravettoni G, et al. Myelinolytic lesions in spinal cord of cobalamin-deficient rats are TNF- α -mediated. *FASEB J* 1999; 13: 297-304.
272. Hoffman M, Schmidt M, Wels W. Activation of EGF receptor family members suppresses the cytotoxic effects of tumor necrosis factor- α . *Cancer Immunol Immunother* 1998; 47: 167-75.
273. Sauer H, Wefer K, Vetrugno V, Pocchiari M, Gissel C, Sachinidis A, et al. Regulation of intrinsic prion protein by growth factors and TNF- α : the role of intracellular reactive oxygen species. *Free Rad Biol Med* 2003; 35: 586-94.
274. Abe K, Saito H. Protective effect of epidermal growth factor on glutamate neurotoxicity in cultured cerebellar neurons. *Neurosci Res* 1992; 14: 117-23.
275. Dhodda VK, Sailor KA, Bowen KK, Vemuganti R. Putative endogenous mediators of preconditioning-induced ischemic tolerance in rat brain identified by genomic and proteomic analysis. *J Neurochem* 2004; 89: 73-89.
276. Ninomiya M, Yamashita T, Araki N, Okano H, Sawamoto K. Enhanced neurogenesis in the ischemic striatum following EGF-induced expansion of transit-amplifying cells in the subventricular zone. *Neurosci Lett* 2006; 403: 63-7.
277. Naylor M, Bowen KK, Sailor KA, Dempsey RJ, Vemuganti R. Preconditioning-induced ischemic tolerance stimulates growth factor expression and neurogenesis in adult rat hippocampus. *Neurochem Int* 2005; 47: 565-72.
278. Enokido Y, Akaneya Y, Ninobe M, Mikoshiba K, Hatanaka T. Basic fibroblast growth factor rescues SSS neurons from cell death caused by high oxygen atmosphere in culture. *Brain Res* 1992; 599: 261-71.
279. Teramoto T, Qiu J, Plumier JC, Moskowitz MA. EGF amplifies the replacement of parvalbumin-expressing striatal interneurons after ischemia. *J Clin Invest* 2003; 111: 1125-32.
280. Mattson MP, Lovell MA, Furakawa K, Markesbery WA. Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca^{2+} concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J Neurochem* 1995; 65: 1740-51.

281. Mattson MP, Rychlik B, Chu C, Christakos S. Evidence for calcium reducing and excitoprotective roles for the calcium binding protein (calbindin D28k) in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 1991; 6: 41-51.
282. Shohami E, Ginis I, Hallenbeck JM. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999;10: 119-30.
283. Caso JR, Lizasoain I, Lorenzo P, Moro MA, Leza JC. The role of tumor necrosis factor-alpha in stress-induced worsening of cerebral ischemia in rats. *Neurosci* 2006; 142: 59-69.
284. Saito K, Suyama K, Nishida K, Sei Y, Basile AS. Early increases in TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels following transient cerebral ischemia in gerbil brain. *Neurosci Lett* 1996; 206: 149-52.
285. Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Toung PR, White RF, Barone FC, et al. Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke* 1994; 25: 1481-8.
286. Meirstrell III ME, Botchkina GI, Wang H, Di Snato E, Cockcroft KM, Bloom O, et al. Tumor necrosis factor is a brain damaging cytokine in cerebral ischemia. *Shock* 1997; 8: 341-8.
287. Szafarski J, Burtrum D, Silverstein FS. Cerebral hypoxia-ischemia stimulates cytokine gene expression. *Stroke* 1995; 26: 1093-100.
288. Buttini M, Appel K, Sauter A, Gebicke-Haerter PJ, Boddeke HW. Expression of tumor necrosis factor alpha after focal cerebral ischaemia in the rat. *Neurosci* 1996; 71: 1-16.
289. Taupin V, Toulmond S, Serrano A, Benavides J, Zavala F. Increase in IL-6, IL-1 and TNF levels in rat brain following traumatic lesion. Influence of pre- and post-traumatic treatment with Ro5 4864, a peripheral-type (p site) benzodiazepine ligand. *J Neuroimmunol* 1993; 42: 177-85.
290. Shohami E, Novikov M, Bass R, Yamin A, Gallily R. Closed head injury triggers early production of TNF and IL-6 by brain tissue. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994; 14: 615-9.
291. Fan L, Young PR, Barone FC, Feuerstein GZ, Smith DH, McIntosh TK. Experimental brain injury induces differential expression of tumor necrosis factor- α mRNA in the CNS. *Mol Brain Res* 1996; 36: 287-91.
292. Nawashiro H, Tasaki K, Ruetzler CA, Hallenbeck JM. TNF- α pretreatment induces protective effects against focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17: 483-90.
293. Ohtsuki T, Ruetzler CA, Tasaki K, Hallenbeck JM. Interleukin- α mediates induction of tolerance to global ischemia in gerbil hippocampal CA1 neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16: 1137-42.
294. Barger SW, Horster D, Furukawa K, Goodman Y, Kriegstein J, Mattson MP. Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca²⁺ accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9328-32.
295. Mattson MP, Cheng B, Baldwin SA, Smith-Swintosky VL, Keller J, Geddes JW, et al. Brain injury and tumor necrosis factors induce calbindin

D-28k in astrocytes: evidence for a cytoprotective response. J Neurosci Res 1995; 42: 357-70.

10. ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Mersin’de doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Giresun’da, lise öğrenimimi Erzurum’da tamamladım. 1992 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümüne girdim. 1996 yılında mezun oldum. Aynı yıl Ankara Üniversitesi Eğitim Bilimleri Fakültesinden Pedagojik Formasyon sertifikası aldım. 1997-2000 yılları arasında Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimi yaptım. 2001 yılında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında doktora programına başladım.