

172009

T.C  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SIÇAN KARACİĞERİNDEKİ YAŞLANMAYA BAĞLI  
ANTIOKSİDAN SİSTEM DEĞİŞİKLİKLERİNE  
TAURİNİN ETKİSİ**

**DOKTORA TEZİ**  
**Uzm. Bio. ZUHAL YILDIRIM**

**Prof. Dr. NEDRET KILIÇ**

**ANKARA - 2006**

## TEŐEKKÜR

Doktora eğitimim süresince her aŐamada ve tezime yönelik tüm çalıŐmalarımın gerçekleŐtirilmesinde yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen tez yöneticim Sayın Prof. Dr. Nedret KILIÇ'a, tez çalıŐmalarımda değerli katkılarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Çiğdem ÖZER'e, Sayın Prof. Dr. Aydan BABÜL'e, Sayın Dr. Murat TAŐ'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Gülnur TAKE'ye, Sayın Prof. Dr. Deniz ERDOĞAN'a, Sayın Uzman Dr. Aylin SEPİCİ'ye, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyeleri ve yardımcılarna ve en son olarak en içten minnet duygularıyla yaŐantımın her döneminde sevgi ve destekleriyle her zaman yanımda olan aileme teŐekkürü bir borç bilirim.

Őubat 2006

**Zuhal YILDIRIM**

## **KISALTMALAR**

CAT:Katalaz

GSH:Reducte glutatyon

GSSG:Okside glutatyon

GPx:Glutatyon peroksidaz

MDA:Malondialdehit

SOD:Süperoksit dismutaz

ROS:Reaktif oksijen türleri

TR:Tiyoredoksin redüktaz

Trx:Tiyoredoksin

TBA:Tiyobarbitürik asit

TBARS:Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler

OH<sup>·</sup>:Hidroksil radikali

O<sub>2</sub><sup>·-</sup>:Süperoksit radikali

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:Hidrojen peroksit

NO: Nitrik oksit

NOS: Nitrik oksit sentaz

eNOS: Endotelyal nitrik oksit sentaz

iNOS:İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

<b><u>İÇİNDEKİLER</u></b>	<b>Sayfa</b>
<b>I.GİRİŞ VE AMAÇ</b>	1
<b>II.GENEL BİLGİLER</b>	3
<b>II.1.YAŞLANMA</b>	3
II.1.1.Yaşlanma Fizyolojisi	3
II.1.2.Yaşlanma Teorileri	3
II.1.2.1.Protein Değişiklikleri ile İlgili Teoriler	3
II.1.2.2.Organ Sistem Teorisi (Pacemaker Teorisi)	4
II.1.2.3.Serbest Radikal Teorisi	5
II.1.3.HücreSEL Yaşlanma	8
II.1.3.1.Replikatif yaşlanma	8
<b>II.2.SERBEST RADİKALLER VE ANTIÖKSİDAN SİSTEM</b>	8
II.2.1.Serbest Radikaller	8
II.2.1.1.Serbest Radikallerin Oluşumu	8
II.2.1.2.Nitrik Oksit	12
II.2.1.3.Serbest Radikallerin Organizmadaki Etkileri	13
II.2.1.4.Serbest Radikal Hedefleri	14
II.2.2.Antioksidanlar	15
II.2.3.Oksidatif Stres ve Yaşlanma	19
<b>II.3. TAURİN</b>	21
II.3.1.Taurinin Genel Özellikleri	21
II.3.2.Taurinin Genel Etkileri	26
II.3.2.1.Taurinin Membran Stabilize Edici Fonksiyonu	26
II.3.2.2.Taurinin Hücre Ca <sup>2+</sup> Homeostazisi Üzerine Etkisi	27
II.3.2.3.Taurinin Lipit Metabolizması Üzerine Etkisi	28
II.3.2.4.Taurinin Antioksidan Özelliği	28

<b>II.4.TİYOREDOKSİN SİSTEMİ</b>	31
<b>III. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	43
III.1.Kullanılan Gereçler	43
III.1.1Deney Hayvanları	43
III1.2.Kullanılan Aletler	43
III.1.3.Kullanılan Kimyasal Maddeler	43
III.2.Uygulanan Yöntemler	43
III.2.1.Deney Hayvanlarının Hazırlanması	44
III.2.2.Yöntemlerin Uygulanması	45
III.2.2.1.Tiyoredoksin Redüktaz Aktivitesinin Tayini İçin Hazırlık Aşamaları	45
III.2.2.1.1.Tiyoredoksin Redüktaz Aktivitesinin Ölçülmesi	45
III.2.2.2.Karaciğer Dokusu Glutasyon Düzeyinin Ölçülmesi	46
II.2.2.3.Lowry Protein Tayini	47
III.2.2.4.Karaciğer Dokusu Glutasyon Peroksidaz Aktivesinin Ölçülmesi	48
III.2.2.5.Karaciğer Dokusu MDA Düzeyinin Ölçülmesi	49
III.2.2.6.İmmünohistokimyasal Olarak eNOS Tayini	50
III.2.2.7.İstatistik Değerlendirme	51
<b>IV.BULGULAR</b>	52
IV.1.Karaciğer Dokusunda MDA Düzeyleri	53
IV.2.Karaciğer Dokusunda GSH Düzeyleri	53
IV.3.Karaciğer Dokusunda GPx Aktivitesi	53
IV.4.Karaciğer Dokusunda TR Aktivitesi	53
IV.5.Histolojik Bulgular	56
<b>V.TARTIŞMA</b>	60

<b>VI. SONUÇ</b>	65
<b>VII.ÖZET</b>	66
<b>VIII.SUMMARY</b>	68
<b>IX.KAYNAKLAR</b>	70



## **ŞEKİLLER**

## **Sayfa**

Şekil 1. Gençlerde ve yaşlılarda oksidatif strese yanıt farklılıkları	7
Şekil 2. Lipit peroksidasyon basamakları	11
Şekil 3. Oksidatif stresin DNA hasarı oluşturma mekanizmaları	15
Şekil 4. Oksidatif stres ve antioksidan sistem etkileşimi ve yaşlanma ile ilişkisi	21
Şekil 5. Taurin biyosentez yolu	23
Şekil 6. Tiyoredoksin sistemi ile katalizlenen protein disülfit redüksiyon mekanizması	32
Şekil 7. Hücre kompartmanlarında tiyoredoksin ve tiyoredoksin redüktaz yerleşimi	33
Şekil 8. E.coli hücre redüksiyonlarında tiyoredoksin ve glutaredoksin Sistemi	38
Şekil 9. Tiyoredoksin ve glutaredoksin sistem ile hücre sinyalizasyonu ve tiyol redoks regülasyonu	41
Şekil 10. Lowry Standart Eğrisi (mg/ml)	48
Şekil 11. Taurin uygulanmayan (kontrol) ve uygulanan (deney) genç ve orta yaşlı sıçanların karaciğer dokusundaki MDA düzeyleri (nmol/g doku)	54
Şekil 12. Taurin uygulanmayan (kontrol) ve uygulanan (deney) genç ve orta yaşlı sıçanların karaciğer dokusundaki GSH düzeyleri (µmol/mg protein)	54
Şekil 13. Taurin uygulanmayan (kontrol) ve uygulanan (deney) genç ve orta yaşlı sıçanların karaciğer dokusundaki GPx aktiviteleri (nmol okside NADPH/dak/mg protein)	55
Şekil 14. Taurin uygulanmayan (kontrol) ve uygulanan (deney) genç	

ve orta yaşı sıçanların karaciğer dokusundaki TR aktiviteleri  
(Ü/mg protein)

55



## **TABLolar**

## **Sayfa**

Tablo 1.Yaşlanma sürecinde rol oynayan hücresel olaylar	6
Tablo 2.Antioksidan sistemde yer alan moleküller	16
Tablo 3.Taurinin çeşitli sistemlere etkileri	24
Tablo 4.Çeşitli dokulardaki taurin konsantrasyonu	26
Tablo 5.Memeli tiyoredoksin redüktazın substratları	35
Tablo 6.Çalışma grupları ve özellikleri	44
Tablo 7.Taurin uygulanmayan (Kontrol) ve uygulanan (Deney) genç ve orta yaşlı sıçan karaciğer dokusunda oksidan stres ve antioksidan enzim değerleri ortalama $\pm$ SD	52
Tablo 8.Taurin uygulanan genç ve orta yaş grubu sıçanlarda immünreaktif eNOS dağılımı	59

## **RESİMLER**

## **Sayfa**

Resim 1.Genç Kontrol

57

Resim 2.Genç Taurin

57

Resim 3.Orta Yaşlı Kontrol

58

Resim 4a-4b.Orta Yaşlı Taurin

58



## **I. GİRİŞ VE AMAC**

Yaşlanma bütün canlı sistemleri etkileyen, ölüm riskini arttıran değişikliklerin birikimi sonucu gelişen, kaçınılmaz bir olaydır. Yaşlanmaya neden olan faktörler arasında genetik bozukluklar, çevresel etkenler, hastalıklar ve doğuştan başlayan yaşlanma olayları gelmektedir<sup>1</sup>.

Yaşlanma sürecinin iki temel özelliği vardır: Fizyolojik işlevlerde azalma ve yaşa bağlı olarak hastalık sıklığında artış. İnsanda homeostatik kapasite 23-30 yaş civarında maksimuma ulaşır ve daha sonra organ sistemlerinin çoğunda fizyolojik işlevlerde ilerleyen bir azalma izlenir. Özellikle sinir iletim hızı, bazal metabolizma hızı, standart hücre sıvısı, kardiyak indeks, glomerular filtrasyon hızı ve vital kapasitedeki azalma hızı belirgindir<sup>2</sup>.

Yaşlılıkta sıklığı artan birçok hastalığın patogenezinde serbest radikallerin yer alması oksidatif stres ve yaşlanma ilişkisini güçlendirmiştir<sup>3</sup>. Oksidatif stres; iskemi reperfüzyon, Alzheimer, Parkinson, ateroskleroz, hipertansiyon, kanser, diabetes mellitus vb. birçok hastalığın patogenezinde rol oynar. Bu hastalıklar aynı zamanda insanlardaki ölüm sebeplerinin çoğunluğunu oluşturur<sup>4</sup>. Oksidatif stres ve yaşlanma arasında doğrudan bir ilişki vardır. Yapılan çalışmalarda genellikle yaşlanma ile birlikte dokulardaki serbest radikal düzeylerinin arttığı bildirilmektedir<sup>5,6</sup>.

Yaşlanma sürecinde etkili olduğu düşünülen lipit peroksidasyon ürünlerinden biri de malondialdehitdir (MDA). Serbest radikalleri MDA gibi lipit peroksidasyon ürünlerinin etkilerini ortadan kaldırmada sülfidril içeren ve glutatyon gibi moleküller önemli rol oynamaktadır<sup>7,8</sup>.

Taurin; organizmada metionin, sistein gibi sülfür içeren amino asitlerin metabolizmasından açığa çıkar<sup>9,10</sup>. Organizmadaki taurin havuzu diyetle alınan kükürtlü amino asitlerin endojen metabolizması ile belirlenir<sup>11</sup>. Taurin esas olarak beyin ve karaciğerde sentezlenmektedir<sup>12</sup>.

Bugün taurinin pek çok önemli işlevlerinin olduğu saptanmıştır. Safra asidi sentezinde sınırlayıcı, osmoregülatör, enerji verici ve santral sinir sisteminde nöroinhibitör etkili olduğu gösterilmiştir<sup>13</sup>.

Literatürde taurinin in vivo ve/veya in vitro şartlarda antioksidan olarak davrandığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır<sup>10,14,15</sup>. Örneğin, CCl<sub>4</sub> ile indüklenmiş karaciğer ve karaciğer mikrozomlarında taurinin malondialdehit (MDA) yapımını azalttığı, pnömotoksik maddelere bağlı sekonder olarak akciğerde gelişen lipit peroksidasyonunu azalttığı bildirilmiştir<sup>15</sup>. Ayrıca taurin, doksorubisin gibi antikanser ilaçların kalpte lipit peroksidasyonunu artırıcı etkilerini önlemektedir<sup>16</sup>. Yine bu amino asidin koroner arter greftlerinde serbest radikal süpürücü özelliği nedeniyle reperfüzyon sırasında hücre hasarını ve lipit peroksidasyonunu belirgin şekilde azalttığı gösterilmiştir<sup>17</sup>.

Literatürdeki bu bilgilere dayanarak çalışmamızda taurin uygulamasının genç ve orta yaşlı erkek sıçanlarda karaciğer dokusundaki oksidan (MDA) ve antioksidan (glutatyon, glutatyon peroksidaz, tiyoredoksin redüktaz) parametreler üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçladık.

## **II. GENEL BİLGİLER**

### **II.1.YAŞLANMA**

#### **II.1.1.Yaşlanma Fizyolojisi**

Canlılarda yaşlanma evrensel, ilerleyici ve geri dönüşümsüzdür<sup>1</sup>. Genel olarak yaşlanma, organizmanın zamana bağlı olarak fonksiyonel kapasitesinde ve hücrelerin organizma içinden ve dışından gelen etkenlere karşı koyma yeteneğindeki azalmayı ifade eder. Bu tanımlamaya göre, yaşlanma birbiri ile ilintili başlıca iki biyolojik sürecin sonucunda meydana gelmektedir: Fonksiyon kaybı, strese karşı uyum sağlama ve direnç gösterme yeteneğinin kaybı. Araştırmacıların çoğu biyolojik yaşlanmayı organizmanın homeostazisini devam ettirme yeteneğinin kaybolması olarak tanımlamaktadır. Homeostazisini devam ettirmedeki başarısızlığının temelinde rol alan hücre düzeyindeki olaylar Tablo 1’de özetlenmiştir<sup>18</sup>.

#### **II.1.2. Yaşlanma Teorileri**

Yaşlanma süreci ile ilgili olarak birçok teori ortaya atılmıştır. Bunlardan en çok kabul görenleri başlıca: Protein değişiklikleri ile ilgili teoriler, organ sistem teorisi ve serbest radikal teorisi<sup>19</sup>.

##### **II.1.2.1. Protein Değişiklikleri ile İlgili Teoriler**

Protein değişiklikleri ile ilgili olarak bazı teoriler ileri sürülmüştür. Bunlardan birisi olan protein sentez hataları teorisi hücre fonksiyonlarında yaşa bağlı olarak meydana gelen değişikliklerin protein sentezindeki hataların birikmesinden kaynaklandığını öngörmektedir. Hücre kültürleri ile yapılan in vitro çalışmalar bu teorinin doğru olmadığını ortaya koymuştur<sup>19,20</sup>. Protein değişiklikleri ile ilgili ikinci teoride ise translasyon sonrası proteinlerde

meydana gelen bir takım değişikliklerin hücre fonksiyonlarında değişikliklere ve sonuçta yaşlanmaya neden olacağı ileri sürülmektedir. Ancak translasyon sonrası proteinlerde meydana gelen değişikliklerin yaşlanmadan çok yaşlılıkta izlenen patolojilerin bir kısmında etkili olabileceği kabul edilmektedir. Proteinlerle ilgili diğer bir teori de protein turnover değişikliği teorisidir. Yaşlı hücrelerle yapılan çalışmalarda, bu hücrelerde bazı proteinlerin sentez hızının azaldığı ve pek çok proteinin de lizozomlardaki eliminasyon sürelerinin değiştii gösterilmiştir<sup>21</sup>. Son yıllarda rekombinant DNA tekniklerindeki gelişmeler bu teorinin yaşlanmadaki rolünü daha iyi aydınlatabilecektir. DNA hasar ve tamir teorisi ise yaşam süresince DNA'da sürekli hasarlar meydana geldiğini ve özellikle tamir mekanizmalarında meydana gelen değişikliklerin yaşlanmayla birlikte hücresel fonksiyonlarda izlenen progresif azalmaya neden olabileceğini öngörmektedir<sup>22</sup>. Ancak yapılan çalışmalar DNA'da meydana gelen değişikliklerin yaşlanmayla birlikte artmakla beraber bu değişikliklerin her zaman yaşam süresi ile ilgili olmadığını ortaya koymaktadır<sup>23</sup>.

#### **II.1.2.2. Organ Sistemi Teorisi (Pacemaker Teorisi)**

Organ sistemi teorisi (Pacemaker Teorisi), bazı organların veya organ sistemlerinin fonksiyonlarının yaşlanma ile birlikte azaldığını ve bu organ/organ sistemlerinde izlenen fonksiyon kayıplarının ise sistemik yaşlanma sürecinden sorumlu olduğunu ileri sürmektedir<sup>19</sup>. Bu teoriye göre yaşlanma için immün sistem ve nöroendokrin sistem "pacemaker" rolü oynamaktadır. Yaşlanma ile birlikte immün sistemde özellikle T hücrelerinde büyük fonksiyon kayıplarının izlenmesi, otoantikörlerin gelişme sıklığının artması bu görüşü desteklemektedir<sup>24,25</sup>. Bu teoriye göre nöroendokrin sistem vücutta yaş ile ilgili değişikliklerin kontrolünde rol alan önemli bir sistemdir.

göre bu artış da hipertansiyon, karbohidrat toleransının bozulması vb. durumlardan sorumludur<sup>4</sup>. Ancak bu teorinin en büyük eksikliklerinden biri söz konusu "pacemaker" sistemlerde meydana gelen değişiklikleri açıklayamamasıdır.

### **II.1.2.3. Serbest Radikal Teorisi**

Serbest radikal teorisi yaşlanmanın, yaşam süresince oluşan düşük düzeylerdeki serbest radikal hasarlarının birikmesi ile meydana geldiğini kabul eder. Mitokondride başlayan bu reaksiyonlar yaş ile birlikte artar ve ömür, harabiyete neden olan reaksiyonların mitokondride verdikleri zararlar ölçülebilir<sup>26</sup>. Aerobik organizmalar yaşamları boyunca oksijen ile karşı karşıya kalır ve sürekli olarak prooksidan ve antioksidan sistemi dengede tutmaya çalışırlar. Yaşlanmada bu dengenin prooksidanlar lehine bozulduğu, yaş ile birlikte antioksidan kapasitenin azaldığı bilinmektedir. Serbest radikal teorisi yaşlanmanın, dokularda peroksidatif hasarın artması ve buna karşılık antioksidan kapasitenin azalmasının sonucu gerçekleştiğini öngörür<sup>26,27,28</sup>.

Yaşlanmada serbest radikal teorisi ilk kez 1954 yılında çevresel hastalıklar ve intrinsik yaşlanma sürecindeki olaylarda rol alan serbest radikal reaksiyonlarının gösterilmesi ile gündeme gelmiştir<sup>26</sup>. Serbest radikal reaksiyonlarına bağlanan değişiklikleri üç grupta toplamak mümkündür:

- a) Kolajen vb.uzun ömürlü moleküllerde kümülatif oksidatif değişiklikler<sup>29</sup>,
- b) DNA üzerindeki oksidatif hasarlar<sup>30</sup>,
- c) Proteinlerin translasyon sonrası glikolizasyondaki değişiklikler<sup>26</sup>.

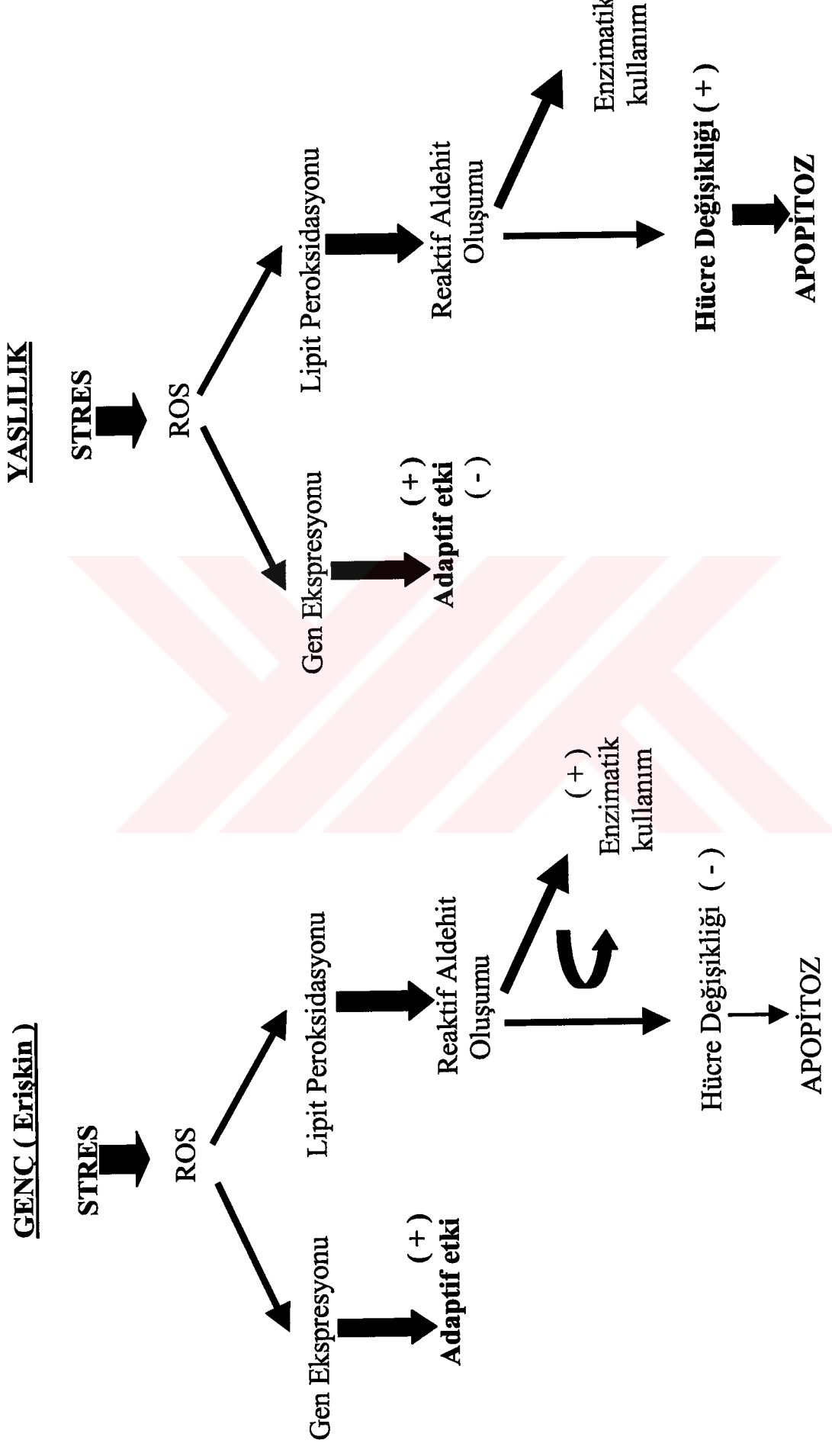
Oksidatif stresin yaşlanma üzerindeki etkileri ile ilgili olarak çelişkili sonuçlar bildirilmiştir. Yine organizmayı oksidatif stresten koruyan antioksidan sistem, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon

(GSH) vd. ile ilgili olarak literatürde farklı sonuçlar bildirilmiştir<sup>31,32</sup>. Kısaca özetlenecek olursa oksidatif stresin organizmada meydana getirdiği hasar stresin derecesi ile ilişkilidir.

Serbest radikaller hücre ve dokularda ancak ölçülebilir düzeylerde ve sürekli olarak oluşur. Yüksek organizmalarda ROS (Reactive Oxygen Species:reaktif oksijen türleri) fizyolojik fonksiyonların sürdürülmesinde sinyal molekül olarak görev yapar<sup>33</sup>. Az miktarlarda oluşan ROS hücre yaşlanmasına neden olurken fazla miktarlarda yapılması kanser ve hücre nekrozu olaylarına yol açabilmektedir (Şekil 1).

Tablo 1. Yaşlanma sürecinde rol oynayan hücresel olaylar

- 1.Genetik olarak programlanmış yaşlanma mekanizmaları**
- 2. Sistemlerin koordinasyonunun bozulması**
  - a. Nöral
  - b. Nöroendokrin
  - c. Endokrin
- 3.Genetik bilgi kaybı**
  - a. Baz delesyonu ve yer değiştirmesi
  - b. DNA ve RNA kaybı
  - c. Tek zincir kırıkları
  - d. Transkripsiyon veya translasyonun bozulması
- 4. Yapısal hasar veya değişiklikler**
  - a. Hücre kaybı ve membran hasarı
  - b. Protein değişikliği, çapraz bağlar ve glikasyon
  - c. Lipitlerin ve karbohidratların oksidatif değişiklikleri
- 5. Zararlı maddelerin birikmesi**
  - a. Tamir yeteneğinin kaybı
  - b. Detoksifikasyon sürecinin kaybı



Şekil 1. Gençlerde ve yaşlılarda oksidatif strese yanıt farklılıkları

### **II.1.3. Hücresel Yaşlanma**

Hücresel yaşlanma, çoğalabilen hücrelerin çok çeşitli uyarılara karşı oluşturduğu farklı yanıtlar olarak tanımlanır. Mitotik hücreler çoğalabilme özelliğine sahip iken postmitotik hücreler bu özelliklerini kaybetmiştir. Mitotik hücrelere örnek olarak bazal keratositler, gastrointestinal sistem , karaciğer, diğer epitel hücreleri, düz kas hücreleri, stromal fibroblastlar; postmitotik hücrelere ise olgun nöronlar ve farklılaşmış iskelet ve kalp kası hücreleri verilebilir<sup>1</sup>.

#### **II.1.3.1.Replikatif Yaşlanma**

Hücresel yaşlanma mitotik hücrelerin proliferatif potansiyelini sınırlayan süreç olarak tanımlanmıştır. Hayfick ve ark. normal insan fibroblast kültürlerinde hücrelerin çoğalma yeteneklerini dereceli olarak kaybettiklerini göstermiştir<sup>19</sup>. Elli ya da daha fazla bölünmeden sonra hücreler bölünemezler fakat canlılıklarını devam ettirirler, çoğalmayı uyaran mitojenik uyarılara cevap veremezler. Bu fenomen replikatif yaşlanma olarak tanımlanır. Replikatif yaşlanma fenomeninin izlenmediği hücreler de mevcuttur. Örneğin germ hücre kültüründe prekürsör (öncül) ve erken embriyonik hücreler ve kök hücreler sınırsızca çoğalırlar. Yine kanser hücrelerinin pek çoğu sınırsız çoğalma yeteneğine sahiptir.

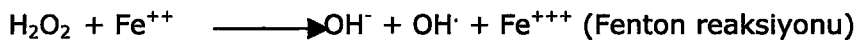
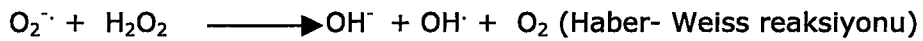
## **II.2. SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDAN SİSTEM**

### **II.2.1.Serbest Radikaller**

#### **II.2.1.1. Serbest Radikallerin Oluşumu**

Tek hücreli organizmaların ortaya çıkışından yaklaşık bir milyar yıl sonra, fotosentetik aktivite sonucunda oluşan oksijenin (O<sub>2</sub>) hayatı başlattığı kabul edilmektedir. Birçok biyolojik sistem O<sub>2</sub> ile yaşamaya uyum sağlamakla

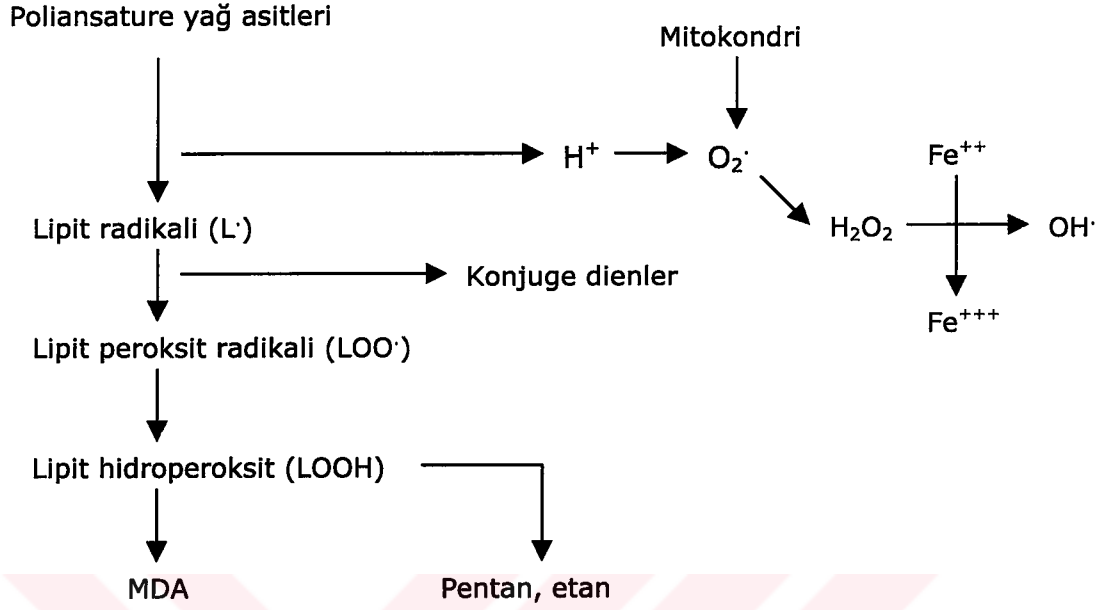
birlikte; O<sub>2</sub> ve onun minör metabolik ürünleri olan süperoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, serbest radikal değildir), hidroksil radikali (OH<sup>-</sup>) ve singlet oksijen canlı sistemler için genellikle toksiktir<sup>34</sup>. En önemli ROS kaynakları mitokondriyal elektron transportu, peroksimal yağ asit metabolizması, sitokrom P<sub>450</sub> reaksiyonu ve fagositik hücrelerdir. ROS DNA, protein ya da lipit gibi temel kimyasal yapıların çoğunu hedef molekülden bir ya da daha çok elektron transferi yaparak okside eder. Bu reaktif oksijen türleri organizmada genellikle normal fizyolojik olaylar sırasında oluşur ve bir çok önemli fonksiyona aracılık eder<sup>35</sup>. Solunum sırasında oksijen molekülü sitokrom oksidaz enzimi ile doğrudan suya indirgenir. Bu sırada oksijenin çok az bir kısmı elektron transport zincirindeki elektron kaçakları nedeniyle süperoksit anyonu oluşturur. Ayrıca hücrelerde çeşitli enzimler (ksantin oksidaz, sitokrom P<sub>450</sub>, NADPH oksidaz, vb.) aracılığıyla, küçük moleküllerin (katekolaminler, flavinler, vb.) otooksidasyonu ile veya ksenobiyotiklerin (parakuat, nitrofurasyon, adriamisin, vb.) redoks döngüsü gibi değişik mekanizmalarla O<sub>2</sub><sup>-</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> meydana gelir<sup>36</sup> Hidroksil radikali ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile O<sub>2</sub><sup>-</sup> arasındaki reaksiyon (Haber-Weiss reaksiyonu) sonucunda oluşur. Bu reaksiyon geçiş metalleri (başlıca demir) tarafından katalizlenir ve Fenton reaksiyonu olarak adlandırılır<sup>37</sup>.



Hidroksil radikali oldukça reaktiftir ve hücresel elemanların hemen hemen tamamı ile reaksiyona girer ve toksiktir. Tiyol radikali orta reaktif iken NO radikali ise zayıftır<sup>36</sup>.

Reaktif oksijen türleri en önemli hasarı lipitler üzerinde yapar. Poliansature yağ asitleri serbest radikallere karşı çok duyarlıdır. Yağ asitlerinin oksitlenmeye başlamasıyla birlikte bir dizi reaksiyon sonucunda lipit peroksidasyon ürünleri meydana gelir. Örneğin serbest radikalın, hücre membranında yer alan fosfolipit tabakasındaki doymamış yağ asitlerinin alfa metilen gruplarından bir hidrojen atomu uzaklaştırması ile yağ asidi radikal özelliği kazanır<sup>38</sup>. Oluşan bu lipit radikali dayanıksız olup hemen lipit konjuge dien molekülü ve daha sonra buna oksijen molekülünün bağlanmasıyla lipit peroksit radikali meydana gelir. Lipit peroksit radikali de daha sonra lipit hidroperoksit molekülünü oluşturur veya lipit endoperokside dönüşür. Lipit peroksit molekülleri aynı zamanda membrandaki diğer yağ asidi moleküllerini de etkileyerek başlamış olan peroksidasyon olaylarının zincir halinde devamını sağlar. Lipit peroksitleri daha sonra aldehit (en önemlisi 4-hidroksinonenal), keton, alkol ve eter moleküllerine ayrıştır (Şekil 2)<sup>38</sup>.

Serbest radikallere bağlı hücre hasarında başlıca üç ana mekanizma rol oynar: (1) Serbest radikallerin direkt olarak yaptıkları hasar, (2) lipit peroksidasyonu sonucu biyolojik membranlarda (hücre membranı ve bunlara bağlı olarak görev yapan enzimler, ör.; sinyal iletiminde rol alan moleküller, membran taşıma sistemleri, vb.) yaptıkları hasar ve (3) lipit peroksidasyonu sonucu radikal olmayan fakat toksik olan maddelerin hücre içinde kolayca difüze olarak diğer bölgelerde meydana getirdikleri hasarlar. Günümüzde oksidatif stres sırasında hücre ölümüne yol açan olaylar arasında lipit peroksidasyonu başta olmak üzere serbest radikallerin nükleik asitlerde ve proteinlerde meydana getirdiği değişiklikler de sorumlu kabul edilmektedir.



Şekil 2. Lipit peroksidasyon basamakları

Serbest radikal aracılı lipit peroksidasyonu sonucunda oluşan kısa zincirli reaktif ürünleri başlıca üç sınıfa ayırabiliriz: 4-hidroksialkalenler (HNA), ketoaldehitler ve 2-alkalenler<sup>39</sup>. Düşük molekül ağırlıklı olan bu ürünlerden 4-hidroksi-2 nonenal (HNE) ve MDA oksidatif hasarın belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan belirteçlerdir<sup>40,41</sup>.

Üç karbonlu bir ketoaldehit olan MDA, normal metabolik şartlarda, önce asetat veya malonata kadar okside olur, daha sonra Krebs siklusu ile CO<sub>2</sub>'e indirgenerek atılır. Fakat aşırı lipit peroksidasyonunda MDA konsantrasyonu artar ve dokulara hasar verir . MDA, proteinlerin lizin kalıntıları veya fosfaditiletanolamin ve fosfaditilserin gibi fosfolipitlerin amin gruplarıyla kovalent modifikasyonlar oluşturabilir<sup>42,43</sup>.

Biyolojik sistemlerdeki oksidatif stresin ölçülmesinde en yaygın yöntem ise MDA'nın spektrofotometrik ölçümüdür<sup>44</sup>.

MDA düzeyleri diabet, miyokard enfarktüsü, Alzheimer hastalığı, kalp yetmezliği, yanık, egzersiz gibi durumlarda artmaktadır<sup>45</sup>.

Hücre membran peroksidasyonu doğrudan etkisiyle membran akışkanlığını azaltarak normalde geçişi olmayan maddelerin geçişine izin verir ( $Ca^{+2}$  iyonları) ya da membrana bağlı enzimlerin inaktivasyonuna neden olur. Bu da hücre yaşlanmasına ve ölümüne neden olur<sup>46,47</sup>.

#### **II.2.1.2. Nitrik Oksit**

Nitrik oksit (NO) biyolojik sistemlerde üretilen çok yönlü, inorganik bir serbest radikaldir<sup>48</sup>. Düşük konsantrasyonlarda vasküler tonusun kontrolü, nörotransmisyon, öğrenme ve hafıza gibi çok çeşitli fizyolojik süreçte görev yapan, yüksek konsantrasyonlarda ise savunma amacı ile statoksin olabilen bir moleküldür<sup>49,50</sup>.

NO, P<sub>450</sub> sitokrom-oksidoredüktaz ailesine ait bir enzim grubu olan Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enzimleri tarafından katalizlenen bir reaksiyon sonucu vücutta pek çok yerde oluşmaktadır<sup>51</sup>.

Şimdiye dek tanımlanmış NOS'lar: Tip-I nötonal (nNOS), Tip-II indüklenebilir (iNOS) ve Tip-III endotelial (eNOS)dır<sup>52</sup>.

eNOS izoformu guanilat silazın hem grubuna bağlanarak siklik guanozin monofosfat (cGMP) üretimini artırır<sup>53</sup>.

NO biyolojik sistemlerde oksijen, süperoksit anyonu ve geçiş metalleri ile reaksiyona girmekte ve nitrit, nitrat, peroksinitrit ve metal-NO ürünlerini açığa çıkarmaktadır<sup>54</sup>.

eNOS ve nNOS enzimlerinin protein düzeyinde aktivitesi hücre içi  $Ca^{+2}$ 'un artışıyla veya diğer proteinlerin bağlanmasıyla düzenlenebilir. nNOS özellikle santral ve periferik sinir sisteminde bulunurken, eNOS başlıca vasküler endotel hücreleri olmak üzere pek çok doku ve hücrede eksprese edilir<sup>52,55,56</sup>.

Endotelial NO'nun vasküler homeostazisin sürdürülmesi açısından fizyolojik önemi vardır. NO bunu; damar dilatasyonu, trombosit agregasyonu ve lökosit adhezyonundan intimanın korunması ve vasküler düz kas proliferasyonunun engellenmesi ile gerçekleştirir. Endotelden NO yapımı eNOS emzim aktivitesi ve/veya gen ekspresyonu ile düzenlenmektedir<sup>56</sup>.

### **II.2.1.3. Serbest Radikallerin Organizmadaki Etkileri**

Serbest radikaller, özellikle antioksidanlarla dengelenmediği bazı durumlarda organizma için zararlı olabilmektedir. Oksijen toksisitesinin kimyasal mekanizmasında en popüler teori hücre içinde oluşmuş  $O_2$  radikalleri ve kimyasal olarak aktif diğer oksijen metabolitlerinin oluşturduğu hücre hasarıdır. Serbest radikaller sayılan reaksiyonların ya hepsini ya da bir kısmını yaparlar:

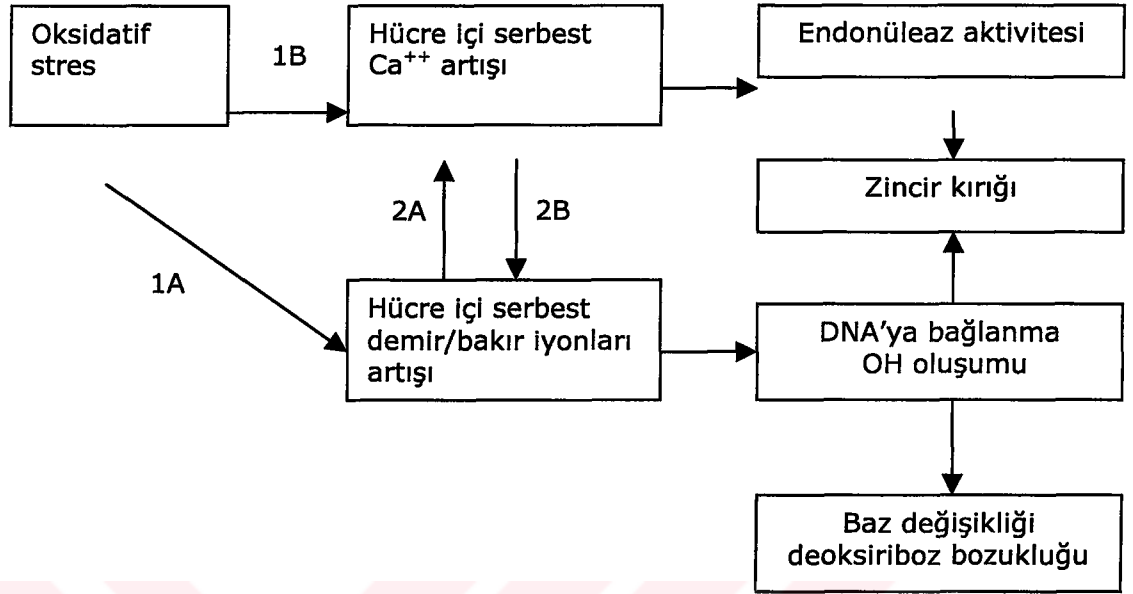
- 1- Diğer molekülleri ayırt etmeksizin saldırır.
- 2- Oksijen tüketimi zincir reaksiyonunu başlatır; tek serbest radikalın çok sayıda diğer molekülleri hasarlandırması gibi.

3- Yapısal proteinler, enzim ve DNA benzeri moleküllerde rastgele çapraz bağ ve fragmantasyona neden olur.

#### **II.2.1.4.Serbest Radikal Hedefleri**

Serbest oksijen radikalleri, doymamış bağlar ve tiyol bağları düzeyinde hücrenin tüm elemanları ile reaksiyona girebilmektedir. Proteinlerdeki bazı amino asitler serbest radikallere çok duyarlıdır ve sonuçta proteinin yapısında değişiklikler meydana gelir. Hidroksil radikali proteinler arasında çapraz bağlar oluşturabildiği gibi amino asitlerdeki bağları kopararak makro moleküllerin parçalanmasına yol açar<sup>57</sup>. En önemli ROS hedefi nükleer ve mitokondriyal DNA'dır. Nükleik asitler de serbest radikallere maruz kaldıklarında yapısal değişikliklere uğrar ve DNA'da zincir kırıkları, baz modifikasyonları ve nokta mutasyonları meydana gelir<sup>57</sup>. Serbest radikallerin DNA üzerindeki hasarları genellikle iki hipotezle açıklanmaktadır. Birinci hipoteze göre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekülü hücre içinde kolayca difüze olur ve özellikle DNA yapısında yer alan Fe ve Cu atomları ile reaksiyona girerek DNA yakınında hidroksil radikalleri oluşmasına neden olur. Oluşan bu radikaller DNA'ya bağlanarak baz değişiklikleri ve deoksiriboz moleküllerinde yapısal değişikliklere neden olur<sup>58</sup>. İkinci hipoteze göre ise oksidatif stres hücre içinde bir dizi metabolik olayı başlatır ve bunların sonucunda DNA'yı parçalayabilen nükleaz enzimleri aktifleşir ve DNA'da kırıklar meydana getirir (Şekil 3)<sup>59</sup>.

Serbest radikallerin %50'den fazlası mitokondrilerde üretilir<sup>23</sup>. Mitokondriyal DNA histon içermez ve oksidatif strese nükleer DNA'dan daha az dayanıklıdır, dolayısıyla oksidatif stresten daha fazla etkilenir. Oksidatif strese bağlı mutasyonlar, mitokondriyal DNA'da çekirdek DNA'sına göre 10-20 kat daha fazladır<sup>60</sup>. Buna karşılık DNA tamir aktivitesi ise nispeten düşüktür.



Şekil 3. Oksidatif stresin DNA hasarı oluşturma mekanizmaları (1: Hücre içi serbest Ca<sup>++</sup> artışı, 2: Metal iyonları ile etkileşim)

### **II.2.2. Antioksidanlar**

Oksidanların zararlı etkileri antioksidanlar tarafından azaltılır. Antioksidanlar; oksidanları engellemeden önce canlı biyolojik hedefler ile reaksiyona girerler, zincir reaksiyonlarını önlerler, oksijenin yüksek reaktif ürünler oluşturmasını önlerler (Tablo 2).

Biyolojik sistemler; enzimatik sistemlerin gelişmesi, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutasyon peroksidaz (GPx) ve diğer antioksidanların kombinasyonu ile oksidatif hasara karşı korunurlar(Tablo 2)<sup>61</sup>.

Sies, biyolojik sistemlerdeki prooksidan sistem ile antioksidan kapasite arasındaki denge durumunu aşağıdaki formülle özetlemiştir<sup>57</sup>:



Tablo 2. Antioksidan sistemde yer alan moleküller

<b>1- Antioksidan enzimler</b>	Süperoksit dismutaz (SOD) -Katalaz -GSH peroksidaz -GSH redüktaz -GSH-S-Transferaz
<b>2-Antioksidan proteinler</b>	-Seruloplazmin -Transferrin -Laktoferrin -Albumin -Haptoglobin
<b>3-Düşük moleküler ağırlıklı antioksidan bileşikler</b>	-GSH, NADPH -Askorbat, urat - $\alpha$ -Tokoferol - $\beta$ -Karoten
<b>4-DNA tamir enzimleri</b>	<b>a</b> -Glikozilaz -5-Hidroksi metil sitozin -HMU (5-hidroksi metil urasil) -TG ve TG'nin(Timin glikol) ürünleri (5-hidroksil 5-metil hidantion, üre) <b>b</b> -Endonükleaz <b>c</b> -Poli (ADP) riboz transferaz
<b>5-Okside proteini parçalayan enzimler</b>	Makroproteinazlar (MOP)

Antioksidanların azalması, ROS yapımının artması ya da her ikisinin birlikte olması halinde ROS yeterince ortadan kaldırılamaz ve oksidatif stres oluşur<sup>62</sup>.

Oksidatif stres sonucu hücrelerde şiddetli metabolik disfonksiyon, membran lipitlerinde peroksidasyon, nükleotitlerde nikotinamit azalması, intrasellüler serbest Ca artışı, iskelet yapısında bozulma ve DNA hasarı oluşur. DNA hasarı sıklıkla tek zincir kırıkları, çift zincir kırıkları ya da kromozomal aberasyon (anomaliler) şeklindedir. Antioksidanlar reaktif oksijen ürünlerini bağlayarak bunların oluşturabilecekleri hasarı azaltabilirler veya ortadan kaldırabilirler<sup>61</sup>.

Doğal savunma mekanizmaları olan SOD, katalaz, redükte glutatyon,  $\alpha$ - tokoferol ve askorbat ile oluşmuş radikaller ortadan kaldırılır. Mitokondride çeşitli şekillerde oluşan ROS farklı antioksidan sistemler ile önlenir. Mitokondri matriksinde aktif bölgesinde mangenez bulunan SOD'un özel bir formu bulunur. Özellikle radyasyon ve hipoksiye bağlı streste MnSOD'un ekspresyonu artar. İntermembranda bulunan sitokrom c  $O_2^-$  ile azalır. Sitokrom c'nin azalması solunum zincirinde bazı elektronların kaçışına neden olabilir. Sitokrom c ROS'a karşı temizleyici role sahip gibi görünmektedir<sup>63</sup>.

Katalaz, bütün bilinen organizmalarda bulunmaktadır.  $H_2O_2$ 'yi oksijen ve suya indirger, NADPH bağımlıdır<sup>64,65,66,67,68</sup>.



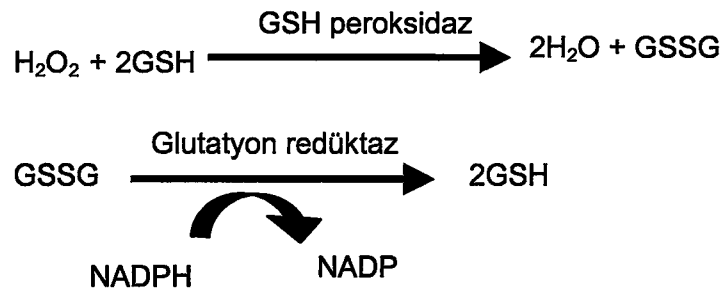
Glutasyon bağımlı antioksidan sistem glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz olarak iki enzim içerir. Bu sistem glutasyonun okside ve redükte formlarını içerir<sup>64</sup>.

Glutasyon peroksidaz, glutasyon bağımlı antioksidan sistemin bir bölümünü oluşturur. Glutasyon bağımlı sistem, hücre içindeki hidroperoksitleri indirgeyen temel mekanizmadır<sup>69</sup>. Enzimin selenyuma bağlı ve selenyumdan bağımsız iki tipi bulunmaktadır<sup>65,66,69</sup>.

Selenyum bağımsız glutasyon peroksidaz organik peroksitleri detoksifiye edebilir ancak  $H_2O_2$ 'i metabolize edemez<sup>65,69</sup>.

Total enzim miktarının üçte ikisi sitozolde, üçte biri mitokondride bulunur. Glutasyon peroksidaz enziminin en fazla bulunduğu bölgeler eritrositler ve karaciğerdir<sup>69</sup>.

Glutasyon peroksidaz,  $H_2O_2$ 'yi suya indirger. Aynı zamanda lipit hidroperoksitleri daha az reaktif olan hidroksi yağ asitlerine metabolize edebilir. Dolayısıyla membranları lipit peroksidasyona karşı korur<sup>65,67</sup>. Glutasyon peroksidazın  $H_2O_2$  ve diğer hidroperoksitleri indirgemesi glutasyon redüktaz ve NADPH'a bağımlıdır<sup>65,67,68,69,70</sup>. Okside glutasyon (GSSG), NADP<sup>+</sup> üretilen glutasyon redüktaz reaksiyonu ile redükte glutatyon (GSH) çevrilir<sup>70</sup>.



Canlıların yaşamı için glutatyonun redükte olan şeklinin (GSH) yüksek ve okside olan şeklinin (GSSG) ise düşük konsantrasyonda olması gerekir. GSH, serbest radikaller için proteinlerin sülfidril gruplarına göre daha fazla tercih edilen bir substrattır, dolayısıyla GSH'ın tercih edilmesi ile proteinlerin sülfidril gruplarının oksidasyonu önlenir. Yüksek GSSG düzeylerinde, proteinleri inaktive edebilen glutatyon-protein-sülfidril karışımı oluşabilir. Bu yüzden yüksek GSH ve düşük GSSG düzeyi önemlidir<sup>71</sup>. GSH'un antioksidan olarak aşağıdaki özellikleri sayılabilir:

1- Serbest radikal ve reaktif oksijen ürünleri için etkili bir temizleyicidir.

2- GSH; östrojen, melanin, prostoglandin ve lökotrien gibi fizyolojik metabolitler ile bromobenzen ve asetoaminofen gibi ksenobiyotikler ile merkapturat oluşturmak için reaksiyona girer. Bu reaksiyonlar glutatyon-S transferaz ile başlatılır.

4- GSH-S-nitroglutatyon ürünü oluşturmak üzere NO ile konjuge olur<sup>71</sup>.

### **II.2.3. OKSİDATİF STRES VE YAŞLANMA**

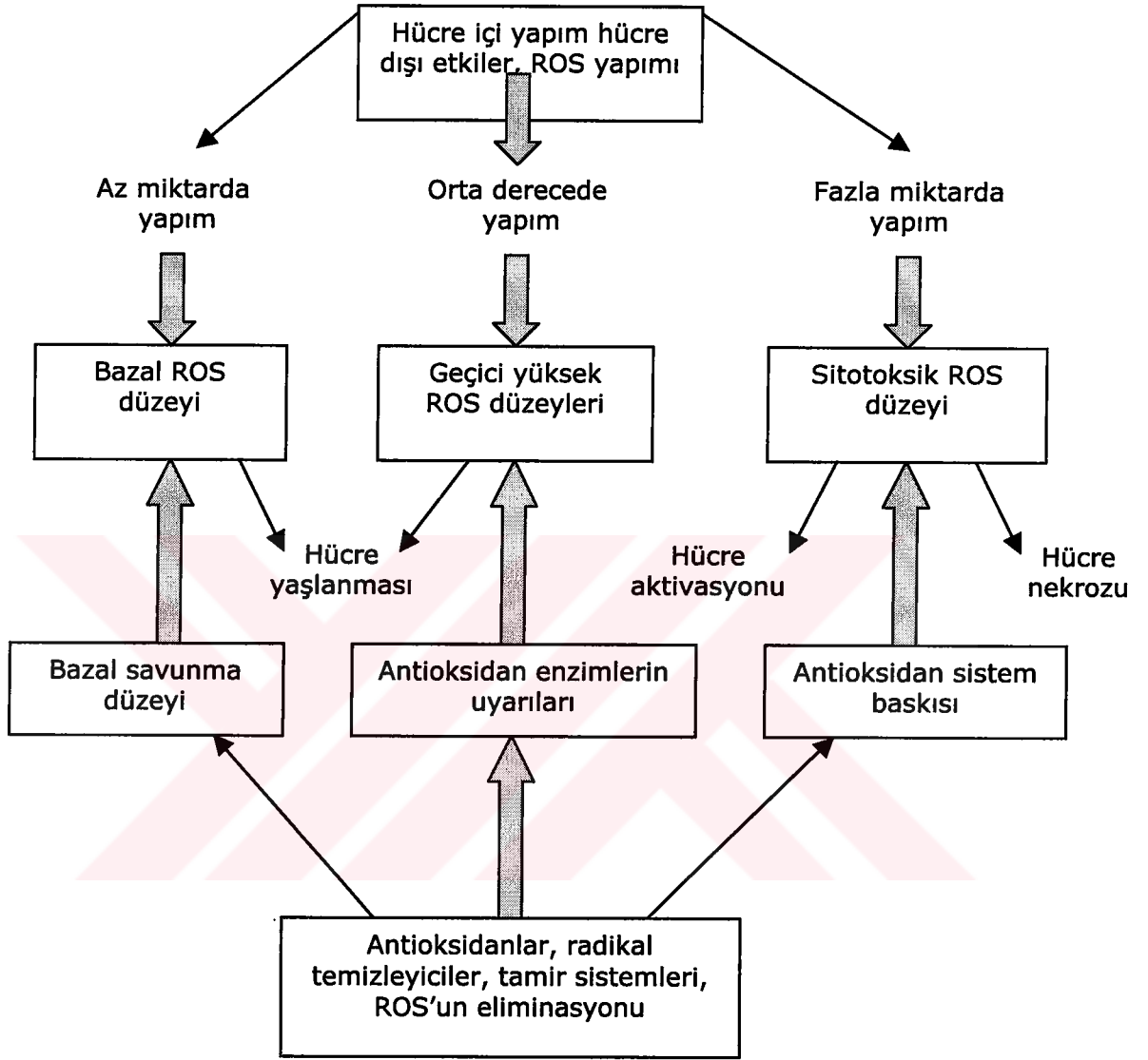
Yaşlılıkta sıklığı artan bir çok hastalığın patogeneğinde serbest radikallerin yer alması oksidatif stres ve yaşlanma ilişkisini güçlendirmiştir<sup>72</sup>.

Oksidatif stres; iskemi reperfüzyon, Alzheimer, Parkinson, diabetes mellitus, vb. bir çok hastalığın patogeneğinde rol oynar. Oksidatif stres ve yaşlanma arasında doğrudan bir ilişki vardır. Yapılan çalışmalarda genellikle yaşlanma ile birlikte dokulardaki serbest radikal düzeylerinin arttığı bildirilmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda lipit peroksidasyon

ürünlerinin yaşlı sıçanlarda hem mide ve hem de kan düzeylerinin gençlere oranla anlamlı olarak arttığı bulunmuştur<sup>5,6</sup>. Yapılan çalışmalarda yaşlı sıçan beyin ve karaciğer homojenatlarında ve yaşlı insan plazmalarında da lipit peroksidasyon ürünlerinin arttığı gösterilmiştir<sup>73,74</sup>. Yine yaşlılar, iskemi-reperfüzyon hasarına daha duyarlıdır ve reperfüzyondan sonra kalp dokusunda oluşan oksidatif hasar yaşlılarda gençlere göre daha yüksek bulunmuştur<sup>75</sup>.

Yaşlanma sürecinde serbest radikal artışına zıt olarak antioksidan enzim etkinliğinde de azalma izlenir (Şekil 4). Yaşlanma sürecinde, reaktif oksijen, nitrojen, lipit peroksidasyon ve AGE'leri (Advanced Glycolysation end Products: ilerlemiş glikolizasyon son ürünleri) ürünlerine bağlı olarak gen ekspresyonunda ve fonksiyonlarında bozulmalar ortaya çıkar<sup>76</sup>.

Antioksidan kapasitenin arttırılmasının yaşlanmayı geciktirici rol oynayabileceğinin anlaşılması büyük ilgi alanı uyandırmıştır. Ancak Sohol ve ark.'nın çalışmaları katalaz ve SOD'un fazla eksprese edilmesinin yaşam süresini etkilemediğini göstermiştir<sup>77</sup>.



Şekil 4. Oksidatif stres ve antioksidan sistem etkileşimi ve yaşlanma ile ilişkisi

## **II.3.TAURİN**

### **II.3.1.Taurinin Genel Özellikleri**

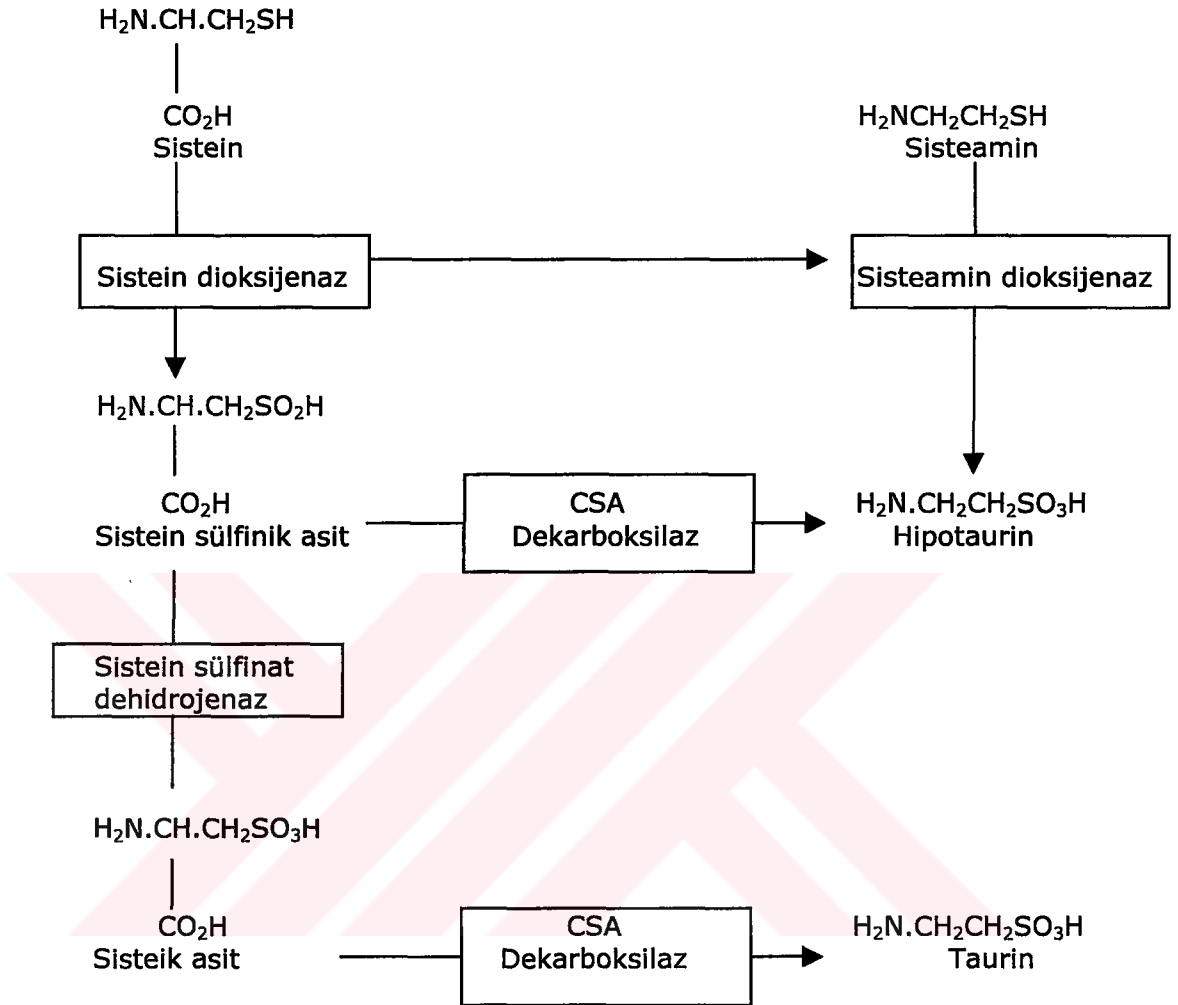
Taurin; renksiz, suda eriyebilir özelliğine sahip, molekül ağırlığı 125 dalton olan nonesansiyel bir  $\beta$  amino asittir<sup>10,11,13,78</sup>. İlk kez öküz safirasından elde edilmiştir<sup>9</sup>.

Taurinin amin grubu (-NH<sub>2</sub>), 2. veya β karbon halkasına oturmuştur<sup>12</sup>. Taurin yüksek asidite taşır ve fizyolojik pH sınırında tam olarak iyonize halde bulunur. Tersine karboksilik gruplar bu aralıklarda noniyonize durumdadır. Taurinin "eş" iyonik özelliği ona düşük lipofilik özellik kazandırır. Bu nedenle taurin için lipofilik membranlardan difüzyon yavaştır. Taurinin biyolojik membranlarda permeabilitesinin olmaması, bu membranlardan geçmek için yüksek konsantrasyon gradiyenti sağlanması zorunluluğunu getirir. Örneğin retina için bu konsantrasyon gradiyenti 400 / 1, beyin için 500 / 1'dir. Taurinin hücreye transportu Na<sup>+</sup> iyonu ile birlikte olup her taurin molekülü transport edildiğinde 1-3 Na<sup>+</sup> hücre içine taşınır ve bu Na<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPaz ile geri pompalanır<sup>11</sup>.

Taurin; organizmada metionin, sistein gibi sülfür içeren amino asitlerin metabolizmasından elde edilir<sup>9,10</sup>. Organizmadaki taurin havuzu diyetle alınan kükürtlü amino asitlerin endojen metabolizması ile belirlenir<sup>11</sup>. Taurin esas olarak beyin ve karaciğerde sentez edilmektedir(Şekil 5)<sup>9,12</sup>.

Taurin yüksek konsantrasyonlarda beyin gelişimi için önemlidir. Ortalama 70 kg'lık bir insanda 70 gr taurin bulunur<sup>12</sup>.

Taurin ilk defa Jacobsen ve Smith (1968) tarafından tanımlanmıştır. Safra asit sentezinde sınırlayıcı, osmoregülatör, enerji verici ve santral sinir sisteminde nöroinhibitör etkili olduğu gösterilmiştir<sup>13</sup>. Bugün taurinin pek çok önemli fonksiyonlarının olduğu saptanmıştır (Tablo 3)<sup>11</sup>.



Şekil 5. Taurin biyosentez yolu

Safra asit konjugasyonu için düşük miktarlarda taurine ihtiyaç vardır. Taurinin verilmiş dozu artınca idrarla atılımı da artar. Diyetteki taurin artışı, kas harabiyeti, radyasyon ve kortikosteroidler hipertaurinemiye neden olan etkenlerdir. Taurinin idrarla atılımı artsa bile kas, beyin, karaciğer, kalp gibi dokularda taurin miktarı değişmemektedir<sup>12</sup>.

Taurinin, kalpte insülin reseptörleri ile etkileşerek glukoz ve glikojen metabolizmasını değiştirdiği gösterilmiştir<sup>9,79</sup>.

Tablo 3. Taurinin çeşitli sistemlere etkisi

<b>Kardiyovasküler sistem</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Antiaritmik</li><li>-Düşük Ca<sup>+2</sup> düzeylerinde pozitif inotropik</li><li>-Yüksek Ca<sup>+2</sup> düzeylerinde negatif inotropik</li><li>-Dijital pozitif inotropisinin güçlendirilmesi</li><li>-Kalsiyum paradoksunun antagonizması</li><li>-Hipotansif etki (merkezi ve periferal)</li><li>-Aşırı Ca<sup>+2</sup> yükü kardiyomyopatisinde koruyucu</li><li>-Agrege trombosit direncini artırma</li></ul>
<b>Beyin</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Antikonvülzan</li><li>-Nöronal uyarılabilirliğin korunması</li><li>-Serebellar fonksiyonların korunması</li><li>-Kimyasal uyarılara karşı savunma</li><li>-Termoregülasyon</li><li>-Antiagresif etki</li><li>-Kardiorespiratuar cevapların merkezi düzenlenmesi</li><li>-Öğrenme</li><li>-Motor davranış değişikliği</li><li>-Uyku süresini değiştirme</li><li>-Antitremor etki</li><li>-Yeme ve içmenin baskılanması</li><li>-Anoksi ve hipoksiye direnç</li></ul>
<b>Retina</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Fotoreseptör dış segment ve tapetum lusidumun yapı ve fonksiyonlarının korunması</li></ul>
<b>Karaciğer</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Safra tuzu sentezi</li></ul>
<b>Üreme sistemi</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Sperm motilite faktörü</li></ul>
<b>Kas</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Membran stabilizasyonu</li></ul>
<b>Genel</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Nörotransmitter ve hormon salınımının düzenlenmesi</li><li>-Ozmöregülasyon</li><li>-Glikoliz ve glikoneogenezin stimülasyonu</li><li>-Hiperkolesteroleminin azaltılması</li><li>-Hücre proliferasyonu ve yaşayabilirliği</li><li>-Antioksidan</li><li>-Fosforilasyonun düzenlenmesi</li><li>-Ksenobiotiklerin konjugasyonu</li></ul>

Taurin aynı zamanda insanlar için tek üriner aminoasittir. Çünkü sulfonik amino asitlerin % 99'u geri emilirken, taurinin % 90-95'i geri emilmemektedir<sup>12</sup>.

Taurinin yarılanma ömrü serbest diyetle, visseral organlarda  $8.7 \pm 2$  gün, taurinden zengin diyetle  $4.8 \pm 2$  gün, rat için 12- 13 gündür<sup>10</sup>.

Yapılan araştırmalara göre anne sütünü de içine alan birkaç vücut sıvısında taurin önemli miktarlarda bulunmaktadır. Tersine bazı hazır besinlerde, inek sütünde çok az ya da hiç yoktur<sup>9</sup>.

Okisidanların sıklıkla oluştuğu bir doku olan retina da taurin bol miktarda bulunmaktadır<sup>80</sup>. Retinal rod dış segmentlerinin membranları doymamış yağ asitlerinden zengin ve peroksidatif hasara karşı korumasızdır. Taurin rod dış segmentlerinin fonksiyonları üzerine koruyucu etki gösterir<sup>15</sup>.

Taurin; trombositlerde, sekretuar yapılarda, özellikle uyarılabilen dokularda ve sıklıkla oksidatif hasara maruz kalan dokularda yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Ancak plazma düşük miktarlarda taurin içermektedir (Tablo 4)<sup>12</sup>. Ayrıca yenidoğan sığınlarda kalbin taurin içeriği yüksektir ve yaşamın ilk beş gününde hızla azalır<sup>10</sup>.

Tablo 4 . Çeşitli dokulardaki taurin konsantrasyonu (mM/kg doku).

Kalp	30	Mide	9
Akciğer	13	Timus	11
Karaciğer	2	Serebellum	3
Böbrek	11	Pons	4
Dalak	16	Orta beyin	3
İncebarsak	15	Frontal korteks	6
Kalınbarsak	12	Spinal kord	4
Kas	15		

### **II.3.2.Taurinin Genel Etkileri**

#### **II.3.2.1.Taurinin Membran Stabilize Edici Fonksiyonu**

Taurinin membran stabilize edici fonksiyonu aşağıdaki altı örnekte incelenebilir:

- 1)** Hayes ve ark. taurin eksikliği olan kedilerde fotoreseptör hücrelerinde bozukluklar olduğunu göstermişlerdir.
- 2)** Kurbağa retinasında oksidanlara karşı koruyucu olduğu bildirilmektedir.
- 3)** Tavşan spermatozoalarında lipit peroksidasyonunu önleyerek antioksidan özellik gösterir.

- 4) Karbontetraklorüre karşı karaciğer hücrelerini koruyucu etkisi vardır.
- 5) Taurinin iskelet kası harabiyetine karşı eksternal koruyucu bir ajan olduğu ileri sürülmektedir.
- 6) Taurinin membran stabilize edici fonksiyonu lenfoblastik hücre kültürlerinde çalışılmış ve bu hücreleri demir-askorbat ile oluşturulan hasardan koruduğu gösterilmiştir<sup>10</sup>.

Taurin membran stabilize edici fonksiyonunu; amin grubu ile zararlı ajanlarla reaksiyona girip, bunları detoksifiye ederek ve hücre sel harabiyet ve ölüme neden olan iyon ve su geçirgenliğinin direkt etkilerini önleyerek gerçekleştirir<sup>10,11</sup>.

### **II.3.2.2.Taurinin Hücre Ca<sup>+2</sup> Homeostazisi Üzerine Etkisi**

Taurin Ca<sup>+2</sup> modülatör etkisini, Ca<sup>+2</sup>'a hassas olan sistemlere Ca<sup>+2</sup> sağlanmasındaki değişimlerle veya Ca<sup>+2</sup>'a olan hassasiyeti değiştirerek gösterir. Sinyal şiddeti değiştikçe sitozolik Ca<sup>+2</sup> miktarında da değişiklikler oluşur. Cevabın şiddetinin değişikliği ise Ca<sup>+2</sup> bağlayan troponin, kalmodulin, Ca<sup>+2</sup> bağlayan miyozin ATPaz ve diğer Ca<sup>+2</sup> bağımlı ATPaz'ların afinitesinin değişmesine neden olur<sup>11</sup>. Taurin, sarkoplazmik retikulum, mitokondri ve diğer organellerin Ca<sup>+2</sup> depolama kapasitesini arttırı ve Ca<sup>+2</sup>'a bağımlı ATPaz pompalarının pompalama hızını stimule ederek Ca<sup>+2</sup>'un veziküllere depolanma kapasitesini ve pompanın turnover hızını arttırır<sup>11</sup>.

Taurinin iskelet kasında da Ca<sup>+2</sup> akışının regülasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir<sup>11</sup>. Bu membran stabilize edici etkisi, sarkoplazmik retikulumu denervasyona bağlı hasardan korur ve sarkoplazmik retikulumun Ca<sup>+2</sup>-ATPaz aktivitesini hızlandırarak, Ca<sup>+2</sup> transport kaybı hızını azaltır<sup>12,81</sup>.

### **II.3.2.3.Taurinin Lipit Metabolizması Üzerine Etkisi**

Taurinin önemli fizyolojik rollerinden biri fosfolipit metabolizması üzerindeki modülatör etkisidir. Sebring ve Huxtable (1986) taurinin primer etkileşiminin nötral fosfolipitlerle olduğunu bildirmişlerdir<sup>82</sup>.

Taurinin, protein kinaz C aktivasyonu için gerekli diaçilgliserol miktarını etkileyerek; bu reaksiyonun diğer ürünü olan IP<sub>3</sub> ve intrasellüler Ca<sup>+2</sup> salınımını kontrol edebildiği de bildirilmektedir<sup>82</sup>.

Taurinin etkilediği diğer bir fosfolipit metabolizması ise fosfatidiletanolaminin metilasyonu reaksiyonudur. Taurin kimyasal yapısı itibariyle, fosfatidiletanolaminin yüklü baş gruplarına benzer ve bundan dolayı seçilen katabolik bölgeye bağlanabilir. Bu da metilasyon reaksiyonunu kompetitif inhibisyonla sonuçlandırır. Yani taurin sarkolemmal fosfolipit metiltransferaz enzim aktivitesini inhibe eder. Fosfatidiletanolamini, fosfotidilkoline çeviren bu enzim Na<sup>+</sup>-Ca<sup>+2</sup> alış veriş sisteminden etkilenir. Böylece taurin, bu metilasyon reaksiyonunu inhibe ederek Na<sup>+</sup>-Ca<sup>+2</sup> alış veriş sisteminin aktivitesini korur<sup>82,83</sup>. Fosfatidiletanolaminin membrana Ca<sup>+2</sup> bağlanmasında etkili fosfolipitlerden biridir. Taurinin azalması halinde bu fosfolipitin de azalması ile nöronal membranda destabilizasyon meydana gelebileceği ileri sürülmektedir<sup>84</sup>.

### **II.3.2.4.Taurinin Antioksidan Özelliği**

Taurinin in vivo ve/veya in vitro şartlarda antioksidan olarak davrandığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır<sup>10,14,15</sup>.

Taurin ve öncüllerinin özellikle oksidatif hasara maruz kalan dokularda bol bulunduğu dikkat çekicidir. Taurin ve hipotaurin dişilerde follüküller ve uterusu, erkek üreme sisteminde ise spermatozoa, özellikle semen sıvısı ve prostatta yüksek konsantrasyonlarda bulunur<sup>85,86,87</sup>.

Memeli spermi glutasyon redüktaz ve katalazdan yoksundur. Oysa spermde taurin ve hipotaurin oldukça yüksek düzeydedir. Bilindiği gibi süperoksit sperm için oldukça toksiktir, lipid peroksidasyonuna ve motilite azalmasına yol açar. Böylece taurin ve hipotaurin aracılığıyla sperm motilitesi korunmuş olmaktadır. Hatta taurin ve hipotaurin farelerde "sperm motilize edici faktör" olarak kabul edilmektedir<sup>15</sup>. Diğer taraftan taurin insan akrozomlarında bulunan majör amino asitlerden biridir<sup>15,85</sup>.

Taurinin, retina rod dış segmentlerini aydınlatma yolu ile oluşan oksidanlara karşı koruduğu tespit edilmiştir<sup>11,88</sup>.

Güçlü bir oksidan olan hipokloröz asit (HOCl), nötrofillerin aktiviteleri sırasında salgıladıkları myeloperoksidaz enziminin katalizlemesiyle, klor iyonu (Cl<sup>-</sup>) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den oluşmaktadır<sup>10,11,88</sup>. HOCl ise karbohidratlar, amino asitler, nükleik asitler, peptit zincirleri gibi biyolojik olarak önemli substratları direkt okside edebilme özelliğindedir. HOCl, primer aminlerle reaksiyona girerek kloraminleri oluşturur. Bu reaktif aminlerden biri de taurindir. 1 mol HOCl anyonu ile 1 mol taurin reaksiyona girerek, taurinin amin grubunun 1 veya 2 Cl<sup>-</sup> iyonu kazanmasıyla, N-klorotaurini oluşturur. Bu bileşiğin yarılanma ömrü 2.5 gündür<sup>10,11</sup>.

HOCl özellikle aminlerle (-NH<sub>2</sub>) ve sülfür içeren (R-SH) moleküllerle çok hızlı reaksiyona girmektedir. HOCl'in hedef hücre membranındaki zararlı etkisi; membranın -SH veya -NH<sub>2</sub> gruplarına hücum etmesi ile ortaya çıkmakta, sonuçta bu olayı membranın denatürasyonu izlemektedir. Thomas ve ark. (1984) N-Klorotaurinin ekstrasellüler ortamdan anyon transport sistemi ile eritrosit içine

transport edildiğini göstermişlerdir. N-Klorotaurin eritrosit içinde glutatyon ile indirgenir<sup>88,89</sup>.

Taurinin HOCl ile oluşturulan korneal hasarın iyileştirilmesinde etkili olduğu bilinmektedir. Bu bilgiler taurinin biyolojik sistemlerde HOCl temizleyicisi olduğunu desteklemektedir<sup>11,89</sup>.

Taurinin, hipoksi ve reoksijenasyonda serbest radikallere karşı kalp kasını ve beyni koruduğu ileri sürülmektedir<sup>90</sup>. Bu etki taurinin intrasellüler rollerinden biri olarak, membran lipit peroksidasyonunu engellemesi ile ortaya çıkar<sup>91,92</sup>. Hipoksi ve reperfüzyonda beyinde, tiyol içeren amino asitlerin ve sistein ve sisteamin gibi aminlerin artışı sonucu taurinin de arttığı gösterilmektedir. Reperfüzyondan sonra bu maddelerin oksijenden türeyen serbest radikallerle okside olarak taurinin oluşturduğu tespit edilmiştir<sup>93</sup>. Taurin, postiskemik dokuda sadece serbest radikal düzeylerini azaltmakla kalmayıp; aynı zamanda hücreye Ca<sup>+2</sup> girişini engelleyerek, lipit peroksidasyon oluşumunu ve membran fonksiyonlarının bozulmasını da engellemektedir<sup>10,93</sup>.

Taurinin CCl<sub>4</sub> ile indüklenmiş karaciğer ve karaciğer mikrozomlarındaki MDA yapımını azalttığı, pnömotoksik maddelere bağlı sekonder olarak akciğerde gelişen lipit peroksidasyonunu azalttığı bildirilmiştir<sup>15</sup>. Ayrıca taurin, doksorubisin gibi antikanser ilaçların kalpte lipit peroksidasyonunu artırıcı etkilerini önlemektedir<sup>16</sup>.

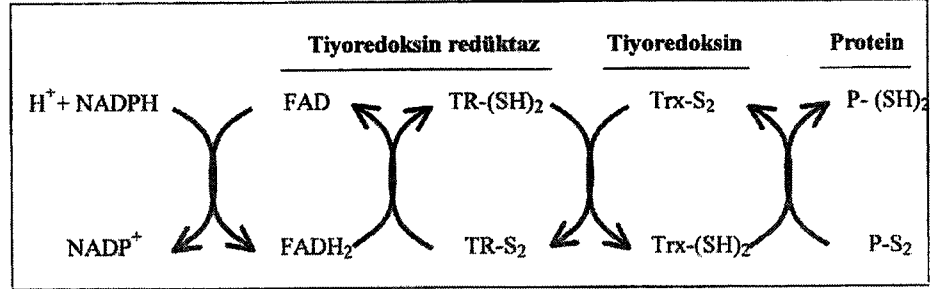
Ayrıca taurinin yanısıra onun metabolik öncüleri olan sisteik asit, sistein sülfirik asit ve sisteaminin de in vivo antioksidan olarak rol aldığı ve oksijen radikal türlerini inaktive ettiği gösterilmiştir<sup>94</sup>.

Sonuç olarak; taurinin biyolojik sistemler üzerindeki antioksidan ve membran stabilizatör etkisi aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- 1) Taurin HOCl ile reaksiyona girerek HOCl'i temizler. Böylece membran denatürasyonunu önler<sup>88</sup>.
- 2) Membran stabilize edici etkisi ile membranı permeabilite ve transport değişikliklerine karşı korur<sup>88,95</sup>.
- 3) Direkt antioksidan etkisi ile, membran fosfolipitleri ile etkileşerek, lipit peroksidasyonunu engeller<sup>95</sup>. Lipit peroksidasyonunun son ürünü ve göstergesi olan MDA düzeyini azaltır<sup>11,12,96</sup>.
- 4) Taurinin aynı zamanda sulfonik asit grubuyla, serbest metal iyonları ve oksidan metallerle bağlanarak indirekt bir antioksidan etki de yaratabildiği bildirilmektedir<sup>96</sup>.

#### **II.4.TİYOREDOKSİN SİSTEMİ**

Tiyoredoksin aktif merkezinde iki redoks aktif yarı sistein amino asidi içeren, yaygın olarak bulunabilen küçük bir proteindir. Klasik aktif bölgesi Trp-Cys32-Gly-Pro-Cys35 amino asit dizilimine sahiptir. Yarı sistein amino asidi molekül içi disülfid köprüleri yaptığıında okside formda (tiyoredoksin-S<sub>2</sub>) veya redükte formda (tiyoredoksin-(SH)<sub>2</sub>) bulunur.Tiyoredoksinin aktif merkezi, ditiyolün disülfide reversibl oksidasyonu ile redoks reaksiyonlarına katılır ve ditiyol-disülfid dönüşüm reaksiyonlarını katalizler. Tiyoredoksin-S<sub>2</sub>, NADPH ve flavoprotein tiyoredoksin redüktaz (EC 1.6.4.5) ile redüklenir. Tiyoredoksin-(SH)<sub>2</sub> ise bir çok tiyol bağımlı hücrel redüklenme reaksiyonlarına katılan güçlü bir protein disülfid redüktandır (Şekil 6)<sup>97,98,99,100,101</sup>.



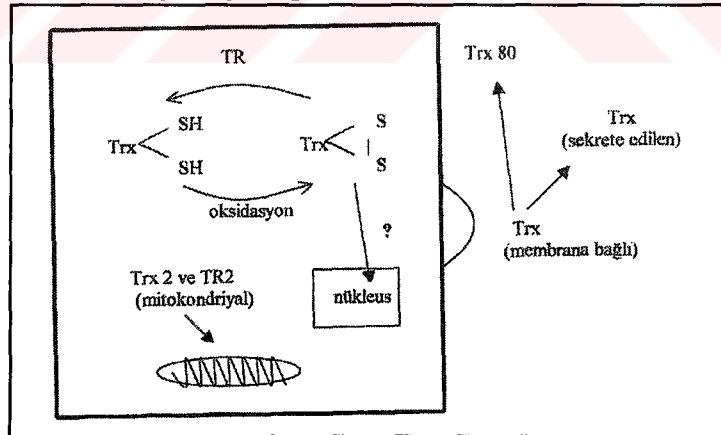
Şekil 6. Tiyoredoksin sistemi ile katalizlenen protein disülfid redüksiyon mekanizması

Tiyoredoksin 1964'de E. coli'den saflaştırılmasından beri bilinmektedir. Bir çok prokaryot ve ökaryotta bulunur ve yaşayan tüm hücrelerde tespit edilebilir. Bakteri, mantar, bitki ve hayvan hücrelerinin hepsi yaklaşık 12000 MA tiyoredoksin içerir. E. coli tiyoredoksin-S<sub>2</sub>'ni 108 amino asit içeren kristallografik olarak üç boyutlu yapısı tespit edilmiş en iyi tanınan tiyoredoksindir. Tiyoredoksin-S<sub>2</sub>, aktif merkezinin S-S köprüleri üç boyutlu yapının çıkıntı yapan bölümüne yerleşmiş, "erkek" bir proteindir. Proteinin merkez çekirdeği, beş kenarı, dört α-heliks segmentle yandan kuşatılmış β-kırmalı tabaka içerir. Okside ve redükte yapıları birbirine çok benzerdir. Proteinin merkezindeki yan zincirlerin katlantıları da hemen hemen benzerdir. Fakat aktif bölge ve çevre bölgelerin lokal konformasyonlarında farklılıklar gözlenmiştir. Bu durum Cys32 ve Cys35 arasındaki mesafenin redüklenme sonucu 0.1<sup>0</sup>A kısalmasına bağlanmaktadır. Bunun sebebi de disülfid bağı oluştuğunda Cys 35'in X<sub>1</sub> açısının -50,9<sup>0</sup>'den, okside durumda -39,1<sup>0</sup>'ye değişmesidir. İndirgenmiş yapıda daha yüksek hareketlilik gözlenmektedir<sup>100,102,103</sup>.

Tiyoredoksin-S<sub>2</sub> asidik bir proteindir. pH 4.5'un altındaki değerlerde, dimer oluşturmak üzere çöker. Liyofilizasyon sonrası pH 8 ve üzerinde geri dönüşümlü olarak çözünmeyen multimerler oluşturur. Tiyoredoksin-(SH)<sub>2</sub> nötr

pH'da havadaki oksijen ile okside olur ve bu olay yüksek pH değerlerinde çok daha hızlı meydana gelir. Tiyoredoksin-(SH)<sub>2</sub> EDTA varlığında ve N<sub>2</sub> altında karardır. Tiyoredoksin-(SH)<sub>2</sub> ve tiyoredoksin-S<sub>2</sub> her ikisi de aynı olağanüstü ısı dayanıklılığını gösterir, +80°C'de saatler sonra yapı değişmez. E.coli tiyoredoksin için hesaplanan redoks potansiyel değeri pH 7.0'de -0.26V'tur. Dithiothreitol ve lipoik asit için benzer değerler -0,33 ve -0,29V, NADPH için ise -0,31V'tur<sup>99</sup>.

Tiyoredoksindeki aktif bölge yüzeyleri birçok proteine uymak için düzenlenmiştir. Bu yüzden tiyoredoksin geniş bir grup proteine bağlanmak için, konformasyonel değişikliklerin şaperon benzeri mekanizmasını kullanmaktadır. Bunun yanında disülfid redüksiyonunun hızını artırmak için hidrofobik çevrede hızlı tiyol-disülfid değişim kimyasını da kullanmaktadır<sup>104,105</sup>. Şekil 7'de tiyoredoksin sisteminin hücre kompartmanlarında yerleşimi görülmektedir<sup>106</sup>.



Şekil 7. Hücre kompartmanlarında tiyoredoksin (Trx) ve tiyoredoksin redüktaz (TR) yerleşimi

Tiyoredoksin redüktaz FAD içeren bir enzimdir. Enzim yapısal ve işlevsel olarak diğer piridin nükleotit disülfid okside-redüktazlardan olan glutatyon redüktaz ve lipoamit dehidrogenaza benzer. E. coli tiyoredoksin

redüktazı 70000 molekül ağırlığına sahiptir ve nonkovalent bağlarla birbirine bağlanmış iki altünite içerir. Her bir altünite bir FAD molekülüne ve aktif merkezde redoks aktif disülfide sıkıca bağlıdır. Bu disülfid, sırası ile Cys-Ala-Thr-Cys şeklindedir. Enzimin NADPH için Km değeri 25°C' de 1.2 µM' dür ve oldukça özeldir. NADP<sup>+</sup> ise 15 µM K<sub>i</sub> değeri ile enzimin kompetitif inhibitörüdür. Enzim 25°C'de E.coli tiyoredoksin-S<sub>2</sub> için yüksek oranda özgüdür. Tiyoredoksin sisteminde elektron akışının NADPH'dan FAD'ye, FAD'den enzimdeki redoks aktif disülfide ve daha sonra tiyoredoksine olduğu düşünülmektedir<sup>99,107,108</sup>.

Memeli hücrelerinde de klasik tiyoredoksin sistemi mevcuttur. Tiyoredoksin homolog olarak sıçan Navikoff hepatoma, sığır karaciğeri, tavşan kemik iliği ve insan plasentasından saflaştırılmıştır. Memeli tiyoredoksinlerinin aktif bölgesindeki amino asit dizisi E. coli tiyoredoksini ile % 90 benzerdir ve aynı yapısal katlanmalara sahiptir<sup>99,109</sup>. Bununla birlikte E. coli tiyoredoksin sistemi ile kesin farklar da vardır:

**a)** Tüm memeli tiyoredoksinlerinde, aktif merkezdeki disülfide ek olarak molekülün C terminal yarısında iki yarı sistin amino asidi daha vardır. Bu iki yarı sistin amino asidinin molekül içi disülfide oksidasyonu, protein agregasyonuna ve tiyoredoksin redüktaz için substrat olarak aktivitesinin kaybına yol açar. Okside proteinler kromatografi sisteminde çoklu pikler yaptığı için, memeli tiyoredoksinin saflaştırılması sadece redüklenmiş formda mümkün olabilmektedir<sup>99,109</sup>.

**b)** Memeli hücrelerindeki tiyoredoksin redüktaz oldukça büyüktür ve 116000 molekül ağırlığına sahiptir. Hidroperoksitler, C vitamini veya selenid gibi disülfid olmayan substratları da redükleyen geniş substrat özgüllüğüne sahip bir enzimdir<sup>106</sup>. E. coli tiyoredoksini de redükleyebilir ancak K<sub>m</sub> 14 kat

artar. 5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB),  $\text{Cu}^{+2}$ , vitamin  $\text{K}_3$  (menadiyon) ve alloksan diğler substratlarıdır (Tablo 5)<sup>99,109,110</sup>

Tablo 5. Memeli tiyoredoksin redüktazının substratları

<b>Disülfid proteinler</b>
Tiyoredoksin
Protein disülfid izomeraz
NK-lizin
<b>Düşük moleköl ağırlıklı disülfidler <sup>a</sup></b>
DTNB (5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit)
Lipoik asit
L-Sistin
<b>Selenyum içeren bileşikler</b>
Glutasyon peroksidaz
Selenodiglutasyon
Selenosistin
Selenit
<b>Peroksidazlar</b>
15-HPETE (hidro peroksi eikoz tetra enoik asit)
Hidrojen peroksid
<b>Diğler substratlar</b>
Alloksan
Menadiyon (vitamin $\text{K}_3$ )
Dehidroaskorbat
GSNO (S-nitrozo glutasyon)

<sup>a</sup> İnsülin ve GSSG memeli tiyoredoksin redüktazı için doğrudan bir substrat değildir, bunların redüksiyonu için tiyoredoksin gibi bir elektron donörü gereklidir<sup>111</sup>.

Bazı proteinlerin redüklenebilir disülfid bağları vardır. Bunlar; insülin, insan koryogonotropini, fibrinojen ve kan pıhtılaşma faktörlerinden özellikle faktör 8 ve faktör 10'dur. Disülfid proteinlerin tiyoredoksin-(SH)<sub>2</sub> ile redüklenmesi geniş farklılık gösterir. İnsan serum albümini içindeki 17 disülfid redüklenmezken, faktör 8 kompleksi içindeki 100 disülfidin 75'i hızla redüklenir. Tiyoredoksin fizyolojik pH'da insülin ve proinsülini yüksek bir aktiviteyle redükler. İnsülin disülfidlerinin redüklenmesi Zn<sup>+2</sup> iyonlarınca kontrol edilir. Zn<sup>+2</sup> tiyoredoksin sisteminin güçlü bir inhibitörüdür ve aynı zamanda insülin yapısını da kararlı hale getirir. Pankreas β hücrelerinde insülinin kontrolsüz degradasyonu (redüklenmesi) diyabet etiyolojisinin aydınlatılmasında rol oynayabilir<sup>99,110</sup>. İnsülin disüfidi tiyoredoksin-(SH)<sub>2</sub>'yi etkin bir şekilde okside ettiği için, bu protein tiyoredoksin sisteminin aktivitesini test etmekte klasik bir substrat olarak kullanılır<sup>112</sup>.

Tiyoredoksin redüktaz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den kaynaklanan oksidatif stresin sebep olduğu hasarın önlenmesi ve onarımı ile ilgilidir. Tiyoredoksin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin redüklenmesini katalizleyen tiyoredoksin peroksidazlar ailesi için elektron verir. Glutasyon peroksidaz ve katalazın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi redüklemesine karşın, hücre içerisinde aşırı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> olduğu zaman tiyoredoksin peroksidazların bunun düzeyini azaltarak apoptozisin indüksiyonunu inhibe edebildiği gösterilmiştir<sup>97,106,113,114</sup>.

Vitamin E (α-tokoferol) gibi doğal fenolik bileşiklerden türemiş fenoksil radikallerinin de tiyoredoksin tarafından redüklenebildiği bildirilmiştir<sup>115</sup>.

İnsan tiyoredoksin redüktazının lipit hidroperoksitleri hidrojen peroksit ile aynı hızda redüklediği ve redükleme hızının selenosistin varlığı ile sekiz kat arttığı gösterilmiştir<sup>116</sup>.

Hücre içerisindeki glutatyon, aktive edilmiş NO ara ürünleri ile kolayca reaksiyona girip nötrofillerde olduğu gibi kararlı S-nitrozo glutatyon gruplarını oluşturur. Nikitovic ve ark. tarafından tiyoredoksin sisteminin, S-nitrozo glutatyon redüklenmesini katalizlediği ve bu sırada NADPH'ın S-nitrozo glutatyon tarafından oksidasyonu ile GSH ve nitrik oksidin serbestleştiği gösterilmiştir<sup>97,112</sup>.

Selenid ve selenodiglutatyon (GS-Se-SG) selenyum metabolizmasındaki temel ara maddelerdir. Her ikisi de tiyoredoksin redüktaz tarafından redüklenir. Sonuçta selenid, fosforile formda, proteinojenik amino asit olan selenosisteinin selenol grubu için öncül maddedir<sup>97</sup>.

Doğal öldürücü (NK) hücreler tarafından salgılanan NK-lizin, insan tiyoredoksin redüktazı tarafından etkin şekilde redüklenir ve inaktive edilir. Böylece memeli hücre membranı ile ilgili tiyoredoksin redüktaz, işgalci mikroorganizmaları NK-lizin gibi yüksek derecede toksik maddelerin etkilerine karşı fizyolojik olarak korur<sup>97</sup>.

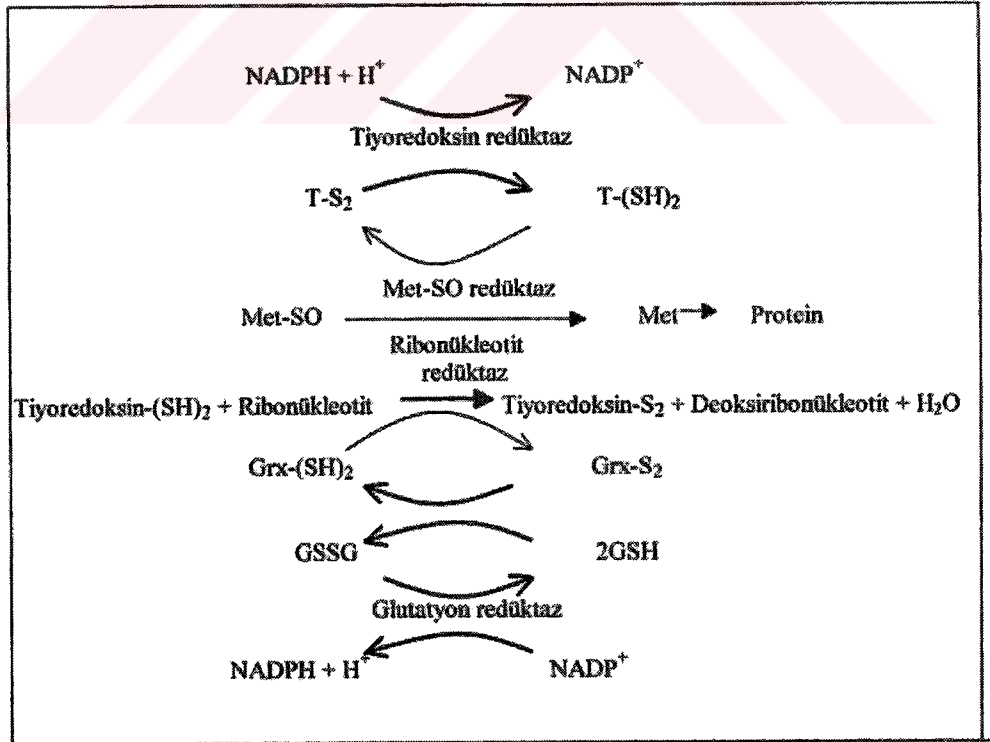
Fizyolojik bir bileşik olan lipoat disülfid periferik nöropatili şeker hastalarının ve akut mantar zehirlenmesi olan kişilerin tedavisinde farmakolojik olarak kullanılır. Uygulanan lipoat disülfid tiyoredoksin redüktaz tarafından in vivo olarak metabolik aktif formuna redüklenir<sup>97</sup>.

Tiyoredoksin sistemi, oksidatif stresten korunma amacı ile, plazma glutatyon peroksidazı için bir elektron vericisi olarak in vitro işlev görebilmektedir. Kan plazmasındaki tiyoredoksinin (aynı zamanda GSH'ın da) fizyolojik konsantrasyonun düşük olması ve membran ile ilişkili tiyoredoksin

redüktazın tiyoredoksini etkin olarak redüklemesinin henüz belirlenmemiş olması nedeniyle, bu konunun in vivo önemini ileride yapılacak çalışmalar gösterecektir<sup>97</sup>.

Musrati ve ark. tiyoredoksinin, bir nükleozit analogu olan arabinozilsitozinin, 5-fluorüridin ve karsinojen  $\beta$ -naftilamin gibi kimyasal ajanların E. coli büyümesi üzerine olan inhibitör etkilerini azalttığını göstermişlerdir<sup>117</sup>.

Tiyoredoksin sistemi, tiyoredoksin ve NADPH-tiyoredoksin redüktazdan oluşmaktadır. Bu sistem ribonükleotit redüktaz, metiyonin sülfoksit redüktaz ve sülfat redüktaz gibi enzimler için hidrojen donörü işlevini gerçekleştirir. DNA sentezi için gerekli olan deoksiribonükleotidin sentezinden sorumlu ribonükleotit redüktaz birçok canlı hücre için temel bir bileşendir (Şekil 8)<sup>99,100,109,118</sup>.



Şekil 8. E.coli hücre redüksiyonlarında tiyoredoksin ve glutaredoksin sistemi

1-Kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) hücre içi GSH'ı tüketmek için kullanılan alkali ve aynı zamanda farklı immünmodülatör özellikler gösteren bir ajandır. Arner ve ark. düşük konsantrasyonda CDNB' nin insan ve sığır tiyoredoksin redüktazını tamamen inaktive ettiğini saptamışlardır. İnhibisyon, CDNB ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra da devam etmektedir. CDNB' nin memeli tiyoredoksin redüktazını inaktive ettiği ve bunu glutatyon redüktazdan 100 kat daha hızlı yaptığı gösterilmiştir<sup>119,120</sup>.

Alzheimer hastalığının patogenezinde reaktif oksijen türlerinin rolünü destekleyen kanıtlar artmaktadır. Lovell ve ark.'nın yaptığı çalışmada, Alzheimer hastalığında beyindeki tiyoredoksin protein düzeyleri ve nöron kültürlerinde amiloid  $\beta$ -peptit toksitesine karşı tiyoredoksin sisteminin olası koruyucu rolü araştırılmıştır<sup>121</sup>. Tiyoredoksin düzeyi tüm beyin bölgelerinde genel bir azalma gösterirken, tiyoredoksin redüktaz aktivitesi çalışılan tüm beyin bölgelerinde artış göstermiştir. Nöron kültürlerinde oluşan toksisiteye karşı canlılığını sürdüren hücre sayısında artış gözlenmiştir. Sonuç olarak, tiyoredoksin redüktazın amiloid  $\beta$ -peptit toksitesine karşı koruyucu olmasına rağmen, Alzheimerli hastalardaki enzim artışının tiyoredoksin düzeylerindeki azalma nedeni ile hiçbir koruma getiremediği belirtilmiştir<sup>122</sup>.

Mansur ve ark., tiyoredoksinin sinir sisteminde, normalde sitoplazmadan çok motor nöronun nükleusunda birikmesine rağmen, sinir zedelenmesini takiben sitoplazmik bölgede dramatik olarak tiyoredoksin artışı saptamışlardır. Saptanabilir protein artışını beş haftadan daha uzun süre gözlemişlerdir<sup>123</sup>.

Maurice ve ark., tiyoredoksin sistemini romatoid artritli ve diğer romatoid hastalıklı bireylerde araştırmışlardır<sup>124</sup>. Romatoid artritli hastaların

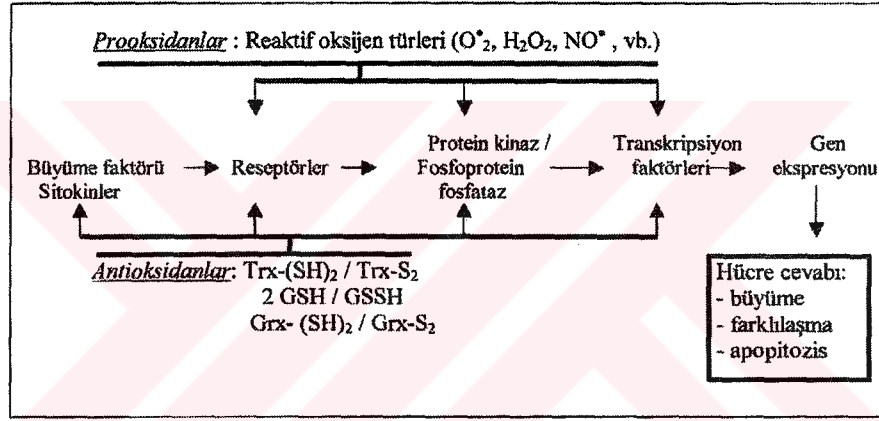
sinoviyal sıvılarında tiyoredoksin yüksek düzeylerde bulunmuştur. Aynı hastaların plazma tiyoredoksin düzeylerinde, osteoartritli, gutlu ve reaktif artritli hastalarla karşılaştırıldığında önemli artış saptanmıştır. Romatoid artritli hastalarda tiyoredoksinin varlığı sinoviyal sıvıda gelişen mononükleer hücrelerde ve sinoviyal dokuda tanımlanmıştır. Plazmalarında, tiyoredoksin redüktaz mRNA salınımı gözlenmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve TNF- $\alpha$  indüksiyonu ile sinoviyal fibroblast benzeri sinoviyokistlerin stimülasyonu tiyoredoksin üretiminde artışa neden olmuştur. Tiyoredoksindeki artışın romatoid artrit aktivasyonuna neden olduğu düşünülmüştür<sup>125</sup>.

Ultraviyole ışınların oluşturduğu serbest radikaller fotokimyasal redüklenme reaksiyonları sonucu deriyi kolaylıkla etkiler. Schallreuter ve ark., deri yüzeyinde serbest radikal temizleyicisi olarak işlev yapan membran bağlantılı tiyoredoksin redüktazın melanin sentezindeki olası düzenleyici rolünü göstermişlerdir<sup>126</sup>. Ayrıca keratinosit hücre kültürleri ile yapılan deneylerde, Ca<sup>+2</sup>' un bu sistemin allosterik inhibitörü olduğunu göstermişlerdir. Tiyoredoksin redüktaz biyoanalizinin, tirozinaz pozitif albinoların (Hermansky-Puldak Sendromu) saptanmasında kullanışlı bir yöntem olduğunu ileri sürmüşlerdir<sup>126</sup>.

Son çalışmalar, oksidatif stresin preeklemsi patogenezi ile ilgili olduğunu belirlemiştir. Ejima ve ark., tiyoredoksin ve tiyoredoksin redüktazın insan plasentasının hücre fonksiyonlarındaki aktivitesini inceleyerek yalnızca sitoplazmada değil aynı zamanda mitokondride de bulunduğunu ve oksidatif stresin sebep olduğu hasardan koruyabildiğini göstermişlerdir<sup>127</sup>.

Tiyoredoksin bazı insan tümörlerinde aşırı artmış olarak bulunan bir redoks proteinidir. Tiyoredoksin tümör hücrelerinden salınır ve kanser

hücrelerinin diğer büyüme faktörlerine hassasiyetini artırır. Redoks aktivitesi, tiyoredoksin tarafından oluşturulan hücre büyüme uyarısı için esansiyeldir. Tiyoredoksin ile etkilenmiş hücreler; in vivo artmış tümör büyümesi ve azalmış apoptozis çeşitli ajanların sebep olduğu hem in vivo hem de in-vitro apoptozise azalmış duyarlılık gösterir. Redoks-inaktif mutant tiyoredoksin ile etkilenmiş olan hücreler ise in vivo tümör büyümesinde inhibisyon etkisi gösterir (Şekil9)<sup>128</sup>.



Şekil 9. Tiyoredoksin (Trx) ve glutaredoksin (Grx) sistemi ile hücre sinyalizasyonu ve tiyol redoks regülasyonu

Malign hastalıkla ilgili olarak, hekim üç temel yönle ilgilenir: Önleme, erken tanı ve etkili tedavi. Tiyoredoksin sistemi her üç yönde de rol oynar.

Oksidatif stresin DNA hasarı için anahtar faktör olduğu düşünülmektedir. Öyleyse antioksidan tiyoredoksin sistemi tümör önleyici sistem olarak ele alınabilir. Bu aynı zamanda sinyal verme süreçleri için de geçerlidir. Tiyoredoksin redüktazın selenol grubu mutajen  $H_2O_2$  için primer algılayıcı olarak iş görebilir ve antioksidatif proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonuna yol açan sinyal kaskadını başlatabilir<sup>129,130</sup>.

Tiyoredoksin redüktazın tümörü uyaran etkileri değerlendirildiğinde, bu seleno enzimin temel bir ilaç hedefi olduğu açıktır. Karmustin, fotemustin ve sisplatin gibi birçok anti-neoplastik ajanın memeli tiyoredoksin redüktazlarının etkili inhibitörleri olduğu gözlenmiştir<sup>131</sup> Tiyoredoksin redüktazın klinik olarak kullanılan inhibitörleri yalnızca tiyoredoksinin redüklenmiş formu ile tepkimeye girer, tiyoredoksinin okside formu inaktive olmaz. Bu durumda NADPH ile redüklenmiş tiyoredoksin türleri birinci kemoterapötik hedef olarak tanımlanmalıdır. Redüklenmiş tiyoredoksin ile etkileşen ilaçların bunun denatürasyonuna ve sonuçtaki yıkımına sebep olabileceği hesaba katılmalıdır. Selenyum enzimden ayıran ajanlar, NADPH yokluğunda bile benzer etkiye sahip olabilir<sup>97</sup>.

### **III. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **III.1. Kullanılan Gereçler**

##### **III.1.1. Deney Hayvanları**

Çalışmamızda erkek, 6-7 haftalık genç ve 13-14 aylık orta yaşlı Wistar albino erkek sıçanlar kullanıldı. Çalışma grubunu oluşturan tüm sıçanlar laboratuvar ortamında normal musluk suyu ve standart sıçan yemi ile serbest olarak beslendi. Deney hayvanları Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi'nden sağlanmıştır. Bu çalışma Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 05.04.2005 tarihli ve 05.028 nolu kararı ile kabul edilmiştir. Karar örneği ektedir.

##### **III.1.2. Kullanılan Aletler**

- Homojenizatör (Virtis-Virtishear, The virtis Company, INC. USA)
- Hassas terazi (Schimadzu, Libror AEG 220)
- Santrifüj (Damon IEC, B-20A Hermle Z 323 K, soğutmalı Germany)
- Spektrofotometre ( Schimadzu UV 1601)
- Vortex ( Heidolph Reax 2000)
- Benmari (Heto Maxi-Shake)
- Derin dondurucu (Sanyo CFC Free Japan)
- pH-metre (Nel Elektronik) (Nel)
- Santrifüj (Hermle Z 380 K)
- Mikrofiltre (Amicon millipore ultrafiltration membranes, Filter code: YM3, Dia:14 mm NMWL:3,000)

##### **III.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Hidroklorik asit, EDTA, asetik asit, fosforik asit, amonyum sülfat, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaOH, etanol, metafosforik asit, n- butanol, KHCO<sub>3</sub>, KOH, Merck firmasından sağlandı.

DTNB, siğır serum albumin, Tris, NADPH, tiyoredoksin redüktaz, glutasyon redüktaz, Tiyobarbitürik asit (TBA), Folin Ciocalteu fenol reaktifi, NaN<sub>3</sub>, tetraetoksipropan **Sigma** , NH<sub>4</sub>OH **Pür Kimya** firmasından sağlandı.

### **III.2. Uygulanan Yöntemler**

#### **III.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması**

Siğanlar Tablo 6'da gösterildiği şekilde dört gruba ayrıldı.

Tablo 6. Çalışma grupları ve özellikleri

<b>Gruplar</b>	<b>Uygulama</b>	<b>Denek Sayısı</b>	<b>Ağırlık (g)</b>
<b>1. Grup: GK (genç- kontrol)</b>	Serum fizyolojik	10	170±10
<b>2. Grup: GT (genç- deney)</b>	Taurin	10	170±10
<b>3. Grup: OYK (orta yaş- kontrol)</b>	Serum fizyolojik	10	400± 20
<b>4. Grup: OYT (orta yaş - deney)</b>	Taurin	10	400± 20

Deney grubunu oluşturan genç ve orta yaşlı siğanlara 200 mg/kg /gün taurin 0.5 ml izotonik tuz çözeltisinde çözülerek, 7 gün süreyle günde tek doz olarak intraperitoneal olarak verildi<sup>132</sup>. Kontrol grubundaki genç ve orta yaşlı siğanlara ise izotonik tuz çözeltisi aynı süre ve hacimde uygulandı. Tüm denekler son enjeksiyondan 24 saat sonra tiyopental sodyum anestezisi altında (50 mg/kg) kalplerinden kan alınarak feda edildiler. Karaciğer hızla çıkartılıp kan ürünlerinden arındırılmak amacı ile soğuk serum fizyolojik

( izotonik NaCl) içinde yıkandı, alüminyum folyolara sarılarak, sıvı azotta dondurulup analiz süresine kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda saklandı.

### **III.2.2. Yöntemlerin uygulanması**

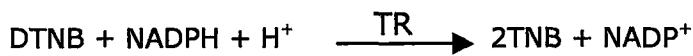
#### **III.2.2.1.Tiyoredoksin Redüktaz (TR) Aktivitesinin Tayini İçin Hazırlık Aşaması**

Ölçüm sisteminde interferans veren, başlıca redükte glutatyon veya diğer düşük molekül ağırlıklı tiyoller olmak üzere, bileşikler orijinal yöntemde bazı değişiklikler yapılarak ilk basamaklarda uzaklaştırıldı.<sup>104,133</sup>

Dokular 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA (TE tamponu)'da 1/10 oranında homojenize edildi. Homojenat 13,000 g,  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika santrifüj edilip süpernatant alındı. Süpernatant buzda soğutulmuş 1.0 M asetik asit ilavesi ile pH 5.0'e ayarlandı. Oluşan çökelti 13.000 g,  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dakika santrifüj ile uzaklaştırıldı. Süpernatant 1.0 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  ile pH 7.5'a ayarlandı. Süpernatandaki protein miktarı ölçüldü ve benmaride  $60^{\circ}\text{C}$ 'ye ısıtıldı. Solüsyon hızlı bir şekilde  $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutuldu ve çökelti 13,000 g,  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dakika santrifüj ile uzaklaştırıldı. % 85 doygunluğa kadar amonyum sülfat yavaşça karıştırarak ilave edildi ve çökelti 13,000 g,  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dakika santrifüj sonrasında toplandı. Çökelti 300 µl TE tampon ile çözüldü. Delik büyüklüğü 3000 olan mikrofiltre ile, 2000 g'de 5 dakika santrifüjle filtrasyon yapılarak üstte kalan kısmı alındı.

#### **III.2.2.1.Tiyoredoksin Redüktaz Aktivitesinin Ölçülmesi**

**Prencip:** Memeli tiyoredoksin redüktaz (TR)'i NADPH varlığında 5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB)'i redükler.



Reaksiyonun ürünü TNB (5'-tiyonitrobenzoik asit) sarıdır ve  $13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  molar absorpsiyon katsayısıyla  $412 \text{ nm}$ 'de en yüksek absorbansa sahiptir.

### **Reaktifler**

- NADPH, 40 mg/ml su içinde
- 0.2 M, EDTA
- Potasyum fosfat tamponu, 1.0 M, pH: 7.0
- DTNB, 25 mg/ml %99 etanol içinde
- BSA (sığır serum albumin), 20 mg/ml

### **Deneğin Yapılışı**

50  $\mu\text{l}$  NADPH, 0.5 ml EDTA, 1.0 ml potasyum fosfat tamponu, 0.8 ml DTNB ve 100  $\mu\text{l}$  BSA'dan oluşan reaksiyon karışımı hazırlandı. Su ile 10 ml'lik sonuç hacime tamamlandı. Reaksiyon karışımından her iki küvete konuldu. Numune küvetine 100  $\mu\text{l}$  protein örneği ve referans küvetine aynı hacimde tampon ilave edildi. Reaksiyon  $412 \text{ nm}$ 'de 3 dakika boyunca izlendi.

### **Aktivite Hesaplanması**

Sabit sıcaklık ( $25^{\circ}\text{C}$ ) ve pH'da 1 dakikada  $1 \mu\text{mol}$  TNB açığa çıkaran tiyoredoksin redüktaz aktivitesi 1 IÜ'dür. TNB için molar absorpsiyon katsayısı  $13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanılarak  $\Delta A = a_m \cdot \Delta c \cdot l$  formülüne göre dakika başına oluşan  $\mu\text{mol}$  TNB hesaplandı ve sonuçlar Ü/ mg protein olarak verildi.

### **III.2.2.2. Karaciğer Dokusu Glutatyon Düzeyinin Ölçülmesi**

Doku glutatyonunun ölçümü, Ellman'ın yöntemiyle yapıldı<sup>134</sup>. Bu yöntem, hafif alkali ortamda, 5,5' ditiyobis 2-nitrobenzoik asidin (DTNB, Ellman reaktifi), dokudaki alifatik tiyol bileşikleriyle reaksiyonu sonucu her

molekül tiyol başına oluşan, p-nitrofenol anyonunun miktarının spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

### **Reaktifler**

- Metafosforik asit: 0.5 M
- Fosfat tamponu: 1M, pH:8.0
- Ellman reaktifi: DTNB: 160 µM ve KHCO<sub>3</sub>: 319 µM, pH: 8.0 olacak şekilde KOH ile ayarlandı.

### **Deneğin Yapılışı**

Karaciğer örnekleri, 1/5 ağırlık/hacim (w/v) olacak şekilde metafosforik asitle seyreltilip, homojenize edildi. Homojenatlar, 3500 rpm'de, 10 dakika santrifüj edildi. Her bir numune tüpüne, 0.2 ml süpernatant, 0.1 ml distile su, 0.3 ml fosfat tamponu, 2.4 ml Ellman reaktifi konularak karıştırıldı, 410 nm'de kör tüpüne karşı, absorbans ölçüldü.

### **Hesaplama**

$\Delta A = \Sigma \times \Delta c \times l$  eşitliğinde, p-nitro fenolat için  $\Sigma = 13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  değeri ve Lowry yöntemi ile bulunan mg protein değeri kullanılarak, glutasyon miktarı µmol GSH/ mg protein olarak hesaplandı.

### **II.2.2.3. Lowry Protein Tayini**

Doku protein düzeyleri sığır serum albumini (BSA)'nın standart olarak kullanıldığı Lowry yöntemine göre ölçüldü<sup>135</sup>.

### **Reaktifler**

- BSA (sığır serum albumini): 1 mg/ ml
- Alkalen reaktif: 0,1 N NaOH içinde % 2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:32 kısım  
NaK tartarat: % 2: 1 kısım  
CuSO<sub>4</sub>5H<sub>2</sub>O: % 1: 1 kısım
- Folin Ciocalteu fenol reaktifi:1/ 1 oranında distile su ile seyreltilir.

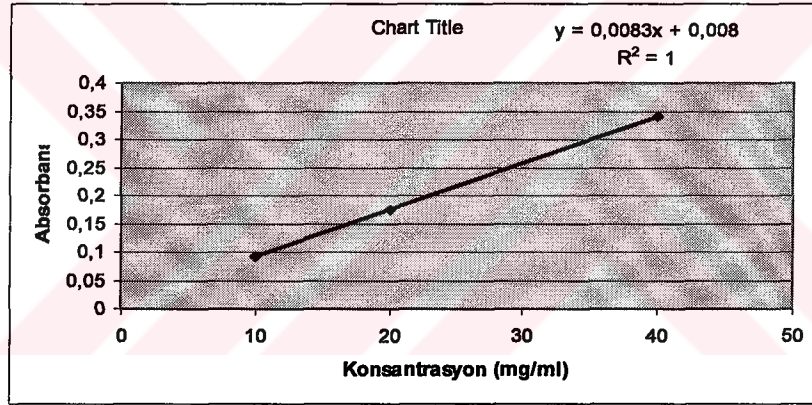
### **Deneğin Yapılışı**

Her bir numune tüpüne 20 µl süpernatant, 80 µl distile su, 2 ml alkalin reaktif eklenip, karıştırıldı. Tüpler oda ısısında, karanlıkta 15 dakika inkübe edildikten sonra, 0,2 ml Folin Ciocalteu's fenol reaktifi eklenip, karıştırıldı. Tüpler oda ısısında, karanlıkta 1 saat inkübe edildi. 750 nm'de köre karşı absorban ölçüldü. BSA'nın ölçülen absorbanı, standart olarak kullanıldı.

### **Hesaplama**

Protein Miktarı=(Numune absorbanı/Standart absorbanı) x Standart Konsantrasyonu

Sonuçlar mg/ml cinsinden verilir.



Şekil 10. Lowry Standart Eğrisi (mg/ml)

### **III.2.2.4. Karaciğer Dokusu Glutatyon Peroksidaz (Gpx) Aktivitesinin**

#### **Ölçülmesi**

Glutatyon peroksidaz aktivitesi Paglia ve Valentine'in yöntemi esas alınarak çalışıldı<sup>136</sup>. Bu yöntemde GSH'tan GSSG oluşum hızı, 340 nm dalga boyunda NADPH'in NADP'ye dönmesini esas alarak karışımın optik dansitesindeki azalma ile tayin edilmektedir.

#### **Reaktifler**

- Homojenat tamponu: 0.5 mM EDTA içeren 50 mM potasyum fosfat tamponu pH:7.4

•Reaksiyon karışımı: 50 mM potasyum fosfat tamponu (50mM) içine 3.6 mM  $\text{NaN}_3$ , 5mM GSH, 0.3 mM NADPH çalışmaya başlamadan hemen önce hazırlanır.

•Glutatyon redüktaz: 200 Ü/mg protein

•Hidrojen peroksit çözeltisi: 0.25 mM

### **Deneğin Yapılışı**

Homojenat tamponu içinde % 20 (w/v) olacak şekilde homojenize edilen doku daha sonra 2000 g'de  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edilerek süpernatant alındı.

200  $\mu\text{l}$  süpernatant, 2ml reaksiyon karışımı ve 20  $\mu\text{l}$  glutatyon redüktaz ile iyice karıştırılarak 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

İnkübe edilen bu karışıma 20  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. 5 dakika boyunca 340 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak optik dansite ölçümü yapıldı.

Bu reaksiyon NADPH'ın NADP'ye dönüşümü esasına dayanması nedeniyle NADPH için molar absorpsiyon katsayısı olan  $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanıldı.

$\Delta A = a_m \times \Delta C \times 1$  formülünden dakika başına okside olan NADPH nmol olarak hesaplandı. Süpernatanda Lowry yöntemi esas alınarak protein tayini yapıldı ve glutatyon peroksidaz aktivitesi " nmol okside NADPH/dakika/mg protein" olarak verildi.

### **III.2.2.5. Karaciğer Dokusu MDA Düzeyinin Ölçülmesi**

Uchiyama ve Mihara'nın MDA çalışma yöntemi esas alınarak uygulandı<sup>137</sup>. Bu yöntem lipid peroksidasyon ürünlerinden malondialdehidin TBA ile oluşturduğu kompleksin spektrofotometrik olarak 520 ve 535 nm'de tespiti esasına dayanan bir yöntemdir.

### **Reaktifler**

- Homojenizasyon çözeltisi: % 1.15 KCl çözeltisi
- Tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi: % 0.6 (w/v)
- % 1'lik fosforik asit çözeltisi
- n-Butanol
- Standart: Tetraetoksipropan

### **Denevin Yapılışı**

Homojenat çözeltisi olarak hazırlanan % 1.15'lik KCl kullanılarak buzlu su banyosu içinde % 10'luk doku homojenatları hazırlandı. Bu homojenatın 0.5 ml'si santrifüj tüpüne alındı. Üzerine 3 ml %1'lik fosforik asit ve % 0.6'lık TBA çözeltisi ilave edildi. Karıştırılmanın ardından kaynamakta olan su banyosunda 45 dakika bekletildi. Soğutma işleminden sonra 4 ml n-butanol ilave edilerek santrifüj yoluyla ayrılan butanol fazın 520 ve 535 nm'de absorbans değerleri elde edildi. Standart olarak tetraetoksipropan kullanıldı.

### **Hesaplama**

Optik dansite farkı esas alınarak sonuçlar nmol/g doku olarak hesaplandı.

### **III.2.2.6. İmmünohistokimyasal Olarak eNos Tayini**

Her gruba ait karaciğerden alınan doku örnekleri %10'luk nötral formalinde 72 saat tespit edildi. Daha sonra alışılmış ışık mikroskop takibinden geçirilen doku örnekleri parafin bloklar haline getirildi. İmmünohistokimyasal çalışma için parafin bloklardan polilizinli camlar üzerine 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı.

Camlar ksilol ve alkol ile deparafinize ve dehidrate edildikten sonra doku içerisinde formaldehitin kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak amacıyla 1M sitrat tamponu (Lab Vision, USA) ile mikrodalgada retriiver işlemi gerçekleştirildi. Takiben, %3'lük hidrojen peroksit (Lab Vision,

USA) ile endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. İşlem sonrasında PBS (phosphate buffer saline) (Lab Vision, USA) (pH 7.4) ile camlar yıkandı. Devam eden işlemlerde Lab Vision anti-rabbit kit kullanıldı. Ultra V block ile non-spesifik bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemten sonra camlara eNOS primer antikoru (poliklonal anti-rabbit Ig Ab-4, Lot: 1711 P 307 B), (NeoMarker, USA) uygulanarak 1 saat oda ısısında bekletildi. Süre sonunda PBS ile yıkanan camlara biyotinli sekonder antikora eklenerek primer antikora bağlanması sağlandı. PBS ile yıkanan camlar enzim kompleksiyle etkileşime bırakıldı, böylece camlarda enzimin biyotine bağlanması sağlandı. Son olarak ortama AEC (3-amino-9-etil karbozol, Lot: AHA 41013) (Lab Vision, USA) kromojeni eklenerek gözle görülebilir ürünün ortaya çıkması sağlandı. Zemin boyası olarak Mayer'in hematoksileni kullanıldı. Bu şekilde boyanan camlar ultramount yardımı ile lamelle kapatılıp, foto ışık mikroskopta değerlendirildi.

### **III.2.2.7. İstatistik Değerlendirme**

Verilerin istatistiksel değerlendirmeleri "SPSS for Windows 10.0" paket programı kullanılarak Mann-Whitney U testi ile yapıldı.

#### **IV. BULGULAR**

Çalışmamızda genç ve orta yaşlı grubu sıçanlarda, taurin uygulamasından sonra karaciğer dokusunda oksidan stresin göstergesi olarak MDA düzeyleri, antioksidan fonksiyon göstergesi olarak da GSH düzeyleri, GPx ve TR aktivite değişiklikleri incelendi.

Gruplar arası farkı belirlemede ANOVA Varyans Analizi, iki grup arası farkı belirlemede Mann-Whitney U testi kullanıldı (Tablo 7).  $p < 0.05$  değerleri anlamlı kabul edildi.

Tablo 7. Taurin uygulanmayan (Kontrol) ve uygulanan (Deney) genç ve orta yaşlı sıçan karaciğer dokusunda oksidan stres ve antioksidan enzim değerleri ortalama  $\pm$  SD

Parametre	Genç Kontrol n=10	Genç Taurin n=10	p
MDA nmol/g doku	65 $\pm$ 20	39 $\pm$ 11	p<0.05
GSH $\mu$ mol / mg protein	0.019 $\pm$ 0.003	0.018 $\pm$ 0.005	p>0.05
GPx nmol okside NADPH / dak / mg protein	65.52 $\pm$ 12.1	72.42 $\pm$ 18.2	p>0.05
TR Ü/mg protein	0.99 $\pm$ 0.06	1.161 $\pm$ 0.16	p<0.05
	<b>Orta Yaşlı Kontrol n=10</b>	<b>Orta Yaşlı Taurin n=10</b>	<b>P</b>
MDA nmol/g doku	55 $\pm$ 20	42 $\pm$ 7	p<0.05
GSH $\mu$ mol / mg protein	0.015 $\pm$ 0.003	0.021 $\pm$ 0.004	p<0.05
GPx nmol okside NADPH / dak / mg protein	41.69 $\pm$ 11.9	103 $\pm$ 16.4	p<0.05
TR Ü/mg protein	0.75 $\pm$ 0.08	1.071 $\pm$ 0.10	P<0.05

Gruplara göre elde edilen MDA ve GSH düzeyleri ile GPx ve TR aktivite değişiklikleri sırasıyla Şekil 11, 12, 13, 14' de görülmektedir.

#### **IV.1.KARACİĞER DOKUSUNDA MDA DÜZEYLERİ**

Genç ve orta yaşlı sıçanların kontrol grupları karaciğer MDA düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmadı ( $p>0.05$ ). Taurin verilen genç ve orta yaşlı sıçanlar kendi kontrol grupları ile karşılaştırıldığında karaciğer MDA düzeyleri anlamlı olarak azalmış bulundu ( $p<0.05$ ).

#### **IV.2. KARACİĞER DOKUSUNDA GSH DÜZEYLERİ**

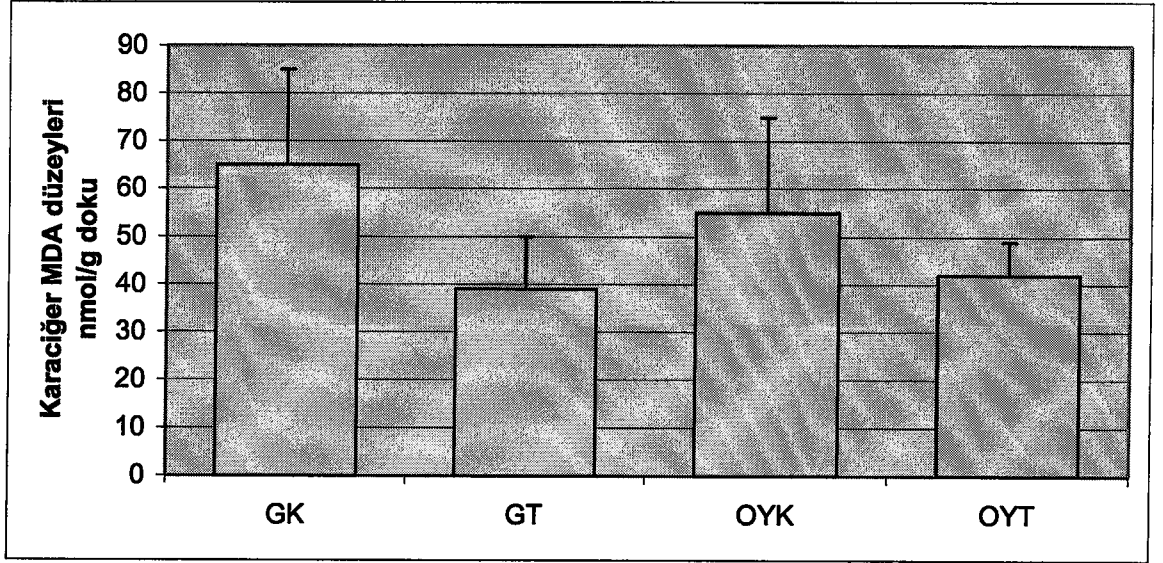
Genç ve orta yaşlı sıçanların kontrol grupları karaciğer GSH düzeyleri arasında gençlerde yüksek olmak üzere, anlamlı fark bulundu ( $p<0.05$ ). Taurin verilen orta yaşlı sıçanlar kendi kontrol grupları ile karşılaştırıldığında karaciğer GSH düzeyleri anlamlı olarak artmış bulunurken ( $p< 0.05$ ),genç sıçanların taurin grubunda karaciğer GSH düzeylerinin kendi kontrol gruplarına göre değişmediği görüldü ( $p>0.05$ ).

#### **IV.3.KARACİĞER DOKUSUNDA GPx AKTİVİTESİ**

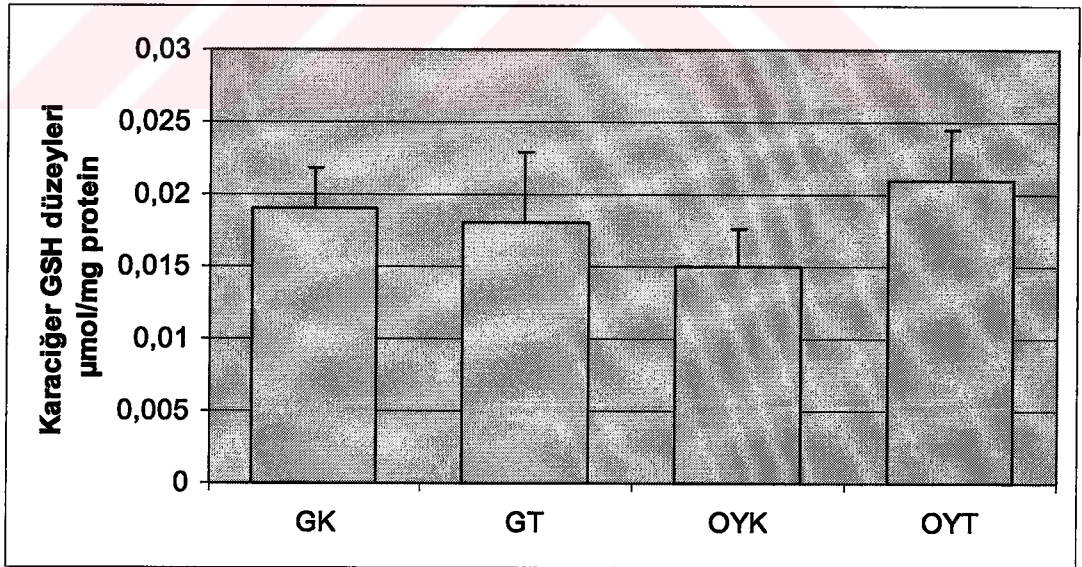
Genç ve orta yaşlı sıçanların kontrol grupları karaciğer GPx aktiviteleri arasında anlamlı fark bulundu ( $p<005$ ). Taurin verilen orta yaşlı sıçanlar kendi kontrol grupları ile karşılaştırıldığında karaciğer GPx aktiviteleri anlamlı olarak artmış bulundu ( $p<005$ ). Genç grupta taurin uygulaması karaciğer GPx aktivitesini artırmakla birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>005$ ).

#### **IV.4.KARACİĞER DOKUSUNDA TR AKTİVİTESİ**

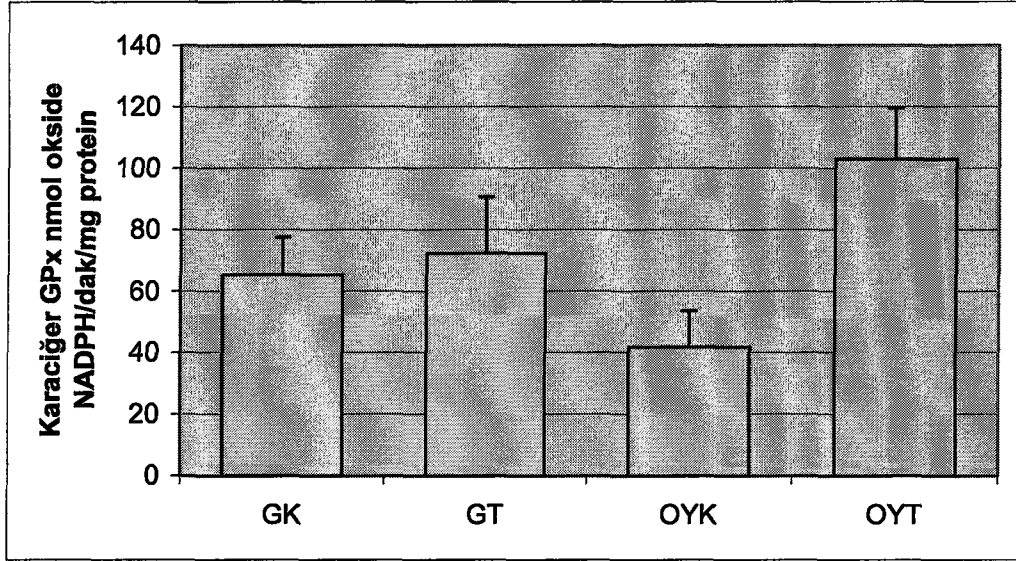
Genç ve orta yaşlı sıçanların kontrol grupları karaciğer TR aktiviteleri arasında anlamlı fark bulundu ( $p<0.05$ ). Taurin verilen genç ve orta yaşlı sıçanlar kendi kontrol grupları ile karşılaştırıldığında karaciğer TR aktiviteleri anlamlı olarak artmış bulundu ( $p<0.05$ ).



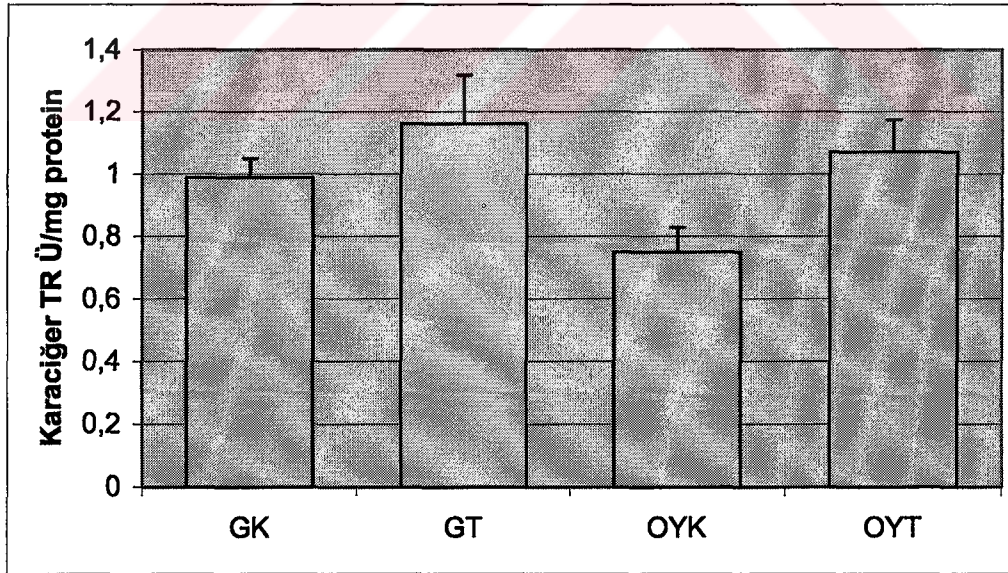
Şekil 11. Taurin uygulanmayan (kontrol) ve uygulanan (deney) genç ve orta yaşlı sıçanların karaciğer dokusundaki MDA düzeyleri (nmol/g doku) (GK-OYK  $P > 0.05$ , GK-GT  $P < 0.05$ , OYK-OYT  $P < 0.05$ )



Şekil 12. Taurin uygulanmayan (kontrol) ve uygulanan (deney) genç ve orta yaşlı sıçanların karaciğer dokusundaki GSH düzeyleri (µmol/mg protein) (GK-OYK  $P < 0.05$ , GK-GT  $P > 0.05$ , OYK-OYT  $P < 0.05$ )



Şekil 13. Taurin uygulanmayan (kontrol) ve uygulanan (deney) genç ve orta yaşlı sıçanların karaciğer dokusundaki GPx aktiviteleri (nmol okside NADPH/dak/mg protein) (GK-OYK  $P < 0.05$ , GK-GT  $P > 0.05$ , OYK-OYT  $P < 0.05$ )



Şekil 14. Taurin uygulanmayan (kontrol) ve uygulanan (deney) genç ve orta yaşlı sıçanların karaciğer dokusundaki TR aktiviteleri (Ü/mg protein) (GK-OYK  $P < 0.05$ , GK-GT  $P < 0.05$ , OYK-OYT  $P < 0.05$ )

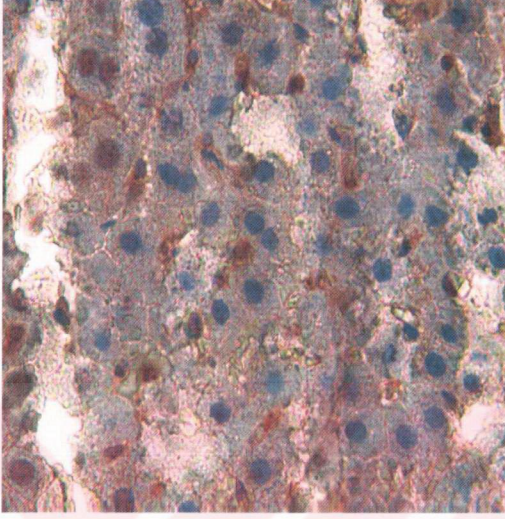
#### **IV.5.HİSTOLOJİK BULGULAR**

Genç kontrol gruplarında doku genelinde hepatositlerde eNOS immünoreaktivitesi izlenmezken, tüm sinüzoitlerdeki endotel hücrelerinde ortadan kuvvetliye değişen tutulum ilgiyi çekti (Resim 1).

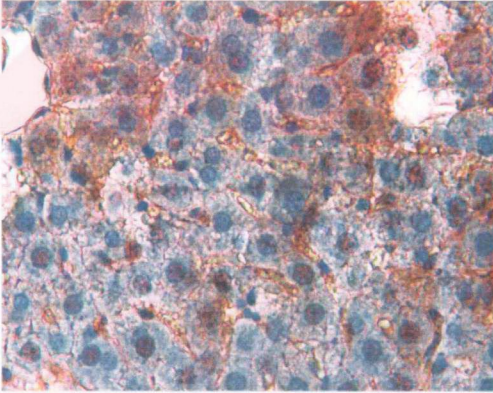
Genç sıçanlara taurin uygulanan gruptan alınan karaciğer örneklerinde, tutulumun kontrol grubuna eşdeş olduğu dikkati çekti; hepatositlerde eNOS reaktivitesi izlenmezken, sinüzoit duvarını oluşturan endotel hücrelerinde tutulumun olduğu izlendi (Resim 2).

Orta yaşlı sıçanlardan alınan karaciğer örneklerinde tutulumun hepatosit düzeyinde olduğu dikkati çekti. Bu grupta, genç kontrol grubundan ayrıcalı olarak endotel hücrelerinde hiç tutulum gözlenmezken, hepatositlerde yaygın sitoplazmik tutulum belirlendi (Resim 3).

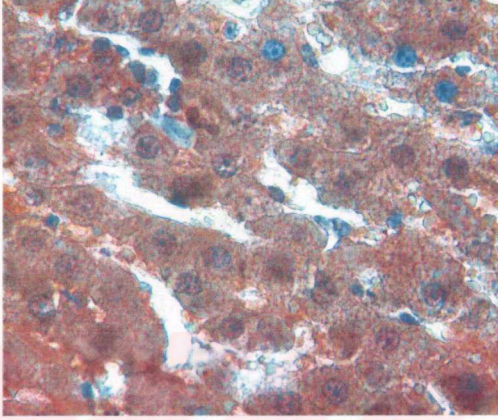
Orta yaşlı sıçanlara taurin uygulanan grupta, eNOS aktivitesinin kontrole göre belirgin derecede azaldığı saptandı. Hepatositlerde tutulum izlenmezken (Resim 4a), sinüzoit endotel hücrelerinde eNOS reaktivitesi gözlemlendi. Bu bulgular genç kontrol grubuna eşdeş olarak değerlendirildi (Resim 4b).



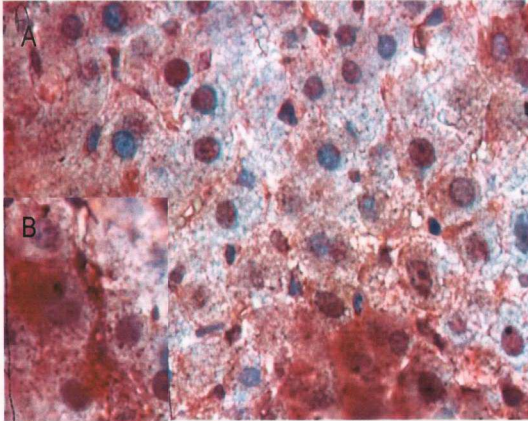
**Resim 1: Genç Kontrol**



**Resim 2: Genç Taurin**



Resim 3. Orta Yaşlı Kontrol



Resim 4a-4b. Orta Yaşlı Taurin

Tablo8. Taurin uygulanan genç ve orta yaş grubu siçanlarda  
immunoreaktif eNOS dağılımı

Gruplar	Hepatosit	Sinüoit Endotel Hücresi
Genç Kontrol	-	++ / +++
Genç Taurin	-	++ / +++
Orta Yaş Kontrol	+++	-
Orta Yaş Taurin	-	++ / +++

- : Negatif Tutulum

++ : Orta Tutulum

+ : Zayıf Tutulum

+++ : Kuvvetli Tutulum

## **V.TARTIŞMA:**

Yaşlanma, fonksiyon kaybı ve strese direncin azalması ile birlikte görülen biyolojik bir süreçtir<sup>138</sup>. Aerobik hücrelerdeki oksijen metabolizmasının bir sonucu olan oksidatif stres yaşa bağlı değişikliklerin en önemli nedenlerinden biridir<sup>139</sup>.

Yaşlanmayı açıklamak için öne sürülen popüler teorilerden biri de serbest radikal teorisi<sup>7,8</sup>. Serbest radikal teorisi yaşlanmayı oluşturan etkilere serbest radikallerin sorumlu olduğunu kabul eder; düşük kalori diyetin ve serbest radikal inhibitörlerinin yaşam süresini uzatmada etkili olduğunu öngörür<sup>1</sup>. Yaşlanma ile serbest radikal düzeylerinin artması ve buna karşılık antioksidan kapasitenin azalması bu teorisin en güçlü dayanaklarından<sup>7,8</sup>. Organizmadaki oksidan stres-antioksidan kapasite dengesinin oksidan stres lehine bozulması genellikle dokulardaki yaşlanma sürecini hızlandırmaktadır<sup>7,8</sup>.

Sağlıklı insanlarda yapılan çalışmalarda, MDA ile birlikte diğer oksidatif stres göstergelerinin yaşlılarda gençlerdekine göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir<sup>8,140</sup>. Rodriges ve ark. ile Savada ve ark. yaşlı sıçanların beyin ve karaciğer homojenatlarında ve yaşlı insan plazmalarında lipit peroksidasyon ürünlerinin arttığını göstermişlerdir<sup>73,74</sup>.

Bizim çalışmamızda kontrol gruplarının karaciğer doku MDA'ları karşılaştırıldığında genç kontrollerde diğer gruba oranla daha yüksek olduğu saptandı, ancak fark önemsizdi.

Literatürde yaşlı deneklerde birçok dokuda ölçülen antioksidan enzim aktivitelerinin arttığını, azaldığını veya değişmediğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır<sup>141,142,143,144,145</sup>. Fakat elde edilen bulgular yaşla bağlantılı olarak antioksidan savunmanın azaldığını göstermektedir<sup>141</sup>.

Biyolojik sistemlerde antioksidan olarak rol alan taurin bu etkisini iyon membranları stabilize ederek, reaktif oksijen türlerini engelleyerek ve membrandaki doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu azaltarak gösterir<sup>146</sup>. Diyete taurin eklenmesi kan şekeri düzeylerini düşürerek hiperinsülinemiyi ve lipit peroksidasyonunu azaltır<sup>147</sup>.

Taurinin diğer dokularda ve iskelet kasında fonksiyonu ve etki mekanizması benzer olup membran stabilizasyonu ve  $Ca^{+2}$  modülasyonu yaparak; dolayısıyla hücrel zarların  $Ca^{+2}$ 'a karşı geçirgenliğini sınırlayarak; sitozolik  $Ca^{+2}$ 'un sarkoplazmik retikulumu pompalama kapasitesini artırarak etki yapar<sup>11,81,82,93</sup>. Taurin bu özelliklerinden dolayı artmış  $Ca^{+2}$ 'a bağlı lipit peroksidasyon sentezinin ve dolayısıyla oksijen radikallerinin sınırlanmasında da bir antioksidan olarak görev yapar<sup>10,89,93,95,96,148,149,150</sup>.

Taurinin peroksidatif hasara maruz kalan dokularda antioksidan özellik gösterip, lipit peroksidasyonunu azalttığını bilinmektedir<sup>151</sup>. Taurin eksikliğinde belirgin MDA artışı meydana geldiğini gösterilmiştir<sup>16</sup>. Peroksidasyonu önleyici etkileri olduğu bilinen taurinin bizim çalışmamızda yaşlanma sürecindeki oksidan olaylarda da etkili olabileceği gözlenmiştir. 200 mg/kg/gün dozunda 7 gün süre ile yapılan taurin uygulaması sonrasında tüm deneklerin karaciğer MDA düzeyleri anlamlı derecede azaldı. Çalışmamızda taurin sonrasında erişkinlerdeki MDA azalışı daha düşük iken gençlerde farkın daha fazla olduğu dikkati çekti. Fakat genç ve orta yaşlı denekler arasındaki bu fark önemsiz bulundu. Bulgularımıza göre taurinin MDA'yı azaltıcı etkisi genç deneklerde daha etkili olmuştur.

Beyin, karaciğer, böbrek taurinden zengin organlardır. Organizmada serbest amino asit formunda bol bulunan bu amino asidin bilinen en önemli görevlerinden biri toksik hipoklorik asidin (HOCl) süpürücüsü olmasıdır. Açığa

çıkan taurin kloraminin iNOS, TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>, COX<sub>2</sub> gibi inflamatuvar reaksiyonları başlatan hücre sinyal moleküllerinin çıkışını azalttığı dolayısıyla doku hasarını önlediği bildirilmektedir. eNOS'un doku kan akımı artışından sorumlu olduğu bilinmektedir<sup>152</sup>. Karaciğerde de fizyolojik şartlarda sinizoit çapının, ET-1 ve NO arasındaki orana bağlı olarak değiştiği<sup>152</sup> karaciğerde ET-1'in arttığı şartlarda eNOS miktarının azaldığı da saptanmıştır<sup>153</sup>.

Bizim çalışmamızda da histopatolojik incelemeler eNOS'un genç kontrol deneklerin sadece sinizoidal endotelial hücrelerinde olduğunu ve orta yaş grubu karaciğerinde ise hepatositlerde bulunduğunu gösterdi.

Yaşlı hepatositlerdeki eNOS artışı olasılıkla organın doku harabiyetinden korunmasına yöneliktir. Çünkü karaciğerin iskemik ön koşullamasında bu enzimin sitoprotektif NO yapımı artışına yönelik olarak yükseldiği gösterilmiştir<sup>154</sup>.

Bizim çalışmamızda taurin uygulaması sonrasında gençlerde eNOS dağılımında kontrollere göre bir fark bulunamadı. Fakat yaşlılarda taurin, eNOS'un gençlerdeki gibi sadece sinizoit endotel hücrelerinde görülmesi sağlandı. Olasılıkla bu, taurinin inflamatuvar reaksiyonları önlemesi ile ilgili bir bulgudur. Çünkü çalışmalar taurinin indometazine bağlı gastrik mukoza lezyonlarını ve karaciğer zedelenmelerini bu mekanizma ile önlediğini göstermektedir<sup>155</sup>.

Hücrelerde GSH yüksek konsantrasyonlarda bulunur, reaktif oksijen ürünlerine ve toksinlere karşı koruyucudur. Hücrelerin redoks durumu glutatyonun redükte halde korunmasına bağlıdır<sup>156</sup>.

Akbulut ve ark., genç ve yaşlı sıçanlarda yaptıkları çalışmada yaşlı sıçanların plazma ve mide GSH düzeylerini gençlere göre daha düşük bulmuşlardır<sup>5,6</sup>.

Jung ve ark., F344 erkek sıçanlarda düşük molekül ağırlıklı antioksidanlarla yaş bağlantılı değişiklikleri karşılaştırmak için askorbat ve GSH düzeylerine bakmışlardır. Genç (2-5 ay) sıçanlarda askorbat ve GSH'un benzer düzeylerde saptamışlardır. Yaşlanmayla antioksidanlarda belirgin kayıplar meydana gelmektedir. Yaşa bağlı olarak genç sıçanlara oranla yaşlı sıçanlarda (24-28 ay) GSH'da %40'lık bir kayıp olduğu gösterilmiştir<sup>157</sup>.

Bizim çalışmamızda da genç ve orta yaşlı sıçanların kontrol grupları karaciğer GSH düzeyleri arasında gençlerde yüksek olmak üzere, anlamlı fark bulundu. Taurin verilen orta yaşlı sıçanlar kendi kontrol grupları ile karşılaştırıldığında karaciğer GSH düzeyleri anlamlı olarak artmış bulunurken, genç sıçanların taurin grubunda karaciğer GSH düzeylerinin kendi kontrol gruplarına göre değişmediği görüldü.

Taurinin GPx ve SOD'u indükleyerek lipid peroksidasyonunu inhibe edebildiği bilinmektedir<sup>147</sup>. Dolayısıyla bu amino asit glutatyon redüktaz aktivitesindeki eksilmeyi önleyerek dokuların glutatyon havuzunu koruyabilir<sup>147</sup>.

Çalışmamızda karaciğer GPx aktivitesi kendi kontrol grupları ile karşılaştırıldığında taurin verilen orta yaşlı deneklerde anlamlı olarak artmış bulundu. Genç grupta ise karaciğer GPx aktivitesi yüksek olmakla birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi.

TR, redoks homeostazına yardım eden bir enzimdir ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e bağlı oksidatif stresin yol açtığı hasarın önlenmesinde, tamirinde rol alır<sup>158</sup>.

Yaşa bağlı Trx/TR enzimatik sistemindeki azalma prooksidan ortamı ve bunu takip eden kritik mitokondrial proteinlerin oksidatif hasarını artırır<sup>157</sup>.

TR aktivitesi yaşla diğer antioksidan enzimlere göre daha az değişir<sup>138</sup>.

Bizim de çalışmamızda genç ve orta yaşlı sıçanların kontrol grupları karaciğer TR düzeyleri arasında anlamlı fark bulundu. Kendi kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında da taurin gruplarında karaciğer TR düzeyleri anlamlı olarak artmıştı.

Pushpakiran ve ark., sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada taurinin etanol ile artan oksidatif strese karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermişlerdir. 28 gün boyunca verilen taurinin karaciğer, plazma, beyin, böbrek ve kalp dokusunda TBARS düzeylerini düşürdüğünü ve kontrol değerlerine yaklaştırdığını saptamışlardır. Buna karşılık etanole bağlı olarak azalan antioksidan SOD, CAT ve GPx düzeylerini ise artırdığını saptamışlardır<sup>159</sup>.

Bu çalışmanın sonuçları bizim araştırmamızda taurin ile elde edilen olumlu bulgularla uyumluluk göstermektedir.

İnsan ve kedilerden farklı olarak sıçanlar taurin sentezleyebilmekte ve bu nedenle amino asitten kısıtlı beslenmede, doku ve serum taurin konsantrasyonları fazla etkilenmemektedir<sup>160,161</sup>. Fakat yaşla beraber sistein slfinik asit dekarboksilaz aktivitesindeki azalma taurin biyosentezinde sınırlayıcı bir basamak olarak rol oynar<sup>160,162</sup>. Bu nedenle diğer türlerde olduğu gibi orta yaşlı sıçanlarda da ancak eksojen taurin uygulamasıyla antioksidan kapasite yeniden yapılandırılabilir.

Sonuç olarak; çalışmamızda karaciğerin oksidan kapasitesinde önemli farklar olmasa bile yaşa bağlı olarak antioksidan kapasitenin önemli derecede azaldığı, taurin uygulamasının ise özellikle yaşlı deneklerde antioksidan kapasitenin artışına neden olduğu ve lipit peroksidasyonu azaltarak organı koruduğu gösterilmiştir.

## **VI. SONUÇ**

Sonuç olarak bu çalışmadan elde edilen bulgular, halen yaşlanmayı açıklayan yardımcı teorilerden biri olan serbest radikal teorisini desteklemektedir. Ayrıca yaşlanmayla birlikte fizyolojik olarak taurin düzeylerinin azaldığı göz önünde bulundurulursa orta yaşlı deney grubumuzda izlenen değişiklikler taurinin yaşlılık fizyolojisinde serbest radikal teorisi ile birlikte değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir. Tüm veriler göz önüne alınarak; orta yaşlılarda eksojen taurin uygulamasının serbest radikal düzeylerini azaltarak ve glutatyon, glutatyon peroksidaz, tiyoredoksin redüktazda bir artışa yol açarak yararlı olabileceğini söylemek olasıdır.

## **VII. ÖZET**

Bu çalışmada taurinin (200 mg/kg/7 gün) genç (6-7 haftalık) ve orta yaşlı (13-14 aylık) sıçanlarda karaciğer malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GPx) ve tiyoredoksin redüktaz (TR) üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Genç ve orta yaşlı sıçanların kontrol grupları karaciğer MDA düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla ,  $65 \pm 20$  nmol/g doku ve  $55 \pm 20$  nmol/ g doku  $p > 0.05$ ). Buna karşın GSH düzeyleri, GPx ve TR aktiviteleri arasında anlamlı fark bulundu (sırasıyla,  $0.019 \pm 0.003$   $\mu$ mol/mg protein ve  $0.015 \pm 0.003$   $\mu$ mol/ mg protein  $p < 0.05$ ,  $65.52 \pm 12.1$  nmol okside NADPH/dak/mg protein ve  $41.69 \pm 11.9$  nmol okside NADPH/dak/mg protein  $p < 0.05$ ,  $0.99 \pm 0.06$  Ü/mg protein ve  $0.75 \pm 0.08$  Ü/mg protein  $p < 0.05$ ).

Orta yaşlı sıçanların taurin grubunda karaciğer MDA düzeyi kontrole göre anlamlı olarak azalmış bulunurken; GSH düzeyleri, GPx ve TR aktiviteleri anlamlı olarak artmış bulundu (sırasıyla,  $55 \pm 20$  nmol/g doku ve  $42 \pm 7$  nmol/g doku  $p < 0.05$ ,  $0.015 \pm 0.003$   $\mu$ mol/mg protein ve  $0.021 \pm 0.004$   $\mu$ mol/mg protein  $p < 0.05$ ,  $41.69 \pm 11.9$  nmol okside NADPH/dak/mg protein ve  $103 \pm 16.4$  nmol okside NADPH/ dak/mg protein  $P < 0.05$ ,  $0.75 \pm 0.08$  Ü/mg protein ve  $1.071 \pm 0.10$  Ü/mg protein  $p < 0.05$ ).

Genç sıçanları taurin grubunda karaciğer MDA düzeyi kontrole göre anlamlı olarak azalmış bulunurken; karaciğer TR aktivitesi anlamlı olarak artmış bulundu (sırasıyla,  $65 \pm 20$  nmol/g doku ve  $39 \pm 11$  nmol/g doku  $p < 0.05$ ,  $0.99 \pm 0.06$  Ü/mg protein ve  $1.161 \pm 0.16$  Ü/mg protein  $p < 0.05$ ).

Genç sıçanlarda ise taurin grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında karaciğer GPx aktivitesinde artma olmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (sırasıyla,  $65.52 \pm 12.1$  nmol okside NADPH/dak/mg protein ve

72.42 ± 18.2 nmol okside NADPH/dak/mg protein p>0.05). Karaciğer GSH düzeyinde genç taurin grubu ve kontrol grubu arasında bir değişiklik saptanmadı (sırasıyla, 0.019 ± 0.003 µmol/mg protein ve 0.018 ±0.005 µmol/mg protein p>0.05).

Taurin uygulanan genç grupta eNOS aktivitesinde değişiklik gözlemlenmedi. Bununla beraber, taurin eNOS reaktifliğinde orta yaş grubunda düşüşe neden olarak, genç grubun düzeyine benzer bir skor oluşturdu.

Sonuç olarak yaşlanma ile karaciğer dokusunda serbest radikaller artarken antioksidan savunmanın azaldığı gözlemlenmiştir. Eksojen olarak taurin verilmesinin serbest radikal artışını önlerken, antioksidan savunmayı da artırdığı gözlemlenmiştir. Eksojen taurinin GSH düzeylerini, GPx ve TR enzim aktivitelerini orta yaşlılarda anlamlı olarak artırdığı belirlenmiştir.

### **VIII. SUMMARY**

The aim of the present study was to investigate the effects of taurine (200mg/kg/7 day) on malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx) and thioredoxin reductase (TR) in young and middle aged rat liver.

There was not a significant difference on liver MDA levels between the control groups of young and middle aged rats ( $65 \pm 20$  nmol/g tissue and  $55 \pm 20$  nmol/g tissue  $p > 0.05$ , respectively). However, liver GSH levels, GPx and TR activities were significantly different between the control groups of young and middle aged rats ( $0.019 \pm 0.003$   $\mu\text{mol/mg}$  protein and  $0.015 \pm 0.003$   $\mu\text{mol/mg}$  protein  $p < 0.05$ ,  $65.52 \pm 12.1$  nmol oxidized NADPH/min/mg protein and  $41.69 \pm 11.9$  nmol oxidized NADPH/min/mg protein  $p < 0.05$  and  $0.99 \pm 0.06$  U/mg protein and  $0.75 \pm 0.08$  U/mg protein  $p < 0.05$ , respectively).

While liver MDA level was significantly lower in the taurine group of middle aged rats when compared to the control group; liver GSH levels, GPx and TR activities were significantly increase taurine group of middle aged rats ( $55 \pm 20$  nmol/g tissue and  $42 \pm 7$  nmol/g tissue  $p < 0.05$ ,  $0.015 \pm 0.003$   $\mu\text{mol/mg}$  protein and  $0.021 \pm 0.004$   $\mu\text{mol/mg}$  protein  $p < 0.05$ ,  $41.69 \pm 11.9$  nmol oxidized NADPH/min/mg protein and  $103 \pm 16.4$  nmol oxidized NADPH/min/mg protein  $p < 0.05$ ,  $0.75 \pm 0.08$  U/mg protein and  $1.071 \pm 0.10$  U/mg protein  $p < 0.05$ , respectively) in comparison with the control group.

While liver MDA level was significantly lower in the taurine group of young rats when compared to the control group; TR was significantly increase in the taurine group of young rats ( $65 \pm 20$  nmol/g tissue and  $39 \pm$

11 nmol/g tissue  $p < 0.05$ ,  $0.99 \pm 0.06$  U/mg protein and  $1.161 \pm 0.16$  U/mg protein  $p < 0.05$ , respectively) in comparison with the control group.

Liver GPx activity was not statistically different between the taurine and the control groups of young rats ( $65.52 \pm 12.1$  nmol oxidized NADPH/min/mg protein and  $72.42 \pm 18.2$  nmol oxidized/mg protein  $p > 0.05$ , respectively). Liver GSH levels were not different between the young taurine and the control group ( $0.019 \pm 0.003$   $\mu$ mol/mg protein and  $0.018 \pm 0.005$   $\mu$ mol/mg protein  $p > 0.05$ , respectively)

Immunohistochemical studies exhibited no change in eNOS activity after taurine injection in young rats. However, in middle aged rats taurine lowered the eNOS reactivity to the the same level found in young rats.

In conclusion, our results suggested that aging may be related with an increase in free radicals and a decrease in the antioxidant capacity of liver tissue. Exogenous taurine may play a role in aging by means of its reducing effect on free radical levels in parallel to an increase in antioxidant capacity.

## **IX. KAYNAKLAR**

- 1-** Campisi J.: Cellular Senescence and Cell Death. "Physiological Basis of Aging and Geriatrics". (Timiras PS. ed.) 3th edition, 47-56 CRC Press Florida (2003)
- 2-** Goldstein S. : The biology of aging, N England J Med., 285, 1120 (1971)
- 3-** Beckman K.B., Ames B.N.: Endogenous oxidative damage of mtDNA, Mutat Res. 424, 51-58 (1999)
- 4-** Rowe J.W.: Health care of elderly, N Engl J Med., 312, 827 (1985)
- 5-** Akbulut H., Akbulut K.G., Gönül B.: Age-related changes in malondialdehyde and glutathione levels of gastric mucosa of the rats and effects of exogenous melatonin, Digest Dis Sci., 42, 1381-1382 (1997)
- 6-** Akbulut K.G., Gönül B., Akbulut H.: Differential effects of pharmacological doses of melatonin on MDA and GSH levels in young and old rats, Gerontology, 45,67-71 (1999)
- 7-** Crawford D.L., Sinnhuber R.O., Stout F.M., Oldfield J.E., Kaufmes J.: Acute toxicity of malonaldehyde, Toxic Appl Pharmacol., 7, 826-832 (1965)
- 8-** Congy F., Bonnefont-Rousselot D., Dever S., Delattre J., Emerit J.: Study of oxidative stress in the elderly, Presse Medicale, 24, 1115-1118 (1995)
- 9-** Chesney R.W.: Taurine: Its biological role and clinical implications, Adv Pediatr., 32, 1-42 (1985)
- 10-**Wright C.E., Tallan H.H., Lin Y.Y.: Taurine biological update, Ann Rev Biochem., 55, 427-453 (1986)
- 11-**Huxtable R.: Physiological actions of taurine, Physiol Rev., 72(1), 101-163 (1992)

- 12-**Russel W.C.: Taurine: Its biological role and clinical implications, *Adv Pediatr.*, 32, 1-42 (1985)
- 13-**Jacobsen J.G., Smith L.H.: Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivates, *Physiol Rev.*, 48, 424-451 (1968)
- 14-**Grisham, M.B., Granger N.: Metabolic sources of reactive oxygen metabolites during oxidant stress and ischemia with reperfusion. *Clinic in Chest Medicine*, 10 (1), 71-81 (1989)
- 15-**Huxtable R.J.: Physiological actions of taurine, *Physiol Rev.*, 72 (1), 101-144 (1992)
- 16-**Harada H., Cusack B.J., Olson R.D., Stroo W., Azuma J., Hamaguchi T., Schaffer S.W.: Taurine deficiency and doxorubicin: interaction with the cardiac sarcolemmal calcium pump. *Biochemical Pharmacology*, 39 (4), 745-751 (1990)
- 17-** Milei J., Ferreira R., Liesuy S., Forcada P., Covarrubias J., Boveris A.: Reduction of reperfusion injury with preoperative rapid intravenous infusion of taurine during myocardial revascularization, *Am Heart Journal*, 123(2), 339-345 (1992)
- 18-**Yu BP.: Aging and oxidative stress: Modulation by dietary restriction, *Free Rad Biol Med.*, 21,651-668 (1996)
- 19-**Hayflick L.: Theories of biological aging: *Principles of Geriatric Medicine:* Andres R., Bierman E.L., Hazzard W.R. (eds). 9-22, Mc Graw-Hill Book Company New York (1985)
- 20-**Knight J.A.: The process and theories of aging, *Annals Clin Lab Sci.*, 25,1-12 (1995)
- 21-**Mays P.K., McAnulty R.J., Campa J.S., Laurent G.J.: Age-related alterations in collagen and total protein metabolism determined in

- cultured rat dermal fibroblasts: age-related trends parallel those observed in rat skin in vivo, *Int J Biochem Cell Biol.*, 27,937-945 (1995)
- 22**-Guarente L.: Do changes in chromosomes cause aging?, *Cell*, 86,9-12 (1996)
- 23**-Goldstein S., Shmookler Reis R.J.: Genetic modifications during cellular aging, *Mol Cell Biochem.*, 64, 15-30 (1984)
- 24**-Fabris N.: Biomarkers of aging in the neuroendocrine-immune domain. Time for a new theory of aging? *Ann NY Acad Sci.*, 663,335-348 (1992)
- 25**-Aronson M.:Involution of the thymus revisited: immunological trade-offs as an adaptation to aging, *Mechanisms Aging Develop*, 72, 49-55 (1993)
- 26**-Harman D.: Free radical theory of aging, *Mutation Res.*, 275, 257-266 (1992)
- 27**-Sohal R.S., Allen R.G.: Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: A unifying hypothesis, *Exp Gerontol.*, 25. 499-552 (1990)
- 28**-Yu B.P., Yang R.: Critical evaluation of the free radical theory of aging. A proposal for the oxidative stress hypothesis, *Ann NY Acad Sci.*, 784, 1-11 (1996)
- 29**-Baynes J.W.: Role of oxidative stress in development of complications in diabetes, *Diabetes*, 40, 405-412 (1991)
- 30**-Richter C., Park J.W., Ames B.N.: Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive, *Proc Natl Acad Sci.*, 85, 6465-6467 (1988)
- 31**-Cand F., Verdetti J.: Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats, *Free Radic Biol Med.*, 7,59-63 (1989)

- 32-**Perez R., Lopez M., De Quiroga G.B.: Aging and lung antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation in the rat, *Free Radic Biol Med.*, 10, 35-39 (1991)
- 33-**Dröge W.: Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol Rev.*, 82, 47-95 (2002)
- 34-**Biesalski H K.: Free radical theory of aging, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 5-10 (2002)
- 35-**Aruoma O., Kaur H., Halliwell B.: Oxygen free radicals and human diseases, *J Roy Soc Health*, 172-177 (1991)
- 36-**Mehlhorn R.J.: Oxidants and Antioxidants in Aging. "Physiological Basis of Aging and Geriatrics". (Timiras PS. ed.) 3th edition, 61-80, CRC Press Florida (2003)
- 37-**Gutteridge J.M.C., Rowley D.A., Griffiths E., Halliwell B.: Low molecular weight iron complexes and oxygen radical reactions in idiopathic haemochromatosis, *Clin Sci.*, 68,460-467 (1985)
- 38-**Esterbauer H.: Lipid peroxidation products; formation, chemical properties and biological activities. In: Poli G, Cheeseman K.H., Diamani M.V., Slatter T.F. (eds), 29-47 *Free Radicals in Liver Injury* IRL Press Limited, Oxford (1985)
- 39-**Uchida K.: 4-Hydroxy-2-Nonenal: A product and mediator of oxidative stress, *Progr Lip Res.*, 569,1-26 (2003)
- 40-**Basu A.K., Marnett L.J.: Unequivocal demonstration that malondialdehyde is a mutagen, *Carcinogenesis*, 4(3), 331-333 (1983)
- 41-**Shimizu T., Kondo K., Hayaishi O.: Role of prostaglandin endoperoxides in the serum thiobarbituric acid reaction, *Arch Biochem Biophys.*, 206 (2), 271-376 (1981)

- 42**-Lee S.H., Blair I.A.: Characterization of 4-Oxo-2-Nonenal as a novel product of lipid peroxidation, *Chem Res Toxicol.*, 13, 698-702 (2000)
- 43**-Rindgen D., Lee S.H., Nakajima M., Blair I.A.: Formation of a substituted 1,N(6)-etheno-2'-deoxyadenosine adduct by lipid hydroperoxide-mediated generation of 4-oxo-2-nonenal, *Chem Res Toxicol.*, 13,846-52 (2000)
- 44**-Bird R.P., Draper H.H.: Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination, *Methods Enzymol.*, 105,299-305 (1994)
- 45**-De Zwart L.L., Meerman J.H.N., Commandeur J.N.M., Vermeulen N.P.E.: Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 202-226 (1990)
- 46**-Evans C.E.: Erythrocytes, Oxygen radicals and cellular pathology systemic events and disease processes introduction, 2-6 (1999)
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: Formation of hydroxyl radicals in the presence of ferritin and haemosiderin. Is haemosiderin formation a biological protective mechanism?
- 47**-Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: Formation of hydroxyl radicals in the presence of ferritin and haemosiderin. Is haemosiderin formation a biological protective mechanism?, *Free Radicals in Biology and Medicine* Second ed., 19, 234, Clarendon Press Oxford (1983)
- 48**-Moncada S.: The 1991 Ulf von Euler Lecture. The L-arginine: nitric oxide pathway, *Acta Physiol Scand.*, 145, 201-227 (1992)
- 49**-Lowenstein C.J., Dinerman J.L., Snyder S.H.: Nitric oxide: a physiologic messenger, *Ann Intern Med* ., 120, 227-237 (1994)
- 50**-Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A.: Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology, *Pharmacol Rev.*, 109-142 (1991)

- 51-**Marletta M.A.: Nitric oxide synthase structure and mechanism, *J Biol Chem.*, 268, 12231-12234 (1993)
- 52-**Knowles R.G., Moncada S.: Nitric oxide synthases in mammals, *J Biochem.*, 298, 249-258 (1994)
- 53-**Schmidt H.W., Lohmann S.M., Walter U.: The nitric oxide cGMP signal transduction system, regulation and mechanisms of action, *Biochim Biophys Acta*, 1178, 153-175 (1993)
- 54-**Stamler J.S.: Redox signaling, nitrosylation and related target interactions of nitric oxide, *Cell*, 78, 931-936 (1997)
- 55-**Bredt D.S., Synder S.H.: Nitric oxide, a physiologic messenger molecule, *Ann Rev Biochem.*, 63,175-195 (1994)
- 56-**Li H., Wallerath T., Förstermann U.: Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase, *Nitric Oxide*, 7, 132-147 (2002)
- 57-**Sies H.: *Oxidative Stress : Oxidants and antioxidants*, 42-68 , Academic Press, New York (1991)
- 58-**Rezzano H., Podo F.: Structure of binary complexes of mono and polynucleotides with metal ions of first transition group , *Chem Rev.*, 80, 365-399 (1980)
- 59-**Guyton K.Z. ,Kensler T.W.: Oxidative mechanism in carcinogenesis , *Br Med Bull.*, 49, 523-544 (1993)
- 60-**Pollack M., Leeuwenburgh C.: Apoptosis and aging : Role of the mitochondria, *Journal of Gerontology Biological Sciences*, 56A, 11 B475-B482 (2001)
- 61-**Frenkel K.: Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage,*Pharmac Ther.* , 53, 127-166 (1992)

- 62-Harris C.:** Individual variation among humans in carcinogen metabolism, DNA adduct formation and DNA repair, *Carcinogenesis*, 10, 1563-1566 (1989)
- 63-Turrens J.F.:** Mitochondrial formation of reactive oxygen species, *J Physiol.*, 522, 335-344 (2003)
- 64-Babior B.M.:** Superoxide: a two-edged sword, *Braz J Med Biol Res.*, 30, 141-155 (1997)
- 65-Fantone J.C., Ward P.A.:** Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions, *Am J Pathol.*, 107(3), 397-418 (1982)
- 66-Freeman B.A., Crapo J.D.:** Biology of disease: free radicals and tissue injury, *Lab Invest.*, 47(5), 412-426 (1982)
- 67-Michiels C., Raes M., Toussaint O., Remacle J.:** Importance of S-glutathione peroxidase, catalase and Cu/ Zn-SOD for cell survival against oxidative stress, *Free Radic Biol Med.*, 17(3), 235-248 (1994)
- 68-Sies H.:** Biochemistry of oxidative stress, *Angev Chem Int Ed Engl.*, 25, 1058-1071 (1986)
- 69-Yavuz Ö.:** Gerbillerde deneysel olarak oluşturulan iskemi-reperfüzyon modelinde 2-kloroadenozinin beyin dokusu lipid peroksid düzeyleri ve glutatyon peroksidaz aktivitesine etkisi, *Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara (1994)*
- 70-Babior B.M.:** Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes, *New Engl J Med.*, 298 (12), 659-668 (1978)
- 71-Wu G., Fang Y.Z., Yang S.:** Glutathione metabolism and its implications for health, *J Nutr.*, Mar, 134(3), 489-92 (2004)

- 72**-Beckman K.B., Ames B.N.: Endogenous oxidative damage of mtDNA, *Mutat Res.*, 424;51-58 (1999)
- 73**-Rodriguez-Martinez M., Ruiz-Torres A.: Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging, *Mechanisms of Ageing and Development*, 66,213-222 (1992)
- 74**-Savada M., Carlson J.C.: Changes in superoxide radical and lipid peroxide formation in the brain, heart and liver during the lifetime of the rat, *Mechanisms of Ageing and Development* 41,125-137 (1987)
- 75**-Lucas D.T., Szveda L.L.: Cardiac reperfusion injury: Aging, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction, *Proc Natl Acad Sci. USA*, 95,510-514 (1998)
- 76**-Pollack M., Phaneuf S., Dirks A.:The role of apoptosis in the normal aging brain,skeletal muscle and heart , *Ann N Y Acad Sci.*, 959, 93-107 (2002)
- 77**-Orr W.C., Sohal R.S.: Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*, *Science*, 263, 1128-1130 (1994)
- 78**-Gruener R., Markovitz D., Huxtable R., Bressler R.: Excitability modulation by taurine, *J Neurol Sci.*, 24 351-360 (1975)
- 79**-Scaffer S.W., Azuma J.: Myocardial physiological effects of taurine and their significance, *Taurine*,105-120 (1992)
- 80**-Orr H.T., Cohen A.I., Lowry O.H.: The distribution of taurine in the vertebrate retina, *J Neurochem*, 26,609-611 (1976)
- 81**-Huxtable R., Bressler R.: Effect of taurine on a muscle intracellular membrane, *Biochim Biophys Acta*, 323, 573-583 (1973)

- 82-**Schaffer S.W., Azuma J.: Myocardial physiological effect of taurine and their significance, *Taurine*, Lombardini, J.B., 105-119, Plenum Press, New York (1992)
- 83-**Hamaguchi T., Azuma J., Schaffer S.: Sarcolemmal action of taurine linked to altered phospholipid N- methylation, *Taurine*, Lombardini, J.B., 121, Plenum Press, New York (1992)
- 84-**Lombardini J.B.: Recent studies on taurine in the central nervous system, *Adv Exp Med Biol.*, 245-251 (1992)
- 85-**Meizel S., Lui C.W., Workin, P.K., Mrsyn R.J.: Taurine and hypotaurine: Their effects on motility, capacitation and the acrosome reaction of hamster sperm invitro and their presence in sperm and reproductive tract fluids of several mammals. *Development, Growth and Differentiation*, 22(3), 483-494 (1980)
- 86-**Velazquez A., Delgado N.M., Rasodo A.: Taurine content and amino acid composition of human acrosome, *Life Sci.*, 38, 991-995 (1986)
- 87-**Kochakian C.D.: Hypotaurine: regulation of production in seminal vesicles and prostate of guinea-pig by testosterone, *Nature*, 241, 202-203 (1973)
- 88-**Nakamari K., Koyama I., Nakamura T., Yoshido T., Umeda M., Inea K.: Effectiveness of taurine in protecting biomembrane against oxidant, *Chem Pharmacol Bull.*, 38(11), 3116-3119 (1990)
- 89-**Thomas E.L., Grisham M.B., Melton F.D., Jefferson M.M.: Evidence for a role of taurine in the in vitro oxidative toxicity of neutrophils toward erythrocytes, *J Biol Chem.*, 260(6), 3321-3329 (1985)
- 90-**Airaksinen E.M., Paljarvi L., Partanen J., Collan Y., Laakson R., Pentikainen T.: Taurine in normal and diseased human skeletal muscle, *Acta Neurol Scand.*, 81, 1-7 (1990)

- 91-Hochacka R.W.:** Defensive strategies against hypoxia and hypothermia, *Science*, 231, 234-241 (1986)
- 92-Tseng M., Liu K., Radthe N.:** Facillilated ERG recovery in taurine treated bovine eyes on ex vivo study, *Brain Res.*, 509, 153- 155 (1990)
- 93-Schurr A., Tseng M.T., West C.A., Rigor B.M.:** Taurine improves the recovery of neuronal function following cerebral hypoxia: An invitro study, *Life Science*, 40, 2059-2066 (1987)
- 94-Aruoma O.Ī., Halliwell B., Hoey B.M., Butler J.:** The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors, *J Biochem.*, 256, 251-255 (1988)
- 95-Banks M.A., Porter D.W., Martin W.G., Castronova V.:** Taurine protect against oxidant injury to rat alveolar pneumocytes, *Taurine Lombardini*, J.B., 341-354, Plenum Press, New York (1922)
- 96-Tractman H., Pizzo R.D., Fulter W.S., Levine D., Rao P.S., Valderoma E., Sturman J.:** Taurine attenuates renal disease in chronic puromycin aminonucleoside nephropathy, *Am J Physiol Renal Physiol.*, 31, F117-F123 (1992)
- 97-Becker K., Gromer S., Schirmer R.H.:** Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target, *Eur J Biochem.*, 267, 6118-6125 (2000)
- 98-Björnstedt M., Kumar S., Holmgren A.:** Selenodiglutathione is a highly efficient oxidant of reduced thioredoxin and a substrate for mammalia thioredoxin reductase, *J Biol Chem.*, 267, 8030-8034 (1992)
- 99-Holmgren A.:** Thioredoxin, *Ann Rev Biochem.*, 54,237-71.(1985)
- 100- Holmgren A., Björnstedt M.:** Thioredoxin and thioredoxin reductase, *Methods in Enzymology*, 252, 199-208 (1995)

- 101-** Holmgren A.: Redox regulation by thioredoxin and thioredoxin reductase, *Bio Factors*, 11, 63-64 (2000)
- 102-** Charles H., Williams J.R.: Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*, *Faseb J.*, 9, 1267-1276 (1995)
- 103-** Slaby I., Holmgren A.: Structure and enzymatic functions of thioredoxin refolded by complementation of two tryptic peptide fragments, *Biochemistry*, 18, 5584-5599 (1979)
- 104-** Holmgren A.: Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide, *Structure*, 3, 239-243 (1995)
- 105-** Williams Jr C.H., Arscott L.D., Müller S., Lennon B.: Thioredoxin reductase, *Eur J Biochem.*, 267, 6110-6117 (2000)
- 106-** Arner E.S.S., Holmgren A.: Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase, *Eur J Biochem.*, 267, 6102-6109 (2000)
- 107-** Gorlatov S.N., Stadtman T.C.: Human selenium-dependent thioredoxin reductase from hela cells: Properties of forms with differing heparin affinities, *Arch Biochem Biophys.*, 369, 133-142 (1999)
- 108-** Lennon B.W., Williams C.H.: Effect of pyridine nucleotide on the oxidative halfreaction of *Escherichia coli* thioredoxin reductase, *Biochemistry*, 34, 3670-3677 (1995)
- 109-** Holmgren A.: Thioredoxin and glutaredoxin systems, *J Biol Chem.*, 264, 13963-13966 (1989)
- 110-** Holmgren A.: Reduction of disulfides by thioredoxin, *J Biol Chem.*, 254, 9113-9119 (1979)

- 111-** Arner E.S.J, Zhong L., Holmgren A.: Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase, *Methods in Enzymology*, 300, 226-239 (1999)
- 112-** Nikitovic D., Holmgren A.: S-Nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide, *J Biol Chem.*, 271, 19180-19185 (1996)
- 113-** Cha M.K., Kim H.K., Kim I.H.: Thioredoxin-linked "thiol peroxidase" from periplasmic space of *Escherichia coli*, *J Biol Chem.*, 270, 28635-28641 (1995)
- 114-** Netto L.E.S., Chae H.Z., Kang S.W., Rhee S.G.: Removal of hydrogen peroxide by thiol specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties, *J Biol Chem.*, 271, 15315-15321 (1996)
- 115-** Goldman R., Stoyanovsky D.A., Day B.W.: Reduction of phenoxyl radicals by thioredoxin results in selective oxidation of its SH-groups to disulfides. An antioxidant function of thioredoxin, *Biochemistry*, 34, 4765-4772 (1995)
- 116-** Björnstedt M., Hamberg M., Kumar S., Holmgren A.: Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols, *J Biol Chem.*, 270, 11761-11764 (1995)
- 117-** Musrati R.A., Kollarova M., Labudova O.: Effect of thioredoxin on the sensitivity of bacteria to chemical damage, *J Basic Microbiol.*, 39, 137-140 (1999)
- 118-** Holmgren A.: Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide, *J Biol Chem.*, 254, 9627-9632 (1979)

- 119-** Arner E.S.J., Björnstedt M., Holmgren A.: 1-Chloro-2,4- dinitrobenzene is an irreversible inhibitor of human thioredoxin reductase, *J Biol Chem.*, 270, 3479-3482 (1995)
- 120-** Watabe S., Makino Y., Ogawa K., Hiroi T., Yamamoto Y.: Mitochondrial thioredoxin reductase in bovine adrenal cortex, *Eur J Biochem.*, 264, 74-84 (1999)
- 121-** Liu J., Yeo H.C., Overvik-Douki E., Hagen T., Doniger S.J.: Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants, *J Appl Physiol.*, 89, 21-8 (2000)
- 122-** Lovell M.A., Xie C., Gabbita S.P.: Decreased thioredoxin and increased thioredoxin reductase levels in Alzheimer's disease brain, *Free Rad Biol Med.*, 28, 418-427 (2000)
- 123-** Lovlin R., Cottle W., Pyke I., Kavanagh M., Belcastro A.N.: Are indices of free radical damage related to exercise intensity, *Eur J Appl Physiol.*, 56, 313-316 (1987)
- 124-** Maurice M.M., Nakamura H., Gringhuis S., Okamoto T., Yoshida S., Kullmann F., Lechner S.: Expression of the thioredoxin – thioredoxin reductase system in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis and Rheumatism*, 42, 2430-2439 (1999)
- 125-** Williams C.H.: Thioredoxin-thioredoxin reductase a system that has come of age, *Eur J Biochem.*, 267, 6101-6110 (2000)
- 126-** Schallreuter K.U., Wood J.M.: Thioredoxin reductase in control of the pigmentary system, *Clinics in Dermatology*, 7, 92-105 (1989)
- 127-** Ejima K., Nanri H., Toki N., Kashimura M., Ikeda M.: Localizaion of thioredoxin reductase and thioredoxin in normal human placenta and their protective effect against oxidative stress, *Placenta*, 20, 95-101 (1999)

- 128-** Powis G., Gasdaska J.R., Gasdaska P.Y., Berggren M., Kirkpatrick D.L., Engman L., Cotgreave I.A., Angulo M., Baker A. : Selenium and the thioredoxin redox system: Effects on cell growth and death, *Oncol Res.*, 9, 303-312 (1997)
- 129-** Sun Q.A., Wu Y., Zappacosta F., Jeang K.T., Lee B.J., Hatfield D.L., Gladyshev V.N.: Redox regulation of cell signaling by selenocystein in mammalian thioredoxin reductases, *J Biol Chem.*, 274, 24522-24530 (1999)
- 130-** Watson J.A., Rumsby M.G., Wolowacz R.G.: Phage display identifies thioredoxin and superoxide dismutase as novel protein kinase C-interacting proteins: thioredoxin inhibits protein kinase C-mediated phosphorylation of histone, *J Biochem.*, 343, 301-305 (1999)
- 131-** Yokomizo A., Ono M., Nanri H., Makino Y., Ohga T., Wada M., Okamoto T., Yodoi J., Kuwano M., Khno K.: Cellular levels of thioredoxin associated with drug sensitivity to cisplatin, mitomycin C, doxorubicin, and etoposide, *Cancer Res.*, 55, 4293-4296 (1995)
- 132-** Waters E., Wang J.H., Redmond H.P., Wu Q.D., Kay E., Bauchier-Hayes D.: Role of taurine in preventing acetaminophen-induced hepatic injury in the rat, *J Am Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 280, 1274-1279 (2001)
- 133-** Hill K.E., Mc Collum G.W., Boeglin M.E.: Thioredoxin reductase activity is decreased by selenium deficiency, *Biochem Biophys Res Commun.*, 234, 293-295 (1997)
- 134-** Ellman G.L.: Tissue sulfhydryl groups, *Arch Biochem Biophys.*, 82, 70-77 (1959)

- 135-** Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Far A.L., Randall R.J.: Protein measurement with folin phenol reagent, *J Biol Chem.*, 193, 265-275 (1951)
- 136-** Paglia D.E., Valentine W.N.: Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *J Lab Clin Med.*, 70,158-169 (1967)
- 137-** Uchiyama M., Mihara M.: Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test, *Annals of Biochem.*, 86, 271- 278 (1978)
- 138-** Kim H.G., Hong S.M., Kim S.J., Park H.J., Jung H.I., Lee Y.Y., Moon J.S., Lim H.W., Park E.H., Lim C.J.: Age-related changes in the activity of antioxidant and redox enzymes in rats, *Molecules and Cells*, 16, 278-284 (2003)
- 139-** Kokoszka J.E., Coskun P., Espodito L.A., Wallace D.C.: Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis, *Proc Natl Acad Sci.*,98(5), 2278-2283 (2001)
- 140-** Rodriguez-Martinez M.A., Ruiz-Torres A.: Homeostatis between lipit peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging, *Mech Ageing Dev.*, 66, 213-222 (1992)
- 141-** De A.K., Darad R.: Age-associated changes in antioxidants and antioxidative enzymes in rats, *Mech Ageing Dev.*, 59, 123-128 (1991)
- 142-** Matsuo M., Gomi F., Dooley M.M.: Age-related alterations in antioxidants capacity and lipit peroxidation in brain, liver and lung homogenates of normal and vitamin E- deficient rats, *Mech Ageing Dev.*,64, 273-292 (1992)

- 143-** Jung K., Henke W.: Developmental changes of antioxidant enzymes in kidney and liver from from rats, *Free Radic Biol Med.*, 20, 613-617 (1996)
- 144-** Abbasoğlu D.S., Toptanı T.S., Uğurnal B., Koçak T.N., Aytaç T.G., Uysal M.: Lipit peroxidation and antioxidant enzymes in livers and brains of aged rats, *Mech Ageing Dev.*, 98, 177-180 (1997)
- 145-** Gomi F, Matsuo M.: Effects of aging and food restriction on the antioxidant enzyme activity of rat livers, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.*, 53, B161-B167 (1998)
- 146-** Banks M.A., Porter D.W., Martin W.G., Castranova V.: Taurine protects against oxidant injury to rat alveolar pneumocytes. In: Lombardini J.B., Schaffer S.W., Azuma J., *Taurine: Nutritional Value and Mechanisms of Action*, 341-59, Plenum Press, New York (1992)
- 147-** Nandhini A., Thirunavukkarasu V., Ravichandran M.K., Anuradha C.V.: Effect of taurine on biomarkers of oxidative stress in tissues of fructose-fed insulin-resistant rats, *Singapore Med J.*, 46(2), 82 (2005)
- 148-** Gordon E.R., Heller R.F.: Taurine protection of lungs in hamster models of oxidant injury: A morphologic time study of paraquat and bleomycin treatment, *Taurine*, Lombardini J.B., 319-328, Plenum Press, New York (1992)
- 149-** Gordon E.R., Shaked A.A., Salona D.F.: Taurine protects hamster bronchioles from acute NO<sub>2</sub> induced alterations, *Am J Pathol.*, 125, 585-600 (1986)
- 150-** Pasantes M.H., Cruz C.: Taurine and hypotaurine inhibit light induced lipit peroxidation and protect rod outhier segment structure, *Brain Res.*, 330, 154-157 (1985)

- 151-** Ohta H., Azuma J., Awata N., Hamaguchi T., Tanaka Y., Sawamuro A., Kishimoto S., Seperelakis N.: Mechanism of protective action of taurine against isoprenaline induced myocardial damage, *Cardiovascular Research*, 22, 407-413 (1988)
- 152-** Moncada S., Higgs A.: The L-arginine nitric oxide pathway, *N Engl J Med.*, 329, 2002-2012 (1993)
- 153-** Rockey D.C.: Vascular mediators in the injured liver, *Hepatology*, 37(1), 4-12 (2003)
- 154-** Koti R.S., Tsui J., Lobos E., Yang W., Seifalian A.M., Davidson B.R.: Nitric oxide synthase distribution and expression with ischemic preconditioning of the rat liver, *Faseb J.*, 19(9), 1155-7 (2005)
- 155-** Kerai D.J., Waterfield C.J., Kenyon S.H., Asker D.S., Timbrell J.A.: Reversal of ethanol-induced hepatic steatosis and lipid peroxidation by taurine: a study in rats, *Alcohol & Alcoholism*, 34, 529-541 (1999)
- 156-** Pennincks M.: A short review on the role of glutathione in the response of yeast nutritional, environmental and oxidative stresses, *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 737-742 (2000)
- 157-** Suh J.H., Health S.H., Hagen T.M.: Two subpopulations of mitochondria in the aging rat heart display heterogeneous levels of oxidative stress, *Free Radic Biol Med.*, 35, 1064-1072 (2003)
- 158-** Becker K., Gromer S., Schirmer R.H., Müller S.: Thioredoxin reductases as a pathological factor and drug target, *Eur J Biochem.*, 267, 6118-6125.(2000)
- 159-** Pushpakiran G., Mahalakshmi K., Anuradha C.V.: Taurine restores ethanol-induced depletion of antioxidants and attenuates oxidative stress in rat tissues, *Amino Acids*, 27(1), 91-96 (2004)

- 160-** Huxtable R.J.: Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine, *Prog Neurobiol.*, 32, 4471-533 (1989)
- 161-** Gaull G.E.: Taurine in pediatric nutrition: review and update, *Pediatrics*, 83, 433-42 (1989)
- 162-** Rosa J., Stipanuk M.H.: Evidence for a rate-limiting role of cysteinesulfinatase decarboxylase activity in taurine biosynthesis in vivo, *Comp Biochem Physiol.*, 81B, 565-71 (1985)



## **ÖZGEÇMİŞ**

1970 Edremit doğumluyum. 1992 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldum. 1994 yılında Bolu Halk Sağlığı Laboratuvarı'nda biyolog olarak çalışmaya başladım. 1995 yılından bugüne kadar Ankara Etimesgut Halk Sağlığı Laboratuvarı'nda çalışmaktayım.

1998 yılında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansımı tamamladım. Aynı yıl doktora başladım. Halen bu bölümde doktora çalışmalarına devam etmekteyim.



**T.C**  
**GAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**REKTÖRLÜĞÜ**  
**Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı**

15.12/2005

SAYI : B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/ 47-5074  
KONU:

Sayın

**Prof.Dr.Nedret KILIÇ**  
**Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi**  
**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**  
**Öğretim Üyesi**

G.Ü.ET-05.028 kod numaralı ve *“Memeli Dokularında Yaşlılığa Bağlı Olarak Değişen Stres Yanıtlarından Sorumlu Olan Moleküler Değişikliklerin İncelenmesi”* başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanmıştır.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

I certify that the research project numbered G.Ü.ET-05.028 and entitled *“Elucidation of The Molecular changes Responsible for The Attenuated Stress Response in Aged Mammalian Tissues”* is in compliance with Gazi University Ethical Council regulations.

With my best regards.

**Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN**  
**Gazi Üniversitesi**  
**Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı**

