



T.C.

**ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ANKARA ŞEHİR HASTANESİ TIBBİ BİYOKİMYA A.B.D.**

**ANDROGENETİK ALOPESİ OLAN HASTALARDA NF
KAPPA B, TNF-ALFA, TGF-BETA, TİYOREDOKSİN,
NİTRİK OKSİT, TOTAL OKSİDAN STATUS (TOS),
TOTAL ANTİOKSİDAN STATUS (TAS) DÜZEYLERİ VE
TİYOL DİSÜLFİD HOMEOSTAZİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Uzmanlık Tezi

Araş. Gör. Ahmet Rifat BALIK

Ankara, 2019



T.C.

**ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ANKARA ŞEHİR HASTANESİ TIBBİ BİYOKİMYA A.B.D.**

**ANDROGENETİK ALOPESİ OLAN HASTALARDA NF
KAPPA B, TNF-ALFA, TGF-BETA, TİYOREDOKSİN,
NİTRİK OKSİT, TOTAL OKSİDAN STATUS (TOS),
TOTAL ANTİOKSİDAN STATUS (TAS) DÜZEYLERİ VE
TİYOL DİSÜLFİD HOMEOSTAZİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Uzmanlık Tezi

Araş. Gör. Ahmet Rifat BALIK

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Aysun BAY KARABULUT

Ankara, 2019

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında ve yazılmasında desteğini gördüğüm, beraber çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Aysun BAY KARABULUT'a;

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini hoşgörü ile aktararak desteklerini esirgemeyen ve bizleri çok yönlü olarak yetiştirmeye çabalayan, tıbbi biyokimya uzmanlığının yanı sıra akademik bir vizyon da kazandırmaya çalışan ve mesleğe adım atmaya hazırlandığım dört yıl boyunca kendimi her anlamda çok şanslı hissetmemi sağlayan kıymetli hocalarım Prof. Dr. Özcan EREL, Prof. Dr. Leyla Didem KOZACI, Prof. Dr. Fatma Meriç YILMAZ, Prof. Dr. Gülsen YILMAZ, Prof. Dr. Cemile BİÇER, Doç. Dr. Serpil ERDOĞAN, Doç. Dr. Ceylan BAL ve Dr. Öğr. Üyesi Salim NEŞELİOĞLU'na;

Biyokimya uzmanlığı adına bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, bu meslekte yetişmemi sağlayan, aydınlatıcı fikirleri ve yaklaşımları ile örnek olan değerli uzmanlarımıza;

Asistanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, karşılıklı saygı ve anlayış içinde çalıştığım asistan arkadaşlarıma;

Çalışmalarımız sırasında ihtiyaç duyduğumuz anda yardımlarını esirgemeyen teknisyen arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ahmet Rifat BALIK

Ankara, 2019

ÖZET

Androjenetik alopesi, erkeklerde en yaygın saç dökülme sebebidir. AGA (Androjenetik Alopesi)'da DHT (Dihidrotestosteron)'nin patojenik rolü keşfedilmiştir. Ancak androjenler saç folikülünün büyümesini düzenleyen diğer bileşenleri de etkilerler. AGA patagonezinde foliküler minyatürizasyon temel rolü oynamaktadır. Terminal kılların minyatürizasyonu, perifolüküler lenfositik infiltrasyon ve fibrozis ile ilişkili bulunmuştur. AGA patogenezinde oksidatif strese maruziyet etkilidir.

Serbest oksijen radikalleri NF- κ B'yi aktive eder ve proinflamatuvar sinyal aktivasyonuna sebep olur. NF- κ B, inflamasyonda rol oynayan sitokinlerin, ekspresyonunu kontrol eder. TNF- α bir proinflamatuvar sitokindir, ekstrinsik hücre ölüm yolunu başlatmakta ve ayrıca ROT (Reaktif Oksijen Türleri) üretimini artırabilmektedir. TGF- β fibrozisde anahtar bir role sahiptir. Tiyoredoksin, reaktif oksijen türlerinin temizlenmesi ve oksidatif strese karşı koruma etkilerine sahiptir. NO, NOS enzimiyle L-arginin'den üretilen serbest bir radikaldir. Oksidatif stresi global olarak değerlendirilmek için total antioksidan status (TAS) ve total oksidan status (TOS) ölçülür. Tiyoller oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarına girebilen bileşiklerdir. Dolayısıyla hücrelerde oksidatif stres durumunu önlemede kritik role sahiptirler.

Yapmış olduğumuz çalışmada AGA hastalığında mikroi inflamasyon, perifoliküler fibrozis ve oksidatif stres araştırıldı. Bunu için hasta ve kontrol gruplarından serum örnekleri alındı. Serumlarda NF- κ B, TNF- α , TGF- β 1, Tiyoredoksin, NO, TOS, TAS ve Tiyol Disülfid Homeostazı ölçüldü ve değerlendirildi.

Sonuç olarak, AGA olan bireylerde NF- κ B, TNF- α , TGF- β 1, Tiyoredoksin, NO, TOS serum düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulundu. TAS, Doğal Tiyol, Total Tiyol ve Disülfid serum düzeyleri ise AGA olan bireylerde kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu.

Androjenetik alopesi hastalarında redoks dengenin bozularak oksidan etkenlerin arttığını ve antioksidan savunmanın ise azaldığını gördük. Parametreler arasındaki korelasyon ve moleküler ilişkileri değerlendirdik. AGA'da androjenler serbest oksijen radikalleri artırarak oksidatif strese sebep olur. Bu da mikroi inflamasyon ve fibroze sebep olur. Böylece hastalarda saç kaybı hızlanmaktadır.

Androjenetik alopeside oksidatif stres aktif rol oynamaktadır. Androjenlerin kıl folikül döngüsüne olan etkilerinin anlaşılması, yeni ve etkin tedavi yöntemlerinin

geliştirilmesi açısından önemlidir. Bu çalışma ile AGA patogenezi faktörlerinin, biyokimyasal oksidan ve antioksidan parametreleri ve apoptozis markırları ile ilişkisi incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Androjenetik alopesi, Oksidatif stres, İnflamasyon, Fibrozis, Minyatürizasyon



ABSTRACT

Androgenetic alopecia is the most common cause of hair loss in men. The pathogenic role of DHT (Dihydrotestosterone) in AGA (Androgenetic Alopecia) has been discovered. But androgens affect other components that regulate the growth of the hair follicle. Follicular miniaturization plays a major role in AGA pathogenesis. The miniaturization of terminal hairs was associated with perifollicular lymphocytic infiltration and fibrosis. Exposure to oxidative stress is effective in the pathogenesis of AGA.

Free oxygen radicals activate NF- κ B and cause proinflammatory signal activation. NF- κ B controls the expression of cytokines effective in inflammation. TNF- α is a proinflammatory cytokine, initiating the extrinsic cell death path and may also increase ROS (Reactive Oxygen Species) production. TGF- β has a key role in fibrosis. Thioredoxin has protection against reactive oxygen species and protection against oxidative stress. NO is a free radical produced from L-arginine by NOS enzymes. Total antioxidant status (TAS) and total oxidant status (TOS) are measured to evaluate oxidative stress globally. Thiols are compounds which can enter into oxidation and reduction reactions. Therefore, they have a critical role in preventing oxidative stress in cells.

In our study, microinflammation, perifollicular fibrosis and oxidative stress were investigated in AGA. Serum samples were taken from the patient and control groups. Serum NF- κ B, TNF- α , TGF- β 1, Thioredoxin, NO, TOS, TAS and Thiol Disulfide Homeostasis were measured and evaluated.

In conclusion, serum NF- κ B, TNF- α , TGF- β 1, Thioredoxin, NO, TOS serum levels were significantly higher in individuals with AGA. TAS, Native Thiol and Total Thiol and Disulfide serum levels were significantly lower in patients with AGA.

In patients with androgenetic alopecia, we found that redox balance deteriorated, oxidant agents increased and antioxidant defense decreased. We evaluated the correlation and molecular relationships between the parameters. The androgens in AGA cause oxidative stress by increasing free oxygen radicals. It causes microinflammation and fibrosis. Thus, hair loss is accelerated in patients.

Oxidative stress plays an active role in androgenetic alopecia. Understanding of the effects of androgens on the hair follicle cycle is important in terms of developing

new and effective treatment methods. In this study, we tried to contribute to the understanding of AGA pathogenesis factors with biochemical oxidant and antioxidant parameters and apoptosis markers.

Key Words: Androgenetic alopecia, Oxidative stress, Inflammation, Fibrosis, Miniaturization



İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLOLAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Saç.....	2
2.2. Kıl Folikülü	2
2.2.1. Embriyolojisi	2
2.2.2. Yapısı	3
2.2.3. Gelişim Döngüsü	5
2.2.3.1. Anajen Evre	5
2.2.3.2. Katajen Evre.....	6
2.2.3.3. Telojen Evre.....	6
2.2.4. Kıl Tipleri.....	6
2.3. Alopeci.....	7
2.3.1. Tanımı	7
2.3.2. Androjenetik Alopesi	7

2.3.2.1. Patogenezi	8
2.4. Parametreler	14
2.4.1. Nükleer Faktör Kappa B	14
2.4.2. Tümör Nekroz Faktör Alfa	17
2.4.3. Transforme Edici Büyüme Faktör Beta	18
2.4.4. Tioredoksin	21
2.4.5. Nitrik Oksit	23
2.4.6. Total Oksidan Status	24
2.4.7. Total Antioksidan Status	26
2.4.8. Tiol Disülfid Homeostazi	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Gerekli Materyaller	29
3.1.1. Sarf Malzemeler	29
3.1.1.1. ELİSA (Enzim Bağlı İmmün Ölçüm) Kitleri	29
3.1.1.2. Kolorimetrik Test Kitleri	29
3.1.2. Kimyasal Malzemeler	29
3.1.2.1. Nitrik Oksit Analizi İçin Kullanılan Kimyasallar	29
3.1.2.2. Tiol Disülfid Homeostazi İçin Kullanılan Kimyasallar	29
3.1.3. Cihazlar	30
3.2. Hasta ve kontrol Grubunun Özellikleri	30
3.3. Yöntemler	31
3.3.1. Serum NF-κB Düzeylerinin Ölçümü	32

3.3.2. Serum TNF- α Düzeylerinin Ölçümü	32
3.3.3. Serum TGF- β Düzeylerinin Ölçümü.....	33
3.3.4. Serum Tioredoksin Düzeylerinin Ölçümü	34
3.3.5. Serum Nitrik Oksit Düzeylerinin Ölçümü	35
3.3.6. Serum Total Oksidan Status (TOS) Düzeylerinin Ölçümü.....	37
3.3.7. Serum Total Antioksidan Status (TAS) Düzeylerinin Ölçümü	38
3.3.8. Serum Tiyo Disülfid Homeostazis Düzeylerinin ölçümü	40
3.4. İstatistiksel Analiz.....	42
4. BULGULAR.....	43
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	72
7. KAYNAKLAR	74
8. EKLER	94
EK-1. ETİK KURUL ONAYI	94
EK-2. ÖZGEÇMİŞ.....	95

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AA	Alopesi Areatata
AGA	Androgenetik Alopesi
AP-1	Aktivatör Protein-1
ARE	Ariesteraz
ASK-1	Apoptoz Sinyali Düzenleyici Kinaz-1
BAFF	B-hücresi Aktive Edici Faktör
CaM	Kalmodulin
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz
COX-2	Siklooksijenaz 2
Cys	Sistein
DHT	Dihidrotestosteron
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DTNB	5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)
EDTA	Etilendiamin tetraasetikaist
ELİSA	Enzim Bağlı İmmün Ölçüm
Gpx	Glutatyon Peroksidaz
GSH	Glutatyon
GSH-Px	Glutatyon Peroksidaz
GTP	Guanosin-5'-Trifosfatın
HSD	Hidroksisteroid Dehidrojenaz
IL	İnterlökin
IKK	İnhibitör Kappa B Kinaz
IκB	İnhibitör Kappa B
LAP	Latent İlişkili Peptid
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LPS	Lipopolisakkarit
LTβ	Lenfotoksin Beta
MCP	Monosit Kemoatraktan Protein
MDA	Malondialdehit
NAC	N-Asetil Sistein

NADPH	Redükte Nikotinamid Dinükleotid Fosfat
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
OSİ	Oksidatif Stres İndeksi
PCO	Protein Karbonil
PDI	Protein Disülfid İzomeras
PON1	Paraoksanaz 1
Prx	Peroksiredoksin
RHD	Rel Benzeşim Alanı
ROT	Reaktif Oksijen Türlerin
sGC	Çözülebilir Guanilat Siklaz
SOD	Süperoksid Dismutaz
TAS	Total Antioksidan Seviye
TOS	Total Oksidan Seviye
TACE	TNF-α Dönüştürücü Enzim
TEAC	Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite
TGF-β	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör Alfa
TNF-R	TNF Reseptörü
Trx	Tiyoredoksin
TrxR	Tiyoredoksin Redüktaz
TXNIP	Tiyoredoksin Etkileşimli Protein
UV	Ultraviyole
XO	Ksantin Oksidazın
8-OHG	8-Hidroksiguanin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1. Kıl folikülü embriyolojik gelişimi ve yapısı	3
Şekil 2. Kıl folikülü yapı ve döngüsü	5
Şekil 3. Normal saç folikülünde androjen metabolize eden enzimlerin lokalizasyonu	9
Şekil 4. NF-κB klasik ve alternatif aktivasyon yolağı	16
Şekil 5. Tioredoksin sisteminin bazı fizyolojik etkileri.....	22
Şekil 6. Nitrik oksit sentezi.....	23
Şekil 7. Total nitrit ölçümü	36
Şekil 8. Hasta ve kontrol grubu serum NF-κB düzeyi karşılaştırması	44
Şekil 9. Hasta ve kontrol grubu serum TNF-α düzeyi karşılaştırması	44
Şekil 10. Hasta ve kontrol grubu serum TGF-β düzeyi karşılaştırması.....	45
Şekil 11. Hasta ve kontrol grubu serum Tioredoksin düzeyi karşılaştırması	45
Şekil 12. Hasta ve kontrol grubu serum Nitrik Oksit düzeyi karşılaştırması	46
Şekil 13. Hasta ve kontrol grubu serum TOS düzeyi karşılaştırması	46
Şekil 14. Hasta ve kontrol grubu serum TAS düzeyi karşılaştırması	47
Şekil 15. Hasta ve kontrol grubu serum Nativ Tyol düzeyi karşılaştırması	47
Şekil 16. Hasta ve kontrol grubu serum Total Tiylol düzeyi karşılaştırması	48
Şekil 17. Hasta ve kontrol grubu serum Disülfid düzeyi karşılaştırması	48

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1. NF- κ B proteinin sınıflandırılması.....	15
Tablo 2. Nitrik oksit ölçümünde numune ve körde bulunan reaktif miktarları	36
Tablo 3. Hasta ve kontrol gruplarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi	43
Tablo 4. Parametreler arası korelasyon	49



1-GİRİŞ VE AMAÇ

Androgenetik alopesi (AGA), erkek tipi saç dökülmesi olarak bilinmektedir ve genetik olarak yatkın kişilerde androjen hormon kaskadının aşırı aktivasyonu kaynaklı, kıl folikülü dermal papillasının minyatürizasyonu sonucu oluşan, yaş ile birlikte ilerleyen ve her iki cinsiyette de görülebilen bir durumdur (10). AGA patagonezinde; androjenler, büyüme faktörleri, yaş, genetik yatkınlık, ırksal faktörler ve lokal etmenler suçlanmaktadır ve foliküler minyatürizasyon temel rolü oynamaktadır (16). Androgenetik alopesinin, saç büyüme destekleyicileri veya androjen metabolizmasının modülatörleri ile sınırlı başarı oranı, başka patojenik yolların da hesaba katılabileceği anlamına gelmiştir. AGA'nın patogenezinde foliküler mikroi inflamasyonun ortaya çıkması son zamanlarda birçok bağımsız çalışmada gözlenmiştir (92). Oksidatif stres ve inflamasyon biyolojik sistemlerde yakından bağlantılıdır, bu nedenle AGA hastalarının dermal papilla hücrelerinde oksidatif stres mevcudiyetine dair kanıtlar da vardır (178, 179). Kelleşen kafa derisi biyopsilerinin yakın histolojik gözleminde terminal kılların minyatürizasyonu AGA'da ayırt edici bir özellik olup sıklıkla perifoliküler fibrozis ile ilişkili bulunmuştur (105).

Androgenetik alopesi patogenezinde rol oynadığı düşünülen oksidatif stres, mikroi inflamasyon ve perifoliküler fibrozis süreçlerini değerlendirebilmek için hasta ve kontrol gruplarından alınan serum örneklerinde NF κ -B, TNF- α , TGF- β , Tioredoksin, Nitrik Oksit, TAS, TOS düzeyleri ve Serum Tiyo Disülfid Homeostazı ölçülerek karşılaştırıldı. Gerçekleştirdiğimiz çalışma AGA hastalarında bu test profili ile yapılan ilk araştırmadır. Elde edilen verilerden yararlanılarak hastalık patogenezinde hangi faktörün daha baskın rol oynadığı anlaşılmaya çalışıldı. Sonuç olarak ölçülen tüm parametrelerde anlamlı sonuçlar elde edilmesiyle birlikte şiddetli ve ileri düzey bir oksidatif stres varlığı görüldü. Böylece AGA patogenezinde oksidatif stresin etkin bir rol üstlendiği kanaatine varıldı. Bu çalışma ile hastalığın etyopatogenez ve tedavisine yönelik yeni çalışmalara ışık tutmak amaçlanmıştır.

2- GENEL BİLGİLER

2.1. Saç

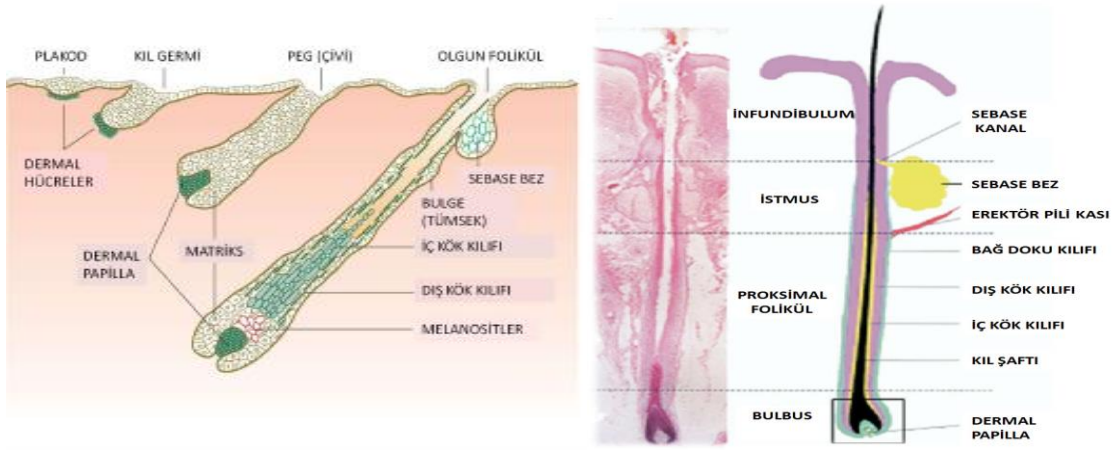
Saçın, insanlar için yaşamsal bir işlevi yoktur fakat kamuflaj, istenmeyen moleküllerin depolanması ve atılımı, saçlı derinin ultraviyolede korunması gibi fonksiyonları vardır. Ek olarak, ter bezi ürünlerinin dispersiyonu gibi birçok yararlı biyolojik işleve ve toplumda psikososyal öneme de sahiptir (1).

2.2. Kıl Folikülü

2.2.1. Embriyolojisi

Uterusta epitel ve altta yatan mezenkim, kıl folikülü oluşturmak için etkileşir. Doğumda insan vücudunu yaklaşık beş milyon kıl folikülü kaplar. Foliküllerin kesin aralığı ve dağılımı, morfogenezi sırasında ifade edilen genler tarafından oluşturulur. Dağılım sağlandıktan sonra, gelişmekte olan foliküldeki moleküler olaylar, her bir kılın gelecekteki fenotipini belirler (1).

Primitif kıl germi 10. embriyonik haftada epidermisin bazal tabakası boyunca ortaya çıkar ve papilla olarak bilinen fibroblastların kalınlaşmış kümeleriyle etkileşime girerek dermise doğru büyürler. Kıl germi papillayı sararak bulbusu oluşturur (3). Fetal folikülün bir tarafında iki tomurcuk oluşur, bunlar; sebace beze farklılaşan üst tomurcuk ve erektör pili kasının bağlantısını sağlayan alt tomurcuktur. Sebace bezin olduğu seviyenin üzerinden, folikülün öteki tarafından apokrin bezin kökenin oluşturan üçüncü bir tomurcuk gelişir. Sebace duktusun yüzeyel açıklığından, girişine doğru uzanan, folikülün en üst bölümüne infundibular segment adı verilir. Folikülün, sebace duktus ve erektör pili kasının başlangıç noktası arasındaki bölümüne intmus adı verilir (4). Folikül duvarından oluşan alt epidermal katmandan foliküler kök hücrelerin kaynağı olan tümsek (bulge) oluşur (3). Alt bölüm, folikülün en aşağı kısmını ve kıl bulbusunu içerir (4). Kıl folikülü, dış kök kılıfının nispeten sabit bir kanal oluşturarak, epidermal hücrelerin dermis veya subkutan dokuya doğru uzamasıyla gelişir. Kılın tabanındaki germinal hücrelerin çoğalmasıyla, foliküler kanal içinde uzanan kıl gövdesi ve içi kök kılıfı oluşur (2).



Şekil 1. Kıl folikülü embriyolojik gelişimi ve yapısı (5).

Embriyonik folikül yeterli uzunluğa eriştiğinde matriksten; kıl shaftı, medulla, korteks, kutikula ve iç kök kılıfı, mezenkimden ise; dış kök kılıfı meydana gelir (Şekil 1). Matriks ayrıca saça renk veren melanositleri de içerir. Primitif kıllar hem damarlardan hem de sinirlerden yoksundur fakat kısa süre sonra yoğun vasküler ve sinir ağları folikülü çevreler. Yaklaşık altıncı ayda folikül oluşumu tamamlanır ve sayısı belirlenir. Doğumdan sonra yeni folikül oluşumu gözlenmez. Bu nedenle papillada oluşan hasar, kalıcı kıl ya da saç kaybına sebep olur. Fetus genellikle sekizinci ayda dökülen uzun, ince lanugo kıllarla kaplıdır. Lanugo kılları kısa, ince pigmentsiz vellus kıllarıyla değiştirilir. Doğumda çoğu zaman saçlı deride kalın, pigmente terminal kıllar bulunur (3).

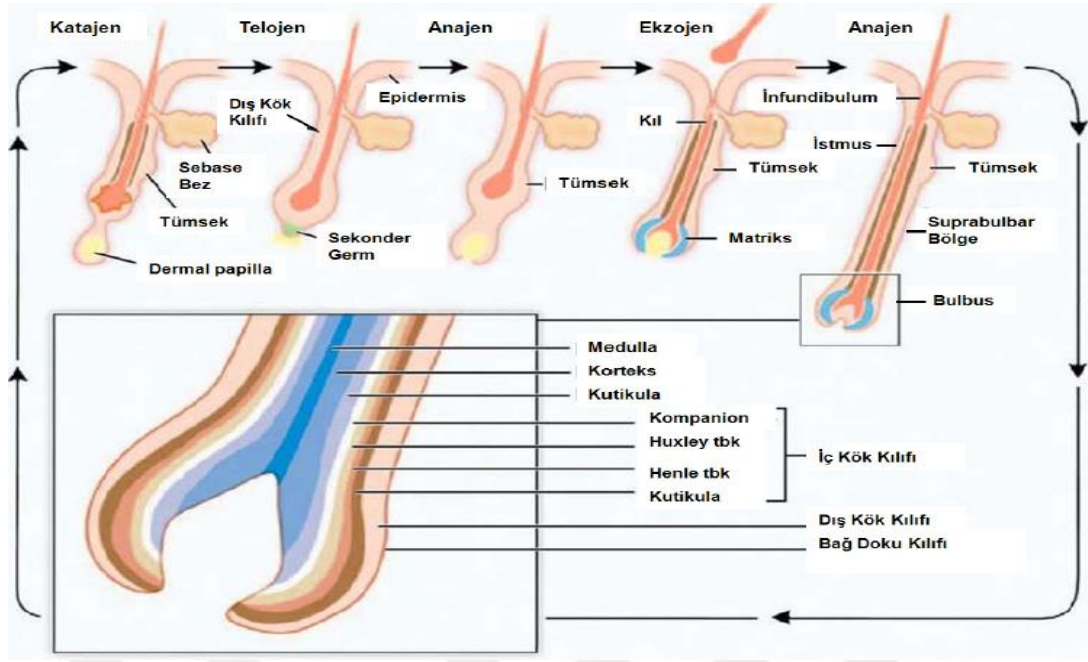
2.2.2. Yapısı

Saç folikülleri, bulundukları yere bağlı olarak büyüklük ve şekil bakımından önemli ölçüde farklılık gösterir, ancak hepsi aynı temel yapıya sahiptir (1). Saçlı deride bulunan terminal kıl folikülü sırasıyla, dermal papilla, bulbus, erektör pili bağlanma bölgesi, tümsek, infundibulum ve foliküler açıklıktan meydana gelir (Şekil 2) (3). Saçın bulbusundan hızla yükselen matriks hücreleri spesifik ara filamentler ve ilişkili proteinlerden oluşan saç shaftını üretir. Saç shaftındaki pigment, matriks hücreleri arasında serpiştirilmiş melanositler tarafından üretilir. Matris hücreleri farklılaştıkça ve yukarı doğru hareket ettikçe, boyut ve eğriliği ile saçın şeklini büyük ölçüde belirleyen sert iç kök kılıfı tarafından son şekillerine kavuşturulur (1). Kıl shaftı; medulla, korteks ve kutikuladan oluşur. Medulla, lanugo ve vellus kıllarında bulunmaz. Erektör pili kası, papiller dermiş içinde yer alır ve perifoliküler bağlantı yerindeki konnektif doku kılıfına

doğru oblik olarak uzanırlar. Erektör pili kasının kasılması kılın dikleşmesine neden olur (2). Korteks, saçın büyük kısmını oluşturan, boyuna dizilmiş, iğsi şekilli, pigmentli keratinositlerden oluşur. İç kök kılıfı, içten dışa doğru; Kutikula, Huxley ve Henle olmak üzere üç tabakadan oluşur. Dış kök kılıfı folikülün dış zarfıdır ve infundibulumda epidermisle birleşir. Dış kök kılıfı erektör pili kası için bir çentik oluşturmak üzere kalınlaşır (3).

Dış kök kılıfın çıkıntı kısmındaki epitelyal kök hücreler, aynı zamanda, epidermal ve sebace bezi hücreleri için bir rezervuar olarak da işlev görebilir. Dış kök kılıfındaki hücreler normal olarak epidermal hücreler tarafından ifade edilenlerden farklı olan bir dizi keratin, adezyon molekülü, sitokin ve büyüme faktörü reseptörü eksprese eder. Bunlar folikülden göç ederek hasar veya kayıptan sonra epidermisi yeniden oluştururlar. Kıl folikülünün dış kök kılıfı melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri içerir (1).

Folikül tabanında bulunan dermal papilla, kılın büyüme hızını belirleyen temel yapıdır, fibroblast ve diğer mezenkimal hücrelerden zengindir. Büyüklüğü bulbus çapıyla dolayısıyla kıl çapıyla orantılıdır. Saçların büyümesi, saç çizgisini oluşturan dermal papilla ve saç matrisi arasındaki karmaşık etkileşime bağlıdır. Bu etkileşimleri yönlendiren kimyasal haberciler arasında sitokinler, kemokinler ve vasküler ve sinirsel büyüme faktörleri yer alır. Folliküler melanogenez sadece büyüme fazı sırasında ortaya çıkar ve saç pigmentasyonu melanozomların sayısına, büyüklüğüne, transferine ve dağılımına bağlıdır. Her bir kıl folikülüne ait onu besleyen ve uyaran damar ve sinir ağı mevcuttur (3). İç ve dış kök kılıflarının yanı sıra kılın gövdesi de kıl bulbusunun matriksi tarafından üretilir. Kıl gövdesi ve içi kök kılıfı, tam keratinize olmuş iç kök kılıfı, intmus seviyesinde dökülene kadar, kılın yukarı doğru büyümesi sırasında beraber hareket ederler. Foliküler kanalın üst kısmındaki epidermis, dış kök kılıfıyla devamlılık gösterir. Folikülün üst iki kısmı (infundibulum ve intmus) kalıcıdır; alt kısım ise kıl büyümesinin her döngüsüyle tamamen yenilenir (4).



Şekil 2. Kıl folikülü yapı ve döngüsü (6).

2.2.3. Gelişim Döngüsü

Her kıl folikülünün kendine ait gelişim döngüsü vardır ve üç faza ayrılır: aktif büyümenin olduğu anajen faz; folikülün büzüşme gösterdiği katajen faz; ve dinlenme dönemi olan telojen faz. Döngü vücudun farklı bölgelerinde değişkenlik göstermektedir (2).

2.2.3.1. Anajen Evre

Kıl folikülü bu fazda maksimum boyuta ulaşır ve matriks hücreleri yüksek mitotik aktivite gösterirler. Saçın uzunluğu anajen fazın süresine bağlı olarak değişmektedir. Anajen faz, vertikal ve frontal bölgede, temporal bölgeye göre daha uzundur (3). Döngünün en uzun fazıdır ve saçlı deride anajen fazı yaklaşık 3-5 yıl sürer. Normalde kafa derisinde kılların yaklaşık %85-90'lık bir bölümü anajen fazdadır. Bu sayı yaş ile azalır. Erkek tipi kelliği olan bireylerde azalma daha hızlı gerçekleşir (anajen uzunluğunun belirgin şekilde azalması sebebiyle). Kafa derisindeki anajen kıllar günde 0,37 mm hızla büyür (4). Vücudun değişik bölgelerindeki foliküllerin ürettiği farklı uzunluktaki kılların boyutu anajen fazının süresi ile orantılıdır. Örneğin, kafa derisi kıl folikülleri anajen safhasında 3-5 yıl kalır ve uzun tüyler üretir; kaş kıl folikülleri ise bunu sadece 2-3 ay boyunca yapar ve kısa tüyler üretir (1).

2.2.3.2. Katajen Evre

Katajen safhası boyunca, kıl folikülleri, foliküler keratinositlerin çoğunda büyük ölçüde programlanmış hücre ölümünü (apoptozis) yansıtan oldukça kontrollü bir inversiyon sürecinden geçer. Foliküler melanogenez de bu aşamada durur ve bazı foliküler melanositler de apoptosise uğrarlar. Katajen aşamasının sonuna doğru, dermal papilla yoğunlaşır ve yukarı doğru hareket eder, kıl folikülü tümseğin (bulge) altında kalmaya başlar. Dermal papilla katajen safhasında tümseğe ulaşmazsa, folikül periyodu durdurur ve saçlar kaybolur (1). Katajen fazı yaklaşık 1-2 hafta sürer. Senkronize olarak gerçekleşen apoptoz milyonlarca hücrenin ölümüne yol açar ve foliküllerin üçte ikisi bu aşamada geçici olarak kaybedilir. Dermal papilla neredeyse kaybolur ve geriye sadece fibröz bant veya kümelerin izleri kalır. Kıl shaftının alt kutbu kalınlaşarak çubuk şeklini alır (3).

2.2.3.3. Telojen Evre

Telojen fazı ortalama 3-5 ay sürer. Birçok vücut bölgesinde anajen faz çok daha kısa ve telojen çok daha uzundur (4). Buda, kısa kılların uzun zaman boyunca daha fazla uzamadan oldukları gibi kalmalarına yol açar. Telojen faz süresi zarfında keratinize ancak artık metabolik olarak aktif olmayan çomak şeklinde kıllar, folikülün üst kısmına yerleşirler. Tümsekte bulunan kök hücrelerden köken alarak büyüyen yeni anajen kıl, eski dermal papillaların bulunduğu bölgeye göç ederek uzar. Büyüyen kıl sonunda telojen saç telinin dökülerek folikülden uzaklaştırılmasına yardımcı olur. Bu nedenle, normal olarak kaybedilen tüm kılların, genellikle "kök" olarak tanımlayan keratotik bir alt kutbu vardır. Normalde, kafa derisi üzerindeki kılların yaklaşık %85'i anajende, %1'den daha azı katajende ve %15'i telojendedir (3). Telojen safhası sırasında, saç shaftı, genellikle tarak veya yıkama sırasında folikülden dökülen bir çomak kılına dönüşür. Çoğu insan günde 50 ila 150 saç telini dökülmesi sonucu kaybeder. Kafa derisinde telojen aşamasındaki foliküllerin yüzdesindeki artış, aşırı dökülmeye yol açar (1).

2.2.4. Kıl Tipleri

Dört ana kıl tipi vardır.

Lanugo: Normal şartlarda intrauterin dönemde dökülen ve verniks kazeozada bulunan uzun, ince, renksiz ve medullasız kıllardır. Prematüre bebekler lanugo kılları ile doğabilir.

Vellus: Genellikle doğumda avuç içi ve ayak tabanı hariç tüm vücut üzerinde mevcut pigmente olmayan, medullasız, kısa (<2 cm) ve ince (<40) kıllardır.

Terminal: Uzun, kalın (> 40 µm), pigmente, medullası olan, saçlı deri, kaş ve kirpiklerde bulunan kıllardır.

Seksüel: Androjenlerin etkisi altında, pubertede vellus kıllarından gelişen terminal kıllardır (3).

2.3. Alopesi

2.3.1. Tanımı

Saç kaybı alopesi olarak adlandırılır. Saç dökülmesinin olağanın üzerinde olması (100'den fazla kıl/gün olarak tanımlanır), ya saç büyümesinin fizyolojik döngüsündeki değişikliklerden ya da saçın sistemik veya lokal etkiler tarafından zarar görmesinden kaynaklanabilir (7). Alopesiler, skar dokusunun bulunup bulunmamasına ve lokalize veya diffüz bir paterne sahip oluşuna göre gruplandırılırlar. Klasik olarak sikatrisyel ve sikatrisyel olmayan şeklinde iki sınıfa ayrılırlar (8). Sikatrisyel alopesi, kıl folikülünün kalıcı olarak hasar görüp atrofiye gittiği alopesi türleri olarak tanımlanır. Saç kaybı geri dönüşümlü olduğu alopesi ise sikatrisyel olmayan alopesidir. Androjenetik alopesi genellikle sikatrisyel olmayan alopesiler grubunun içerisinde değerlendirilir ancak çoğu zaman bifazik patern görülür. Yani hastalık erken evrede sikatrisyel olmadığı halde ileri dönemde kalıcı sikatriks özellik gösterebilir (9).

2.3.2. Androjenetik Alopesi

Androjenetik alopesi, erkek tipi saç dökülmesi olarak da bilinmektedir ve genetik olarak yatkın kişilerde androjen hormon kaskadının aşırı aktivasyonu kaynaklı, kıl folikülü dermal papillasının minyatürizasyonu sonucu oluşan, yaş ile birlikte ilerleyen ve her iki cinsiyette de görülebilen bir durumdur (10). AGA kadınlarda ve erkeklerde en sık görülen saç dökülmesi tipidir ve erkek popülasyonunun yaklaşık %50'sini etkiler (11, 12). Androjenlerin etkisi altında anajen fazı kısalmış ve ilgili kafa

derisi bölgesinde hücresel kıl matriks hacmi azalır. Bu, kalın terminal kıl foliküllerinin ince vellus benzeri kıl foliküllerine dönüşümü ile sonuçlanır. İleri vakalarda, erkeklerde sadece temporal ve oksipital bölgelerde kalan kıllar ile kellik gelişebilir. Kadınlar parietal bölgede belirgin incelmeye ile daha diffüz saç dökülmesi sergilemeye eğilimlidirler (11).

2.3.2.1. Patogenezi

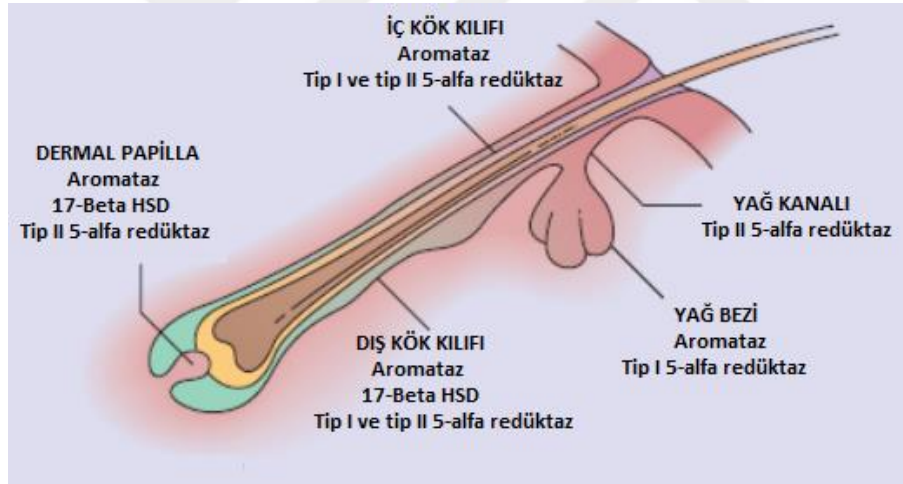
AGA patogenezi; androjenler, büyüme faktörleri, yaş, genetik yatkınlık, ırksal faktörler ve lokal etmenler suçlanmaktadır ve foliküler minyatürizasyon temel rolü oynamaktadır (16).

Ergenlikte, androjen hormonlar olan testosteron ve DHT'un her birinin ayrı rolü bulunmaktadır. Testosteron artmış kas kitlesi, fallus ve skrotumun büyümesi, ses değişikliği, cinsel dürtü ile pubik ve aksiller terminal kılların varlığı ile ilişkilidir. DHT ise temporal saç çekilmesi, akne, prostat büyümesi ile sakal bölgesi, dış kulaklar, burun delikleri ve ekstremitelerde terminal kıl gelişiminde rol alır (17).

Testosteron, dolaşımdaki ana androjendir, ancak çoğu vücut bölgesinde testosteronun saç büyümesi üzerindeki etkisi, daha güçlü metaboliti olan DHT tarafından sağlanır ve AGA genellikle DHT ile ilişkilidir (5, 17). AGA'da 5 α -redüktazın testosteronu transforme ettiği dihidrotestosteronun (DHT) patojenik rolü keşfedilmiştir (14). Testosteronun DHT'a dönüşümü, 5 α -redüktaz enzimi tarafından katalize edilir. Farklı genler tarafından kodlanan iki 5 α -redüktaz izoformu vardır ve optimum pH, substrat afiniteleri ve doku dağılımları bakımından farklıdır (5). Tip I 5 α -redüktaz, ağırlıklı olarak sebace glandlar ve karaciğerde bulunurken, tip II 5 α -redüktaz daha çok karaciğer ve prostat glandları yanı sıra saçlı deri, sakal ve göğüs kıl foliküllerinde bulunur (17). Kıl folikülünde tip II 5 α -redüktaz, dermal papillada, dış kök kılıfında ve proksimal iç kök kılıfında yer alır (18). Dallob ve arkadaşları 1994'te yaptıkları bir çalışmada, AGA oluşumunda tip II 5 α -redüktaz enziminin rol oynadığını bularak saç araştırmalarında çığır açmışlardır (15).

Saç büyümesinde DHT'un biyolojik rolüne ilişkin bilginin çoğu tip II 5 α -redüktaz genindeki mutasyonların neden olduğu 5 α -redüktaz eksikliği (tip II psödohermafroditizm, psödovaginal perineoscrotal hipospadias) olan erkeklerde yapılan çalışmalardan gelmektedir. Bu hastalarda dolaşımdaki testosteron seviyeleri normal

erkek aralığında veya üstünde olup DHT seviyeleri düşüktür, testosteron/DHT oranları normalden 3,5–5 kat daha yüksektir. Denekler, androjen bağımlı saç gelişiminin dışı bir modelini gösterir; terminal kılları büyük ölçüde aksilla ve alt pubik üçgen ile sınırlıdır ve bu bölgelerdeki kıl büyümesinin daha az kuvvetli androjenlere tepki verdiğini düşünülmektedir (5). Tip II 5 α -redüktazın genetik yokluğu erkek tipi AGA gelişimini engeller AGA'sı olan erkek hastaların saçlı deri biyopsi materyallerinde, AGA'sı olmayan saçlı deriye göre 5 α -redüktaz aktivitesi ve DHT düzeylerinin artmış olduğu görülmüştür. DHT minyatürize kıl ve kıl folikülü gelişiminden sorumludur ve deri ve kan düzeyindeki azalma minyatürizasyonun geri dönüşüne neden olur (17). Çeşitli teknikler kullanılarak araştırmacılar kıl folikülünün farklı bölgelerinde androjen metabolize eden enzimleri tespit etmişlerdir (Şekil 3) (17). Zayıf ve kuvvetli androjenleri birbirine bağlayan 3 β - ve 17 β -hidroksisteroid dehidrojenaz (17 β -HSD) ve androjenleri östrojenlere dönüştüren aromataz da dahil olmak üzere diğer steroid metabolize edici enzimler de saç folikülünde eksprese edilmiştir (5).



Şekil 3. Normal saç folikülünde androjen metabolize eden enzimlerin lokalizasyonu (HSD: hidroksisteroid dehidrojenaz) (17).

Hadımların kel olmadıkları ve fonksiyonel androjen reseptörlerinin eksik olduğu androjen duyarsızlık sendromu veya testiküler feminizasyonlu erkeklerin yanı sıra kastre edilmiş erkekler de kellik olmaz ve sakal, aksiller veya pubik kılları büyümmez. Hamilton, testosteronun hadımlara ve kastre edilen erkeklere verilmesinin genetik olarak yatkın olanlarda kelliğe yol açtığını gösterdi. Ayrıca, testosteron tedavisi yapılmadığı sürece erken yaşta bilateral orşidektomi geçirmiş genetik olarak duyarlı

genç erkeklerde kellik gelişmediğini de belirtmiştir. Bu gözlemler, genetik olarak duyarlı erkeklerde kellik gelişiminin ön koşulu olarak androjenleri desteklemektedir. Dermal papilla, androjenik aksiyonun ana bölgesi olarak kabul edilir ve androjenlere tepki olarak, saç folikülü keratinositleri gibi diğer hücrelerin büyümesi ve aktivitesinde bulunan çözünebilir düzenleyici faktörlerin üretimini değiştirebilir. Lokal ve sistemik olarak türetilen testosteron, ya direkt olarak dermal papilla ve kıl bulbusunda eksprese edilen hücre içi androjen reseptörlerine doğrudan bağlanır veya daha güçlü olan DHT'a metabolize edilir ve bu ise androjen reseptörlerine daha büyük bir afinite ile bağlanır. Koparılmış saç köklerinin ve kılsız saç derilerinden elde edilen cildin, kellik olmayan saç derisinden alınan örneklerden daha yüksek DHT konsantrasyonları içerdiği gösterilmiştir. Androjen sinyal yolu faktörlerindeki bir dizi değişiklikler muhtemelen androjen reseptörlerinin ekspresyonunda artış, daha fazla steroid ligand ve daha yüksek 5 α -redüktaz seviyelerini bağlamak için artmış androjen duyarlılığı da dahil olmak üzere saç folikül minyatürüne yol açabilir. Kafa derisinde, androjen duyarlılığı ve androjen reseptörlerinin dağılımı bölgeye özgüdür. Bu, oksipital kafa derisinin neden androjenlerin etkilerine karşı dirençli olduğunu ve genellikle AGA'nın en şiddetli vakalarında bile korunacağını açıklayabilir. Kelleşen ön kafa derisi bölgelerine transplante edilen oksipital kıl folikülleri intrinsik androjen duyarsızlığını korur ve minyatürize olmazlar. Tersine, saç derisinin saçsız bölgelerinden alınan kıl folikülleri, önkol gibi başka bir vücut bölgesinin cildine transplante edilirse, bunlarda kıllar intrinsik androjen duyarlılıklarının korunması nedeniyle gerilemeye devam eder. Kelleşen bir kafa derisinden alınan dermal papilla kültürü hücreleri, saçsızlık olmayan bir kafa derisindeki eşdeğer hücrelere göre daha yavaş büyür ve strese bağlı hücre yaşlanmasına daha duyarlıdır. Fazla androjenler ile tedavi edildiğinde, saçsız bir kafa derisinden alınan dermal papilla hücreleri apoptosise maruz kalır, keratinositlerin proliferasyonunu uyarma yeteneklerini kaybederler ve keratinosit proliferasyonunu inhibe edebilen TGF- β 'nın salgılanmasını artırırlar. Bu sonuçlar, in vivo olarak, hassas saç derisi kıl foliküllerinin fazla androjen uyarımının, dermal papilla hücrelerinin saç folikülü döngüsü yeniden düzenleme ve yeni saç shaftı büyütme yeteneğini bozduğunu düşündürmektedir (19).

Minyatürleştirme, büyük, terminal foliküllerin, vellus foliküllerinin boyutlarına ulaşana kadar küçülme sürecini ifade eder. Minyatür terminal folikülleri, histolojik olarak primer vellus foliküllerinden, rezidüel bağ dokusu ve bulbusun altında izlenen

sinirlerin “streamer” varlığı ile ayırt edilebilir; bu streamer, sonunda adipoz doku ve dermis ile değiştirilir. Minyatür folikül atrofik erektör pili kasına sahiptir. AGA kıl folikülünde minyatürleşmeye özgü birçok değişiklik meydana gelir. Bu değişiklikler arasında dermal papilla büyüklüğünde, büyüyen saç matrisinin büyüklüğünde, saç shaft çapındaki ve saç döngüsünün anajen kısmında bir azalma yer alır. Kıl folikülü dermiste daha yüzeysel olarak yer alırken, saçlar daha ince, daha kısa ve daha az pigmentli hale gelir. Sonunda, birim alan başına daha az sayıda saç kökü olur (20).

Üç kanıt, dermal papillaların saç folikülündeki androjen eyleminin birincil hedefi olduğunu düşündürmektedir.

- 1) Folikülün alt kısmındaki androjen reseptör ekspresyonu dermal papilla hücreleri ile sınırlıdır.
- 2) Saç folikülünün büyüklüğü muhtemelen dermal papilla hacmi ile belirlenir.
- 3) Dermal papillada tip II 5 α -redüktaz ekspresyonu var iken saç folikül epitelinde sadece tip I 5 α -redüktaz eksprese edilir.

Androjenler, dermal papilla ve ekstrasellüler matriks içindeki hücre sayısını değiştirerek saç büyümesi üzerinde etkili olabilirler. İnsan sakal kıl köklerinin dermal papillalarından kültürlenmiş hücrelerde keratinositlerin çoğalmasını uyaran androjenlere tepki olarak büyüme faktörlerini salgılar. Saç derisi foliküllerinden dermal papilla hücrelerinin testosteron varlığında TGF- β salgıladığı bildirilmiştir. TGF- β , saç büyümesini inhibe ettiği bilinen bir büyüme faktörüdür. Bu nedenle, androjenlere saç büyümesinin değişken yanıtı, dermal papilla tarafından üretilen büyüme faktörleri türlerindeki farklılıkları yansıtabilir (5).

Foliküler androjen etki yolundaki bir başka varyasyon, androjen reseptörlerinin konsantrasyonudur. Çeşitli çalışmalardan elde edilen veriler, androjen reseptörlerinin konsantrasyonunun, androjene bağımlı foliküllerde, androjen bağımlı olmayan foliküllere ve erkeklerin foliküllerinde, kadınların foliküllerinden daha yüksek olduğunu göstermektedir. Saç boyutunu kontrol eden dermal papilla hücrelerinin sayısı olduğu anlaşılmış ve minyatürizasyon kaynağının bu papilla hücrelerinin kaybı olduğunu öne sürülmüştür. Bu kaybın, androjen ile yönlendirilmiş apoptoz veya hücre migrasyonu yoluyla olabileceğini düşünülmektedir (5, 20).

Genetik olarak yatkın kişilerde saç foliküllerinde artmış androjen etkilerine, yükselmiş androjen reseptör yoğunluğu ve/veya tip II 5 α -redüktaz aktivitesinin artmasının aracılık ettiği düşünülmektedir. AGA'dan etkilenen neredeyse tüm erkekler dolaşımlarında normal androjen seviyelerine sahiptir. Aile analizleri göstermiştir ki, AGA'dan muzdarip bir babanın erkek çocuklarında AGA gelişimi için önemli ölçüde artmış risk mevcuttur. Tersine, AGA olmayan bir babanın erkek çocuklarında AGA riski önemli ölçüde azalmıştır (13).

Androgenetik alopesinin, saç büyüme destekleyicileri veya androjen metabolizmasının modülatörleri ile sınırlı başarı oranı, başka patojenik yolların da hesaba katılabileceği anlamına gelmiştir. AGA'nın patogeneğinde mikroskobik foliküler inflamasyonun ortaya çıkması son zamanlarda birçok bağımsız çalışmada ortaya konulmuştur. Bir çalışma, aktif olarak ilerleyen alopesi bölgelerinde, kollajen demetlerinden (foliküler fibrozis) oluşan foliküler dermal kılıfın genişlemesiyle bağlantılı olarak, saç foliküllerinin üst üçte birlik kısmında aktive edilmiş T hücrelerinin ve makrofajlarının enflamatuar bir sürecine atıfta bulunmuştur. Saçlı deri biyopsilerinin yatay kesit çalışmaları, perifoliküler fibrozisin genellikle hafif olduğu, skatrisyel alopesiden ayırt edilmesi gereken gevşek, eşmerkezli kollajen katmanlarından oluştuğunu gösterdi. “Mikroinflamasyon” terimi, klasik enflamatuar alopesilerdeki inflamatuvar ve destrüktif sürecin aksine, yavaş, süptil ve inatçı bir seyir gerektirdiği için önerilmiştir. Bununla birlikte, minoxidil ile tedavi edilen erkek AGA'lı hastalarda mikroinflamasyonlu hastaların %55'inin tedaviye yanıt olarak yeniden saç büyümesi gösterdi, buna karşılık enflamasyon ve fibrozisi olmayan hastalarda bu oranın %77 olduğu gösterildi (92).

Önemli bir soru, inflamatuvar reaksiyon paterninin bireysel saç folikülü etrafında nasıl üretildiğidir. Enflamasyon, çok adımlı bir süreç olarak kabul edilir. Infundibulum yakınındaki üst folikülde perifoliküler bir infiltratın gözlemlenmesi inflamasyonun tetiklenmesinde primer nedensel olayın ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir. Foliküler infundibulumun mikrobiyal kolonizasyonu temelinde, bu lokalizasyonda ve *Propionibacterium* sp., *Staphylococcus* sp., *Malassezia* sp. veya geçici floranın diğer üyelerine ait mikrobiyal toksinler veya antijenlere inflamatuvar yanıt yatıyor olabilir. *Propionibacterium* sp. tarafından porfirin üretimi, piloseba kanalında bu ilk proinflamatuvar stresin olası bir kofaktörü olduğu düşünülmüştür. Alternatif olarak,

keratinositlerin kendileri, radikal oksijen türleri ve nitrik oksit (NO) üreterek ve hücre içinde depolanmış İnterlökin 1-Alfa (IL-1 α)'yı serbest bırakarak, iritanlar, kirleticiler, ultraviyole (UV) ışınimleri ve kimyasal strese cevap verebilirler. Bu pro-inflamatuar sitokinin kendi başına, kültürde izole edilmiş saç foliküllerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, İnterlökin 1 (IL-1) reseptörleri eksprese eden bitişik keratinositler, IL-1 tepki genlerinin transkripsiyonunu başlatır: İnterlökin 1-Beta (IL-1 β), Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α), IL-1 α , İnterlökin 8 (IL-8), Monosit Kemoatraktan Protein 1 ve 3 (MCP-1, MCP-3), nötrofil ve makrofaj araçlarının, insan kıl folikülünün epitel bölmesinde up-regüle edildiği gösterilmiştir. Ayrıca, bitişik fibroblastlar da böyle bir pro-enflamatuar sinyale cevap vermek için tam olarak donatılmıştır (92).

Kelleşen kafa derisi biyopsilerinin yakın histolojik gözleminde terminal kıllarının minyatürizasyonu AGA'da ayırt edici bir özellik olup sıklıkla perifoliküler fibrozis ile ilişkilidir. Kıl foliküllerinin minyatürleştirilmesinin, folikülün altındaki "kollajen veya bağ dokusu şeritleri" denilen bir birikintiyle ve yoğun olarak paketlenmiş kollajen demetlerinden oluşan foliküler dermal kılıfının 2-2,5 kat büyütülmesiyle ilişkili olduğu bulunmuştur (105). Kalıcı inflamasyon, matriks metalloproteinaz (proinflamatuar sitokinler tarafından transkripsiyonel olarak da sürdürülür) gibi nedensel ajanların devam ettiği durumlarda, kollajenazların aktif rol oynadığı bağ dokusu yeniden şekillenmesi ile birlikte perifoliküler fibrozis ortaya çıkar. Kollajenazların, perifoliküler fibrozisteki doku değişikliklerine katkıda bulunduğundan şüphelenilmektedir. Kafa derisi biyopsilerinin histolojik incelemesinde terminal kılların minyatürizasyonu sıklıkla perifoliküler lenfositik infiltrasyon ve sonuç olarak fibrozis ile ilişkilidir. Saçsız folikülün altında fibrozise neden olan mikroskopik foliküler inflamasyonun, folikülün bir terminal kıl folikülünü reforme olmasını önleyeceği düşünülmektedir (92).

Son histolojik çalışmalar, saç foliküllerinin üst üçte birlik kısmında perifoliküler inflamasyonu göstermekte olup, klinik olarak AGA'nın inflamatuvar olmayan bir hastalık olarak kabul edilmesine rağmen, inflamasyonun AGA'da patojenik bir rol oynadığını göstermektedir (177). Oksidatif stres ve inflamasyon biyolojik sistemlerde yakından bağlantılıdır, bu nedenle AGA hastalarının dermal papilla hücrelerinde oksidatif stres mevcudiyetine dair kanıtlar da vardır (178, 179). AGA hastalarının

dermal papillasında oksidatif stres varlığı yakın zamanda doğrulanmıştır (179) Ayrıca AGA'yi artan oksidatif stres ile bağlayabilen çeşitli literatür raporları vardır ve AGA, kardiyovasküler hastalık için artmış risk faktörleri ve artmış inflamasyon varlığı ile ilişkili bulunmuştur (180-183) AGA hastalarının serumunda, idrarında ve saçında gözlenen bakır ve çinkonun bozuk metabolizması oksidatif stresi artırabilir (184, 185) Yapılan bir çalışmada AGA hastalarının plazmasında gözlenen azalmış Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC) ile birlikte lipid peroksidasyon belirteci olan Malondialdehit (MDA) düzeyinin artması, bu hastalarda artmış olan oksidatif stres varlığının bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, azaltılmış toplam antioksidan aktivite ve AGA hastalarının plazma örneklerinde bulunan MDA düzeylerinde artış, bu hastalarda oksidatif stres varlığının göstergeleridir (186). İyi bilinen bir antioksidan olan askorbik asidin, dermal papilla hücre büyümesini uyardığı ve desteklediği gösterilmiştir (186) Dahası, güçlü antioksidan etkilere sahip olduğu bilinen yeşil çay epigallocatechin-3-gallatin saç büyümesini arttırdığı bildirilmiştir (187). Bu bulgular, antioksidanların saç büyümesi üzerindeki yararlı etkilerini göstermektedir ve bu etkiler için bir temel sunmaktadır (127).

2.4. Parametreler

2.4.1. Nükleer Faktör Kappa B

Nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ilk olarak 1986 yılında Ranjan Sen ve David Baltimore tarafından keşfedilen ve tüm hücre tiplerinde mevcut olan bir transkripsiyon faktörüdür (21). NF- κ B öncelikle, farelerde B lenfositlerin nükleuslarında immunoglobulin κ hafif zincir gen ekspresyonunu düzenleyen ökaryotik nükleer transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır (22, 23). Daha sonra yapılan araştırmalarda ise, NF- κ B'nin monositik-makrofajlar, fibroblastlar, B ve T lenfositler gibi çeşitli hücre tiplerinde sentezlenen önemli bir düzenleyici protein olduğu tespit edilmiştir (24, 25). NF- κ B, indüklenebilir, oksidatif strese yanıt olarak harekete geçen ve birçok genin ekspresyonunda ve inflamatuvar genlerin üretiminden sorumlu olan redoks duyarlı transkripsiyon faktörüdür (26).

NF- κ B ailesi, beş üyeden oluşmaktadır: RelA/p65, RelB, c-Rel, NF- κ B1/p50 (prokürsörü: p105) ve NF- κ B2/p52 (prokürsörü: p100). Bu beş üye, birbirleriyle ve bir uyaran olmadığında ise bir inhibitör olan İnhibitör Kappa B (IkB) ile dimer

oluşturabilmektedir. Üyelerin içerdikleri Rel benzeşim alanı (Rel homology domain: RHD) sayesinde, birbirleriyle dimerizasyonları, hedef DNA bölgesine bağlanmaları ve IκB proteinleriyle etkileşimleri sağlanmaktadır (27, 28). NF-κB transkripsiyon faktörü ailesi, memeli hücrelerde; yapıları, fonksiyonları, sentezlenme şekilleri ve C terminal dizisine göre farklılık gösteren iki protein grubu başlığı altında incelenir (Tablo 1) (29).

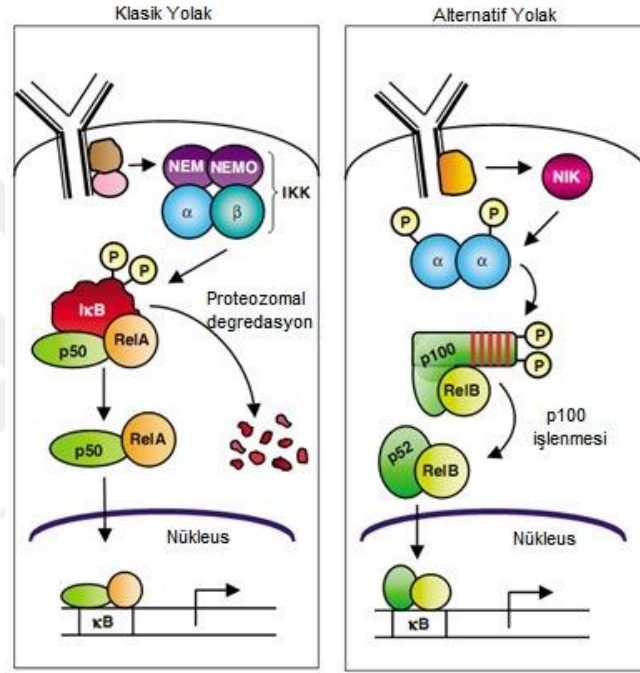
Tablo 1. NF-κB proteinin sınıflandırılması (30)

Sınıf	Protein	Diğer isimleri	Gen
I	NF-κB1	P105- p50	NFKB1
	NF-κB2	P100-p52	NFKB2
II	RelA	P65	RELA
	RelB	-	RELB
	C-Rel	-	REL

İstirahat halinde iken NF-κB sitoplazmada p50, p65 ve IκB-α'dan oluşan bir heterotrimer halinde bulunmaktadır. IκB proteinleri, nükleus ile sitozol arasında NF-κB dengesini sağlar. IκB-α'nın, 3 alt üniteden (IKKα, IKKβ ve IKKγ=NEMO) oluşan, bir serin/treonin protein kinaz olan İnhibitör Kappa B Kinaz (IKK) tarafından fosforilasyonu, ubiquitinasyonu ve degradasyonu sonucu p50-p65 heterodimeri oluşur. Bu heterodimer daha sonra nükleusa geçer ve 10 baz çiftlik GGGPuNNPyPyCC bölgesine bağlanır (Pu: pürin, Py: Pirimidin, N: Herhangi bir baz) (Şekil 4) (31, 32,33). NF-κB'nin nükleusa geçişi sadece aktive olduğu zaman gerçekleşmektedir. NF-κB nükleusta immün sistem, büyüme ve inflamasyon, hayatta kalma başarısı, proliferasyon, anjiyogenez, invazyon, metastaz, hematopoez gibi durumları denetleyen 200'ün üzerinde geni düzenlemektedir (34, 43).

NF-κB, Klasik (Kanonik) Yolak ve Alternatif (Kanonik Olmayan) Yolak olmak üzere iki temel yolak üzerinden aktivite göstermektedir. Klasik yolakta RelA-p50 dimeri temel olarak bulunur ve uygun bir aktive edici gelene kadar sitoplazmada IκB ailesinin inhibitör proteinleri ile birleşik halde yer alır (35, 36). Serbest radikaller, stres, UV radyasyon, okside düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), viral antijenler, TNF-α ve IL-1 gibi inflamatuvar sitokinler, lipopolisakkarit (LPS) gibi bakteriyel antijenler, B ve T hücrelerinin aktivasyonu gibi çeşitli uyaranlarla hücrelerin stimülasyonu sonucunda

aktivasyon olur. Alternatif yolak ise AFF (TnFSF13B), B-hücresi Aktive Edici Faktör (BAFF), CD40 Ligandı, Lenfotoksin Beta (LT β) gibi TNF süper ailesine ait daha az sayıda sitokin tarafından indüklenmektedir (37, 38). Klasik yoldan farklı olarak, daha üst basamaklarında NF- κ B İndükleyici Kinaz (NIK) içermektedir. NIK, fosforilasyonu indükler ve RelB'nin temel inhibitörü olan p100'un 26S proteozom bağımlı sürecini yönlendiren IKK- α 'yı aktive eder. Böylece serbest hale gelen RelB-p52 ve RelB-p50 nükleusa transloke olur ve DNA'ya bağlanır (39, 40).



Şekil 4. NF- κ B klasik ve alternatif aktivasyon yolağı (188).

NF- κ B, ökaryotik hücrelerde transkripsiyon faktörü olarak işlev görerek önemli birçok hastalığın patofizyolojisinde kilit rol oynamaktadır. NF- κ B'nin aktivasyon mekanizmasındaki gerçekleşecek olan bir hata, hücreyi ölüme götüren apoptoz ve nekroz olaylarını tetikler. NF- κ B aracılığı ile gerçekleşen olaylar, doğal ve kazanılmış immün yanıtla ilgili birçok genin aktive edilmesini veya baskılanmasına yol açar. NF- κ B, büyüme faktörleri, sitokinler, immunreseptörler, hücre adezyon molekülleri ve bazı akut faz proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonundan sorumlu olmakla beraber birçok ajan ve koaktivatörle bütün hücre tiplerinde aktifleşebilir. IL-8 gibi kemokinler, İnterlökin 2(IL-2), İnterlökin 6 (IL-6), IL-1 β , TNF- α gibi sitokinler, G-CSF ve GM-CSF

gibi koloni stimüle edici faktörler ve bazı interferonlar bu etkenler arasında sayılabilir. Serbest oksijen radikalleri, UV radyasyon, bakteriyel LPS, forbol esterleri, inhalasyon partikülleri, gama radyasyon, bakteriyel veya viral ürünler İkB fosforilasyonunu etkileyen güçlü oksidanlar gibi hücreye etkisi olan birçok dış faktör İkB fosforilasyonunu ve bu sayede NF-κB'nin aktivasyonunu etkileyebilir (40, 41). Hücre-hücre adezyonu, hücre iyileşmesi, inflamatuvar hücrelerin göçü, öncül patojenik sinyallerin yayılması ve genişlemesi, onkogenizin başlaması ve hızlanması NF-κB ile ilişkili hücreyel olaylar arasında kabul görmektedir.

NF-κB, inflamatuvar ajanlar (sitokinler), ultraviyole ışınları, serbest radikaller, tümör oluşturunucular, karsinojenler, kemoterapötik, viral ve bakteriyel ajanlar gibi uyaranlara hücreyel yanıt oluşturmada görev alır. NF-κB, siklooksijenaz (COX-2) ve nitrik oksit sentaz (NOS) gibi indükleyici enzimler, kemokinler, büyüme faktörleri adezyon molekülleri ve proinflamatuvar sitokinleri kodlayan genlerin regülasyonu ile immün ve inflamatuvar yanıtların oluşturulmasında önemli rol alırlar (42). Redoks duyarlı bir transkripsiyon faktörü olan NF-κB; oksido-inflamatuvar kaskadın indüklendiği, yoğun olarak sitokin sekresyonu ve adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu arttırmada rol oynayan genlerin kontrolünde aktif görev aldığı yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (43-46).

2.4.2. Tümör Nekroz Faktör Alfa

Dr. Williams B. Coley 100 yıl kadar önce tümör hastalıklarının tedavisinde ham bakteri ekstraktlarını kullanırken bu bakteriyel ekstraktların tümör nekrozuna sebep olabileceğini bulmuştur. Tümörlerin gerilemesi sağlanırken aynı zamanda hastalar bakteriyel ekstraktlardan kaynaklı olarak şiddetli sistemik inflamatuvar reaksiyona maruz kalıyorlar ve buna katlanıyorlardı. Bu reaksiyona sebep olduğu bilinen majör inflamatuvar uyaran ilk kez 1975 yılında Carswell ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. İlk tanımlandığı dönemde endotoksinlerle indüklenen ve sarkomlarda hemorojik nekroza neden olan bir glikoprotein olarak tarif edilmiştir. Endotoksinle tedavi gören hayvanların tümör hücrelerinde lizise sebep olması nedeniyle "Tümör Nekroz Faktör" olarak isimlendirilmiştir. Zaman içerisinde TNF-α (Tümör Nekroz Faktör Alfa)'nın birçok inflamatuvar, enfeksiyöz ve malign olayda rol aldığı belirlenmiştir (47,48). İnsan kaynaklı TNF-α ilk defa 1985 yılında klonlanmıştır ve daha

sonrasında anti-TNF- α antikorlar ile solubl TNF reseptörleri üretilmiş ve çok sayıda inflamatuvar hastalığın tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (49).

TNF- α doğal ve kazanılmış immünite, hücre proliferasyonu ve apoptoziste rol oynayan, önemli proinflamatuvar özelliklere sahip 17-70 kDa ağırlığında bir sitokindir (47, 50). Bu sitokin özellikle makrofajlar ve monositler olmak üzere T hücreleri, düz kaslar, fibroblast, endotel hücreler, adipositler, B hücreleri gibi birçok hücre tarafından sentezlenmektedir (47, 51).

TNF- α , N terminali hücre içerisinde bulunan tip II transmembranöz bir proteindir. Öncelikle 26 kDa molekül ağırlığında olan ve plazma membrana yerleşik durumda bulunan pro-TNF- α 'nın hücre dışı domaini TNF- α dönüştürücü enzim (TACE, ADAM-17) tarafından kesilerek 17 kDa molekül ağırlığında solubl form oluşur (52). TNF- α sinyal iletimindeki en önemli faktörlerden biri transkripsiyon faktörü NF- κ B aracılığı ile düzenlenmesidir. TNF- α -NF- κ B yolağını kontrol eden 300 civarında moleküler bağlantı tespit edilmiştir (53). Tamamlanmış TNF- α proteini çoğu çekirdekli hücrelerde belirtilmiş TNF reseptör 1 (TNF-R1) veya TNF reseptör 2 (TNF-R2) reseptörlerinden birine bağlanmaktadır. TNF- α bu reseptörlerden biri ile etkileşime girince çok sayıda genin regülasyonunu etkileyerek çeşitli yanıtlar ortaya çıkarmaktadır (54). TNF'ye ait bilinen bütün yanıtlar iki farklı reseptörden birine bağlanmasıyla tetiklenmektedir. TNF-R1 ve TNF-R2 normal veya hastalıklı dokulara ait çeşitli hücre tiplerinden kademeli olarak regüle edilir (55).

2.4.3. Transforme Edici Büyüme Faktör Beta

Transforme edici büyüme faktörü, 25 kDa ağırlığında ve yapısında bir disülfid köprüsü bulunan homodimerdir (56, 57). TGF- β (Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta) süperailisi, erken gelişimin regülasyonu ve farklılaşması, hücre siklusunun kontrolü, hematopoezis, ekstrasellüler matriks oluşumu, angiogenezis, immün fonksiyonlar, kemotaksis, apoptozis gibi olaylarının düzenlenmesini üstlenen multifonksiyonel sitokin ailesidir. TGF- β 'ya verilen cevap, siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörlerinin indüksiyonu ile geç G1 safhasında "restriksiyon noktasında" hücre siklusunun durdurulmasıdır. Ayrıca hücrelerin farklılaşmasını ve büyümesini indükleyen transkripsiyon faktörlerini (c-myc) içerir ve hücre farklılaşmasını engelleyen faktörleri ise baskılar. Baskılama etkisi transkripsiyon faktörleri ve Smad proteinleri ile

sağlanır (58, 59, 60). Memeli dokusundan TGF- β molekülünün TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 izoformları eksprese edilmiş bulunmaktadır. TGF- β ailesi, bağ dokusu, mezenşim, plateletler, endotelyum, kemik ve immün sistem hücreleri gibi çeşitli doku ve hücrelerde sentezlenmektedir. Farklı izoformların (TGF β 1, 2, 3) etkileri hedef hücrelerin tipine, farklılaşma durumlarına ve diğer sitokinlerin varlığına bağlıdır (61, 62, 63). TGF- β bilinen en güçlü immün-supresif moleküllerden biridir. TGF- β immün sistemin efektör T (Th1 ve Th2) ve sitostatik T hücrelerini baskılayarak, düzenleyici T-reg hücrelerini ise aktifleyerek immün ve inflamatuvar cevabı baskılamaktır (64).

TGF- β , hücrede inaktif prepropeptid öncül molekülü olarak sentez edilir ve golgi cisimciğinde plazmin (proteaz) aracılığı ile regüle edilir. Karboksi uçtan itibaren 110-140 aminoasitlik kısım olgun proteini oluşturmaktadır. Olgun protein kısmı yedi adet korunmuş sistin kalıntısı taşır. Bu sistin kalıntıları molekül içi ve moleküller arası disülfid bağları yaparak dimerik yapının oluşmasını sağlar. Olgun protein kısmının dimerizasyonu biyolojik olarak aktif molekül oluşmaktadır. Olgun proteinden, latent ilişkili peptid (LAP=Latency associated peptide) diye adlandırılan propeptidin ayrılmasıyla protein olgun formuna kavuşur. Bu işlem plazma membranında meydana gelir. LAP, nonkovalent olarak olgun domaine bağlanmıştır ve olgun proteinin aktivitesini ve TGF- β 'nın reseptörlere bağlanmasını engeller. LAP, ayrıca latent TGF- β binding protein (LTBP) ile bağlanarak daha da büyük bir kompleks oluşturur. LTBP'nin görevi, TGF- β /LAP kompleksinin stabilitesini artırmak, TGF- β 'nın doğru katlanmasını sağlamak ve aktivasyonu meydana geldiği hücrelerin yüzeyine veya ekstrasellüler matrikse TGF- β /LAP kompleksinin sekresyonunu sağlamaktır. Öncül TGF- β 'nın, olgun forma aktivasyonu LAP'ı ayıran plazmin ve katepsin gibi proteazlar tarafından kontrol edilir. Ayrıca integrin, trombospondin gibi ekstrasellüler matriks proteinleri ve lipoprotein-a da latent TGF- β 'nın aktivasyonunu düzenlemektedirler (65).

Bir kaskad şeklinde ilerleyen TGF β sinyalizasyon yolunun aktivasyonu ligandın reseptörlerine bağlanması ile başlatılır. Hücre membranında TGF- β tip I (TbRI) ve TGF- β tip II (TbRII) olmak üzere iki tip reseptör bulunur. Endoglin ve betaglican olarak da adlandırılan TGF β tip III reseptörleri (TbRIII) TGF- β 'nın ilk iki tip reseptörlerine bağlanmasını kolaylaştırır. TGF β tip II reseptörün membran dışı bölgesine, sonra da tip I reseptörüne bağlanır. Oluşan ligand/reseptör kompleksi ikişer TbRI ve TbRII içeren bir heterotetramerdir. TbRI ve TbRII reseptörleri serin/treonin kinaz özelliğine sahiptir.

TGF- β 'nın tip II reseptörüne bağlanması, bu reseptörün kinaz aktivitesinin ortaya çıkmasını ve tip I reseptörün yapısında bulunan GS (glisin, serin) bölgesinin fosforilasyonunu sağlamaktadır. Bu şekilde aktiflenmiş TbRI sitozolde bulunan Smad proteinleri fosforiller. Smad proteinlerinin sekiz alt tipi bilinmektedir. RSmad olarak adlandırılan Smad 2 ve 3 TGF- β sinyalizasyon yolunda yer almakta ve ligand/reseptör kompleksleri tarafından fosforillenerek aktiflenmektedir. Smad 4 ise RSmad proteinlerinin etkisi ile fosforillenmektedir. Smad6 ve Smad7 ise Smad-reseptör veya Smad-Smad etkileşimlerini inhibe ederek TGF- β yolunun kontrolüne katılırlar. Smad proteinlerinin yapısında bir bağlaç bölgesi tarafından birleştirilen iki globüler bölge bulunmaktadır. N-terminalindeki MH1 bölgesi 5'-AGAC-3' nukleotid dizisini tanıyarak DNA'ya bağlanır. Bağlaç bölgesinde ubiquitin ligaz'ın bağlandığı yerler ve fosforilasyon yerleri bulunmaktadır. Bu bölge, ayrıca, diğer sinyalizasyon yollarının TGF- β yolu ile kesiştiği noktadır. C-terminalindeki MH2 bölgesi Smad reseptör, Smad-Smad ve Smad-transkripsiyon faktör etkileşimlerine aracılık eder. MH2 bölgesinde aktif TbRI tarafından fosforile edilen Ser-X-Ser aminoasit dizisi bulunmaktadır. Ser-X-Ser motifin fosforilasyonu sonrası RSmadlar Smad4'ün MH2 bölgesine bağlanırlar. RSmad/Smad4 kompleksin oluşması ile TGF- β yolunun sitoplazmik kolu sonlandırılır ve kompleksin nukleusa aktarılması ile TGF- β yolunun nukleer kolu başlatılmış olur. RSmad/Smad4 kompleksi nukleoporinlerin aracılığı ile sitozolden nukleusa aktarılır. Nukleusta RSmad/Smad4 kompleksi 300-400'e yakın genin promotör bölgesine bağlanarak transkripsiyonu regüle eder.

RSmad/Smad4 kompleksin DNA'ya bağlanması çeşitli kofaktörler tarafından kolaylaştırılır ve kontrol edilir. Bu kofaktörler, komplekse çeşitli ko-aktivatör ve ko-represörlerin bağlanmasını da kolaylaştırarak transkripsiyonun regulasyonunu sağlar. Öte yandan, Smad/Smad/DNA etkileşimini kontrol eden kofaktörlerin aktivasyonu veya ekspresyonu TGF β -Smad dışındanda birçok sinyalizasyon yolu tarafından kontrol edilir. Böylece TGF β -Smad yolu hücredeki diğer sinyalizasyon yolları ile karşılıklı etkileşime girer. TGF- β /Smad yolundaki signal iletisinin durdurulması iki mekanizma ile gerçekleştirilir: defosforilasyon ya da ubikitinizasyon. TGF- β reseptörlerinden ayrılınca, RSmad proteinleri hızla defosforile edilerek inaktif olur ve sitozole aktarılır. Defosforilasyon mekanizmasına ek olarak, ubiquitin ligaz enzimin etkisi ile RSmadların bağlaç bölgesine ubiquitin bağlanır. Ubiquitin bağlanmış RSmadlar ise proteozomal

yıkılıma uğrar. RSmadların ubiquitinizasyonu hücrede TGF β 'ya olan cevabın derecesini ve süresini kontrol eder (66, 67).

2.4.4. Tioredoksin

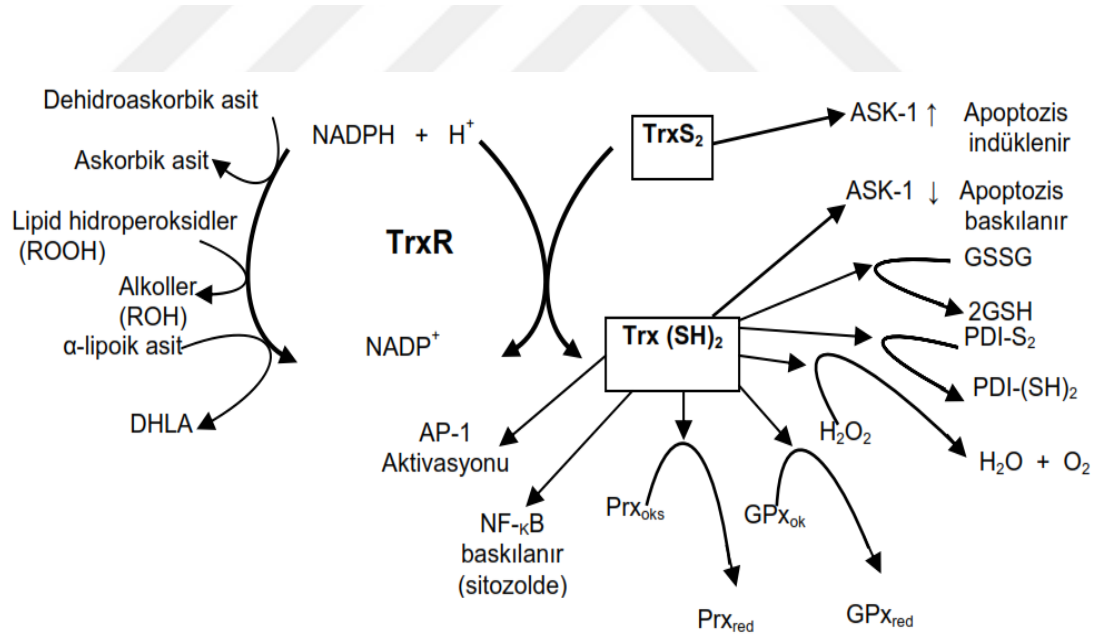
Hücresel seviyede oksidasyon/redüksiyon (redoks) dengesinin düzenlenmesi sağlayan antioksidan sistemlerden birisi de tioredoksin sistemidir. Tioredoksin sistemi içerisinde Tioredoksin (Trx), Trx'in indirgenmesinden sorumlu olan Tioredoksin Redüktaz (TrxR), Trx'in aktif bölgesine bağlanarak inaktivasyonu ile fonksiyonel modülasyonundan sorumlu Tioredoksin Etkileşimli Protein (TXNIP) ve TrxR'nin koenzimi olan nikotinamid dinükleotid fosfatın indirgenmiş formu (NADPH) bulunmaktadır. Tioredoksin, ilk olarak 1964 yılında Laurent ve arkadaşları tarafından *E. coli*'de keşfedilmiş ve ribonükleotid redüktaz için hidrojen vericisi olarak gösterilmiştir (78). Tioredoksinler, 12 kDa ağırlığında, redoks tepkimelerinde düzenleyici olarak görev alan proteinlerdir ve tüm ökaryotik ve prokaryotik organizmalarda bulunurlar (189). Tioredoksin sistemi ökaryotik hücrede transkripsiyon regülasyon faktörlerinin düzenlenmesi, kanserli hücre gelişiminde sinyal molekülü ve ROT inaktivasyonu gibi görevler üstlenmektedir. Tioredoksin, redoks aktif disülfid/ditiyol bağı sayesinde, multifonksiyonel bir proteindir ve aktif bölgesinde Cys-Gly-Pro-Cys bölümü taşır (190).

Tioredoksin sistemi Glutatyon (GSH) sisteminin aksine hücre sitoplazmasında yaklaşık olarak 1000 kat daha düşük konsantrasyonlarda bulunur (GSH, 1-10 mM; Trx, 1-10 μ M). Ayrıca Trx ve GSH sistemlerinin hücrenin oksidatif stresten korunmasındaki fonksiyonları birbirinden farklıdır. GSH özellikle düşük redoks potansiyelinin muhafaza edilmesi ve serbest tiol düzeylerinin yükseltilmesinden; Trx ise ROT inaktivasyonu haricinde çeşitli protein interaksiyonlarında ve nükleer sinyal iletimi ve gen regülasyonunda rol oynayan tiollerin redoks regülasyonundan sorumludur. (191).

Tioredoksin sistemin memelilerde başlıca fonksiyonlarından bazıları, ribonükleotid redüktaz ve tioredoksin peroksidaz gibi enzimlere (tiyol-disülfüt değişimiyle) redükleyici ekivalanları sağlamak, bazı transkripsiyon faktörlerinde anahtar sistein rezidülerini indirgeyerek DNA'ya bağlanmalarını artırmak ve gen transkripsiyonlarında değişiklik yapmaktır. Memeli hücrelerinde Trx sisteminin pek çok

hücre içi olayla da ilişkili olduğu gösterilmiştir. Glukokortikoid reseptörü gibi çeşitli steroid reseptörlerinin, androjen reseptörlerinin, ornitin dekarboksilaz gibi enzimlerin, NF- κ B ve Aktivatör Protein-1 (AP-1) gibi transkripsiyon faktörlerinin; Trx'in disülfid redükleyici aktivitesi üzerinden aktive edildiği rapor edilmiştir (192).

Trx'ler TrxR ile birlikte birçok proteinin disülfid bağlarının indirgenmesine katılır. Trx protein ailesinin gen ekspresyonu farklı hücre populasyonlarında hidrojen peroksit, oksidatif stres, viral enfeksiyonlar, mitojen stimülasyonu ve ultraviyole ışık maruziyeti, malignan transformasyon gibi çeşitli tipte uyarıcılarla indüklenebilir. Yapılan bazı çalışmalar, in vitro ortamda çeşitli iskemi-reperfüzyon organ modellerinde dışarıdan Trx ilavesinin hücre koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir. Özetle, Trx Sisteminin başlıca biyolojik aktiviteleri arasında; DNA sentezindeki kofaktör rolü, hücrelerin apoptoza karşı korunması, hücre proliferasyonunun uyarılması ve progresyonu, anjiyogenezin uyarılması, antioksidan etkiler, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin uyarılması ve birçok hücre proteinine bağlanmak suretiyle fonksiyonel modifikasyon sayılabilmektedir (194, 195).



Şekil 5. Tiyoredoksin sisteminin bazı fizyolojik etkileri (AP-1: Aktivatör Protein-1, NF- κ B: Nükleer Faktör-Kappa B, ASK-1: Apoptoz Sinyali Düzenleyici Kinaz-1, PDI: Protein Disülfid İzomeraz, Prx: Peroksiredoksin/Tiyoredoksin Peroksidaz, Gpx: Glutasyon Peroksidaz, NADPH: Redükte Nikotinamid Dinükleotid Fosfat) (193).

2.4.5. Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO) ilk kez 1979 yılında periferik vasküler düz kaslarda güçlü bir gevşetici olarak belirlenmiştir (68). NO, nitrojen ve oksijen atomlarında oluşan, yağda çözünebilen, başlıca endotel hücresi, makrofaj, nöron ve düz kas hücresinde L-arginin'den nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığı ile sentez edilen ve molekül ağırlığı 30 kDa olan, renksiz gaz yapısında biyolojik bir moleküldür (Şekil 6). Bu molekül biyolojik membranlardan kolaylıkla geçebilen ve eşleşmemiş elektronu olan serbest bir radikaldir ve yarı ömrü birkaç saniyedir (69, 70).



Şekil 6. Nitrik oksit sentezi

Üç ayrı NOS enzimi vardır; nöronal NOS (nNOS veya NOS I), indüklenabilir NOS (iNOS veya NOS II), endotelial NOS (eNOS veya NOS III)'tur. Nöronal NOS (nNOS veya NOS I), 12. kromozomda lokalize olarak bulunan ilk izoformdur. Esas olarak santral sinir sisteminde ve periferik sinirlerde bulunur. Nörotransmitter/nöromodülatör olarak görev yapar, Ca^{+2} /kalmoduline bağımlı olarak aktivite gösterir ve çözünür formda bulunan sitozolik bir enzimdir (71, 72). İndüklenabilir NOS (iNOS veya NOS II), 17. kromozomda lokalize olarak bulunan, tip II alveolar epitel hücreleri, makrofajlar, mast hücreleri, fibroblastlar, nötrofiller ve kondrositlerde yoğun olarak bulunan bir enzimdir ve aktivitesi kalsiyuma bağılı değildir (73). İndüklenabilir NOS TNF- α , endotoksin, interferon- γ ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinler ile indüklenmektedir (74). Sitozolik bir enzim olan iNOS, indüklenmesinden birkaç saat sonra, uzun süre (saatler, günler) devam edebilen nanomolar konsantrasyonlarda proinflamatuvar NO salınımına sebep olmaktadır (75). Endotelial NOS (eNOS veya NOS III), 7. kromozomda lokalizedir ve ilk olarak vasküler endotelial hücrelerde tanımlanmıştır. Endotelial NOS kardiyovasküler sistemde damar tonüsünün düzenlenmesi, vasküler düz kas gevşemesi, trombosit agregasyonunun inhibe

edilmesi gibi fizyolojik olaylarda görev alır (71, 72). Diğer iki NOS enzimlerinden farklı olarak hücresel membranda partiküler subselüler fraksiyonda, özellikle plazmalemmal kaveolada yer alır (76). Nöronal NOS gibi Ca^{+2} ve CaM'e bağımlı aktive olabilen bir enzim olup kısa süreli ve pikomolar konsantrasyonlarda NO sentezini katalize etmektedir. Endotelial NOS'un aktivasyonu sonucu oluşan NO, difüzyonla düz kas hücrelerine giriş yaparak guanilat siklazı aktive etmektedir. Bunun sonucunda çözülebilir guanilat siklaz (cGMP) düzeyinde artma ve düz kaslarda gevşeme meydana gelmektedir (75).

Klasik nörotransmitterlerden farklı olarak, NO hücre içerisinde spesifik bir reseptöre bağlı değildir. Gaz molekülü olan NO sitoplazmada bulunan, sGC hedefleyerek hücre membranından geçer. Nitrik oksitin sGC'ye bağlanması proteinde değişikliklere neden olur ve aktivitesi artar (77). Aktive olan sGC, guanosin-5'-trifosfatın (GTP), guanosin 3', 5' siklik monofosfata (cGMP) dönüşümünü katalize eder. Çözülebilir GMP ökaryotik hücrelerde fosfodiesterazlar, iyon kanalları ve protein kinazlar olmak üzere üç farklı yönde sinyal verir. Bu etkileşimlerle intrasellüler cGMP konsantrasyonlarındaki artma, intrasellüler serbest Ca konsantrasyonunda düşme ile sonuçlanır ve kontraktıl tonus kaybının indüklenmesine neden olan olaylar zincirini başlatır. Bu olaylar, cGMP-bağımlı proteinkinazların aktivasyonu, hiperpolarizasyon, voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının kapanması, intrasellüler organellerde kalsiyum sekestrasyonu ve kontraktıl aperiüstada desentizasyonun engellenmesidir (77).

Mevcut çalışmalar; moleküler oksijen, androjen, uzun süre L-arjinin kullanımı ve tekrarlayan intrakavernozal prostaglandin E1 enjeksiyonlarıyla NOS aktivitelerinin arttığını gösterirken, kastrasyon, denervasyon, hiperkolestrolemi ve diabetes mellitusun NOS aktivitelerinde düşmeye neden olduğunu göstermişlerdir (28, 196,197).

2.4.6. Total Oksidan Status

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulunduran, yüklü ya da yüksüz olabilen atom veya moleküllerdir. Bu bileşikler normal metabolik yolların işlevi esnasında çeşitli dış faktörlerin etkisiyle de meydana gelebilmekte ve hücre bileşenleriyle etkileşebilme özelliğine sahiptirler (87). Antioksidanların etkilerindeki yetersizlik ve/veya serbest radikal oluşumunda artış buna bağlı olarak oksidan-antioksidan dengesinin bozulmasıyla oksidatif stres ortaya çıkar. Oluşan oksidatif stresin toplam değeri total oksidatif stres veya total oksidan status (TOS) olarak ifade

edilmektedir. Aşırı oksijen ya da nitrojen türlerinin birikmesi veya antioksidan tampon sisteminin yetersizliği bu duruma sebep olmaktadır.

Hayatı boyunca insan vücudunda fizyolojik olarak kesintisiz metabolik süreçler oluşmaktadır. Hücreler aerobik metabolizma ürünleri olarak (hidroksil radikali, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi) zararlı oksidan molekül üretir. Enflamasyon gibi bazı patolojik durumlarda, sigara, alkol gibi kötü alışkanlıklar, radyasyon, aldığımız besinler, kimyasal maddeler ROT üretimini artırır. Antioksidan/oksidan denge bozulur ve oksidatif strese doğru kayar. Artmış ROT çift bağ içeren yapılarda (lipit, protein, DNA vb.) reaksiyon sonucu bir hidrojen atomu kopararak zincirleme oksidasyon reaksiyonlarını başlatır.

Serbest radikallerin çoğu oksijen kaynaklıdır, oksijen haricinde karbon, kükürt, azot, kaynaklı radikaller de vardır. ROT başta nükleik asitler, lipitler, proteinler olmak üzere tüm hücre bileşenlerine zarar veren kararsız bir yapıya sahiptir. Bu zarar organizmada bazı sistemler tarafından önlenmeye çalışılmaktadır, ancak bu mekanizmaların yetersiz kalması durumunda, oksidatif stresin zararlı etkileri ortaya çıkar. Bu zararlı etkiler protein oksidasyonu, DNA hasarı (bazların parçalanması, kollarının kırılması ve denatürasyon), tiyollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması ve lipid peroksidasyonu şeklinde olabilir. Lipid peroksidasyonu hücre zarlarında yapı ve fonksiyonlarının bozulmasına sebep olur. İyon dengeleri bozulması ile hücre içi kalsiyum miktarının yükselmesi gerçekleşir ve proteazlar aktive olur. Bu olaylar sonucunda da hücrede hasar meydana gelir (88, 89).

Oksidan ve antioksidanlar arasındaki denge bozulduğunda ve oksidanlar tarafına doğru kaydığında oluşan oksidatif hasar; metabolik hastalıklar, kardiyolojik hastalıklar, gastrointestinal sistem hastalıkları, erken yaşlanma ve serebrovasküler bozukluklara yol açar. DNA hasarı sonucu Down sendrom gibi anomaliler oluşur ve daha birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığı bilinmektedir. Bu sebeple TOS düzeyinin ölçülmesine olan ilgi artmıştır. Oksidatif hasar sonucu oluşan ürünler (malondialdehit (MDA), protein karbonil (PCO), 8 hidroksiguanin (8-OHG) gibi) vücut sıvıları ve dokularda biriktiği için biyokimyasal testlerle oksidatif stres değerleri tespit edilebilir. Serum ve plazmada TOS ölçülebilir kılınmıştır ve bu sayede vücutta oksidan-antioksidan dengenin hangi yöne kaydığı tespit edilebilmektedir (90).

Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) = (TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eqv./L) / TAS (mmol Troloks eqv./L)) X 100

2.4.7. Total Antioksidan Status

Reaktif oksijen türleri metabolik ve fizyolojik süreçlerde üretilir ve enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidatif mekanizmalarla uzaklaştırılırlar. ROT organizmalarda zararlı oksidatif reaksiyonlar meydana getirebilirler. Belli koşullar altında, oksidanlardaki artış ve antioksidanlarda azalma önlenemez ve oksidatif veya antioksidatif denge oksidatif duruma doğru kaymaktadır. Sonuç olarak, 100'den fazla hastalıkta rol oynayan oksidatif stres gelişir. Antioksidan moleküller bu zararlı reaksiyonları önler veya inhibe eder (79, 80). İnsan vücudunda bulunan endojen antioksidan moleküller hücrelerin membran bütünlüğünün korunmasına katkıda bulunurlar, dokuları ve organları serbest radikallere karşı korurlar. Superoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz, mitokondrial sitokrom oksidaz sistemleri, kasta ana proteini oluşturan miyoglobulin, epifiz bezi tarafından salınan ve ciltte bulunan melatonin, kan ve plazmada bulunan seruloplazmin, transferrin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, albümin endojen antioksidanlardandır. Esansiyel aminoasitlerden glutatyon, sistein, metionin, anne sütünde yüksek oranda bulunan ve yenidoğan bebeklerde hastalıklara karşı savunmada yardımcı olan laktoferin, enflamasyonda ortaya çıkan sitokinler de birer antioksidandır. Meyve ve sebze ile alınan vitaminler, tokoferol (vitamin E), karoten ve askorbik asit (vitamin C) ise ekzojen antioksidanlardandır. Nonenzimatik serbest radikallerin toplayıcısı mannitol ve diğerleri (allopurinol, oksipurinol) de antioksidandır (81, 82).

Organizma, normal fizyolojik şartlar altında iç veya dış kaynaklı serbest radikallere ve bunlardan kaynaklı oksidatif strese karşı karmaşık bir antioksidan savunma gerçekleştirmektedir. Ortaya çıkan bu antioksidan savunmanın sürdürülebilmesinde plazma çok önemli bir yere sahiptir. Bunun sebebi plazmanın antioksidanları vücudun tüm doku ve organlarına taşıyabilmesidir Plazmada bulunan antioksidan moleküller total antioksidan status (TAS)'a büyük katkı sunmaktadır. İnsan plazmasında bulunan antioksidan düzeyinin %85'ini albümin, ürik asit ve askorbik asit oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra serbest demir toplayan seruloplazmin ve transferrin gibi proteinler de bulunmaktadır (83, 84).

Antioksidanların teker teker ölçülmesinden ziyade TAS'ın ölçülmesi, daha değerli bilgiler verebilir. TAS ölçümü, serum, plazma ve vücut sıvılarında tüm antioksidan unsurların mevcut birikmiş kapasitesini dikkate alarak antioksidanların basit toplamından daha bütünleşmiş bir parametre sağlar. Böylece redoks durumu, fizyolojik durum, beslenme ve çevresel etmenlerin değerlendirilmesinde katkıda bulunabilir (83, 84).

Antioksidanlar sinerjik etkileşimdedirler ve bir antioksidan düzeyi azalma başka bir antioksidan ile kompanse edilebilir olmasından ötürü total oksidan/antioksidan status ölçümü, oksidanların/antioksidanların tek tek ölçülmesinden daha değerlidir (85, 86).

2.4.8. Tiyol Disülfid Homeostazi

Tiyoller, bir sülfür atomu ve bir karbon atomuna bağlı hidrojen atomundan oluşan sülfidril grubu (-SH) içeren organik bileşikler sınıfıdır. Plazma tiyol havuzunun çok büyük bir kısmı temel olarak albumin ve diğer proteinlerden oluşurken, küçük bir kısmı ise sistein (Cys), sisteinilglisin, glutatyon, homosistein ve γ -glutamil sistein gibi düşük molekül ağırlıklı tiyollerden oluşmaktadır. Proteinlerin ve düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin tiyol grupları, sistein rezidüeleri, ortamda bulunan oksidan moleküller tarafından oksitlenerek tersinir disülfid (S-S) bağ yapılarına dönüşürler. Tiyol grupları okside olurken oksidan molekülleri indirgeyerek, zararlı etkileri olan radikalleri ortadan kaldırmış olurlar. Bu arada kendisinin oksitlenmesi ile oluşan disülfid bağ yapıları tekrar tiyol gruplarına redüklenebilir ve bu dönüşümler sürdürülebilir bir tiyol disülfid dengesini oluşturur (91).

Dinamik tiyol disülfid homeostaz durumu; yukarıda kısaca özetlenen antioksidan korunmanın yanı sıra; detoksifikasyon, sinyal iletimi, apoptoz, enzimatik aktivitenin düzenlenmesi, transkripsiyon faktörleri ve hücrel sinyal iletimi mekanizmalarında kritik rollere sahiptir. Anormal tiyol disülfid denge düzeyleri; diabetes mellitus, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, romatoid artrit, kronik böbrek yetmezliği, parkinson hastalığı, alzheimer hastalığı, multiple sklerozis ve karaciğer hastalıkları gibi çeşitli hastalıkların patogeneğinde yer almaktadır. Dinamik tiyol disülfid homeostazının belirlenmesi, çeşitli normal veya anormal biyokimyasal işleyişler hakkında değerli bilgiler sağlayabilir (91).

2014 yılına kadar dinamik tiyol disülfid dengesini kolorimetrik olarak ölçen bir yöntem bulunmamaktaydı (Winther JR, 2014). Tiyol biyokimyası temel ve uygulamalı biyobilimlerde son yıllarda hızla büyüyen bir alan olmasına rağmen 1979 da Ellman'ın -SH gruplarını 5,5'-Ditiobis (2-Nitrobenzoik Asit) (DTNB) kullanarak ölçen bir yöntem geliştirmesinin dışında bu alanda kayda değer bir kolorimetrik ölçüm yöntemi geliştirilememiştir. O zamanlarda dengenin sadece bir ayağı biliniyordu. Plazma dinamik tiyol disülfid homeostazı keşfedilinceye kadar yapılan çalışmalar genelde Cys, CySS, GSG ve GSSG gibi düşük molekül ağırlıklı tiyol bileşiklerinin tiyol ve disülfid miktarlarının belirlenmesiyle ilgiliydi. Bir denge halinde bulunan tiyol disülfid homeostazının Erel ve Neşelioğlu tarafından 2014 yılında -SS- tarafının da ölçülmesiyle bu denge mekanizmasının her iki tarafının da değerlendirilebilmesine olanak sağlanmıştır (91). Bu yeni yöntem ile;

Doğal Tiyol (-SH) ve Total Tiyol düzeyleri geliştirilen kit ile ölçülmekte, disülfid (SS) düzeyi ise aşağıdaki formül ile hesaplanarak tayin edilmektedir.

$$\text{Disülfid} = (\text{Total Tiyol} - \text{Doğal Tiyol}) / 2$$

Bunun haricinde üç tane de indeks hesaplanarak tiyol disülfid homeostazisine ışık tutmaktadır. Bunlar;

$$\text{İndeks 1} = (\text{Disülfid} / \text{Doğal Tiyol}) \times 100$$

$$\text{İndeks 2} = (\text{Disülfid} / \text{Total Tiyol}) \times 100$$

$$\text{İndeks 3} = (\text{Doğal Tiyol} / \text{Total Tiyol}) \times 100$$

3- GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gerekli Materyaller

3.1.1. Sarf Malzemeler

3.1.1.1. ELİSA (Enzim Bağlı İmmün Ölçüm) Kitleri

- Nükleer Faktör Kappa B (Cloud Clone Corp.)
- Tümör Nekroz Faktör Alfa (DİA Source)
- Transforming Growth Faktör Beta (Cloud Clone Corp.)
- Tiyoredoksin (Cloud Clone Corp.)

3.1.1.2. Kolorimetrik Test Kitleri

- Total Antioksidan Status (TAS) (Rel Assay Diasnostics)
- Total Oksidan Status (TOS) (Rel Assay Diasnostics)

3.1.2. Kimyasal Malzemeler

3.1.2.1. Nitrik Oksit Analizi İçin Kullanılan Kimyasallar

- Kadmiyum granülleri (Sigma-Aldrich)
- Sülfanilamid (Sigma-Aldrich)
- Hidroklorik asit (HCl) (Sigma-Aldrich)
- Glisin (Sigma-Aldrich)
- Sodyum hidroksit (NaOH) (Sigma-Aldrich)
- Çinko sülfat ($ZnSO_4$) (Sigma-Aldrich)
- Bakır sülfat ($CuSO_4$) (Sigma-Aldrich)
- N-Naftiletlen daimine (NNDA) (Sigma-Aldrich)

3.1.2.2. Tiyol Disülfid Homeostazi Analizi İçin Kullanılan Kimyasallar

- 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) (Sigma-Aldrich)
- Trizma base (Sigma-Aldrich)
- Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (Sigma-Aldrich)
- Sodyum borohidrat ($NaBH_4$) (Sigma-Aldrich)
- Metanol (Sigma-Aldrich)
- Formaldehit (Sigma-Aldrich)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich)

3.1.3. Cihazlar

- Multimod okuyucu (Thermo Scientific/Varioskan Flash)
- Mikro ELİSA yıkayıcı (Thermo Scientific/WellWash Versa)
- ELİSA plate inkübatör (Thermo TS-100)
- Mikro plate karıştırıcı (VWR)
- Vortex (Labnet/VX100)
- Santrifüj (Nüve/NF 800-R)
- -80 °C derin dondurucu (Sanyo/MDF-U5386S)
- Çoklu otomatik pipet (Capp)
- Otomatik pipet (Socorex/Acura 825)
- Distile su cihazı (Elga/Purelab Optionq-DV25)
- Otomatik analizör (Roche-Cobas 501)
- Spektrofotometre (Shimadzu UV-1601)

3.2. Hasta ve Kontrol Grubunun Özellikleri

Bu çalışma Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu'nun onayı alınarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen bireyler Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deri ve Zührevi Hastalıkları Polikliniği'ne başvuran kişiler arasından seçilmiştir. Çalışmaya katılmayı kabul eden tüm hastalara ve sağlıklı bireylere çalışmayı anlatan bilgilendirilmiş gönüllü onam formu verilip okutulmuş ve imzalı onayları alınmıştır. Gönüllü kişiler kan alma birimine yönlendirilerek sarı kapaklı jelli biyokimya tüpüne birer tüp kan alınmıştır. Alınan kanlar uygun koşullarda Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'na getirilerek 1500 g'de 10 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Ayrılan serumların her birisi farklı çalışma prosedürleri için (otomatik analizör, ELİSA, manuel spektrofotometri) porsiyonlanarak ayrı ayrı ependorf tüplere doldurulmuştur. Böylece her hasta ve kontrol serum örneği için 3 adet porsiyon oluşturulmuştur. Serum örnekleri -80 C⁰'de çalışmanın yapılacağı güne kadar muhafaza edilmiştir.

Kontrol grubu olarak; otuz adet erkek bireyden oluşmuştur. (Yaş ortalaması: 35,67 yıl, SD (Standart Sapma): 9,12) herhangi bir kronik hastalığı bulunmayan, sigara ve alkol tüketmeyen 18-50 yaş arası bireyler kontrol grubuna dahil edilmiştir.

Androgenetik alopesi grubu olarak; androgenetik alopesi teşhisi konulan, herhangi bir kronik hastalığı bulunmayan, sigara ve alkol tüketmeyen 58 adet 18-50 yaş arası erkek hasta (Yaş ortalaması: 36,48 yıl, SD: 9,95) gruba dahil edilmiştir.

Hasta ve kontrol grubuna ait serum örneklerinden aşağıdaki parametrelerin düzeyleri belirlenmiştir;

- Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B)
- Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α)
- Transforming Growth Faktör Beta (TGF- β)
- Nitrik Oksit
- Tioredoksin
- Total Antioksidan Status (TAS)
- Total Oksidan Status (TOS)
- Tiyol Disülfid Homeostazisi (Doğal Tiyol, Total Tiyol, Disülfid)

3.3 Yöntemler

NF- κ B, TNF- α , TGF- β ve Tioredoksin düzeyleri sandviç prensibine dayalı Enzim Bağlı İmmün Ölçüm (ELİSA= Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) yöntemi ile ölçülmüştür. Bu parametreler Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'nda Thermo Scientific/Varioskan Flash multimod okuyucu kullanılarak ölçülmüştür.

Serum Nitrik Oksit düzeyi, Malatya İnönü Üniveristesi Tıbbi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda Araştırma Görevlisi Önder Otlu tarafından Shimadzu UV-1601 cihazında manuel olarak spektrofotometrik yöntem ile saptanmıştır.

TAS, TOS, Doğal Tiyol, Total Tiyol ve Disülfid parametreleri ise otomatik analizör ile kolorimetrik olarak ölçülmüştür. Bu parametreler Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'nda Roche Cobas 501 otomatik analizörü ile ölçülmüştür.

Hasta ve kontrol grubu serumlarına ait porsiyonlar çalışma zamanı geldiğinde -80°C'den çıkartılarak oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletilmiştir. Daha sonra vorteks işlemi uygulanarak homojenize edilmiş ve analize hazır hale getirilmiştir.

3.3.1. Serum NF-κB Düzeylerinin Ölçümü

Serum NF-κB düzeylerinin belirlenmesinde ticari İnsan Nükleer Faktör Kappa B (NF-κB) ELISA Kiti (Cloud Clone Corp.) kullanıldı. Ölçüm aralığı 0,156-10 ng/mL'dir. Saptama sınırı 0,056 ng/mL'dir.

Kitin içinde bulunan tüm malzemeler ve serumlar kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Standartlar, seyreltme solüsyonu, biotin bağlı antikor, HRP-avidin konjugatı, TMB ve yıkama solüsyonu kit prospektüsünde önerildiği şekilde hazırlandı. NF-κB'ye spesifik antikor ile kaplı mikrotiplerde belirlenmiş kuyucuklara, standart ve örneklerden 100 µL pipetlendi. Platenin üzeri kapatılarak 2 saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra her kuyucuktan standart ve serumlar yıkama işlemi uygulamadan çıkartıldı. Her kuyucuğa 100 µL Biotin-antikor çözeltisi eklenerek 37°C'de 1 saat süre ile inkübe edildi. Daha sonra plate, elisa yıkayıcıya konularak kuyucuklarda bulunan sıvı aspire ettirildi ve ardında 350 µL yıkama solüsyonu ile üç kez yıkatıldı. Daha sonra plate ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerine konularak kalan sıvı emdirilerek uzaklaştırıldı. Daha sonra her bir kuyucuğa 100 µL HRP-avidin konjugatı eklenerek üstü kapatıldı ve 37 °C'de 30 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Aspirasyondan sonra yıkama işlemi bu kez beş defa olacak şekilde tekrarlandı. Işıktan korunacak şekilde her kuyucuğa 90 µL TBT substratından ilave edildi ve kuyucukların mavi renk aldığı gözlemlendi. Platenin üzeri kapatıldı ve 30 dakikayı geçmeyecek şekilde 37°C'de 15-20 dakika inkübe edildi. Sonrasında her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklenerek rengin sarıya döndüğü gözlemlendi. Plate multimod okuyucuya yerleştirilerek 450 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı ve otomatik olarak hesaplanan absorbansa karşı konsantrasyon sonuçları ng/mL olacak şekilde kaydedildi.

3.3.2. Serum TNF-α Düzeylerinin Ölçümü

Serum TNF-α düzeylerinin belirlenmesinde ticari İnsan Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF-α) ELISA Kiti (Dia Source) kullanıldı. Ölçüm aralığı 4,6-12,4 pg/mL, saptama sınırı ise 0,7 pg/mL'dir.

Kitin içinde bulunan tüm malzemeler ve serumlar kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Kalibratörler, kontroller, konjugat solüsyonu, yıkama solüsyonu, kromojen TMB ve HRP-konjugat, kit prospektüsünde önerildiği şekilde hazırlandı. Mikrotiplerde bulunan tüm kuyucuklara 50 µL inkübasyon tamponu pipetlendi. Her bir

kalibratör, kontrol ve numunenin 200 µL'si uygun kuyucuklara pipetlendi. Oda sıcaklığında 2 saat boyunca 700 rpm'e ayarlanan yatay plate çalkalayıcı ile inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her kuyucuktan sıvı aspire edildi. Daha sonra plate yıkayıcıya koyularak üç kez 0,4 mL yıkama solüsyonu ile yıkandı ve kuyucuklarda bulunan sıvı aspire edildi. Hazırlanmış olan sıfır kalibratör her bir kuyucuğa 100 µL pipetlendi. Ardından tüm kuyucuklara 50 µL anti-TNF- α -HRP konjugatı pipetlendi. Oda sıcaklığında 2 saat boyunca 700 rpm'e ayarlanan yatay plate çalkalayıcı ile inkübe edildi. Her kuyucuktan sıvı aspire edilerek yıkayıcıda üç kez 0,4 mL yıkama solüsyonu ile yıkandı. Hazırlanan TMB solüsyonu yıkamadan sonraki ilk 15 dakika içerisinde güneş ışığından korunan bir odada her bir kuyucuğa 200 µL olacak şekilde eklendi. Daha sonra plate güneş ışığından korunarak 30 dakika boyunca oda sıcaklığında 700 rpm'de yatay çalkalayıcıda inkübe edildi. Kuyucuklara 50 µL stop solüsyonu pipetlendi. Daha sonra plate multimod okuyucuda 450 nm'de okutulularak sonuçlar kaydedildi.

3.3.3. Serum TGF- β Düzeylerinin Ölçümü

Serum TGF- β 1 düzeylerinin belirlenmesinde ticari İnsan Transforming Growth Faktör Beta 1 (TGF- β 1) ELISA Kiti (Cloud Clone Corp.) kullanıldı. Ölçüm aralığı 15.6-1,000 pg/mL.'dir. Saptama sınırı ise 5,8 pg/mL'dir.

Kitin içinde bulunan tüm malzemeler ve serumlar kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Standartlar, seyreltme solüsyonu, biotin bağlı antikor, HRP-avidin konjugatı, TMB ve yıkama solüsyonu kit prospektüsünde önerildiği şekilde hazırlandı. Serumda latent TGF- β 1'i immünreaktif forma aktive etmek için asit aktivasyonda kullanılmak üzere 100 mL 1 M HCl ve nötralizasyonda kullanılmak üzere 100 mL 1,2 M NaOH hazırlandı. Daha sonra her bir serum örneğinden 50 µL alınarak üzerine 10 µL 1 M HCl eklenerek iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Üzerine 10 µL 1,2 M NaOH eklenerek iyice karıştırıldı ve 80 µL standart dilüent eklendi. Böylece 50 µL'lik serum örneğimiz üç kat dilüsyona uğramış oldu. Daha sonra TGF- β 1'ye spesifik antikor ile kaplı mikrotiplerde belirlenmiş kuyucuklara, standart ve hazırlanan örneklerden 100 µL pipetlendi. Üzeri kapatılarak 1 saat 37 °C'de inkübe edildi. Yıkama yapmadan kuyucuklar boşaltıldı. Her kuyucuğa 100 µL Biotin-antikor çözeltisi eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Plate elisa yıkayıcıya konularak kuyucuklarda bulunan sıvı aspire ettirildi ve ardında 350 µL yıkama solüsyonu ile üç kez yıkatıldı. Daha sonra plate ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerine konularak kalan

sıvı emdirilerek uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 100 µL HRP-avidin konjugatı eklenerek üstü kapatıldı ve 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Yıkama işlemi bu kez beş defa olacak şekilde tekrarlandı. Işıktan korunacak şekilde her kuyucuğa 90 µL TBT substratından ilave edildi ve kuyucukların mavi renk aldığı gözlemlendi. Platenin üzeri kapatıldı ve 30 dakikayı geçmeyecek şekilde 37°C'de 10-20 dakika inkübe edildi. Sonrasında her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklenerek rengin sarıya döndüğü gözlemlendi. Plate multimod okuyucuya yerleştirilerek 450 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Sonuçlar başlangıçta yapılan asit aktivasyon ve nötralizasyondan kaynaklı dilüsyondan dolayı üç ile çarpıldıktan sonra kaydedildi.

3.3.4. Serum Tiyoredoksin Düzeylerinin Ölçümü

Serum Tiyoredoksin düzeylerinin belirlenmesinde ticari İnsan Tiyoredoksin ELISA Kiti (Cloud Clone Corp.) kullanıldı. Ölçüm aralığı 31,2-2,000 pg/mL'dir. Saptama sınırı ise 12,7 pg/mL'dir.

Kitin içinde bulunan tüm malzemeler ve serumlar kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Standartlar, seyreltme solüsyonu, biotin bağlı antikor, HRP-avidin konjugatı, TMB ve yıkama solüsyonu kit prospektüsünde önerildiği şekilde hazırlandı. Tiyoredoksine spesifik antikor ile kaplı mikrotiplerde belirlenmiş kuyucuklara, standart ve hazırlanan örneklerden 100 µL pipetlendi. Üzeri kapatılarak 1 saat 37 °C'de inkübe edildi. Yıkama yapmadan kuyucuklar boşaltıldı. Her kuyucuğa 100 µL Biotin-antikor çözeltisi eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Plate elisa yıkayıcıya konularak kuyucuklarda bulunan sıvı aspire ettirildi ve ardında 350 µL yıkama solüsyonu ile üç kez yıkatıldı. Daha sonra plate ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerine konularak kalan sıvı emdirilerek uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 100 µL HRP konjugatı eklenerek üstü kapatıldı ve 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Yıkama işlemi bu kez beş defa olacak şekilde tekrarlandı. Işıktan korunacak şekilde her kuyucuğa 90 µL TBT substratından ilave edildi ve kuyucukların mavi renk aldığı gözlemlendi. Platenin üzeri kapatıldı ve 30 dakikayı geçmeyecek şekilde 37°C'de 10-20 dakika inkübe edildi. Sonrasında her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklenerek rengin sarıya döndüğü gözlemlendi. Plate multimod okuyucuya yerleştirilerek 450 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak sonuçlar kaydedildi.

3.3.5. Serum Nitrik Oksit Düzeylerinin Ölçümü

Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz enzimleri tarafından sentezlenir ve sulu ortamda kendiliğinden hızla oksitlenerek nitrata dönüşür. Nitrik oksit (NO), 2-30 sn gibi çok kısa sürede nitrit (NO₂) ve daha sonra da nitrata (NO₃) oksitlenir. Nitrat, nitrik oksit türevlerinin en kararlı yapısıdır. Nitrik oksit stabil yapıda değildir ve bu nedenle direkt ölçmek çok zordur. Nitrat kadmiyum ile nitrite indirgenir ve nitrit miktarı esas alınarak NOS aktivitesi ölçülür. Ortamdaki NOS aktivitesi ile oluşan NO, nitrit üzerinden Griess reaktifi ile tepkimeye girdiğinde oluşan renkli bileşik spektrofotometrede 545 nm’de ölçülmüştür. Aşağıdaki reaktifler kullanılmıştır;

1. Kadmiyum Granülleri: 0.1 M H₂SO₄ içerisinde 9 ay stabil saklanabilir.
 2. Sülfanilamid: 5 g sülfanilamid 3 mol/L HCl asit içinde çözülmüştür. 1 yıl oda sıcaklığında stabildir.
 3. Glisin-NaOH tampon: 15 g glisin bir miktar distile suda çözüldükten sonra pH sı 2mol/L NaOH çözeltisi ile 9,7’ye ayarlanmıştır. Son hacim 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Bu çözelti 1 ay 0-8 °C’de stabildir.
 4. Çinko Sülfat (ZnSO₄): 75mmol/L; 10,8 mg alınıp 500 ml’ye distile su ile tamamlanmıştır.
 5. Bakır Sülfat (CuSO₄): 5mmol/L; 250 mg CuSO₄ alınıp 200 ml’ye distile su ile tamamlanmıştır.
 6. N-Naftiletillen daimine (NNDA): 50 mg NNDA 250 ml distile suda çözülmüştür. Bu çözelti 2 ay 0-8 °C’de stabildir.
 7. Sodyum Hidroksit (NaOH): 55mmol/L; 1,1 g alınıp 500 ml’ye distile su ile tamamlanmıştır.
- NaNO₂ standartı: 85 mg sodyum nitrit tartılıp 10 mmol/L sodyum tetra borat (Na₂B₄O₇.10H₂O) içerisinde çözülmüştür.

Deproteinizasyon işlemi uygulanmıştır.

Tablo 2. Nitrik oksit ölçümünde numune ve körde bulunan reaktif miktarları

	Numune	Kör
Numune (Plazma)	0.5 ml	-
Çinko Sülfat	2 ml	2 ml
Sodyum Hidroksit	2.5 ml	2.5 ml
Distile Su	-	0.5 ml

Oda ısısında 10 dakika bekletildikten sonra 4000 g 'de 20 dk. santrifüj edilmiştir.

Kadmiyum granüllerinin aktivasyon işlemi; Granüller üç defa distile su ile yıkanmıştır. 1-2 dakika CuSO_4 çözeltisi içinde bekletilmiş ve daha sonra vortekslenmiştir. Üç defa da Glisin-NaOH tampon ile yıkanmıştır. 10 dakika içinde kullanılmak üzere kurutma kağıdı yardımıyla kurutulmuştur.

Total nitrit ölçümü;

	Numune	Standart
Glisin-NaOH buffer	1 ml	1ml
Deproteinize sample	1ml	-
Standart dilusyonu	-	1ml
2.5-3 gr Cd granülleri (indirgenmiş)	Var	Var



-90 dk oda ısısında inkübasyon-



	Numune	Standart	Kör
Distile Su	-	-	1 ml
Numune (indirgenmiş)	1 ml	-	-
Standart	-	1 ml	-
Sülfanilamid	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
N-Naphthylethylene diamine	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml

Şekil 7. Total nitrit ölçümü

Standart ölçümü;

Standart ölçmek için 10 mmol/L NaNO₂ stok çözeltisinden 5; 10; 25; 50; 100; 200 µmol/L'lik seri dilusyonlar hazırlandı. Numunelere uygulanan işlemlerin aynısı standartlara da uygulandı.

Nitrit düzeyinin hesaplanması;

Absorbanslarını 545 nm'de okuduğumuz numune sulandırma faktörü olan 10 ile çarpılıp, elde ettiğimiz değer nitrit standart eğrisinden elde edilen faktörle çarpılıp sonuç µmol/L olarak hesaplanmıştır.

3.3.6. Serum Total Oksidan Status (TOS) Düzeylerinin Ölçümü

Serumların TOS seviyeleri Rel Assay Total Oksidan Status Test Kiti kullanılarak ölçüldü. TOS Erel yöntemine göre ölçüldü (90). Bu ölçüm yönteminde; numunede bulunan oksidanlar, (Ferröz) Fe⁺²-o-dianisidine kompleksini (Ferrik) Fe⁺³ iyonuna okside eder. Oksidasyon reaksiyonu reaksiyon ortamı içinde bol miktarda bulunan gliserol molekülleri ile hızlandırılır. Fe⁺³ iyonu asidik ortamda ksilenol oranj (xylenol orange) ile renkli bir kompleks yapar. Renk şiddeti, örnekte bulunan oksidan moleküllerin miktarı ile orantılıdır ve spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Ölçüm hidrojen peroksit ile kalibre edilir ve birimi µmol H₂O₂ ekivalent/L olarak ifade edilir ve µmol H₂O₂ ekivalent/mg protein olarak rapor edildi.

Reaktif 1: 900 mL 25mM H₂SO₄ solüsyonu içerisinde 114 mg ksilenol oranj ve 8,18 g NaCl çözüldü. Çözeltiye 100 mL gliserol ilave edildi. Reaktifin son halinde 150 µM ksilenol oranj, 140 mM NaCl, 1.35 M gliserol ve pH değeri 1,75 olmuştur. Bu reaktif 4 °C'de en az 6 ay stabildir.

Reaktif 2: 1.96 g demirli amonyum sülfat ve 3.17 g o-dianisidin dihidrokloridin 25 mM 1000 mL H₂SO₄ solüsyonunda çözülmesiyle hazırlandı. Reaktifin nihai konsantrasyonunda 5 mM demir amonyum sülfat ve 10 mM o-dianisidin dihidroklorürden meydana gelmiştir. Bu reaktif 4 °C'de en az 6 ay stabildir.

Yöntem otomatik bir analizöre (Roche Cobas 501) uygulandı. Ölçümün test formatı aşağıda gösterilmiştir.

Reaktif 1 hacim: 225 µl

Serum hacim: 35 µl

Reaktif 2 hacim: 11 µl

Dalga boyu: 560 nm

Okuma noktası: End point ölçüm. İlk absorbans R1 ve R2 karıştırılmadan önce, son absorbans ise reaksiyon grafiği düz bir çizgi çizdikten sonra yani karıştırmadan yaklaşık 3-4 dakika sonra alınır.

Kalibrasyon tipi: Lineer

Kit içeriğinde bulunan reaktifler, standart ve kontroller oda sıcaklığına getirildi. Daha önce TOS kiti uygulaması yapılan Roche Cobas 501 otomatik analizörün uygun kasetine kit reaktifleri koyularak cihaza yerleştirildi. Kit kalibre edilerek çalışmaya hazır hale getirildi. Derin dondurucudan otomatik analizör ölçümleri için porsiyonlanan serum örnekleri çıkartılarak oda sıcaklığında erimeye bırakıldı. Daha sonra serumlar vorteks ile karıştırıldı. Hazırlanan serumlar cihazın raklarına yerleştirilerek order verildi ve çalışma gerçekleştirilerek sonuçlar kaydedildi.

3.3.7. Serum Total Antioksidan Status (TAS) Düzeylerinin Ölçümü

Serumların TAS seviyeleri Rel Assay Total Antioksidan Status Test Kiti kullanılarak ölçüldü. TAS, Erel yöntemine göre ölçüldü (80). Redükte ABTS molekülü asidik ortamda (30 mmol/L, pH 3.6 asetat tamponu) hidrojen peroksit kullanılarak $ABTS^+$ molekülüne okside edilir. Asetat tampon çözeltisinde, konsantre (koyu yeşil) $ABTS^+$ molekülleri daha uzun süre stabil kalır. Yüksek pH değerlerinde (0,4 mol/L, pH 5.8 asetat tamponu) daha konsantre bir asetat tampon çözeltisi ile seyreltilirken, renk kendiliğinden ve yavaşça açılmaktadır. 30 mmol/L asetat tamponu ve pH: 3.6'da koyu yeşil renkte olan radikalın, asetat tamponu 400 mmol/L, pH: 5.8 olduğunda rengi açılmaktadır. Numunede bulunan antioksidanların konsantrasyonu, rengin açılma oranı ile doğru orantılıdır. Renk değişimi ile örnek içindeki antioksidan miktarı arasında ters ilişki bulunmaktadır. Bu reaksiyon, spektrofotometrik olarak izlenebilir ve rengi açılma oranı, aynı zamanda absorbanstaki azalma oranı numunenin TAS konsantrasyonu ile ters orantılı olarak ilişkilidir. ABTS radikali, antioksidan konsantrasyonuna ve antioksidan seviyeye göre mavi ve yeşil rengini kaybetmektedir. Bu renk değişikliği, absorbans değeri 660 nm'de ölçülerek değerlendirme yapılmaktadır. Bu ölçüm metodunun prensibi hidrojen peroksit varlığında ABTS molekülünün $ABTS^+$ molekülüne okside olmasına dayanmaktadır. Reaksiyon hızı, TAS ölçüm deneyleri için

geleneksel bir standart olarak yaygın olarak kullanılan Trolox ile kalibre edilir ve analiz sonuçları, mmol Trolox Equivalent/L olarak ifade edilir. Ölçüm tekrarlanabilirliği %3'ün altında mükemmel yakındır.

Reaktif 1: 0.4 mol/L, pH 5.8 asetat tampon çözeltisi şu şekilde hazırlanmıştır; 32.8 g CH₃COONa, 1000 ml deiyonize su içinde çözöldü (nihai konsantrasyon: 0.4 mol/L). Glasiyel asetik asit (22.8 mL) deiyonize su ile 1000 mL'ye seyreltildi (nihai konsantrasyon: 0.4 mol/L). Sodyum asetat çözeltisi (940 mL), bir pH metre altında 60 ml asetik asit çözeltisi ile karıştırıldı; asetik asit-sodyum asetat tamponunun pH değeri 5.8 idi. Tampon çözeltisi 4 °C'de en az 6 ay stabildir.

Reaktif 2: 30 mmol/L, pH 3.6 asetat tampon çözeltisi, şu şekilde hazırlanmıştır: 2.46 g CH₃COONa, 1000 ml deiyonize su içinde çözöldü (nihai konsantrasyon: 30 mmol/L). Glasiyel asetik asit (1.705 mL), deiyonize su ile 1000 ml'ye seyreltildi (nihai konsantrasyon: 30 mmol/L). Sodyum asetat çözeltisi (75 mL), bir pHmetre altında 925 ml asetik asit çözeltisi ile karıştırıldı; asetik asit-sodyum asetat tamponunun pH'si 3.6 idi. Daha sonra 278 µl ticari H₂O₂ çözeltisi (%35, Merck), tampon çözeltisi ile 1000 ml'ye seyreltildi (nihai konsantrasyon: 2 mmol/L). Daha sonra 0,549 g ABTS, hazırlanan solüsyonun 100 ml'sinde çözöldü (nihai konsantrasyon: 10 mmol/L). Oda sıcaklığında 1 saat inkübasyondan sonra, ABTSS⁺'nın karakteristik rengi ortaya çıktı. Renkli reaktif, 4 °C'de en az 6 ay boyunca stabildir.

Yöntem otomatik bir analizöre (Roche Cobas 501) uygulandı. Ölçümün test formatı aşağıda gösterilmiştir.

Reaktif 1 hacim: 200 µl

Serum hacim: 5 µl

Reaktif 2 hacim: 20 µl

Dalga boyu: 660 nm

Okuma noktası: İlk absorbans R1 ve R2 karıştırılmadan önce, son absorbans beş dakikalık inkübasyon periyodundan sonra alınır.

Kalibrasyon tipi: Lineer

Kit içeriğinde bulunan reaktifler, standart ve kontroller oda sıcaklığına getirildi. Daha önce TAS kiti aplikasyonu yapılan Roche Cobas 501 otomatik analizörün uygun kasetine kit reaktifleri koyularak cihaza yerleştirildi. Kit kalibre edilerek çalışmaya

hazır hale getirildi. Derin dondurucudan otomatik analizör ölçümleri için porsiyonlanan serum örnekleri çıkartılarak oda sıcaklığında erimeye bırakıldı. Daha sonra serumlar vorteks ile karıştırıldı. Hazırlanan serumlar cihazın raklarına yerleştirildi, order verildikten sonra çalışma gerçekleştirilerek sonuçlar kaydedildi.

3.3.8. Serum Tiyol Disülfid Homeostazis Düzeylerinin Ölçümü

Tiyol disülfid homeostaz testleri, Erel ve Neselioğlu tarafından tanımlanan yöntemle Roche Cobas 501 otomatik analizöründe kolorimetrik yöntem ile ölçüldü (91). Serumda mevcut bulunan -SH grupları doğal tiyolü oluşturmaktadır ve DTNB (5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik) asidin) ile reaksiyon sonrasında belirlenir. Kan proteinlerindeki disülfid bağları (-S – S-) NaBH₄ ile birlikte serbest fonksiyonel tiyol grupları (-SH) oluşturmak üzere indirgenir. Kullanılmayan indirgeyici NaBH₄, serumda mevcut bulunan -SH grupları (doğal tiyol) ve NaBH₄ tarafından indirgenme ile elde edilen -SH toplamını (total tiyol) ölçmede kullanılacak olan DTNB'nin indirgenmesini önlemek amacıyla formaldehitte tüketilir. Toplam tiyoller ve doğal tiyoller farkın yarısı, dinamik disülfid miktarını vermektedir. Doğal ve toplam tiyollerin belirlenmesinden sonra, disülfid miktarları, disülfid/toplam tiyol yüzde oranları (SS/SH+SS), disülfid/doğal tiyol yüzde oranları (SS/SH) ve doğal tiyol/toplam tiyol yüzde oranları (SH/SH+SS) hesaplama yöntemiyle bulunmuştur.

Otomatik analizörde yöntem iki kit ile çalışıldı. Birinci kit doğal tiyol reaktifi ve DTNB den oluşan iki reaktifli bir kitti. İkinci kit ise üç reaktiften oluşmaktaydı; sodyum borahidrat, total tiyol reaktifi ve DTNB'dir. İlk kit numunelerdeki doğal tiyol içeriğini ölçmüştür. İkinci kit ise doğal tiyol ve indirgenmiş tiyollerden oluşan toplam tiyol içeriğini ölçmüştür.

Toplam -SH kiti:

Reaktif 1; 1000mL su-metanol solüsyonunda (%50v/v) 378mg sodyumborohidratın çözülmesiyle hazırlandı. Sodyumborohidratın nihai konsantrasyonu 10,0 mM idi. Reaktif taze olarak hazırlandı ve günlük olarak kullanıldı.

Reaktif 2; 1000 mL 100 mM ve pH 8,2 TRIS tamponu içerisinde 0.5 mL formaldehit (nihai konsantrasyon: 6,715 mM) ve 3,8 g EDTA (nihai konsantrasyon: 10,0 mM) çözülerek hazırlandı. Bu reaktif 4 °C'de en az 6 ay stabildir.

Reaktif 3; 1000 mL metanol içinde 3,963g DTNB'nin çözülmesiyle hazırlandı. DTNB'nin nihai konsantrasyonu 10,0 mM idi. Reaktif taze olarak hazırlandı ve günlük olarak kullanıldı.

Doğal -SH kiti:

Reaktif 1'; 1000 mL su-metanol solüsyonu (%50v/v) içinde 585 mg sodyum klorürün çözülmesiyle hazırlandı. Son sodyum klorür konsantrasyonu 10,0 mM idi. Bu reaktif 4 °C'de en az 6 ay stabildir.

Reaktif 2'; 1000 mL 100 mM ve pH 8,2 TRIS tamponu içerisinde 0,5 mL formaldehit (nihai konsantrasyon: 6,715 mM) ve 3,8 g EDTA (nihai konsantrasyon: 10,0 mM) çözülerek hazırlandı. Bu reaktif 4 °C'de en az 6 ay stabildir.

Reaktif 3'; 1000 mL metanol içinde 3,963g DTNB'nin çözülmesiyle hazırlandı. DTNB'nin nihai konsantrasyonu 10,0 mM idi. Reaktif taze olarak hazırlandı ve günlük olarak kullanıldı.

Test formatı aşağıda gösterilmiştir.

R1 hacmi (toplam -SH için): 10 µL (R1: NaBH₄, metanol su çözeltisinde 10 mM, 50v/v)

R1 ' hacmi (doğal-SH için): 10 µL (R1 ' : NaCl, metanol-su çözeltisi içinde 10 mM, 50v/v) Numune hacmi 10 µL

R2 ve R2' hacmi: 110 µL, (Tris tamponu içinde 10,7 mM formaldehit ve 10,0 mM EDTA, 100 mM, pH: 8,2)

R3 ve R3' hacmi: 10 µL, (metanol içinde 10 mM DTNB)

Dalga boyu: Ana dalga boyu 415 nm, ikincil dalga boyu 700 nm (isteğe bağlı olarak bikromatik)

Okuma noktası: Son nokta, artan ölçüm; ilk absorbans, R2 ve R3'ün karıştırılmasından önce alınır ve son absorbans, reaksiyon grafiği bir plato çizdiğinde alınır (analiz süresi yaklaşık 10 dakikadır).

Kalibrasyon tipi: Doğrusal (2-merkaptetanol, deney için kalibratör olarak kullanılır).

3.4. İstatistiksel Analiz

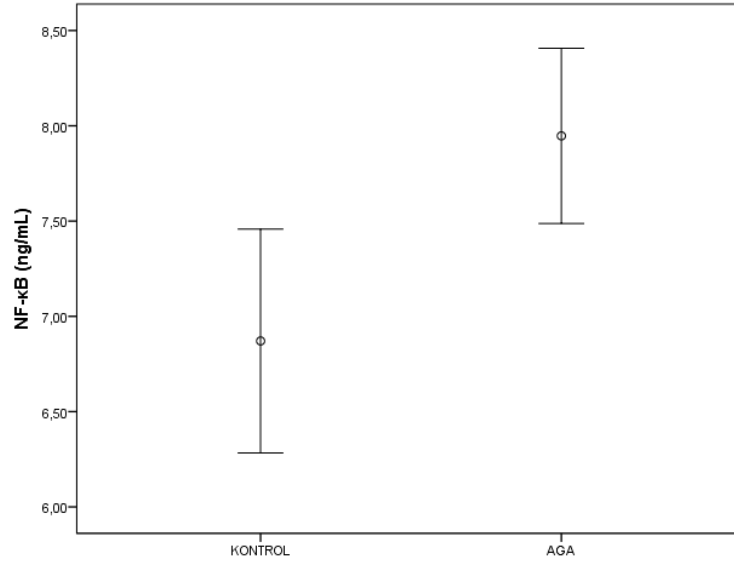
Sonuçlar SPSS 22.0 versiyon kullanılarak mean (ortalama) ve SD (standart sapma) olarak verilmiştir. Grupların normal dağılıp dağılmadığı Shapiro-Wilks testi kullanılarak değerlendirildi. Normal dağılan değerler için, bağımsız örneklem t testi kullanıldı. Korelasyon analizleri için Pearson Corelation testi kullanıldı. $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4-BULGULAR

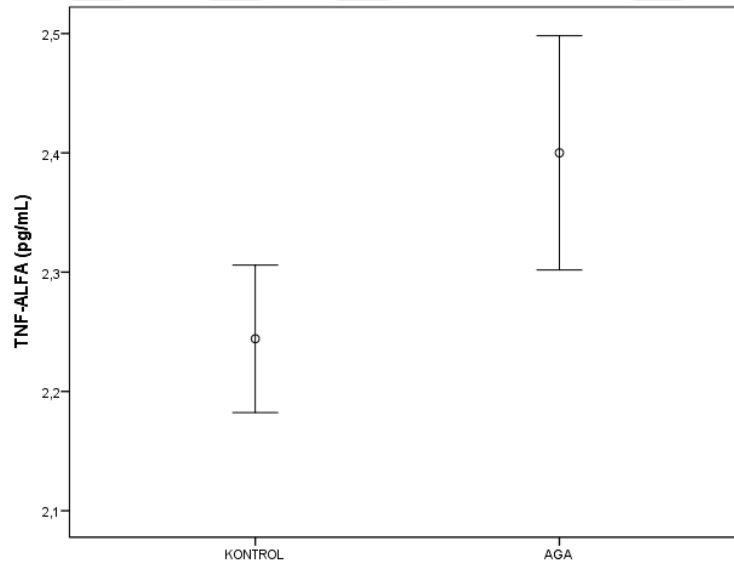
Tablo 3. Hasta ve kontrol gruplarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi, SD: standart sapma

Parametre	Grubu	Ortalama	SD	p değeri
NF-κB (ng/mL)	Kontrol	6,87	1,57	0,005
	Hasta	7,95	1,75	
TNF-α (pg/mL)	Kontrol	2,24	0,17	0,008
	Hasta	2,40	0,37	
TGF-β (pg/mL)	Kontrol	170,38	26,46	0,028
	Hasta	183,27	23,25	
Tiyoredoksin (ng/mL)	Kontrol	10,10	4,20	0,004
	Hasta	13,63	6,83	
NO (μmol/L)	Kontrol	12,90	1,73	<0,001
	Hasta	15,85	2,18	
TOS (μmol H ₂ O ₂ Eqv/L)	Kontrol	3,72	0,13	<0,001
	Hasta	4,01	0,17	
TAS (mmol TEqv/l)	Kontrol	1,75	0,14	0,003
	Hasta	1,64	0,21	
OSİ	Kontrol	0,21	0,018	<0,001
	Hasta	0,25	0,031	
Doğal TiyoL (μmol/L)	Kontrol	404,46	21,39	<0,001
	Hasta	337,50	45,95	
Total TiyoL (μmol/L)	Kontrol	443,83	23,60	<0,001
	Hasta	371,03	49,93	
Disülfid (μmol/L)	Kontrol	19,69	1,29	<0,001
	Hasta	16,76	2,06	
İndeks 1	Kontrol	4,87	0,18	0,008
	Hasta	4,98	0,20	
İndeks 2	Kontrol	4,43	0,15	0,008
	Hasta	4,53	0,16	
İndeks 3	Kontrol	91,13	0,29	0,008
	Hasta	90,94	0,33	



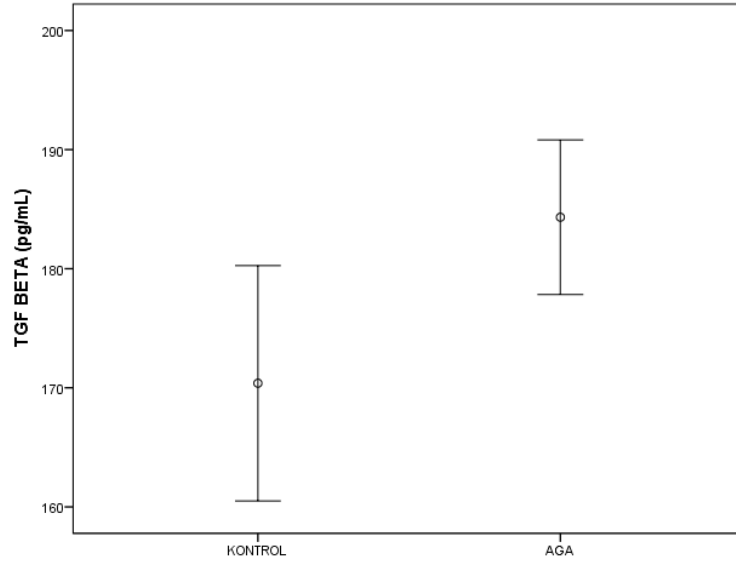
Şekil 8. Hasta ve kontrol grubu serum NF-κB düzeyi karşılaştırması

Yapmış olduğumuz araştırmada elde ettiğimiz sonuçlara göre serum NF-κB düzeyini hasta grubunu oluşturan AGA olan bireylerde, sağlıklı kontrol grubunu oluşturanlara göre anlamlı derecede yüksek bulduk ($p=0,005$) (Tablo 3).



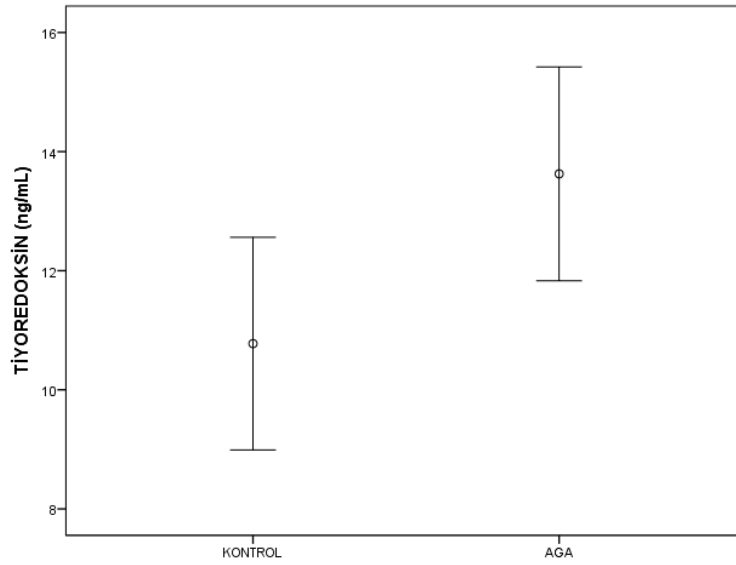
Şekil 9. Hasta ve kontrol grubu serum TNF-α düzeyi karşılaştırması

Elde ettiğimiz sonuçlara göre serum TNF-α düzeyini hasta grubunu oluşturan AGA olan bireylerde, sağlıklı kontrol grubunu oluşturanlara göre anlamlı derecede yüksek bulduk ($p=0,008$) (Tablo 3).



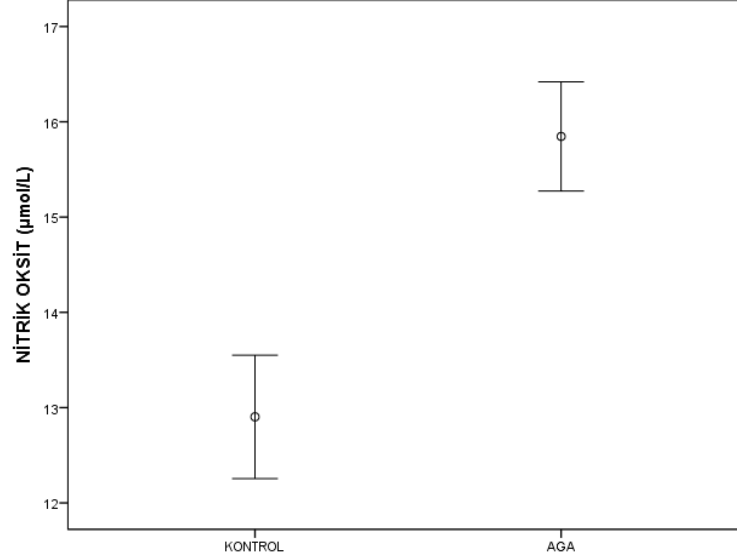
Şekil 10. Hasta ve kontrol grubu serum TGF- β düzeyi karşılaştırması

Yapmış olduğumuz çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre serum TGF- β düzeyini hasta grubunu oluşturan AGA olan bireylerde, sağlıklı kontrol grubunu oluşturanlara göre anlamlı derecede yüksek bulduk ($p=0,028$) (Tablo 3).



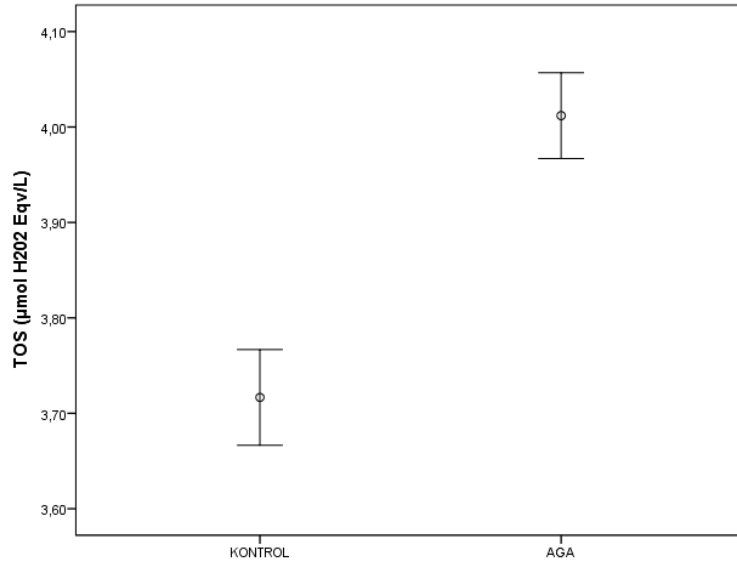
Şekil 11. Hasta ve kontrol grubu serum Tioredoksin düzeyi karşılaştırması

Sonuçlardan elde ettiğimiz verilere göre serum Tiyoredoksin düzeyini hasta grubunu oluşturan AGA olan bireylerde, sağlıklı kontrol grubunu oluşturanlara göre anlamlı derecede yüksek bulduk ($p=0,004$) (Tablo 3).



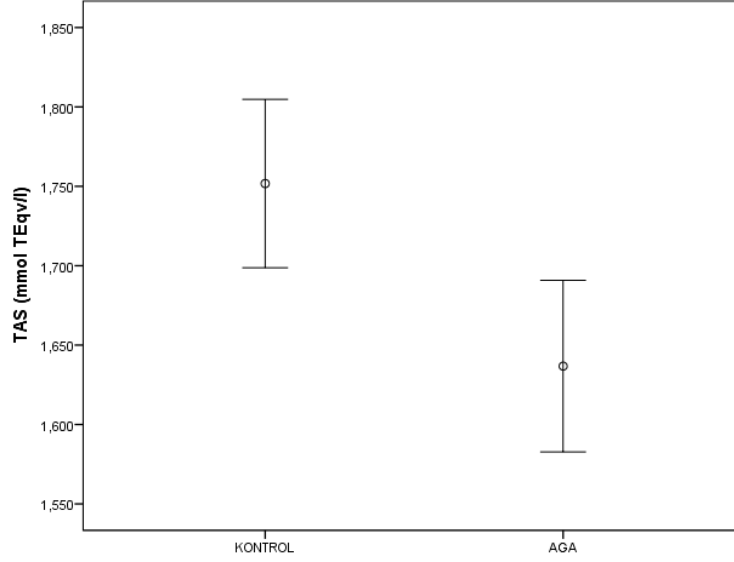
Şekil 12. Hasta ve kontrol grubu serum Nitrik Oksit düzeyi karşılaştırması

Yapmış olduğumuz araştırmada elde ettiğimiz sonuçlara göre serum NO düzeyini hasta grubunu oluşturan AGA olan bireylerde, sağlıklı kontrol grubunu oluşturanlara göre anlamlı derecede yüksek bulduk ($p<0,001$) (Tablo 3).



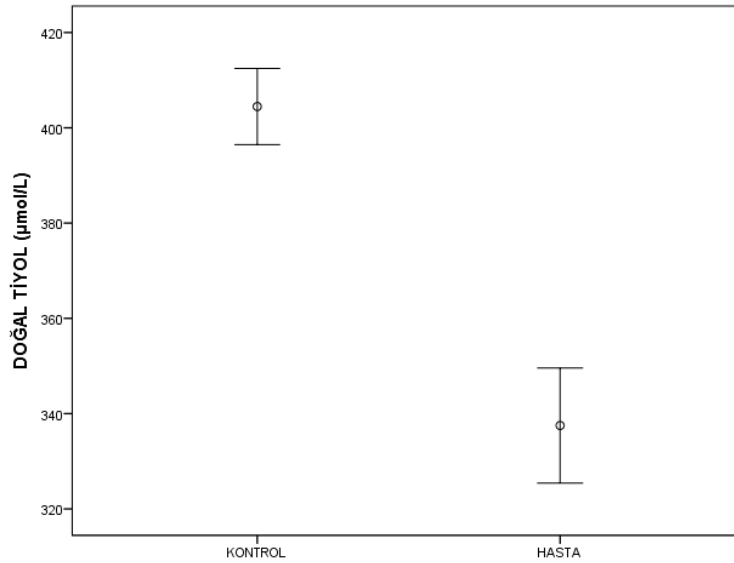
Şekil 13. Hasta ve kontrol grubu serum TOS düzeyi karşılaştırması

Araştırmamızdan elde ettiğimiz verilere göre serum TOS düzeyini hasta grubunu oluşturan AGA olan bireylerde, sağlıklı kontrol grubunu oluşturanlara göre anlamlı derecede yüksek bulduk ($p<0,001$) (Tablo 3).



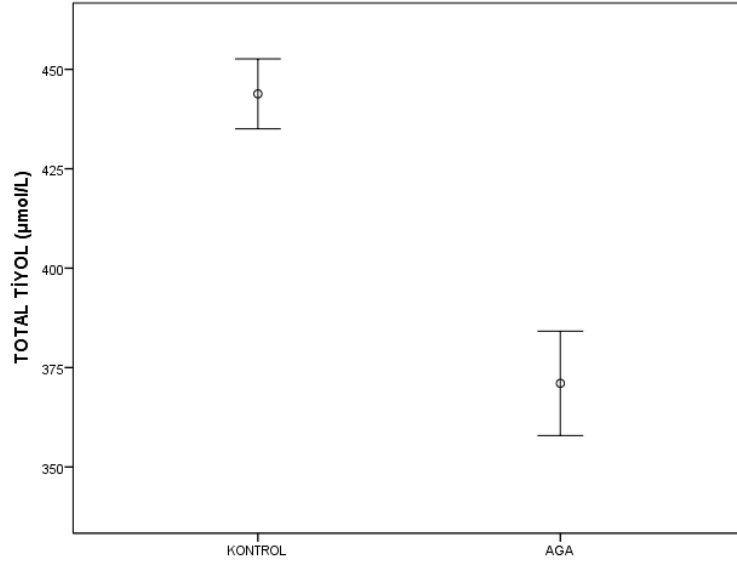
Şekil 14. Hasta ve kontrol grubu serum TAS düzeyi karşılaştırması

Bulduğumuz sonuçlara göre serum TAS düzeyini hasta grubunu oluşturan AGA olan bireylerde, sağlıklı kontrol grubunu oluşturanlara göre anlamlı derecede düşük bulduk ($p=0,003$) (Tablo 3).



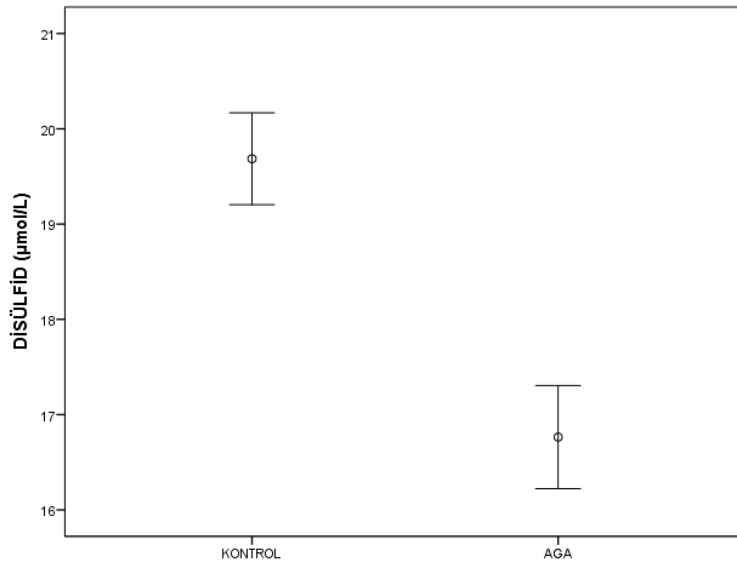
Şekil 15. Hasta ve kontrol grubu serum doğal tiyol düzeyi karşılaştırması

Tespit ettiğimiz sonuçlar gösterdiki, serum Doğal Ti yol düzeyini hasta grubunu oluşturan AGA olan bireylerde, sağlıklı kontrol grubunu oluşturanlara göre anlamlı derecede düşüktür ($p<0,001$) (Tablo 3).



Şekil 16. Hasta ve kontrol grubu serum total ti yol düzeyi karşılaştırması

Yapmış olduğumuz araştırmada elde ettiğimiz sonuçlara göre serum Total Ti yol düzeyini hasta grubunu oluşturan AGA olan bireylerde, sağlıklı kontrol grubunu oluşturanlara göre anlamlı derecede düşük bulduk ($p<0,001$) (Tablo 3).



Şekil 17. Hasta ve kontrol grubu serum disülfid düzeyi karşılaştırması

Elde ettiğimiz verilere göre serum Disülfid düzeyini hasta grubunu oluşturan AGA olan bireylerde, sağlıklı kontrol grubunu oluşturanlara göre anlamlı derecede düşük bulduk ($p<0,001$) (Tablo 3).

Aynı zamanda yapılan analizlerden sonra hesaplanan parametreler olan ve artmış olan oksidatif stres yükünün bir göstergesi kabul edilen OSİ (Oksidatif Stres İndeksi= TOS/TASX100) hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,001$). Tiyo Disülfid Homeostazi'nin değerlendirilmesinde kullanılan ve gerekli ölçümlerden sonra hesaplanarak elde edilen İndeks 1 (Disülfid/Doğal TiyoX100), İndeks 2 (Disülfid/Total TiyoX100) ve İndeks 3 (Doğal Tiyo/Total TiyoX100) AGA olan bireylerde sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu (Herbiri için $p=0,008$) (Tablo 3).

Tablo 4: Parametreler arası korelasyon, * $p=0,05$ 'e göre korele olan sonuçlar.

Parametreler	NF-κB	TNF-α	TGF-β	Tioredoksin	NO	TOS	TAS	OSİ	Doğal Tiyo	Total Tiyo	Disülfid
NF-κB	1	0,22	-0,06	0,08	0,23*	0,08	-0,27*	0,26*	-0,31*	-0,30*	-0,26*
		0,84	0,58	0,45	0,033	0,49	0,011	0,013	0,004	0,004	0,013
TNF-α	0,22	1	0,12	0,23*	0,29*	0,23*	0,07	0,06	-0,15	-0,15	-0,15
	0,84		0,28	0,032	0,006	0,033	0,529	0,61	0,17	0,17	0,17
TGF-β	-0,06	0,12	1	0,17	0,21*	0,17	-0,03	0,08	-0,09	-0,09	-0,11
	0,59	0,28		0,13	0,046	0,10	0,80	0,47	0,43	0,42	0,13
Tioredoksin	0,08	0,23*	0,17	1	0,10	0,02	-0,09	0,08	-0,21*	-0,22*	-0,24*
	0,45	0,032	0,13		0,34	0,82	0,43	0,44	0,046	0,044	0,028
NO	0,23*	0,29*	0,21*	0,210	1	0,37*	-0,15	0,30*	-0,37*	-0,37*	-0,37*
	0,033	0,006	0,046	0,344		<0,001	0,17	0,004	<0,001	<0,001	<0,001
TOS	0,08	0,23*	0,17	0,02	0,37*	1	-0,13	0,52*	-0,32*	-0,32*	-0,30*
	0,49	0,033	0,10	0,82	<0,001		0,24	<0,001	0,002	0,003	0,004
TAS	-0,27*	0,07	-0,03	-0,09	-0,15	-0,13	1	-0,90*	0,28*	0,28*	0,28*
	0,011	0,529	0,80	0,43	0,17	0,24		<0,001	0,009	0,009	0,008
OSİ	0,26*	0,06	0,08	0,08	0,30*	0,52*	-0,90*	1	-0,40*	-0,40*	-0,39*
	0,013	0,61	0,47	0,44	0,004	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	<0,001
Doğal Tiyo	-0,31*	-0,15	-0,09	-0,21*	-0,37*	-0,32*	0,28*	-0,40*	1	1,00*	0,96*
	0,004	0,17	0,43	0,046	<0,001	0,002	0,009	<0,001		<0,001	<0,001
Total Tiyo	-0,30*	-0,15	-0,09	-0,22*	-0,37*	-0,32*	0,28*	-0,40*	1,00*	1	0,97*
	0,004	0,17	0,42	0,044	<0,001	0,003	0,009	<0,001	<0,001		<0,001
Disülfid	-0,26*	-0,15	-0,11	-0,24*	-0,37*	-0,30*	0,28*	-0,39*	0,96*	0,97*	1
	0,013	0,17	0,13	0,028	<0,001	0,004	0,008	<0,001	<0,001	<0,001	

Yapmış olduğumuz çalışmada serum NF-κB değerleri, NO ($p=0,033$) ve OSİ ($p=0,013$) pozitif korele, TAS ($p=0,011$), Doğal Tiyo ($p=0,004$), Total Tiyo ($p=0,004$) ve Disülfid ($p=0,013$) ile ise negatif korele bulundu (Tablo 4). Ayrıca İndeks 1

($p=0,027$) ve İndeks 2 ($p=0,026$) ile de pozitif korelasyon tespit edildi, İndeks 3 ile ise negatif korelasyon belirlendi ($p= 0,026$).

Serum TNF- α düzeyi Tioredoksin ($p=0,032$), NO ($p=0,006$) ve TOS ($p=0,033$) ile pozitif korele bulundu (Tablo 4).

Serum TGF- β değerlerinin serum NO düzeyleri ile pozitif korele ($p=0,046$) olduğu belirlendi (Tablo 4).

Ölçülen Tioredoksin düzeyleri Doğal Tiyo ($p=0,046$), Total Tiyo ($p=0,044$) ve Disülfid ($p=0,028$) ile negatif korele, TNF- α ($p=0,032$) pozitif korele bulundu (Tablo 4).

Serum NO seviyesi NF- κ B, TNF- α ve TGF- β 'ye ek olarak TOS ($p<0,001$) ve OSI ile de güçlü bir pozitif korelasyon göstermiştir ($p=0,004$). Doğal Tiyo ($p<0,001$), Total Tiyo ($p<0,001$) ve Disülfid ($p<0,001$) ile negatif korele bulundu (Tablo 4).

Serum TOS düzeyi Tiyo Disülfid Homeostazı parametrelerinden Doğal Tiyo ($p=0,002$), Total Tiyo ($p=0,003$) ve Disülfid ($p=0,004$) ile güçlü bir negatif korelasyon gösterdi ve ayrıca TNF- α ($p=0,033$) ile ise pozitif korelasyon gösterdi (Tablo 4).

Sonuçlardan elde edilen serum TAS seviyesi Doğal Tiyo ($p=0,009$), Total Tiyo ($p=0,009$) ve Disülfid ($p=0,008$) düzeyleri ile de pozitif korelasyon gösterdi. Aynı zamanda NF- κ B ile ise negatif korelasyon tespit edildi ($p=0,011$) (Tablo 4).

5-TARTIŞMA

Androgenetik alopesi, erkeklerde en yaygın saç dökülme sebebidir ve DHT ana suçlu olarak kabul edilmektedir. Dermal papilla, 5-alfa redüktaz etkisi ile testesteronun DHT'a dönüşümünde merkezi bir rol oynamaktadır. Ancak dermal papilla hücrelerinden türeyen androjenin, saç folikülünün büyümesini düzenleyen diğer bileşenleri etkilediği düşünülmektedir. Kafa derisi biyopsilerinin histolojik incelenmesinde terminal kılların minyatürizasyonu perifolüküler lenfositik infiltrasyon ve fibrozis ile de ilişkili bulunmuştur. Fibroze neden olan mikroskobik inflamasyonun, folikülün terminal kıl folikülüne reforme olmasını önleyeceği düşünülmektedir (92). Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin sistemik belirtileri ile biyolojik sistemlerin detoksifikasyon ve onarım kapasitesi arasındaki dengesizlikten kaynaklanır. AGA patogeneğinde genetik faktörlere ek olarak oksidatif strese maruziyet de hastalık gelişimi ile ilişkilidir (93). Oksidatif stresin saç dökülmesi üzerindeki kilit rolü göz önünde bulundurulmalıdır (94).

İnsan saç folikülü döngüsünün düzenlenmesi hakkında çok az şey bilinmektedir. Çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve peptidlerin, organ kültürü yapılan insan kafa derisi saç foliküllerinde in vitro olarak aktif saç büyümesini (anajen) inhibe etmesi veya bunların regresyon aşamasına (katajen) dönüşümü tanınmasına rağmen endojen insan "saç döngüsü saatinin" moleküler belirleyicileri deşifre edilmeyi beklemektedir. Yapmış olduğumuz araştırmada, AGA patogeneğinde rol oynadığı düşünülen mikroinflamasyon, perifoliküler fibrosiz ve oksidatif stresin analiz edilen parametreler aracılığı ile aydınlatılması amaçlanmıştır.

NF- κ B, inflamatuvar, immün ve akut faz yanıtlarda rol oynayan genlerin ekspresyonunu hızlı bir şekilde aktive edebilen bir multisubunit transkripsiyon faktörüdür (96). İyi bilinen proinflamatuvar fonksiyonlarından dolayı NF- κ B, esasen aşırı veya uygunsuz bir şekilde aktive edildiğinde potansiyel patojenik bir faktör olarak kabul edilir. NF- κ B'nin bu fonksiyonu, özellikle epitelyal yüzeylerde önemli görülmektedir (97). Saç folikülü hücrelerinden dermal papilla ve dermal kılıf hücre popülasyonlarında altta yatan immün mekanizma iyi anlaşılmamıştır ve saç folikülü hücrelerinin

proinflamatuar mücadeleye karşı duyarlılığı halen bilinmemektedir. NF- κ B transkripsiyon faktörü, inflamasyonda rol oynayan sitokinlerin, sitokin reseptörlerinin ve hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunu kontrol eder (98). Öte yandan Sitozolik H₂O₂ ile oksidasyon, inaktif NF- κ B/I κ B kompleksinden NF- κ B inhibitör (I κ B) alt biriminin serbest kalmasına ve NF- κ B aktivasyonuna yol açar. I κ B'den ayrılınca NF- κ B salınımı meydana gelir, nükleer gözeneklerden DNA bağlanma bölgelerine taşınır, bu da proinflamatuar sinyal aktivasyonu gibi çeşitli periyodik dışsal pertürbasyonların senkronizasyonuna izin verir. Tiyoredoksin redüktaz ve glutatyon redüktaz ise NF- κ B'nin inaktif formda bulunduğu NF- κ B/I κ B kompleks stabilitesini korur.

İnsan saç foliküllerinde NF- κ B aktivitesinin olabileceğini önerilmiştir, ancak insan saç döngüsündeki NF- κ B aktivitesinin sinyal spesifitesi, kesin lokalizasyonu ve fonksiyonel önemi bilinmemektedir (95). Yapmış olduğumuz çalışma AGA olan bireylerde serum NF- κ B düzeyi ölçülerek hastalık patogenezindeki rolünün aydınlatılmaya çalışıldığı ilk araştırmadır. Çalışma sonucunda elde ettiğimiz verilere göre, AGA olan bireylerde serum NF- κ B değerleri sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu (p=0,005) (Tablo 3). Ayrıca NO (p=0,033) ve OSİ (p=0,013) ile pozitif korele, TAS (p=0,011), Doğal Tiyol (p=0,004), Total Tiyol (p=0,004) ve Disülfid (p=0,013) ile ise negatif korele bulundu (Tablo 4). Ayrıca İndeks 1 (p=0,027) ve İndeks 2 (p=0,026) ile de pozitif, İndeks 3 ile ise negatif korelasyon belirlendi (p=0,026). Bu sonuçlardan AGA'da artmış olan NF- κ B serum düzeyinin oksidatif stres ve azalmış olan antioksidan savunma ile yakından ilişkili olduğu anlaşılmaktadır.

Jung-Min ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada, saç folikülü dış kök kılıf hücrelerinde inflamasyonun aktivasyon paternini araştırmışlardır. Saç folikülü kalıntılarındaki inflamatuvar hücrelerde IL-1 β ekspresyonunun arttığını bulunmuşlardır. Çift iplikli (ds) RNA mimik polinosinik: polisitidilik asit (poli (I:C)), NF- κ B sinyal yolunu aktive eden iyi bilinen bir toll-like receptor-3 (TLR-3) ligandıdır. NF- κ B aktivasyonunu inhibe etmek için I κ a-süper baskılayıcıyı (B α) eksprese eden rekombinant bir adenovirüsü tanıtmışlardır. Bu I κ -B α aşırı ekspresyonu, NF- κ B aktivitesini ve poli (I:C) ile olan hücre ölümünü zayıflatmıştır. I κ -B α ile NF- κ B 'nin inhibisyonu, poli (I: C) ile indüklenen TNF- α ve IL-1 β salgılanmasını önemli ölçüde

inhibe etmiştir. Araştırmacılar, poli (I:C)'nin NF-κB sinyal yolu aracılığı ile hücre ölümünü ve IL-1β sekresyonunu indüklediği sonucuna varmışlardır (99).

Yapılan başka bir çalışmada Rebecca P. ve arkadaşları, hücre kültürü hazırlanmış saç folikülü dermal kılıfı ve dermal papilla hücrelerinde TNF-α, IL1-β ve LPS analizini kullanarak proinflamatuvar zorlamaya olan yanıtını incelemişlerdir. IL1-β ve LPS, NF-κB aktivasyonunu uyarmış ve TNF-α ve IL1-β'ya yanıt olarak dermal fibroblast, dermal kılıf ve dermal papilla hücreleri tarafından akut NF-κB aktivasyonu gerçekleştiğini bildirmişlerdir (98).

Bu araştırmalardan anlaşılaçağı üzere NF-κB, AGA patogeneğinde de önemli bir faktör olan saç folikülü inflamasyonu oluşumunda rol almaktadır. NF-κB sinyal yolunun aktivasyonu proinflamatuvar stokinler tarafından ve bakteriyel kolonizasyon söz konusu ise LPS ile de aktive edilebilmekte ve folikül hücrelerinde inflamasyonu tetikleyecek olan diğer stokinlerin serbest kalmasına sebep olabilmektedir. Yapmış olduğumuz araştırma sonucunda AGA olan bireylerde NF-κB ile birlikte TNF-α serum düzeyinin de anlamlı derecede yüksek bulunması (p=0,008), seçmiş olduğumuz hastalarda mikroinflamasyonun da söz konusu olabileceğini ve yükselmiş olan TNF-α düzeyinin NF-κB artışını tetiklemiş olabileceğini düşündürmüştür. Aynı zamanda NF-κB aktivasyonu bir yanıt olarak da TNF-α seviyeleri yükselmiş olabilir. NF-κB artışının daha çok oksidatif stres parametreleri ile korele bulunmuş olması ise serum seviyesinde gerçekleşen yükselmenin hastalarda artmış olan oksidatif stres kaynaklı olduğunu akıllara getirmiştir. Oksidatif stres ile indüklenmiş olan NF-κB'nin ise TNF-α salınımını tetikleyerek artışına sebep olabileceğı düşünölmüştür.

Naringenin antioksidan aktiviteye sahip olduğü bilinmektedir. Junqin L. ve arkadaşları penvigus vulgaris hastalarında yapmış oldukları bir çalışmada naringenin, NF-κB yolunu inhibe ederek keratinositleri oksidatif stres hasarından koruduğunu göstermişlerdir (100).

Beita Z. ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada likopenin, oksidatif strese bağılı bilişsel kusurlar ve altta yatan mekanizmalar üzerindeki etkileri belirlemişlerdir. Karotenoid bir pigment olan likopen güçlü antioksidan, antienflamatuvar ve nöroprotektif özelliklere sahiptir. Likopen tedavisi, farelerdeki hipokampusta antioksidan enzimler olan HO-1 ve NQO-1'in mRNA ekspresyonlarını aktive etmiş ve

inflamatuvar stokinler olan IL-1 ve TNF- β 'yı inhibe etmiştir. Ayrıca likopenin, H₂O₂ ile indüklenmiş bir SH-SY5Y hücre modelinde Nrf2 sinyalinin aktivasyonu ve NF- κ B translokasyonunun etkisizleştirilmesiyle nöronal oksidatif hasarı hafiflettiğini göstermişlerdir (101).

B. Zhuan ve arkadaşları pulmoner hipertansiyon ile birlikte kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan hastalarda yaptıkları çalışmada, hastalarda NF- κ B düzeyini yüksek tespit etmişler ve oksidatif stresin bir göstergesi olabilen serum süperoksit dizmutaz düzeyi ile pozitif korele bulmuşlardır. NADPH oksidaz-ROT-NF- κ B transdüksiyon yolunun hastalık durumundaki oksidatif stres yanıtına katıldığını belirtmişlerdir. (102).

Farklı hastalık gruplarında yapılmış olan bu çalışmalar NF κ B'nin oksidatif strese aracılık ettiğini, artan oksidatif stres düzeyi ile korele bir şekilde arttığını, antioksidan müdahaleler ile inhibe edilebileceğini ve NF- κ B inhibisyonu ile oksidatif stresin vermiş olduğu zararların geriye döndürülebileceğini göstermektedir. NADPH oksidaz-ROT-NF- κ B transdüksiyon yolağı aracılı antioksidan genlerin transkripsiyonu, hücrelerin oksidatif strese cevap vermesi için önemli bir mekanizmadır. ROT, hücre içi yapıların oksidasyonu yoluyla hücrelere zarar verebilirken, doku hasarını hafifletmek için antioksidan aktiviteyi artırarak oksidatif stres tepki yollarını aktive edebilir (103). Böylece NF- κ B'nin hastalık durumunda artan oksidatif strese tepki olarak oksidatif stresi bastırma yollarında da rol alabildiğini anlamaktayız. Araştırmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara ve bahsetmiş olduğumuz çalışmalara göre AGA olan bireylerde NF- κ B hastalığın ilerlemesinde çok yönlü olarak yer almakta ve hastalarımızda yüksek bulunması başta oksidatif stres kaynaklıdır. Androjenetik alopesi hastalarında yükselmiş olan serbest oksijen radikalleri yanıt ve/veya savunma mekanizması olarak NF- κ B sinyal yollarında aktivasyona sebep olmuş ve bu da TNF- α gibi proinflamatuvar stokinlerin serbest kalmasına sebep olarak kıl foliküllerinde mikroinflamasyonu tetiklediği kanısına varmaktayız.

Dionigio-Antonio ve arkadaşları AGA için 9000 kişi üzerinde epidemiyolojik bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışmış oldukları popülasyonda özellikle, X kromozomu üzerindeki EDA2R geninin AGA ile anlamlı şekilde ilişkili olduğunu ve EDA2R'nin AGA'ya duyarlılığa neden olduğunu göstermişlerdir. EDA2R'nin ise NF- κ B yolağını aktive edebileceğine vurgu yapmışlardır (104). Bu çalışma bize AGA'ya genetik

yatkılığı olan kişilerde hastalığın gelişmesine NF-κB'in aracılık edebileceğini düşündürmektedir.

Kloepper JE. ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada insan saç folikülü anajen-katajen geçişindeki NF-κB'nin olası rolünü analiz etmişlerdir. İnsan anajen saç foliküllerinin matris epitelyumunda belirgin NF-κB aktivitesi olduğunu göstermişler ve bu durumun NF-κB aktivitesinin anajen bakımı için gerekli olabileceğini iddia etmişlerdir (95).

Androgenetik alopesi olan kişilerde insan saç derisinde anajen faz kısalmıştır ve katajen faza geçiş artmıştır. Bizim araştırmamıza ait sonuçlarda AGA hastalarında serum NF-κB düzeyi yüksek bulunmuştur ve bu bağlamda Kloepper JE. ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışma sonuçları ile çelişmektedir. Bu duruma hasta popülasyonunda eş zamanlı analiz edilen oldukça yüksek bulunan oksidatif stresin NF-κB serum düzeyi artışına, sağlıklı bireylerde anajen faz koruyucusu NF-κB'yi de açacak şekilde tetiklemesi sebep olmuş olabilir. Ayrıca AGA olan bireylerde yüksek bulduğumuz bir proinflatuar stokin olan ve mikroinflamasyonun bir göstergesi olabilen TNF-α da NF-κB'da yükselmeye sebep olabilir. Diğer bir sebebi ise çalışma yapılan ortamların birbirinde farklı olması olabilir. Bizim çalışmamız AGA'lı bireylerden alınan serum örneklerinde NF-κB ölçülen ilk araştırmadır. Diğer taraftan NF-κB anajan koruyucu bir etken olarak düşünüldüğünde hasta grubumuzda azalmış olan anajen fazın geri kazanımı için bir savunma mekanizmasında rol alarak yükselmiş olabileceği de düşünülmelidir.

Bir proinflatuar sitokin olan TNF-α, kıl hücrelerinde ve diğer çeşitli hücrelerde ekstrinsik hücre ölüm yolunu başlatmakta ve ayrıca ROT üretimini büyük ölçüde artırabilmektedir (129). Bunu, TNF reseptörü-1 (TNFR1) ile etkileşimi ve kaspazların müteakip aktivasyonu ile gerçekleştirir. TNF-α, yüksek ROT oluşum seviyelerinin bir sonucu olarak indüklenebilir inflamasyon kaskadı düzenlenmesi yoluyla üretilir. TNF-α, transkripsiyon faktörü c-jun'in fosforilasyonuna neden olan bir MAPK (mitojenle aktive olan protein kinaz)/JNK (c-Jun-N-terminal kinaz) sinyal kaskadı ve mitokondriyal zarın geçirgen olmasına izin veren artmış bax transkripsiyonunu başlatabilir ve bu da daha fazla ROT ve sitokrom C salınımına ve etkilenen hücrede apoptoz oluşumuna neden olur (130).

Androjenetik alopesi olan bireylerde sıklıkla hastalıktan etkilenen dokularda artmış sebum, bakteri kolonileri ve porfirinler görülür. Androjene duyarsız denekler üzerine yapılan çalışmalarda androjenlerin sebum üretimini düzenlediği gösterilmiştir (132). *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) gibi konakçı bakteriler sebumdan beslenir ve artan gıda arzı nedeniyle yağ bezlerini daha kolay kolonize edebilirler (133). *P. acnes* sebum'u metabolize ettiği için, ROT ve IL-1 α ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin aktivasyonu yoluyla porfirinler ve “konak dokusu bozulma ve enflamasyonunda rol oynaması muhtemel proteinler” üretir. Yağ bezinin aşırı kolonileşmesi durumunda, *P. acnes* patojeniktir (134-137). AGA olan bireylerde artmış olan androjenlerin kafa derisinde sebum oluşumunu arttırdığı ve bunun sonucunda ise ortamda sebum ile beslenen konakçı bakterilerin çoğaldığı anlaşılmıştır. Konakçı bakteriler TNF- α gibi proinflamatuvar stokinlerde artışa sebep olmaktadır. TNF- α ise inflamasyon ve oksidatif stresi arttırmaktadır.

Araştırmış olduğumuz AGA hastalığı patogeneğinde oksidatif stres ve mikroi inflamasyonun rol oynadığı düşünüldüğünde TNF- α 'nın bu aşamadaki rolünü merak edilmiştir ve bildiğimiz kadarıyla AGA olan bireylerde serum TNF- α seviyesi ölçülerek yapılan ilk çalışmadır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre serum TNF- α düzeyini hasta grubunu oluşturan AGA olan bireylerde, sağlıklı kontrol grubunu oluşturanlara göre anlamlı derecede yüksek bulduk ($p=0,008$) (Tablo 3). Ayrıca Tiyoredoksin ($p=0,032$), NO ($p=0,006$) ve TOS ($p=0,033$) ile pozitif korelasyon gösterdiği tespit edildi (Tablo 4). Buna göre AGA ilerlemesinde TNF- α artan oksidatif stres ile yakında ilişkilidir.

Farelerde yapılan bir çalışmada N-Asetil Sistein (NAC) ile yapılan tedavi, TNF- α 'nın başlattığı oksidatif stres düzeyini önemli ölçüde azaltmıştır. NAC, travmaya bağlı TNF- α kaynaklı inflamasyon ve oksidatif strese bağlı işitme kanalı kıl hücresi kaybına karşı koruma sağlamıştır. (131). Bu araştırma sonuçlarımızı desteklemekte ve hasta grubumuzda yükselmiş olan oksidatif stresin TNF- α kaynaklı olabileceğini ve antioksidan savunma mekanizmasının kuvvetlendirilmesi ile TNF- α kaynaklı kıl foliküllerini inflamasyona götürebilecek olan oksidatif stres hasarının azaltılabileceği göstermiştir.

Robert S. ve English Jr. gerçekleştirmiş oldukları modellemelerde şu sonuca ulaşmışlardır; AGA, pubertal ve postpubertal kafatası kemiğinin büyümesi ve/veya

galea aponeurotica (GA)'ya bağı kasların aşırı gelişimi ve kronik kasılması ile oluşan kronik GA-iletimli kafa derisi gerginliğinin bir sonucudur. Bu gerginlik proinflatuar kaskadı (ROT, COX-2 sinyalleri, IL-1, TNF- α , vb.) tetikler. Proinflatuar AGA-eğilimli dokularda androjen aktivitesinin (5- α R2, DHT ve AR) yanı sıra TGF- β 1'i indükler. Birlikte görülen DHT ve TGF- β 1 varlığı, perifoliküler fibroz, dermal kılıf kalınlaşması ve AGA'ya eğilimli saç foliküllerini destekleyen kılcak ağların kalsifikasyonuna aracılık eder. Bu kronik, progresif koşullar AGA iyileşmesinde hız sınırlayıcı faktörlerdir. Folikül büyüme alanını sınırlarlar ve AGA eğilimli dokulara oksijen ve besin tedarikini azaltırlar, bu da doku bozulmasına, saç folikülü minyatürizasyonuna ve sonunda da kelliğe yol açar (138). Yapılan bu modelleme, araştırmamızda elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir. Hasta grubumuzu oluşturan AGA olan bireylerde TNF- α , TGF- β 1 ($p=0,028$) ve NO ($p<0,001$) düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Tablo 3). Aynı zamanda NO'nin hem TNF- α ($p=0,006$) hem de TGF- β 1 ($p=0,046$) ile pozitif olarak korelasyon gösterdiği bulundu (Tablo 4). Bu da bize hasta popülasyonumuzda modellemede bahsedilen sebeplerden ötürü AGA eğilimli saç foliküllerinde proinflatuvar stokin olan TNF- α ve reaktif oksijen türlerinin artarak TGF- β 1'i tetiklediği ve hastaları saç kaybına götüren saç folikülü minyatürizasyonuna sürüklediği anlaşılmaktadır.

Xusheng W. ve arkadaşları, TNF- α 'nın saç folikülünün telojen-anajen geçişlerinde önemli bir aracı olduğu, saç folikülünde telojen-anajen geçişini indüklemek için yeterli olduğu, saç folikülü kök hücrelerinde AKT/ β -katenin sinyalini aktive ettiği ve yara kaynaklı olarak saçın yeniden anajene girişinde çok önemli rolü olduğu ortaya koymuşlardır. Makrofajların saç folikülü kök hücrelerini harekete geçirdiği ve telojen-anajen geçişine yol açtığını, çoğunlukla TNF sinyali verdiğini gösterilmiştir. Lgr5⁺ kök hücrelerinde makrofaj-TNF ile indüklenen AKT/ β -katenin sinyalinin, yaralanmadan sonra saç folikülü döngüsünü ve neogenezi teşvik etmede önemli bir rolü olduğunu göstermişlerdir (139). Yapılan bu çalışma, saç foliküllerinde görülen yaralanma kaynaklı makrofaj aktivasyonunun daha çok TNF- α salınarak anajen fazın yeniden kazanılmasına katkı sunduğunu göstermiştir. Buna göre, bizim elde ettiğimiz sonuçlarda TNF- α yüksekliğini bir kompensasyon mekanizması ile açıklamak mümkündür. AGA'da kaybolmuş olan anajen fazın geri kazanılmasında TNF- α 'nın rolü olabileceğini düşündürmüştür.

Kelleşen kafa derisi biyopsilerinin histolojik incelenmesinde terminal kılların minyatürizasyonu AGA'da ayırt edici bir özellik olup sıklıkla perifoliküler fibrozis ile ilişkilidir. Kıl folikülü minyatürizasyonu, folikülün altındaki "kollajen veya bağ dokusu şeritleri" denilen bir birikintiyle ve yoğun olarak paketlenmiş kollajen demetlerinden oluşan foliküler dermal kılıfının 2-2,5 kat büyümesiyle ilişkili olduğu bulunmuştur (105). Yara iyileşmesinde ve fibrozisde TGF- β için fibriler kollajenlerin ve fibronektin proteinlerinin ekspresyonunu düzenlemek bir anahtar fonksiyondur. TGF- β 'nin bağ dokusu onarımını arttıran ve bu şekilde devam eden sinyalleşmesinin doku fibrozunun gelişmesine yol açan potansiyel bir anabolik faktör olduğu ileri sürülmüştür ve TGF- β 1 in vivo olarak hızlı bir fibrotik yanıtı indüklediği gösterilmiştir (106, 107, 108). Yetişkin dermal fibroblastlarda TGF- β 1'in kronik ekspresyonu, apoptoz ile karakterize olan ciddi alopesiye neden olmuştur (109). TGF- β 1'in katajen regülasyonunda önemli rol oynadığı öne sürülmüştür ve saç folikülü katajen indüksiyon markırı olarak kabul edilmiştir. TGF- β 1, kıl folikülleri üzerinde in vitro negatif bir büyüme düzenleyici etkiye sahiptir (110, 111). TGF β 1'deki yetersizlik katajen progresyonunu ve AGA'da perifoliküler fibroziyi geciktirir (112, 113). Dermal papilla hücrelerinde TGF- β 1 üretimi androjene bağımlıdır ve kıl foliküllerinin minyatürleşmesini indükleyebilir (114, 115). Dermal papilla hücreleri ve keratinositlerin hücre kültürü sisteminde, androjen tarafından indüklenen TGF- β 1 salgılanmasının, epitelyal hücre büyümesini etkileyerek, kelleşen frontal kafa derisindeki dermal papilla hücrelerinde etkili olduğu kanıtlanmıştır (116). TGF- β 1, dermal papilla hücrelerinde androjen reseptör transaktivasyonu ve androjen duyarlılığını modüle ederek AGA patolojisine katkıda bulunur (117). TGF- β sinyalleşmesi AGA gelişiminde androjenle indüklenebilir önemli bir yoldur, androjen TGF- β transkripsiyonunu düzenler (118). Aynı zamanda TGF- β sinyalleşmesi AGA gelişimini destekler (117, 119) TGF- β 1 saç büyüme inhibisyonu ve apoptoziste rol alır. (120) Dermal papilla hücrelerinden gelen androjen kaynaklı TGF- β 1'in, saç şaftının minyatürleştirilmesinde önemli bir rol oynadığını gösterilmiştir (121).

Yapmış olduğumuz çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre serum TGF- β düzeyini hasta grubunu oluşturan AGA olan bireylerde, sağlıklı kontrol grubunu oluşturanlara göre anlamlı derecede yüksek bulduk ($p=0,028$) (Tablo 3). Ayrıca serum TGF- β değerlerinin serum NO düzeyleri ile pozitif korele ($p=0,046$) olduğu belirlendi (Tablo 4).

Hyeon Gyeong Y. ve arkadaşları çalışmalarında, testosteron ile indüklenen tip I prokollajen seviyesini dermal fibroblastlarda anti-TGF- β 1 proteini ile azaltmışlardır. Testosteron indüklü AGA'da katajen periyodu fibrozisinin TGF- β 1 ile ilgili olduğunu belirtmişlerdir. AGA'da saç folikül minyatürizasyonu ile sonuçlanan androjen ile indüklenen perifoliküler fibrozisi, patogenetik mekanizmalardan biri olarak önermişlerdir. Dermal fibroblastlarda fibrozisin, saç köklerinin saç döngüsünün katajen fazında hareket etmesini hızlandırdığını ve epitel büyümesini engelleyerek AGA'daki saç foliküllerinin minyatürleştirilmesine neden olduğunu iddia etmişlerdir (122).

Gui-Qing ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada TGF- β sinyalinin AGA patogenezi sırasında belirgin şekilde arttığını gösterilmiştir. Ek olarak, Wnt/b-katenin sinyal inhibisyonunun, TGF- β sinyallemesinin yükselmesine ve Wnt/b-katenin sinyal artışı ile TGF- β sinyallemesinin engellendiğini, AGA patogenezinde bunlar arasında bir karşıt ilişki olabileceğini göstermişlerdir (123).

L. Michel ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada TGF- β familyasının farklı üyeler arasında, sadece TGF- β 2 ekspresyonunun AGA hastalarında negatif olarak modüle olduğu bulunmuşlardır (124).

Yapılan bir çalışmaya göre, yetişkin farelerde TGF- β 1'in epidermal aşırı ekspresyonu telojenden anajene geçişi inhibe etmekte ve bu durum alopesi ile sonuçlanmaktadır (125).

Shigeki ve arkadaşları AGA'nın patomekanizmasını incelemek için keratinosit ve insan dermal papilla hücrelerinin bir kültür modelini oluşturmuş ve androjen tedavisi sonrası bu kültür ortamında TGF- β 1 konsantrasyonu ELISA ile incelemişlerdir. Androjen tedavisinin, TGF- β 1'in sekresyonunu arttırdığı görülmüştür. Dermal papillalarda androjen ile uyarılarak türetilen TGF- β 1'in AGA'da saç büyümesi baskılanmasına aracılık ettiğini, AGA oluşumunda anahtar bir aracı olduğunu, AGA'daki androjen kaynaklı büyüme inhibisyonundan sorumlu olduğunu belirlenmiştir. Ayrıca TGF- β 1'in büyüme baskılanması sırasında dermal papilladan keratinositlere sinyal ilettiğini bulmuşlardır (126).

Yapılan bir çalışmada androjen reseptörü ile transfekte edilen sıçan bıyık kılı dermal papilla hücrelerinde, androjen tedavisini takiben ROT üretimini artırmıştır. TGF- β 1 salgısının dermal papillada androjen tedavisi ile arttığını, androjen ile

indüklenebilir TGF- β 1'in ROT-temizleyici, N-asetil sistein tarafından önemli ölçüde baskılandığı doğrulanmıştır. Bu nedenle TGF- β 1'in androjen tarafından indüklenmesine, saç folikülü dermal papilla hücrelerinde ROT tarafından aracılık edildiği düşünülmüştür. Androjenlerin, dermal papilla hücrelerinde ROT dengesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabileceğini, bunun sonucunda da TGF- β 1'in sekresyonunu etkileyeceğini ve saç matrisi epitel hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edebileceği belirtilmiştir (127).

AGA temelini oluşturan androjenler TGF- β 1 düzeyini oksidatif stres üzerinden arttırmakta ve artan TGF- β 1 ise AGA gelişimini hızlandırmakta ve androjen patogeneze aracılık etmektedir. Androjenlerin, özellikle epitel hücrelerinde ROT homeostazında, hücrel redoks durumunu düzenlemede önemli bir rol oynayabileceği anlaşılmıştır. Ek olarak, ROT'un epitelyal hücrelerde TGF- β 'yi indüklediği bildirilmiştir ve bu nedenle androjenlerin ROT üretimine katıldığı ve ROT'un TGF- β sekresyonuyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (128).

Yapılan tüm bu çalışmalardan anlaşılmaktadır ki, yapmış olduğumuz araştırmadan elde ettiğimiz verilerde, hasta grubunda yüksek bulduğumuz serum TGF- β 1 düzeyi AGA'de patomekanizmanın temeli oluşturan androjenler dermal foliküllerde oksidatif stresi arttırmakta ve artan oksidatif stres aracılığı ile TGF- β 1 düzeyinde artışa sebep olmaktadır. TGF- β 1 düzeyinin kıl foliküllerinde androjenlerle serbest oksijen radikalleri aracılı olarak yükselmesi, çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara bakıldığında NO ile TGF- β 1 pozitif korele bulunması, androjenlerin saç foliküllerinde bu etkisinde NO'nin aktif rol alıyor olabileceğini düşündürmüştür. Artan bu TGF- β 1 ise perifoliküler fibrozise sebep olmakta ve bunun sonucunda foliküler minyatürizasyon gerçekleşmektedir. Diğer taraftan androjenlerin oksidatif stres aracılığı ile indükledikleri TGF- β 1 AGA'da katajen fazı indüklemekte ve hastalığın ilerlemesini hızlandırmaktadır.

Reaktif oksijen türleri sadece dış ve iç ortamda sitotoksik ürünler değil aynı zamanda redoks sinyalleşmesinin önemli araçlarıdır. Bu nedenle bir antioksidan olarak Tiyoredoksin, tiyol ilişkili redoks durumunun dengesini korur ve ayrıca redoks sinyalleşmesinin düzenlenmesinde çok önemli rol oynar. Tiyoredoksin, hücrel solunum, metabolizma ve immün yanıt tarafından oluşturulan çevresel oksidatif stresi ve ROT'u algılar ve bunlara yanıt verir, ardından hedef sinyal proteinlerinin redoks

durumunu, fonksiyonunu ve aktivitesini modüle eder. Böyle bir Tioredoksin sisteminin düzensizliği, çeşitli hücrel fonksiyonlarını, hayatta kalma ve ölüm gibi hücrel kaderi etkiler. Tioredoksin, redoks durumuna hedef sinyal proteinlerinin tiyol-disülfid değişim reaksiyonları ile doğrudan katkıda bulunur (140). Tioredoksin, redoks sinyalleşmesinin düzenlenmesinde ve özellikle de memeli hücrelerinde hücre kaderinin belirlenmesinde önemli rol oynar (141).

Tioredoksin, reaktif oksijen türlerinin temizlenmesi, oksidatif strese karşı koruma ve redoks duyarlı moleküller tarafından hücre sinyal iletiminin düzenlenmesi dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir. Ayrıca, enflamasyonun bastırılması ve hücrel düzeyde apoptozisin inhibisyonu üzerinde belirgin etkiler gösterir. Tioredoksin doğası gereği, çeşitli enflamasyon tipleri ve oksidatif stres sırasında hücrelerin özel bir yolağından çoğaltılır ve salgılanır (142). Hücre dışı ortamdaki hedef hücreler üzerinde sitokin benzeri bir etki gösterir (143). Önceki çalışmalara göre, serum/plazma Tioredoksin seviyesi oksidatif stresin iyi bir göstergesidir (144). Tioredoksinin oksidatif strese cevap olarak salgılandığı ve bunun oksidatif stresi nötralize etmek için adaptif bir koruma olabileceği doğrulanmıştır (145, 146) Bu nedenle, Tioredoksinin önemli ölçüde artmasının, bu dönemde oksidatif strese karşı savunma veya koruyucu mekanizma olabileceği ve oksidatif hasardan daha iyi koruma sağlayabileceği sonucuna varılmıştır. Oksidatif stres ve inflamasyon sırasında Tioredoksin periferik kana salınır ve hem enflamasyonu hem de oksidatif stresi yansıtır. Tioredoksinin kana nasıl ve hangi mekanizma ile salgılandığı ise net değildir (147). Sonuçlardan elde ettiğimiz verilere göre serum Tioredoksin düzeyini hasta grubunu oluşturan AGA olan bireylerde, sağlıklı kontrol grubunu oluşturanlara göre anlamlı derecede yüksek bulduk ($p=0,004$) (Tablo 3). Ölçülen Tioredoksin düzeyleri Doğal Tiyol ($p=0,046$), Total Tiyol ($p=0,044$) ve Disülfid ($p=0,028$) ile negatif korele ve TNF- α ($p=0,032$) ile ise pozitif korele bulundu (Tablo 4). Sonuçlar bize hastalarda artmış olan oksidatif strese ve inflamasyona yanıt olarak serum Tioredoksin düzeyinin yükselmiş olduğunu göstermektedir. Ayrıca hastalarda Doğal Tiyol seviyesinin anlamlı şekilde düşmesi ($p<0,001$) ile oluşan disülfidleri redüklemek için tioredoksin sistemini aktive etmiş olabilir. Yapmış olduğumuz araştırma AGA olan bireylerde serum Tioredoksin düzeyi ölçülerek yapılan ilk çalışmadır.

Yapılan çalışmalarda dolaşımdaki Tioredoksin seviyelerinin şizofreni ve ASD (otizm spektrum bozukluğu) içeren çeşitli psikiyatrik bozukluklarda oksidatif stresin bir göstergesi olabileceğini öne sürmüştür (148, 149).

Dolaşımdaki konsantrasyonlar sepsis, akut pankreatit, akut miyokard enfarktüsü, çocuk hidronefrozu ve malign neoplazmalar gibi bazı hastalıklarda artan şiddette yükselmektedir. Son zamanlarda, artmış serum Tioredoksin konsantrasyonlarının klinik sonuçla olan yakın ilişkisi, akut iskemik inme, spontan intraserebral kanama, anevrizmal subaraknoid kanama ve şiddetli TBI (ağır travmatik beyin hasarı) gösteren hastalarda doğrulanmıştır (150). Serum Tioredoksin düzeyleri diyabet, kronik böbrek hastalığı, ciddi yanık hasarı ve koroner hastalıklar gibi birçok hastalıkta gözlenmiştir. Artmış Tioredoksin ekspresyonu çeşitli malignitelerde görülmüştür ve agresif tümör büyümesi ve kötü sağkalım ile ilişkili olabileceğini düşünülmüştür (151).

Miyazaki ve arkadaşları, hepatosellüler karsinomlu hastalarda artmış serum Tioredoksin seviyesi bulmuşlardır (152). Powis G. ve arkadaşları ise Tioredoksinin oksidatif stresi engellemek için kanserde yüksekmiş olduğu belirtmişlerdir (153).

Jikimoto T. ve arkadaşları Tioredoksinin romatoid artritli hastalarda yüksek oksidatif stresi yansıtan bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (154).

Ayhan ve arkadaşları, yapmış oldukları bir çalışmada oksidatif stresin, obsesif kompulsif bozukluk (OKB) patogenezinde rol oynayabileceğini ve OKB sahip olan çocuklarda kontrol grubuna göre serum Tioredoksin düzeyinin arttığını tespit etmişlerdir (155).

Yu T. ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, serum Tioredoksin düzeylerinin hastalarda kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğunu ve serum Tioredoksin, hastalığa sebep olan oksidatif stres ve enflamasyonun bir göstergesi olabileceğini ve iskemik inmeyi öngörmede bağımsız bir biyobelirteç olabileceğini iddia etmişlerdir (147).

Bizim sonuçlarımızda da hasta grubumuzda serum Tioredoksin düzeyi anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ve bahsedilen çalışmalarda olduğu gibi bu sonucun AGA hastalarında artan oksidatif stresin bir göstergesi olarak kabul etmekteyiz. Aynı

zamanda serum Tioredoksin düzeyinin sonuçlarımızda TNF- α ile pozitif korelasyonu ve Tioredoksinin oksidatif stres ile birlikte inflamasyona bir yanıt olarak da yükseldiği bilgisi, görülen artış sebebinin AGA olan hastalarımızda saç foliküllerinde gerçekleşmiş olan mikroinflamasyonun da bir belirtisi olduğu göstermiştir.

NO, NOS enzimleriyle L-arginin'den hücrelerde üretilen serbest bir radikal olarak tanınır. İmmün ve enflamatuar yanıtlar sırasında üretilir ve proenflamatuar bir ajan olarak tasvir edilir. NO, TNF- α ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinler tarafından uyarılan çeşitli hücrelerde büyük ölçekte sentezlenir (156). Endotel NOS (eNOS) foliküler papilla hücrelerinde eksprese edilir ve saç folikülü büyümesini ve saç büyüme döngüsünü etkiler, iNOS ekspresyonunun enflamatuar stimülasyon ile saç foliküllerinin periferik dokularında arttığı bildirilmiştir. Azalmış iNOS ekspresyonunun enflamatuar yanıtları azaltarak saç büyümesini teşvik ettiğini gösterilmiştir. Bitkilerde doğal olarak bulunan bazı iltihap önleyici aktiviteye sahip flavonoidlerin, iNOS proteinini ve mRNA ekspresyonunu ve ayrıca doza bağlı bir şekilde nitrik oksit (NO) üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (157).

Bununla birlikte, NO'nin insan kıl folikülündeki ve saç döngüsü süreçlerindeki rolü hakkında çok az şey bilinmektedir. İnsan saç köklerinden türetilen dermal papilla hücrelerinin, kültür süpernatantlarındaki nitrat ve nitrit seviyeleri ölçülerek kendiliğinden NO ürettiğini gösterilmiştir. Bu biyomolekül, görünüşte mRNA ve protein seviyelerinde tespit edilen, nitrik oksit sentazın endotel izoformu tarafından oluşur. Dikkat çekici bir şekilde, bazal NO düzeyi, dermal papilla hücrelerini DHT ile uyarmak suretiyle üç kat arttırılmıştır. Yüksek oranda seçici bir indüklenebilir nitrik oksit sentaz inhibitörü olan N-[3-(aminometil)benzil]-asetamidin ilavesi, DHT tarafından indüklenen NO seviyesindeki artışı sınırlandırır. Protein ve mRNA seviyelerinde DHT ile uyarılmış hücrelerin analizi, indüklenebilir nitrik oksit sentaz ekspresyonunu doğruladı. Bu bulgular, insan dermal papilla hücrelerinde NO sinyalini ve saç folikülü aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynayan bazal ve androjenin aracılık ettiği NO üretimini gösterir (158).

Yapmış olduğumuz araştırmada elde ettiğimiz sonuçlara göre serum NO düzeyini hasta grubunu oluşturan AGA olan bireylerde, sağlıklı kontrol grubunu oluşturanlara göre anlamlı derecede yüksek bulduk ($p<0,001$) (Tablo 3). Serum NO seviyesi NF- κ B, TNF- α ve TGF- β 1'ye ek olarak TOS ($p<0,001$) ve OSI ile de güçlü bir

pozitif korelasyon göstermiştir ($p=0,004$). Doğal Tirol ($p<0,001$), Total Tirol ($p<0,001$) ve Disülfid ($p<0,001$) ile negatif korele bulundu (Tablo 4). Araştırmamız AGA olan bireylerde serum NO düzeyi ölçülere yapılan ilk çalışmadır.

Wolf R. ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada dermal papilla hücre kültürünün kendiliğinden NO sentezleyebildiğini göstermişlerdir. Ölçülen düşük miktarlardaki nitrit/nitrat nNOS ve/veya eNOS'un aracılık ettiği bir bazal NO üretimini gösterir. İlginç bir şekilde, eNOS'un insan dermal fibroblastlarındaki spontan NO salınımından sorumlu olduğu, insan saç folikülünün dermal papilla hücrelerindeki sonuçları destekleyen bir bulgu olduğu bildirilmiştir. NO genel olarak düz kas gevşemesi ve anjiyogenez için lider bir faktör olarak kabul edildiğinden, insan dermal papilla hücresinin bazal NO üretiminin insan saçı çevresindeki kılcal ağı iyileştireceğini varsayılmıştır. Perifoliküler vaskülarizasyonu etkilemeye ek olarak, dermal papillanın, androjenler gibi çeşitli sitokinler ve hormonlar üreterek foliküler keratinositlerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını koordine ettiği bilinmektedir. Saç folikülü keratinositlerinin aksine, dermal papilla androjen reseptörleri ve androjen metabolize edici enzimlerle donatılmıştır. Bu nedenle androjenlerin, muhtemelen NO olan farklı sinyal molekülleri ekspresyonunu etkilediklerinden, dolaylı olarak dermal papilla hücreleri yoluyla keratinosit büyümesi üzerinde etki gösterdikleri düşünülmektedir. Bu hipoteze dayanarak, androjenlerin dermal papilla hücresi ile NO üretimine etkisini farklı iç potansiyelleri (DHT ve testosteron) ile ilişkili olarak araştırılmış. Bununla birlikte, dermal papilla hücresinin androjenlerle uyarılmasının, araştırılan androjenlerin iç kuvvetinden etkilenen kültür süpernatantlarında nitrat/nitrit olarak ölçülen bir NO salınımını indüklediğini açıkça gösterilmiştir. Fizyolojik konsantrasyonlarda DHT ve daha az etkili olan testosteron, dermal papilla hücreleri tarafından üretilen belirgin şekilde artan NO seviyelerine yol açmıştır. DHT'nin oksipital dermal papilla hücrelerinde NO üretimi üzerindeki bu kademeli etkileri, DHT'nin daha az etkili olan testosterondan daha etkili olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, in vitro insan dermal papilla hücresi, LPS ve androjenlerle uyarılma üzerine artan kendiliğinden bir NO üretimi sergiler. Bu hücrelerin yapıcı ve uyarılabilir NO sentezi, eNOS ve iNOS ekspresyonuna karşılık gelir. Bu bulgulardan, insan dermal papilla hücresinin androjene bağımlı NO üretiminin, insan saçı folikülünde önemli bir sinyal yolu olduğunu varsayılmıştır (158).

Rafet K. ve arkadaşları, Alopesi areata (AA) hastalığının patogenezi anlamak, tedavi başarısızlığını önlemeye ve yeni tedavi yöntemleri bulmaya yardımcı olabilmek ve AA'nın patogenezi oksidatif stresin rolünü araştırmak için malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) serum düzeylerini ve süperoksit dismutaz (SOD) ve ksantin oksidazın (XO) serum aktivitelerini AA hastalarında ve yaş ve cinsiyet eşliğinde sağlıklı kontrollerde değerlendirmişlerdir. AA olan hastalarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek serum NO tespit etmişlerdir. Sentezlenen NO'nun oksidatif hücre hasarında artışa katkıda bulunacağını ve dolayısıyla NO'nun AA patogenezi rol oynayabileceğini düşünmüşlerdir. (156).

Abigail B. ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada ortaya çıkan oksidatif stres yükü pulmoner disfonksiyona yol açtığını ve astım hastalarında antioksidanların yetersiz kaldığını öne sürmüşlerdir. Fraksiyonel ekshale nitrik oksit (FeNO), oksidatif stres ve eozinofilik solunum yolu enflamasyonu belirteci olarak kullanılmıştır. Diğer taraftan oksijenle reaksiyondan sonra nitrik oksidin stabil son ürünü olan nitrat ve nitrit (EBC-NOx)'i ölçmüşlerdir. EBC-NOx ile hava yolu enflamasyonu arasında, astım hastalarında sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında artmış düzeyde bir ilişki olduğu bildirmişlerdir. EBC-NOx, diğer yaygın oksidatif stres belirteçleri ile yakından ilişkili olduğunu belirttiler. Artan astım şiddeti ile birlikte oksidatif stres yükünün arttığını bildirmişlerdir. EBC-NOx'un FeNO ve diğer oksidatif stres markerleri ile korele olduğu gözlenmiştir. FeNO'un artan astım şiddetiyle birlikte artış gösterdiğini iddia etmişlerdir (159).

Fatma B. ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada Hiperemesis Gravidarum (HEG) hastalarında oksidatif stres serum NO, MDA, TOS ve TAS seviyelerini ölçerek değerlendirmişlerdir. HEG'li hastalarda kontrol grubuna kıyasla serum NO ve OSI (oksidatif stres indeksi) düzeylerinin arttığını ve TAS düzeylerinin azaldığı, TOS ve MDA düzeyleri çalışma katılımcıları arasında farklılık göstermediği göstermişlerdir. Artmış NO ve azalmış TAS aktivitesi ile yansıtıldığı gibi HEG'in oksidatif stres durumu olduğunu ve bu çalışma ile ortaya koyulduğunu belirtmişlerdir (160).

Yapılan tüm bu çalışma sonuçlarına baktığımızda araştırmamızdan elde ettiğimiz verilere göre AGA olan bireylerde yüksek bulunan serum NO düzeyi açıklanmaktadır. Hasta popülasyonumuzda oksidatif stres düzeyinin yüksek ve

inflamasyonun var olduğu belirtilmiştir. Yüksek bulunan serum NO düzeyi ise hastalığın birincil patogeneze faktörü olan androjen seviyesinin artmasıyla özellikle DHT tarafından indüklendiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca proinflamatuvar bir stokin olan ve hasta grubumuzda NO ile pozitif korele bulunan TNF- α tarafından da NO sentezi indüklenmiş olabileceği kanısına varılmıştır. Diğer hastalık gruplarında ise artan NO düzeyi oksidatif stresin bir göstergesi olarak gösterilmiştir. Ayrıca serum TOS seviyesi ile ve bozulan redoks dengenin oksidasyon tarafına kaydığının iyi bir göstergesi olan OSI ile de güçlü bir pozitif korelasyon göstermiştir. Buna dayanarak biz de çalışmamızda artan serum NO düzeylerinin, AGA olan hastalarda özellikle yüksek olan DHT ile indüklendiğini ve yükselen bu androjenleri sa folikülünde büyümeyi baskılayıcı etkilerine ve oksidatif etkilerine aracılık ettiğini söyleyebiliriz. Ayrıca TNF- α ve TGF- β 1 ile de AGA patogenezinde yakında ilişkili olduğu sonucuna vardık.

Oksidatif stresin derecesini belirlemek için, reaktif oksijen türlerinin, nonenzimatik moleküller (glutasyon, ürik asit, melatonin, A, C ve E vitaminleri) ve antioksidan enzimler (süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz, katalaz) seviyesi ölçülebilir. Bununla birlikte, bu ölçümler oksidatif stresin global değerlendirmesini yansıtmamaktadır. Bu nedenle çalışma, geliştirilen bir yöntemle total antioksidan status (TAS) ve total oksidan status (TOS) llerek oksidatif stresin durumunu global olarak değerlendirilmiştir. Oksidatif stresin kilit bir rolü sa dökülmesinde de göz önünde bulundurulur (94).

Araştırmamızdan elde ettiğimiz verilere göre serum TOS düzeyini hasta grubunu oluşturan AGA olan bireylerde, sağlıklı kontrol grubunu oluşturanlara göre anlamlı derecede yüksek bulduk ($p<0,001$) (Tablo 3). Tiyol Disülfid Homeostazı parametrelerinden Doğal Tiyol ($p=0,002$), Total Tiyol ($p=0,003$) ve Disülfid ($p=0,004$) ile güçlü bir negatif korelasyon ve TNF- α ($p=0,033$) ve NO ($p<0,001$) ile ise pozitif korelasyon gösterdi (Tablo 4). Serum TAS düzeyini hasta grubunu oluşturan AGA olan bireylerde, sağlıklı kontrol grubunu oluşturanlara göre anlamlı derecede düşük bulduk ($p=0,003$) (Tablo 3). Doğal Tiyol ($p=0,009$), Total Tiyol ($p=0,009$) ve Disülfid ($p=0,008$) düzeyleri ile de pozitif korelasyon gösterdi. Aynı zamanda NF- κ B ile ise negatif korelasyon tespit edildi ($p=0,011$) (Tablo 4). TOS ve TAS değerlerinden hesaplama ile elde edilen ve organizmanın bozulan toplam redoks dengesinin derecesini belirten OSI ise AGA olan bireylerde kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek

bulundu ($p<0,001$). Ayrıca NF- κ B ($p=0,013$) ve NO ($p=0,004$) ile pozitif korelasyon göstermiştir. Doğal Tiyol ve Total Tiyol ve Disülfid ile ise güçlü bir negatif korelasyon göstermiştir (Herbiri için $p<0,001$). Bu sonuçlarda AGA alan bireylerde redoks dengenin bozulduğu ve oksidan tarafa doğru kaydığı açıkça görülmektedir.

Bahta ve ark. AGA ve oksidatif stres üzerine yapılan bir çalışmada kültürü hazırlanmış saçsız dermal papilla hücrelerinin büyümesinin kültürlenmiş saçlı dermal papilla hücrelerinden daha yavaş olduğunu belirlemişlerdir ve bunun kelleşen dermal papilla hücrelerinin oksidatif strese daha yüksek duyarlılığıyla ilgili olduğu öne sürmüşlerdir. Saçsız dermal papilla hücrelerinin, çevresel strese karşı, saçlı dermal papilla hücrelerinden daha duyarlı olduğunu ve çok küçük çevresel değişikliklerin bile dermal papilla hücresi fonksiyonunu etkileyerek saç minyatürleşmesine yol açabileceğini öne sürmüşlerdir. Sonuç olarak, AGA'nın tedavisi için oksidatif stres yollarını hedefleyen ilaçların yararlı olabileceğini belirtmişlerdir. Bu sonuçlarla tutarlı olarak, Upton ve ark. kelleşmeyen dermal papilla hücrelerinin oksidatif stresin üstesinden gelme kapasitesinin daha az olduğunu vurgulamışlardır (161).

Hilal K. ve arkadaşları 18-30 yaş aralığında, 33 hasta ve 30 sağlıklı erkek bireyde yapmış oldukları çalışmada erken başlangıçlı AGA olan erkek hastalarda oksidatif stres durumunu TAS, TOS ve OSI (oksidatif stres indeksi) düzeylerini ölçerek değerlendirmişlerdir. TAS düzeyi açısından fark bulunmazken, TOS ve OSI hasta grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. TAS düzeyi ile hem yaş hem de hastalık süresi arasında oldukça anlamlı negatif korelasyon saptanmıştır. TAS, TOS ve OSI düzeyleri AGA evresine göre değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmazken, aile öyküsü olan hastalarda OSI düzeyi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (162).

Bilgili ve arkadaşları, AA (Alopesi Areata) olan 39 hasta ve 39 sağlıklı kontrol arasında TAS, TOS ve OSI değerlerini karşılaştırmışlardır. AA hastalarında TOS ve OSI değerleri artarken, TAS aktivitelerinde azalma olduğu saptanmıştır (163).

Nazlı D. ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada AA hastalarının TAS, TOS, OSI düzeyleri, PON1 (paraoksanaz 1), ARE (arilesteraz) ve prolidaz enzim aktivite parametreleri ile AA'da oksidatif stres patogenezi netleştirmek için sağlıklı bir kontrol grubu ile karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada AA'lı hastalarda sağlıklı kontrol

grubuna göre TOS ve OSI değerleri anlamlı olarak artmıştır, TAS düzeyinde gruplar arasında anlamlı fark yoktur. Bu sonuç oksidan/antioksidan dengesizlik ve AA arasındaki ilişkinin kanıtını olarak sunulmuştur (164).

Tüm bu araştırmaları değerlendirdiğimizde ve çalışma sonuçlarımızla karşılaştırdığımızda AGA ve AA gibi oksidatif stresin yüksek olduğu sa kaybıyla ilişkili hastalıklarda TOS düzeyinin oldukça anlamlı olduğunu görmekteyiz. Yaptığımız alışma da benzer bu tür çalışmalara bu noktada katkı sunmaktadır. Diğer taraftan TAS düzeyi ise çalışmalar arasında farlılık göstermektedir. Bunun pekçok sebebi olabilir; seçilen hasta grupları arasında antioksidan gıdalar bakımından beslenme alışkanlığı farlılıkları sayılabilir, hastalar ve sağlıklı bireyler arasında biyolojik antioksidan savunma mekanizma farlılıkları ve oksidasyona verilen cevaplar farlılık göstermektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada ise AGA olan bireylerde oksidatif stres artmış ve antioksidan savunma azalmıştır. Bunun ise hastalık patogenezinde aktif rol aldığını ve hastalık ilerleyişine çok yönlü olarak katkı sonduğunu dşnmekteyiz.

Endojen nonenzimatik antioksidan mekanizmalardan biri olan tiyoller (RSH), bünyelerindeki karbon atomuna bağlı bir sülfhidril grubu (SH) taşıyan ve bu sayede oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarına girebilen bileşiklerdir. Dolayısıyla hücrelerde herhangi bir oksidatif stres durumunu önlemede kritik role sahiptirler. Plazmada tiyoller; albümin tiyolleri, protein tiyolleri ve sistein (Cys), sisteinilglisin, GSH, homosistein ve -glutamilsistein gibi düşük molekül ağırlıklı tiyollerden meydana gelir. Tiyoller (R-SH) oksidatif reaksiyonlar sonucu disülfid bağları (RSSR) oluşturmaktadır (91) Total tiyol, hem intraselüler hem ekstraselüler indirgenmiş ve indirgenmemiş tiyolleri ifade ederken, doğal tiyol yalnızca indirgenmemiş tiyolleri belirtmektedir. Oksidatif stres durumunda, plazma tiyolleri okside olarak dislfidleri oluşturmakta ve plazma tiyol seviyeleri düşmektedir (165). Dinamik tiyol-disülfid denge durumu; antioksidan korunması, detoksifikasyon, sinyal iletimi, apoptoz, enzimatik aktivitenin düzenlenmesi, transkripsiyon faktörleri ve hücresel sinyal mekanizmalarında büyük öneme sahiptir (91) Son yıllarda psoriasis (166), atopik dermatit (167), vitiligo (168), AA (169) gibi dermatolojik hastalıkların etyopatogenezinde oksidatif stresin rol oynadığı düşünülerek bu konuda çalışmalar yapılmıştır.

Pek çok deneysel çalışmada tiyol/disülfid oranındaki meydana gelen değişikliğin hücre statüsünde değişikliklere yol açabileceği belirtilmiştir. Hücrenin redoks

durumundaki değişiklikler oksidasyona hassas bazı genlerin aktivasyonuna veya inhibisyonuna neden olabilir (170).

Yapmış olduğumuz çalışmada hasta grubunda kontrol grubuna göre Doğal Tiyol, Total Tiyol ve Disülfid düzeylerinin anlamlı derecede düştüğünü bulduk (Herbiri için; $p<0,001$) (Tablo 3). Aynı zamanda hesaplanan İndeks 1 ($p=0,008$) ve İndeks 2 ($p=0,008$) sonuçları hasta grubunda anlamlı derecede yüksek bulundu. İndeks 3 ise hasta grubunda sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0,008$). Bu sonuçlar AGA olan bireylerde serum tiyol disülfid homeostazının bozulduğunu göstermektedir. Ayrıca AGA olan bireylerde daha önce hiç serum tiyol/disülfid homeostazı değerlendirilmemiştir, çalışmamız bu alanda ilk olacaktır.

Özyazıcı S. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmaya göre, akut apandist tanısı almış olan 71 hasta ve 71 sağlıklı kontrolde serum tiyol disülfid homeostazı değerlendirilmiştir. Hasta grubunda doğal tiyol, total tiyol anlamlı derecede düşük, disülfid ise anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Sonuçlar oksidatif stresin artmasıyla birlikte hastalarda tiyol gruplarının oksidasyonuna bağlı olarak dengenin disülfid oluşumu yönüne doğru kaydığı şeklinde yapılmıştır (171).

Balta B. ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, Ailesel akdeniz Ateşi (FMF) hastalarında serum tiyol disülfid homeostazı değerlendirilmiştir. FMF olan hasta grubunda doğal tiyol, total tiyol ve disülfid düzeyleri anlamlı derecede düşük bulunmuştur ve bu durum artan oksidatif stresin bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir (172).

Şimşek E. ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmaya göre nazal polipozisi olan hastalarda oksidatif stres düzeyini belirlemek için tiyol disülfid homeostazı değerlendirilmiştir. Nazal polipozis olan hastalarda doğal tiyol ve total tiyol düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Disülfid düzeyi ise anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Çalışma sonuçları nazal polipoziste artan oksidatif stresin bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir (173).

Babademez MA. ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada bell palsisinde tiyol disülfid homeostazını değerlendirmişlerdir. Hastalarda doğal tiyol ve total tiyol düşük, disülfid düzeyi ise yüksek bulunmuştur. Bu bozukluğun hastalığın patogenezine rolü olabileceği iddia edilmiştir (174).

Demir Pektaş S. ve arkadaşları psöriazisli hastalarda eritroid bozukluk ile tiyol disülfid homeostazı arasındaki ilişkiyi değerlendirmişlerdir. Psöriazis alan şiddet indeksine göre hastaları gruplandırmışlardır ve ayrı ayrı MCV, RDW, CRP, doğal tiyol, total tiyol ve disülfid değerlerini ölçerek değerlendirmişlerdir. Sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, psoriasis hastalarında anlamlı derecede yüksek MCV, RDW, CRP, disülfid bulunmuştur. Bununla birlikte, psoriasis hastalarında doğal tiyol anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, Psoriasis Alan Şiddet İndeksi (PASI) ≤ 10 ve PASI > 10 olan hastalar, anlamlı olarak daha yüksek MCV, disülfid düzeyine sahiptir. PASI ≤ 10 olan hastalar ve PASI > 10 olan hastalar anlamlı derecede sağlıklı kontrollerden daha düşük doğal tiyole sahip bulunmuştur. PASI > 10 olan psoriasis hastaları, sağlıklı kontrollerden ve PASI ≤ 10 olan hastalardan anlamlı derecede yüksek RDW ve CRP'ye sahip olduğu gösterilmiştir. Disülfid, PASI skoru ve hastalık süresi önemli ölçüde ilişkili bulunmuştur. Psoriasis hastalarında plazma tiyol seviyelerinin düşmesinin nedeni devam eden inflamasyon ve psoriasis hastalarında oksidatif stresin artması ile açıklanmıştır (175).

Ateş I. Ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada tip 1 diabetes mellitus olan hastalarda oksidatif stres açısından dinamik tiyol disülfid dengesini araştırmışlardır. Yapılan analiz de hasta grubunda disülfid düzeyi yüksek, doğal tiyol ve total tiyol düzeyi ise kontrol grubuna göre düşük çıkmıştır. Hiper glisemi ve kronik inflamasyon oksidatif stresin sebebi olarak değerlendirilmiştir (176).

Bahsedilen çalışmalarda analiz edilen hasta gruplarında artmış olan oksidatif stres ve inflamasyon faktörleri tiyol disülfid homeostazını bozmaktadır. Çalışılan hasta gruplarında doğal tiyol, total tiyol düzeyleri azalmış, disülfid düzeyleri ise artmıştır. Oksidatif stres artışı doğal tiyollerin disülfidlere oksidasyonunu arttırmıştır. Doğal tiyollerde meydana gelen azalmalar bu şekilde açıklanabilir, total tiyolde meydana gelen azalma ise hasta grubunda tiyolleri oluşturan protein ve aminoasit yapılarında meydana gelen azalma ve geri dönüşümsüz oksidasyon sayılabilir (91). Hasta gruplarında artmış olan disülfid düzeyi ise oksidasyona uğrayan doğal tiyol miktarının hastalarda artmış olduğunu göstermektedir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise AGA olan bireylerde sağlıklı kontrol grubuna göre doğal tiyol, total tiyol ve disülfid düzeyleri anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Farklı olarak disülfid düzeyinin de hasta grubunda düşük bulunması tiyollerin protein ve aminoasit kaynaklarında meydana gelen azalma ve

doğal tiyollerde meydana gelen geri dönüşümsüz ileri oksidasyon oranının yüksek olduğunu şeklinde yorumlanabilir. Oksidasyonun az olması durumunda meydana gelen disülfidler geri dönüşümlüdür ve tekrar doğal tiyollere redükte olabilirler. Ancak yüksek oksidasyon durumunda meydana gelen disülfidler ileri oksidasyona uğrayarak geri dönüşümsüz sülfonik asit, sülfenik asit, sülfirik aside okside olmakta ve analiz edilen hasta grubunda disülfidlerinde düşük çıkmasına sebep olmaktadır. Aynı zamanda İndeks 1 ve İndeks 2'nin AGA olan kişilerde yüksek çıkmış olması doğal tiyollerin disüfidlere dönüşüm oranlarının hastalarda daha yüksek olduğunu göstermektedir. Hastalarda düşük bulunan İndeks 3 ise bizlere AGA olan bireylerde okside olan doğal tiyol yüzdesinin daha fazla olduğunu göstermektedir ve bozulan dengenin bir kanıtı olarak sunulmaktadır. Yapmış olduğumuz bu araştırmada gerçekleştirmiş olduğumuz analizlerde diğer ölçümlerde de anlaşılabacağı üzere AGA'da oksidatif stres aşırı derecede artmıştır ve Tiyol disülfid Homeostazının da bozulmasına sebep olmuştur. Bu duruma AGA hastalarında saç foliküllerinde artmış olan mikroi inflamasyon kaynaklı da olabileceğine düşünülmektedir.

6-SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, AGA hastalarında çok yönlü olarak değerlendirilen oksidatif stresin yükselmiş olduğu ve antioksidan savunmanın ise azalmış olduğu görüldü. Androjenetik alopesi patogeneğinde oksidatif stres güçlü bir rol oynamaktadır. Bunu yaparken ise birçok faktörü etkileyerek hastalığın ilerlemesini hızlandırmaktadır. Hastalığın gelişiminde temel rol oynayan androjen yüksekliği oksidatif stresi tetiklemektedir. Özellikle DHT hastalığına yatkın olan saç foliküllerinde NO'nde aralarında bulunduğu serbest oksijen radikallerini arttırarak bölgede oksidatif stresi arttırmaktadır. Artan oksidatif strese yanıt olarak NF- κ B, TGF- β 1, TNF- α yolları aktive olmakta ve bunlar ayrıca kendi aralarında da etkileşime girerek hastalığın patogeneğini çok yönlü olarak ilerletmektedirler. Androjenler ayrıca sebum salgısının artışına sebep olarak bölgede bakteriyel floranın çoğalmasına sebep olmakta ve buna yanıt olarak da TNF- α artışı olmaktadır. TNF- α de NO artışına ve NF- κ B sinyal yolu aktivitesine sebep olarak yeni stokinlerin serbestlenerek saç folikülü hücrelerinde mikroinflamasyonu ve apoptozu arttırmaktadır. Androjen aracılı oksidatif stres ile artan TGF- β 1 perifoliküler fibrozise sebep olmakta ve bunun sonucunda saç büyümesi mekanik olarak da engellenerek kaybı hızlanmaktadır. Tüm bu faktörler bir araya gelerek foliküler minyatürizasyonu indüklemektedirler. Hastalarda Tiyo Disülfid homeostazında meydana gelen bozulma ve artmış olan Total Oksidan Status androjenler aracılı bu oksidatif stres artışının sorumlusunun sadece NO olmadığını göstermektedir. Artmış olan serum Tioredoksin düzeyi hastalarda bozulan redoks dengeye ve gelişmiş olan inflamasyona bir yanıttır. Yapılan araştırmada AGA gelişiminde muhtemel ve şüphelenilen patogeneğiz yollarının anlaşılmasına katkı sunabilmek amacıyla bu çalışmayı gerçekleştirdik. Sonuç olarak AGA gelişiminde oksidatif stresin aslında yükselmiş olan androjenler aracılığı ile diğer patogeneğiz yollarını da aktive edebildiğini, hastalık gelişiminde bir sonuç olmaktan ziyade hastalığı şiddetlendiren ve en önemli sebeplerden biri olduğu kanısına vardık.

Androjenetik alopeside, androjenler ve genetik dengesizliğin yanı sıra, mikrobik flora, endojen ve eksojen stres, mikroinflamasyon ve muhtemel başka ek patojenik faktörlerden şüphelenilir. Daha fazla şüphelinin açığa çıkması muhtemel olsa da

AGA'ya katkıda bulunan nedenler ele alırken, bireysel farklılıklar, biyolojik koşullar, kombine etkenlerin olaylar dizisi ve birbirleriyle bağlantıları akılda tutulmalıdır. Halihazırda aktif ve patentli olduğu iddia edilen çok sayıda terapötik molekülün AGA'nın kesin bir tedavisini sağlamadaki sınırlı etkinliği, AGA mekanizmasının son derece karmaşık olduğunu doğrulamaktadır. Yapmış olduğumuz araştırmadan elde ettiğimiz sonuçlara göre AGA'da oksidatif stres ve serbest radikaller oluşum mekanizmalarının hiç de hafife alınmayacak düzeyde önemli olduğunu göstermiş olduk. Bu alanda yapılacak olan daha spesifik ve ileri araştırmalar ile AGA gelişim patogenezinde en etkin yolun daha net olarak gün yüzüne çıkarılacağına ve buna yönelik etkin tedaviler ile kesin çözüm üretilebileceğine inanmaktayız. Yapmış olduğumuz araştırma ile hastalarda test amacıyla en çok tercih edilen biyolojik örnek olan serumlarda ölçümler yaparak bireylerin psikolojisi ve sosyal yaşamlarını etkileyen ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılan AGA'nın patogenezinin anlaşılmasına katkı sunmaya çalıştık.

7- KAYNAKLAR

1. Paus R, Cotsarelis G. The Biology Of Hair Follicles. N Engl J Med 1999;341(7):491-7.
2. Serdaroğlu S, Oğuz O. Saç hastalıkları. Tüzün Y, Gürer MA, Serdaroğlu S, Oğuz O, Aksungur VL, editörler. Dermatoloji. 3. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008; 1295- 1344.
3. Wolff H: Diseases of Hair. In: Braun Falco's Dermatology. Edited by W.H.C. B: Springer; 2009: 1029-1033.
4. James WD, Berger TG, Elston DM. Andrew's deri Hastalıkları, İstanbul Medikal yayıncılık
5. Burns TBS BS, Cox N, Griffiths C (ed.): Rook's Textbook of Dermatology, 8 edn: Wiley Blackwell; 2010.
6. Wolff K GL, Katz S, Gilchrest BA, PallerAS, Leffel DJ (ed.): Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 7 edn: Mc Graw Hill; 2008
7. Wiedemeyer K, Schill WB, Löser C. Diseases on hair follicles leading to hair loss part 1: nonscarring alopecias. Skinmed 2004; 3(4): 209-14.
8. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Landthaler M: Diseases of hair. Braun-Falco's Dermatology. 3th edition. Berlin, Springer Verlag, 2009; 1029-1059
9. Sperling LC, Mezebish DS. Hair diseases. Med Clin North Am 1998; 82(5): 1155-160.
10. Nabaie L, Kavand S, Robati RM, Sarrafi-Rad N, Shahgholi L, Meshkat-Razavi G: Androgenic alopecia and insulin resistance: are they really related? Clin Exp Dermatol 2009, 34(6):694-697.
11. Hanneken S, Ritzmann S, Nöthen MM, Kruse R. Androgenetic alopecia. Current aspects of a common phenotype. Hautarzt 2003; 54:703-12, German.

12. Otberg N, Finner AM, Shapiro J: Androgenetic alopecia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2007, 36(2):379-398.
13. Blume-Peytavi U, Blumeyer A, Tosti A, Finner A, Marmol V, Trakatelli M, Reygagne P, Messenger A; European Consensus Group. S1 guideline for diagnostic evaluation in androgenetic alopecia in men, women and adolescents. *Br J Dermatol* 2011; 164(1): 5–15.
14. Rebora A. Pathogenesis of androgenetic alopecia. *J Am Acad Dermatol* 2004;50(5):777-9.
15. Dallob AL¹, Sadick NS, Unger W, Lipert S, Geissler LA, Gregoire SL, Nguyen HH, Moore EC, Tanaka WK. The effect of finasteride, a 5 alpha-reductase inhibitor, on scalp skin testosterone and dihydrotestosterone concentrations in patients with male pattern baldness, *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 Sep;79(3):703-6.).
16. Lavker RM, Bertolino AP, Sun TT. Biology of hair follicles. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI (eds), *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 6th ed, pp. 148-59, The McGraw-Hill Companies Inc, New York, USA, 2003.
17. Sperling LC. Alopecias In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, *Dermatology*, 2nd edition. New York, NY: Mosby; 2008.
18. Kaufmann KD. Androgens and alopecia. *Mol Cell Endocrinol* 2002;198(1-2):89-95.
19. Yip L, Rufaut N, Sinclair R. Role of genetics and sex steroid hormones in male androgenetic alopecia and female pattern hair loss: an update of what we now know. *Australas J Dermatol* 2011;52(2):81–8.
20. Chartier MB, Hoss DM, Grant-Kells JM. Approach to the adult female patient with diffuse nonscarring alopecia. *J Am Acad Dermatol* 2002;47:809-818.
21. Baldwin AS Jr (2001). Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease, *J Clin Invest*, 107, 1, 3–6.

22. Ekinci O, Memis L. Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında nükleer faktör kappa b immünohistokimyasal ekspresyonunun prognozla ilişkisi. Gazi Tıp Dergisi 2008; 19(1): 1-5.
23. Sen R, Baltimore D (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism, Cell, 47, 6, 921-928..
24. Baeuerle PA. Pro-inflammatory signaling: Last pieces in the NF-kB puzzle? Curr Biol 1998; 8(1), 19-22.
25. Blank V, Kourilsky P ve Israël A. NF-κB and related proteins: Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. Trends in biochemical sciences 1992;17(4), 135-140..
26. Abraham E. NF-kB activation. Crit Care Med. 2000, 28(4):100-104.
27. Jing H, Lee S. NF- κB in Cellular Senescence and Cancer Treatment. Mol. Cells 2014; 37(3): 189–95.
28. Schmukle AC, Walczak H. No one can whistle a symphony alone - how different ubiquitin linkages cooperate to orchestrate NF- B activity. J Cell Sci. 2012;125(3):549–59.
29. Lawrence T., Gilroy D.W., Colville-Nash P.R. veWilloughby D. Possible new role for NF-kB in the resolution of inflammation. Nature Medicine7, 1291 – 1297, 2001.
30. Vikipedi, özgür ansiklopedi, Wikimedia Foundation, Inc. wikipedia, <http://en.wikipedia.org/wiki/NF-%CE%BAB>, Erişim tarihi: 25.02.2014.
31. Tuncay S.,Okyay P. veBardakci F.Identification ofNF-KB1andNF-KB1αpolymorphisms Using PCR–RFLP Assay in a Turkish population, Biochemical Genetics,48, 104-112, 2010.
32. Shishodia S, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: a friend or a foe in cancer? Biochem Pharmacol 2004; 68: 1071-1080.

33. Gupta SC, Sundaram C, Reuter S and Aggarwal BB. Inhibiting NF- κ B Activation by Small Molecules As a Therapeutic Strategy. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1799(10-12): 775-787.
34. Hayden M.S. ve Ghosh S. Signaling to NF- κ B. *Genes Dev.* 18, 2195-224, 2004.).
35. Baud V, Karin M. Is NF- κ B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2009; 8: 33-40.
36. Ikebe T, Takeuchi H, Jimi E, Beppu M, Shinohara M, Shirasuna K. Involvement of proteasomes in migration and matrix metalloproteinase-9 production of oral squamous cell carcinoma. *Int.J.Cancer* 1998; 77: 578-585.
37. Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF- κ B2 in maturing B cells. *Nat.Immunol.* 2002; 3: 958-965.
38. Coope HJ, Atkinson PG, Huhse B et al. CD40 regulates the processing of NF- κ B2 p100 to p52. *EMBO J.* 2002; 21: 5375-5385.
39. Dejardin E, Droin NM, Delhase M et al. The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF- κ B pathways. *Immunity.* 2002; 17: 525-535.
40. Xiao G, Harhaj EW, Sun SC. NF- κ B-inducing kinase regulates the processing of NF- κ B2 p100. *Mol.Cell* 2001; 7: 401-409.
41. Hassa P.O., Covic M., Hasan S. ve ark. The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-KB coactivator function. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 49, 45588–45597, 2001.
42. Tripathi P, Aggarwal A. NF- κ B transcriptionfactor: a key player in the of immune response. *Current Sci.* 2006, 90:519-531.
43. Christman JW, Lancaster LH, Blackwell TS. Nuclear factor κ B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy. *Int Care Med* 1998; 24:1131-1135.

44. Abraham E. NF-kB activation. Crit Care Med 2000; 28(4): N100-N104.
45. Valen, G., Z.Q. Yan, and G.K. Hansson, Nuclear factor kappa-B and the heart. J Am Coll Cardiol, 2001. 38(2): p. 307-14.
46. Shostak, K. and A. Chariot, EGFR and NF-kappaB: partners in cancer. Trends Mol Med, 2015. 21(6): p. 385-393.
47. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. J Pathol. 2008 Jan;214(2):149-60.
48. Chu, W. (2013). Tumor Necrosis Factor. Cancer Letters 328:222-225.
49. Pennica D, Hayflick JS, Bringman TS, Palladino MA, Goeddel DV. Cloning and expression in Escherichia coli of the cDNA for murine tumor necrosis factor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Sep;82(18):6060-4.
50. Male D, Cooke A, Owen M, Trowsdale J, Champion B. Advanced Immunology, St Louis, C.V. Mosby, 1996.
51. Callard R, Gearing A. The Cytokine Facts Book. Orlando, Academic Press, 1994.
52. Popa C, Netea MG, van Riel PL, van der Meer JW, Stalenhoef AF. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. J Lipid Res. 2007 Apr;48(4):751-62.
53. Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G et al. A physical and functional map of the human TNF-alpha/NFkappa B signal transduction pathway. Nature Cell Biology 2004; 6, 97-105.
54. Skoog, T., Van'tHooft, FM., Kallin, B., Jovinge, S., Boquist, S., Nilsson, J., Eriksson, P., Hamsten, A. ve ark. (1999). A Common Functional Polymorphism (C/A Substitution at Position-863) in the Promoter Region of the Tumour Necrosis Factor Alpha Gene Associated With Reduced Circulating Levels of TNF alpha. Human Molecular Genetics 8:1443-1449.

55. Bradley J.R. (2008). TNF-Mediated Inflammatory Disease. *Journal of Pathology* 214:149-60.
56. Wakefield LM, Romerts AB. 2002. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 12: 22-9. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGF-beta activation. *J Cell Sci* 2003; 116: 217-24.
57. www.ambion.com/techlib/resources/miRNA. Erişim tarihi: 01/05/2009.
58. Coffey RJ Jr, Derynck R, Wilcox JN, Bringman TS, Goustin AS, Moses HL, Pittelkow MR. Production and auto induction of transforming growth factor-alpha in human keratinocytes, *Nature* 1987;328: 817-20.
59. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK. Transforming growth factorbeta: biological function and chemical structure, *Science* 1986; 233: 532-4.
60. Chin D, Boyle GM, Parsons PG, Coman WB. What is transforming growth factorbeta, *The British Association of Plastic surgens* 2004;57: 215-221.
61. Harvey L, David B, Arnold B, Lawrence Z, Paul M, James D. *Molecular Cell Biology*, Third edition. Scientific American Boks 1995;1160-1167.
62. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. Tgf-beta signaling in tumor supression and cancer progression, *Nat Genet* 2001;29:117-29.
63. Lawrence DA. Transforming growth factor beta: A General Review, *Eur. Cytokine netw* 1996;7: 363-374.
64. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Falvell RA. 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 24: 99-146.
65. Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M. Smad 6 inhibits signalling by the TGF- β superfamily, *Nature* 1997;389.9: 622-626.

66. Koumoundourou D., ve ark. Prognostic significance of TGFbeta-1 and pSmad2/3 in breast cancer patients with T1–2, N0 tumours. (2007) *Anticancer Res* 27(4C):2613–2620.
67. Caestecker M.P., Piek E. ve Roberts A.B. Role of Transforming Growth Factor-Signaling in Cancer. (2000) *J Natl Cancer Inst.*; 92:1388–402.
68. Draznin MB, Rapoport RM, Murad F: Myosin light chain phosphorylation in contraction and relaxation of intact rat thoracic aorta. *Int J Biochem*; 917- 928, 1986.
69. Moncada S, Higgs A. The L- arginine-nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 1993; 329:2002 2012.
70. Klotz T, Bloch W, Volberg C, Enge lmann U, Addicks K. Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma. *Cancer* 1998; 82: 1897 -1903.
71. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357:593 -615.
72. Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Dis* 2001;7: 2-10.
73. Ricciardola FLM, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004; 84: 731-765.
74. Filep JG, Battistini B, Sirois P. Induction by endothelin-1 of epitheliumdependent relaxation of guinea-pig trachea in vitro: role for nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1993; 109:637 644.
75. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142
76. Michel T, FeronO. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 1997; 100:2146-52

77. Hobbs AJ: Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. Trends Pharmacol Sci; 18, 484-491, 1997
78. Laurent, T.C., Moore, E.C. ve Reichard, P. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and Characterization of Thioredoxin, the Hydrogen Donor from Escherichia Coli B. J Biol Chem, 1964. 239: 3436-44
79. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Third ed. Oxford: Oxford Science Publications; 2000. p. 617 24.
80. Erel Ö. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation, Clinical Biochemistry 37 (2004) 277– 285
81. Hayrullah Karabulut, Mehmet Şükrü Gülay. Antioksidanlar. Burdur : Mae Vet Fak Derg, 2016; 1(1): 65-76
82. Erel, Ozcan. A Novel Automated Method To Measure Total Antioxidant Response. Sanliurfa , Turkey : Clinical Biochemistry , 2004; 37: 112– 9
83. Prior RL, Cao G (1999). In vivo total antioxidant capacity, comparison of different analytical methods. Free Radic Biol Med, 27, 11, 1173-1181.
84. Ghiselli A, Serafinia. M, Natellaa F, Scaccinia C (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. Free Ra-clic Biol Med, 29, 11, 1106-1114
85. Qanungo, S, A. Sen, and M. Mukherjea, Antioxidant status and lipid peroxidation in human feto-placental unit. Clin Chim Acta. 1999; 285: 1-12
86. Stocker R. and E. Peterhans, Synergistic interaction between vitamin E and the bile pigments bilirubin and biliverdin. Biochim Biophys Acta. 1989; 1002: 238-44.
87. Kehrler JP, Smith CV. Free radicals in biology: Sources Reactivities and Roles in the Etiology of Human Diseases. Natural Antioxidants in Human and Disease, 1994;25-62.

88. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* 2015; 97: 55-74
89. Uysal M. Serbest radikaller ve oksidatif stres. *Tıbbi Biyokimya*, Editör: F.Gürdöl, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2015; 641-6
90. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005; 38(12): 1103-11.
91. Erel O, Neselioglu S. A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clin Biochem.* 47(18):326-332
92. Trüeb RM. Molecular mechanisms of androgenetic alopecia. *Experimental Gerontology.* 37(2002):981-990
93. Trüeb RM. The impact of oxidative stress on hair. *Int J Cosmet Sci* 2015; 37 (Supl 2): 25–30.
94. Trüeb RM. Oxidative stress in ageing of hair. *Int J Trichology* 2009; 1: 6–14.
95. NF- κ B Activity Is Required for Anagen Maintenance in Human Hair Follicles In Vitro, *Journal of Investigative Dermatology* (2014) 134, 2036–2038; doi:10.1038/jid.2014.82; published online 17 April 2014
96. Oxidative Stress, Helmut Sies, Carsten Berndt, Dean P. Jones, *Annu. Rev. Biochem.* 2017. 86:715–48
97. NF- κ B in the regulation of epithelial homeostasis and Inflammation, Andy Wullaert, Marion C Bonnet, Manolis Pasparakis, *Cell Research* (2011) 21:146-158
98. Human hair follicle dermal cells and skin fibroblasts Show differential activation of NF- κ B in response to pro-inflammatory challenge, Rebecca P. Hill, John W. Haycock and Colin A. B. Jahoda, DOI:10.1111/j.1600 0625.2011.01401.x
99. Double stranded RNA induces inflammation via the NF- κ B pathway and inflammasome activation in the outer root sheath cells of hair follicles, Jung-Min Shin, Dae-Kyoung Choi¹, Kyung Cheol Sohn¹, Soo-Yeon Kim¹, Jeong Min

Ha1, Young Ho Lee2, Myung Im1, Young-Joon Seo1, Chang Deok Kim1, Jeung-Hoon Lee1 & Young Lee1 Scientific Reports 7:44127, DOI: 10.1038/srep44127.

100. Naringenin protects keratinocytes from oxidative stress injury via inhibition of the NOD2-mediated NF- κ B pathway in pemphigus vulgaris, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.112>
101. Supplementation of lycopene attenuates oxidative stress induced neuroinflammation and cognitive impairment via Nrf2/NF- κ B transcriptional pathway, 10.1016/j.fct.2017.09.050
102. Mechanisms of oxidative stress effects of the NADPH oxidase-ROS-NF- κ B transduction pathway and VPO1 on patients with chronic obstructive pulmonary disease combined with pulmonary hypertension, B. Zhuan, Y. Yu, Z. Yang, X. Zhao, P. Li
103. Gong Y, Yi M, Fediuk J, Lizotte PP, Dakshinamurti S. Hypoxic neonatal pulmonary arterial myocytes are sensitized to ROS-generated 8-isoprostane. *Free Radic Biol Med* 2010; 48: 882-894
104. EDA2R Is Associated with Androgenetic Alopecia. Dionigio Antonio Prodi^{1,4}, Nicola Pirastu^{1,2,4}, Giuseppe Maninchedda¹, Alessandro Sassu¹, Andrea Picciau¹, Maria Antonietta Palmas¹, Alessandra Mossa¹, Ivana Persico¹, Mauro Adamo¹, Andrea Angius^{1,3} and Mario Pirastu
105. Jaworsky C., Kligman A. M., Murphy G. F., *Br. J. Dermatol.*, 127, 239—246 (1992)
106. Roberts A. B., Sporn M. B., Assoian R. K., Smith J. M., Roche N. S., Wakefield L. M., Heine U. I., Liotta L. A., Falanga V., Kehrl J. H., Anthony S. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 4167—4171 (1986).
107. Sporn M. R., Shull J. H., Smith J. M., Ward J. M., *Science*, 219, 1329—1331 (1983).
108. Mauviel A., *Methods Mol. Med.*, 117, 69—80 (2005).

109. Liu X., Alexander V., Vijayachandra K., Bhogte E., Diamond I., Glick A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98, 9139—9144 (2001)
110. Philpott M. P., Green M. R., Kealey T., J. Cell Sci., 97, 463—471 (1990).
111. Welker P., Foitzik K., Bulfone-Paus S., Henz B. M., Paus R., Arch. Dermatol. Res., 289, 554—557 (1997)
112. Kerstin F, Gerd L, Sven MR, et al. Control of murine hair follicle regression (catagen) by TGF-beta1 in vivo. FASEB J 2000;14:752–60
113. Gyeong YOOH, Sook KIMJ, Rah LEES, et al. Perifollicular fibrosis: pathogenetic role in androgenetic alopecia. Biol Pharm Bull 2006; 29:1246–50
114. Inui, S., Fukuzato, Y., Nakajima, T., Yoshikawa, K., Itami, S., 2002. Androgen-inducible TGF- β 1 from balding dermal papilla cells inhibit epithelial cell growth: a clue to understand paradoxical effects of androgen on human hair growth. FASEBJ. 16,1967–1969.
115. Foitzik, K., Lindner, G., Mueller-Roever, S., Maurer, M., Botchkareva, N., Botchkarev, V., Handjiski, B., Metz, M., Hibino, T., Soma, T., Dotto, G. P., Paus, R., 2000. Control of murine hair follicle regression (catagen) by TGF-beta 1 in vivo. FASEBJ. 14, 752–760.
116. Inui S, Fukuzato Y, Nakajima T, et al. Androgen-inducible TGF-beta1 from balding dermal papilla cells inhibits epithelial cell growth: a clue to understand paradoxical effects of androgen on human hair growth. FASEB J 2002;16:1967–9.
117. Naoki O, Atsushi T, Akira K, et al. Androgen receptor transactivity is potentiated by TGF-b1 through Smad3 but checked by its coactivator Hic-5/ARA55 in balding dermal papilla cells. J Dermatol Sci 2011;64: 149–51.
118. Parrelli JM, Meisler N, Cutroneo KR. Identification of a glucocorticoid response element in the human transforming growth factor beta1 gene promoter. Int J Biochem Cell Biol 1998;30:623–7.

119. Soma T, Ogo M, Suzuki J, et al. Analysis of apoptotic cell death in human hair follicles in vivo and in vitro. *J Invest Dermatol* 1998;111:948–54.
120. Prostaglandin D₂-Mediated DP₂ and AKT Signal Regulate the Activation of Androgen Receptors in Human Dermal Papilla Cells, Kwan Ho Jeong, Ji Hee Jung, Jung Eun Kim and Hoon Kang.
121. Inui S., Fukuzato Y., Nakajima T., Yoshikawa K., Itami S., *Faseb. J.*, 16, 1967—1969 (2002).
122. Perifollicular Fibrosis: Pathogenetic Role in Androgenetic Alopecia, Hyeon Gyeong YOO, Jin Sook KIM, Se Rah LEE, Hyun Keol PYO, Hyung In MOON, Jong Hee LEE, Oh Sang KWON, Jin Ho CHUNG, Kyu Han KIM, Hee Chul EUN, and Kwang Hyun CHO, *Biol. Pharm. Bull.* 29(6) 1246—1250 (2006).
123. An investigation of crosstalk between Wnt/ b-catenin and transforming growth factor- β signaling in androgenetic alopecia, Gui-Qing Lu, MD, PhD, Zhi-Bo Wu, MD, Xiao-Yan Chu, MD, Zhi-Gang Bi, MD, Wei-Xin Fan, MD, PhD
124. Study of gene expression alteration in male androgenetic alopecia: evidence of predominant molecular signalling pathways, L. Michel ID, P. Reygagne, P. Benech, F. Jean-Louis, S. Scalvino, S. Ly Ka So, Z. Hamidou, S. Bianovici, J. Pouch, B. Ducos, M. Bonnet, A. Bensussan, A. Patatian, E. Lati, J. Wdzieczak-Bakala, J-C. Choulot, E. Loing and M. Hocquaux
125. Liu X, Alexander V, Vijayachandra K, Bhogte E, Diamond I, Glick A: Conditional epidermal expression of TGF β 1 blocks neonatal lethality but causes a reversible hyperplasia and alopecia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9139–9144, 2001
126. Identification of Androgen-Inducible TGF- β 1 Derived from Dermal Papilla Cells as a Key Mediator in Androgenetic Alopecia, Shigeki Inui, Yoko Fukuzato, Takeshi Nakajima, Kunihiko Yoshikawa and Satoshi Itami
127. Induction of transforming growth factor- β 1 by androgen is mediated by reactive oxygen species in hair follicle dermal papilla cells Hyoseung Shin^{1, #}, Hyeon Gyeong Yoo^{1, #}, Shigeki Inui², Satoshi Itami², In Gyu Kim³, A-Ri Cho¹,

Dong Hun Lee¹, Won Seok Park⁴, Ohsang Kwon¹, Kwang Hyun Cho^{1,*} & Chong Hyun Won⁵,.

128. Park, S. K., Kim, J., Seomun, Y., Choi, J., Kim, D. H., Han, I. O., Lee, E. H., Chung, S. K. and Joo, C. K. (2001) Hydrogen peroxide is a novel inducer of connective tissue growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 966-971.
129. Wu Q, Wang GP, Xie J, et al. Tumor necrosis factor- α -induced ototoxicity in mouse cochlear organotypic culture. *PLoS One*. 2015;10:e0127703.
130. Furness DN. Molecular basis of hair cell loss. *Cell Tissue Res*. 2015;361:387–399
131. 1-N-acetylcysteine protects outer hair cells against TNF- α initiated ototoxicity in vitro, Joshua A. Tillinger, Chhavi Gupta, Kadri Ila, Jamal Ahmed, Jeenu Mittal, Thomas R. Van De Water & Adrien A. Eshraghi
132. Imperato-McGinley J, Gautier T, Cai L, Yee B, Epstein J, Pochi P. The androgen control of sebum production. Studies of subjects with dihydrotestosterone deficiency and complete androgen insensitivity. *J Clin Endocrinol Metabol* 1993;76:524–8
133. Tanghetti EA. The role of inflammation in the pathology of acne. *J Clin Aesthetic Dermatol* 2013;6:27
134. Shu M, Kuo S, Wang Y, et al. Porphyrin metabolisms in human skin commensal *Propionibacterium acnes* bacteria: potential application to monitor human radiation risk. *Curr Med Chem* 2013;20:562–8
135. Holland C, Mak TN, Zimny-Arndt U, et al. Proteomic identification of secreted proteins of *Propionibacterium acnes*. *BMC Microbiol* 2010;10:230
136. Arican O, Kurutas EB, Sasmaz S. Oxidative stress in patients with acne vulgaris. *Mediators Inflamm* 2005;2005:380–4
137. Lee SE, Kim J-M, Jeong SK, et al. Protease-activated receptor-2 mediates the expression of inflammatory cytokines, antimicrobial peptides, and matrix

- metalloproteinases in keratinocytes in response to *Propionibacterium acnes*. *Arch Dermatol Res* 2010;302:745–56.
138. A hypothetical pathogenesis model for androgenic alopecia: clarifying the dihydrotestosterone paradox and rate-limiting recovery factors, Robert S. English Jr., <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2017.12.027>
139. Macrophages induce AKT/b-catenin-dependent Lgr5⁺ stem cell activation and hair follicle regeneration through TNF, Xusheng Wang, Haiyan Chen, Ruiyun Tian, Yiling Zhang, Marina S. Drutskaya, Chengmei Wang, Jianfeng Ge, Zhimeng Fan, Deqiang Kong, Xiaoxiao Wang, Ting Cai, Ying Zhou, Jingwen Wang, Jinmei Wang, Shan Wang, Zhihai Qin, Huanhuan Jia, YueWu, Jia Liu, Sergei A. Nedospasov, Edward E. Tredget, Mei Lin, Jianjun Liu, Yuyang Jiang & Yaojiong Wu
140. T.C. Zschauer, S. Matsushima, J. Altschmied, D. Shao, J. Sadoshima, J. Haendeler, *Antioxid Redox Signal* 18 (2013) 1053-1062.
141. A. Bindoli, M.P. Rigobello, *Antioxid Redox Signal* 18 (2013) 1557-1593., D.F. Mahmood, A. Abderrazak, K. El Hadri, T. Simmet, M. Rouis, *Antioxid Redox Signal* 19 (2013) 1266-1303
142. Rubartelli A, Bajetto A, Allavena G, et al. Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway. *J Biol Chem*. 1992;267:24161–24164.
143. Bertini R, Howard OMZ, Dong HF, et al. Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med*. 1999;189:1783–1789.
144. Jekell A, Hossain A, Alehagen U, et al. Elevated circulating levels of thioredoxin and stress in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2004;6:883–890.
145. Ruszkiewicz J, Albrecht J. Changes of the thioredoxin system, glutathione peroxidase activity and total antioxidant capacity in rat brain cortex during acute liver failure: modulation by l-histidine. *Neurochem Res*. 2015;40:293–300

146. Nakamura H. Thioredoxin as a key molecule in redox signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2004;6:15–17
147. Prognostic value of serum thioredoxin levels in ischemic stroke, Tieer Yu, Wanli Zhang, Yuanshao Lin, Qian Li, Jie Xue, Zhengyi Cai, Yifan Cheng and Bei Shao, <https://doi.org/10.1080/01616412.2017.1359882>.
148. Zhang XY, Chen DC, Xiu MH, et al. The novel oxidative stress marker thioredoxin is increased in first-episode schizophrenic patients. *Schizophr Res*. 2009;113:151–157.
149. Zhang QB, Gao SJ, Zhao HX. Thioredoxin: a novel, independent diagnosis marker in children with autism. *Int J Dev Neurosci*. 2015;40:92–96.
150. Serum thioredoxin and in-hospital major adverse events after traumatic brain injury, Xiao-Qiao Dong, Wen-Hua Yu, Zu-Yong Zhang, Ding-Bo Yang, Quan Du, Hao Wang, Yong-Feng Shen, Li Jiang, Zhi-Hao Che, Qiang Zhu,, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2017.03.024>
151. Serum thioredoxin is a diagnostic marker for hepatocellular Carcinoma, Jun Li, Zhang-Jun Cheng, Yang Liu, Zhen-Lin Yan, Kui Wang, Dong Wu, Xu-Ying Wan, Yong Xia, Wan Yee Lau, Meng-Chao Wu, Feng Shen
152. Miyazaki K, Noda N, Okada S, Hagiwara Y, Miyata M, Sakurabayashi I, Yamaguchi N, Sugimura T, Terada M, Wakasugi H. Elevated serum level of Trx' in patients with Hepatocellular Carcinoma. *Biotherapy* 1998; 11:277–288.
153. Powis G, Mustacich D, Coon A (2000) The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Radic Biol Med* 29:312–322
154. Jikimoto T, Nishikubo Y, Koshiba M et al (2002) Thioredoxin as a biomarker for oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Mol Immunol* 38:765–772
155. 8-F2-isoprostane, thioredoxin and thioredoxin reductase levels in children with obsessive–compulsive disorder, Ayhan Bilgiç, Rukiye Çolak Sivri, İbrahim Kılın, <https://doi.org/10.1080/08039488.2018.1484512>

156. Evaluation of lipid peroxidation, oxidant/antioxidant status, and serum nitric oxide levels in alopecia areata, Rafet Koca, Ferah Armutcu, H. Cevdet Altinyazar, Ahmet Gürel., *Med Sci Monit*, 2005; 11(6): CR296-299.
157. Mechanism of action of herbs and their active constituents used in hair loss Treatment, Anna Herman, Andrzej P. Herman, doi: 10.1016/j.fitote.2016.08.008
158. Nitric oxide in the human hair follicle: constitutive and dihydrotestosterone-induced nitric oxide synthase expression and NO production in dermal papilla cells, Ronald Wolf □ Gilbert Schonfelder □ Martin Paul Ulrike Blume-Peytavi, *J Mol Med* (2003) 81:110–117 DOI 10.1007/s00109-002-0402-y
159. Biomarkers of oxidative stress and antioxidants in severe asthma, Abigail Bishopp, Ramamurthy Sathyamurthy Sarah Manney, Craig Webster, Mamidipudi Thirumala Krishna, Adel H. Mansur, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anai.2017.02.004>
160. Elevated circulating nitric oxide levels correlates with enhanced oxidative stress in patients with hyperemesis gravidarum, Fatma Beyazit, Hakan Türkön, Eren Pek, Filiz Halici Ozturk, Mesut Ünsal, DOI: 10.1080/01443615.2017.1383371
161. Upton JH, Hannen RF, Bahta AW et al. Oxidative stress associated senescence in dermal papilla cells of men with androgenetic alopecia. *J Invest Dermatol* 2015; 135: 1244–52
162. The role of oxidative stress in early onset androgenetic alopecia, Hilal Kaya Erdogan,, Isıl Bulur, Evin Kocaturk Bahadır Yıldız, Zeynep Nurhan Saracoglu, Ozkan Alatas, *Journal of Cosmetic Dermatology*, 0, 1—4
163. Bilgili SG, Ozkol H, Karadag AS, Ozkol HU, Seker A, Calka O, et al. Serum paraoxonase activity and oxidative status in subjects with alopecia areata. *Cutan Ocul Toxicol*. 2013 Oct; 32(4): 290–3

164. Evaluation of Serum Paraoxonase, Arylesterase, Prolidase Activities and Oxidative Stress in Patients with Alopecia Areata, Nazli Dizen-Namdar, Fatma Emel Kocak, Mehtap Kidir, Gulben Sarici, Hasan Tak, Irfan Altuntas, *Skin Pharmacol Physiol* 2019;32:59–64, DOI: 10.1159/000494690
165. Uysal P, Avcil S, Neşelioğlu S, Biçer C, Çatal F. Association of oxidative stress and dynamic thiol-disulphide homeostasis with atopic dermatitis severity and chronicity in children: a prospective study. *Clin Exp Dermatol.* 2018;43(2):124-130. doi:10.1111/ced.13219
166. Kilic A, Yorulmaz A, Erdogan S, et al. An evaluation of thiol/disulphide homeostasis in patients with psoriasis. *Postep Dermatologii i Alergol.* 2017;34(5):464-467. doi:10.5114/ada.2017.71113
167. Uysal P, Avcil S, Neşelioğlu S, Biçer C, Çatal F. Association of oxidative stress and dynamic thiol-disulphide homeostasis with atopic dermatitis severity and chronicity in children: a prospective study. *Clin Exp Dermatol.* 2018;43(2):124-130. doi:10.1111/ced.13219
168. Colucci R, Dragoni F, Moretti S. Oxidative stress and immune system in vitiligo and thyroid diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/631927
169. Yenin JZ, Serarslan G, Yönden Z, Ulutaş KT. Investigation of oxidative stress in patients with alopecia areata and its relationship with disease severity, duration, recurrence and pattern. *Clin Exp Dermatol.* 2015;40(6):617-621. doi:10.1111/ced.12556
170. Kirlin WG, Cai J, Thompson SA, Diaz D, Kavanagh TJ, Jones DP. Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(11-12):1208-1218. doi:10.1016/S0891-5849(99)00145-8
171. A Novel Oxidative Stress Mediator in Acute Appendicitis: Thiol/Disulphide Homeostasis, Mediators Inflamm. 2016;2016:6761050. doi:10.1155/2016/6761050

172. Does thiol-disulphide balance show oxidative stress in different MEFV mutations?, *Rheumatol Int.* 2018 Jan;38(1):97-104. doi: 10.1007/s00296-017-3914-z.
173. A novel method for determining the relation between nasal polyposis and oxidative stress: the thiol/disulphide homeostasis, *Acta Otolaryngol.* 2016 Nov;136(11):1180-1183.
174. Thiol/disulphide homeostasis in Bell's palsy as a novel pathogenetic marker, *Clin Otolaryngol.* 2017 Apr;42(2):239-244. doi: 10.1111/coa.12701.
175. Evaluation of Erythroid Disturbance and Thiol-Disulphide Homeostasis in Patients with Psoriasis, *Biomed Res Int.* 2018 Jun 5;2018:9548252. doi: 10.1155/2018/9548252
176. Determination of thiol/disulphide homeostasis in type 1 diabetes mellitus and the factors associated with thiol oxidation, *Endocrine.* 2016 Jan;51(1):47-51. doi: 10.1007/s12020-015-0784-6.
177. Aslani FS, Dastgheib L, Banihashemi BM. Hair counts in scalp biopsy of males and females with androgenetic alopecia compared with normal subjects. *J. Cutan. Pathol.* 2009; 36,(7):734–9. , Magro CM, Rossi A, Poe J, Manhas-Bhutani S, Sadick N. The role of inflammation and immunity in the pathogenesis of androgenetic alopecia. *J. Drugs Dermatol.* 2011; 10,(12):1404–1411
178. Wadley AJ, Veldhuijzen van Zanten JJCS, Aldred S. The interactions of oxidative stress and inflammation with vascular dysfunction in ageing: the vascular health triad. *Age (Dordr).* 2013; 35,(3):705–18.,
179. Upton JH, Hannen RF, Bahta AW, Farjo N, Farjo B, Philpott MP. Oxidative stress-associated senescence in dermal papilla cells of men with androgenetic alopecia. *J. Invest. Dermatol.* May 2015; 135,(5):1244–52
180. Magro CM, Rossi A, Poe J, Manhas-Bhutani S, Sadick N. The role of inflammation and immunity in the pathogenesis of androgenetic alopecia. *J. Drugs Dermatol.* 2011; 10,(12):1404–1411.

181. Arias-Santiago S, Gutiérrez-Salmerón MT, Castellote-Caballero L, Buendía-Eisman A, Naranjo-Sintes R. Androgenetic alopecia and cardiovascular risk factors in men and women: a comparative study. *J. Am. Acad. Dermatol.* Sep. 2010; 63,(3):420–9
182. Ertas R, Orscelik O, Kartal D, Dogan A, Ertas SK, Aydogdu EG, Ascioğlu O, Borlu M. Androgenetic alopecia as an indicator of metabolic syndrome and cardiovascular risk. *Blood Press.* Nov. 2015; 1–8.
183. Arias-Santiago S, Gutiérrez-Salmerón MT, Buendía-Eisman A, Girón-Prieto MS, Naranjo-Sintes R. Sex hormone-binding globulin and risk of hyperglycemia in patients with androgenetic alopecia. *J. Am. Acad. Dermatol.* Jul. 2011; 65,(1):48–53
184. Ozturk P, Kurutas E, Ataseven A, Dokur N, Gumusalan Y, Gorur A, Tamer L, Inaloz S. BMI and levels of zinc, copper in hair, serum and urine of Turkish male patients with androgenetic alopecia. *J. Trace Elem. Med. Biol.* Jul. 2014; 28,(3):266–70.
185. Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology.* 2003; 189,(1–2):147–163.
186. Sung, Y. K., Hwang, S. Y., Cha, S. Y., Kim, S. R., Park, S. Y., Kim, M. K. and Kim, J. C. (2006) The hair growth promoting effect of ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting Vitamin C derivative. *J. Dermatol. Sci.* 41, 150-152.
187. Kwon, O. S., Han, J. H., Yoo, H. G., Chung, J. H., Cho, K. H., Eun, H. C. and Kim, K. H. (2007) Human hair growth enhancement in vitro by green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Phytomedicine* 14, 551-555
188. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Nuclear factor-inducing kinase plays a crucial role in osteopontin-induced MAPK/IkappaBalpha kinase-dependent nuclear factor kappaB-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. *J Biol Chem.* 2004, 279(37):38921-35.

189. Schweizer U, Brauer AU, Köhrle J, Nitsch R, Savaskan NE. Selenium And Brain Function: Poorly Recognized Liaison. *Brain Res Reviews*, 2004, 45:164-178.
190. Takagi Y, Mitsui A, Nishiyama A, Nozaki K, Sono H, Gon Y, Hashimoto N, Yodoi J. Overexpression Of Thioredoxin In Transgenic Mice Attenuates Focal Ischemic Brain Damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(7):4131-4136.
191. Schafer, F.Q. ve Buettner, G.R. Review: Redox Environment of the Cell as Viewed Through the Redox State of the Glutathione Disulfide/glutathione Couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 2005. 39(10): 1274-1275.).
192. Oblong, J.E., Berggren, M. ve Powis, G. Biochemical, structural, and biological properties of human thioredoxin active site peptides. *FEBS letters*, 1994. 343(1), 81-84.
193. Nordberg, J. ve Arnér, E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology and medicine*, 2001.31(11): 1287-1312.
194. Holmgren, A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem*, 1989. 264(24): 13963-13966.
195. Nakamura, H., Matsuda, M., Furuke, K., Kitaoka, Y., Iwata, S., Toda, K. ve ark. Adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin protects endothelial F-2 cell injury caused by activated neutrophils or hydrogen peroxide. *Immunology letters*, 1994. 42(1-2): 75-80.
196. Ignarro U, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukoto JM, Rajfer J: Nitric oxide and cyclic GMP formation: upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun*; 170: 843-850, 1990.
197. Leone AM, Wiklund NP, Hokfelt T, Brundin L, Moncada S: Release of nitric oxide by nerve stimulation in the human urogenital tract. *Neuroreport*; 5: 733-736, 1994.

8- EKLER

EK-1: ETİK KURUL ONAYI



T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

SAYI : 26379996 / 168

25.6./2018

KONU :25.06.2018 Tarih ve 138 Sayılı Kurul Kararı

Sayın: Prof. Dr. Aysun Bay KARABULUT
Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Sorumlu Araştırmacılığını yapmış olduğunuz “ ‘Androgenetik Alopesi Olan Hastalarda NF Kappa-B, TNF Alfa, TGF Beta, Tioredoksin, Nitrik oksit, Total Oksidan Status (TOS), Total Antioksidan Status (TAS) düzeyleri ve Tiyoil Disülfid Homeostazisinin Araştırılması ” isimli Dr. Ahmet Rifat BALIK’ ın tez çalışması Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’nun 25.06.2018 tarih ve 138 sayılı kararı ile başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesi etik ve bilimsel açıdan uygun bulunmuştur.

(13.04.2013 tarih ve 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan “İlaç Ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik” gereği klinik araştırmaların etik kurul onayı alındıktan sonra yılda en az bir ara raporunun, araştırma sonlandırıldıktan sonra bir yıl içerisinde sonuç raporunun Etik Kurula geri bildirimi gerekmektedir. Gerekli bildirimi yapmayanların sonraki Etik Kurul başvuruları kabul edilmeyecektir.)

Bilgilerinize rica ederim

Yrd. Doç. Dr. Halil KARA
Klinik Araştırmalar Etik Kurul
Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Ahmet Rıfat BALIK 1987 yılında Samsun iline bağlı Terme ilçesinde doğdu. İlk ve ortaöğrenimini Terme’de tamamladı. 2005 yılında girdiği Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden 2010 yılında mezun oldu. 2011 ve 2015 yılları arasında Samsun Çarşamba Devlet Hastanesi’nde görev yaptı. 2015 yılından bu yana Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.