

BAZI PESTİSİTLERİN HİNDİ (*Meleagris gallopavo*) KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILAN MİTOKONDRIAL TİYOREDOKSİN REDÜKTAZ ENZİMİNİN AKTİVİTESİ ÜZERİNE *IN VITRO* ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

INVESTIGATION *IN VITRO* EFFECTS OF SOME PESTICIDES ON THE ACTIVITY OF MITOCHONDRIAL THIOREDOXIN REDUCTASE ENZYME THAT PURIFIED FROM TURKEY (*Meleagris gallopavo*) LIVER

Yusuf TEMEL¹, İlknur ÖZGENÇLİ¹, Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU¹, Mehmet ÇİFTÇİ^{2*}

¹Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 25100-ERZURUM
²Bingöl Üniversitesi, Rektörlük, 12000-BİNGÖL

ÖZET

Bu çalışmada, hindi (*Meleagris gallopavo*) karaciğerinden saflaştırılan mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enzimi aktivitesi üzerine bazı herbisit ve insektisitlerin *in vitro* etkileri incelendi. Enzimin saflaştırılmasında gradientli santrifügasyonla homojenizasyondan sonra 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemi kullanıldı. Enzim hindi karaciğer mitokondrisinden 3,07 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle, % 2,05 verimle, ve 990 kat saflaştırıldı. Enzimin saflık kontrolü Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile yapıldı ve tüm kinetik çalışmalarda saf enzim kullanıldı. Yapılan kinetik çalışmalarda kullanılan 4 herbisit ve 4 insektisitten 3 herbisit ve 3 insektisit enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi olduğu tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Hindi, Karaciğer, Tiyoredoksin redüktaz, Herbisit, İsektisit, İnhibisyon

ABSTRACT

In this study, we determined the *in vitro* effects of some herbicides and insecticides on the activity of mitochondrial thioredoxin reductase that purified from liver of turkey (*Meleagris gallopavo*). For purification of enzyme with graduation santrifugation homogenization and 2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography technique was used. The enzyme was purified 990-fold from turkey liver mitochondria in a yield of 2,05 % with 3,07 U/mg. SDS-PAGE was done to control the purity of enzyme and also showed a single band for the enzyme. According to the kinetic studies, inhibition effects of 3 pesticides and 3 insecticides including four of herbicides and four of insecticides were identified.

Key Words: Turkey, Liver, Thioredoxin reductase, Herbicide, Insecticide, Inhibition

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mehmet ÇİFTÇİ, Bingöl Üniversitesi, Bingöl Üniversitesi Rektör Yardımcısı, 12000, Bingöl, mciftci@bingol.edu.tr

1. GİRİŞ

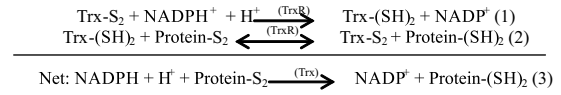
Tiyoredoksin redüktazlar (TrxR), Tiyoredoksin proteinleri (Trx) ve NADDPH, tiyoredoksin sistemi oluştururlar. Bu sistem hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunur [1]. Tiyoredoksin (Trx) ve tiyoredoksin redüktaz (TrxR), büyümenin kolaylaştırılması, apoptoz ve hücre korunması gibi birçok hücre içi olayda görev alan redoks aktif proteinleridir [2]. Tiyoredoksin redüktaz (TrxR) ve tiyoredoksin (Trx) sistem, hücre büyümesi, gen ekspresyonu ve sinyal iletimi, redoks aktivitesinin düzenlenmesi, oksidatif strese karşı koruma, anti apoptotik (programlı hücre ölümü) fonksiyon ve hücre büyümesinde etki gösterirler. TrxR/Trx sistem ayrıca kanser tedavilerinde geniş bir alanda potansiyel hedef olarak kullanılır [3].

Tiyoredoksin redüktazlar (TrxR) lipoamid dehidrogenaz, glutasyon redüktaz ve civa iyonu redüktaz gibi piridin nükleotit disülfid oksido redüktazlar arasında flavoprotein ailesine bağlı enzimlerdir. Bu ailenin üyelerinin her biri disülfid içeren aktif bir bölge, bir NADPH bağlanma yeri ve bir FAD prostetik grubun oluşturduğu homodimerik proteinlerdir [4].

Tiyoredoksin redüktazlar (TrxR), Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys amino asitlerinden oluşan katalitik bölümü ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) bağlanma bölümü ile aktivite gösterirler. Ayrıca, katalitik bölüm ile etkileşime giren ve redoks aktivitesi için gerekli olan C-terminal bölgesinde selenosistein içerirler [5,6]. Selenyum TrxR aktivitesi için gereklidir. Yapılan çalışmalarda kültür ortamına 1 µM Se eklenmesi halinde hücrel TrxR aktivitesinin 40 kat arttığı görülmüştür [7]. TrxR aktivitesi, oksidatif heksosmonofosfat (HMPS) çevriminin kontrol noktası enzimi olan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ile üretilen NADPH tarafından düzenlenir [8].

Enzimin sitozolik ve mitokondriyal olmak üzere iki formu vardır [5]. Memelilerde ise TrxR'ler sitozolik, mitokondriyal ve testis-spesifik tiyol regülatörü olmak üzere 3 değişik izoformda bulunur [9].

Enzimin en önemli fonksiyonu tiyoredoksin proteininin NADPH'a bağımlı olarak indirgenmesini katalizlemektir. Bu reaksiyonda elektronlar NADPH'dan enzimin prostetik grubu olan FAD aracılığıyla enzimin substratı olan tiyoredoksin'e akar ve substratı indirger [4]. TrxR'ler okside tiyoredoksinleri indirgeme kabiliyetleri sebebiyle bu isimle adlandırılmışlardır [6]. Tiyoredoksinler (Trx) ise Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys amino asitlerinden oluşan bir katalitik bölüm içeren 10-12 kDa'luk bir protein ailesidir. Bu proteinlerin iki sistein grubu geri dönüşümlü oksidasyon/reduksiyona uğrar. Trx'in redükte olmuş ditiyol formu [Trx-(SH)₂] disülfid grubu içeren okside protein substratlarını redükte eder. Okside disülfid formu [Trx-(S-S)] ise TrxR tarafından düzenlenen NADPH-bağımlı bir yolla devire geri katılır [10].



Şekil 1. Trx/ TrxR sisteminin hücredeki rolü [5].

Tiyoredoksin dışında lipoik asit [11], lipid hidroperoksit [12], selenit, vitamin C [13], Vitamin K₃ [14], 5,5'-dithiobis-(2 nitrobenzoik asit), allokstan [15], dehidroaskorbat [16] ve tümör supresor protein P53 [17], enzimin bilinen diğer substratlarındandır. Ancak bu substratların çoğunun indirgenmesinde TrxR'nin fizyolojik rolü tam olarak bilinmemektedir.

TrxR/Trx sistemi, DNA sentezi ve hücre çoğalması için gerekli olan deoksiribonükleotidlerin yapımında kritik bir rol oynar. Trx, nükleotid difosfatların deoksiribonükleotidlere dönüşümünü katalizleyen bir enzim olan ribonükleotid redüktazın, ribozu indirgemesi için gerekli olan elektronları sağlar [18].

Bu çalışmada tiyoredoksin redüktaz enziminin hindi karaciğer mitokondrisinden ilk kez saflaştırılması ve bazı pestisitlerin bu enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

2.MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler DTNB, EDTA, Potasyum Fosfat, NADPH, Etanol, Poliakrilamid, Coomassie brilliant blue, Sodyum dodesil sülfat(SDS), DTT, Tris, HCl, 2',5' ADP Sepharose 4B ve diğer tüm kimyasal maddeler Sigma Chem Com.'dan temin edilmiştir.

2.2. Metod

2.2.1 Homojenatın hazırlanması

Homojenat hazırlamak için hindi karaciğeri (20g) bıçak yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Parçalanan karaciğer üzerine 60 ml 0,05 M Tris/HCl (pH 7,5) tamponu ilave edilerek homojenizatör ile süspansiyon edildi. Hazırlanan homojenattan mitokondri organeli elde edebilmek için gradientli santrifüj yapıldı. Mitokondriyal enzim için süspansiyon önce 6.000 g'de +4°C'da 30 dk. santrifüj edildi. Çökelek atıldı, süpernatant 22.000 g'de santrifüj edildi. Elde edilen çökelek 0,05 M Tris/HCl (pH 7,5) tamponu içinde homojenize edildi ve dondurup çözme işlemi uygulandı. Bu süspansiyon 24.000 g'de +4 °C 30 dk. santrifüj edildi ve süpernatant analizler için kullanılmak üzere hazırlandı.

2.2.2. Afinitite kromatografisi ile enziminin saflaştırılması

10 ml'lik yatak hacmi için 2 g kuru 2', 5'-ADP Sepharose 4B jeli tartılarak, 400 ml destile su ile katı maddelerin uzaklaştırılması için birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişirilmiş oldu. Şişirilmiş jelin havası su trompu kullanılarak vakum ile alındı ve daha sonra dengeleme tamponu (10 mM Tris/HCL, 1 mM EDTA pH 7,4) (Tampon A) ilave edilerek jel süspansiyon edildi. Süspansiyon edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla tampon A ile yıkılarak kolon dengelendi. Kolonun dengelenmiş olduğu elüat ile tampon çözeltide 280 nm'de absorbanslarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı.

Böylece afinitite kolonu hazırlanmış oldu. Elde edilen homojenat tampon A ile dengelenmiş olan kolona uygulandı. Daha sonra kolon tampon A ile yıkandı. Yıkama işlemine 412 nm'deki absorbans değeri "0" oluncaya kadar devam edildi. Daha sonra 2' şer ml, 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM ve 10 mM NADP⁺ ihtiva eden tampon A çözeltileri ile gradientli elüsyon işlemi gerçekleştirildi ve tiyoredoksin redüktaz elde edildi.

2.2.3. Bradford yöntemiyle protein tayini

2', 5' ADP-Sepharose 4B afinitite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılan enzim için kantitatif protein miktarı Bradford metoduna göre belirlendi [19].

2.2.4. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-10 kesikli sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi [20].

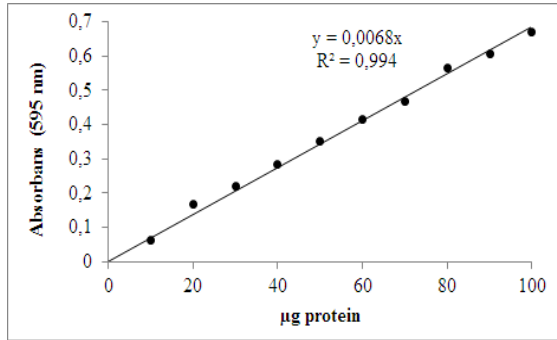
2.2.5. *In Vitro* İnhibisyon Çalışmaları

Etken maddesi glifosatizopropilamin, fenoksaprop-p-etil, 2,4-diklorofenoksiasetik asit dimetilamin tuzu ve haloksifop-p-metilesterolan 4 çeşit herbisit ve etken maddesi diklorvos, deltametrin, sipermetrin, klorpirifos olan 4 çeşit insektisit enzim aktivitesi üzerine *in vitro* etkisi incelendi. Çalışılan her madde ilk olarak saf suyla 1000 kat veya daha fazla seyreltildi. Her pestisit 5 farklı konsantrasyonunda enzimin aktivitesi ölçüldü. İnhibitörsüz enzimin aktivitesi olan kontrol aktivitesi %100 olarak kabul edilip diğer inhibitör konsantrasyonlarında % Aktiviteler hesaplandı. İnhibitör konsantrasyonlarına karşı % Aktivite grafiği çizildi. Çizilen bu grafiklerden inhibitörler için IC₅₀ değerleri hesaplandı.

3. BULGULAR

3.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Homojenattan, gradientli santrifüj ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 2'de gösterildi.



Şekil 2. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

3.2. Hindi Karaciğer Mitokondriyal Tioredoksin Redüktaz Enziminin 2',5'-ADP Sepharose 4B Afinite Kromatografisi İle Saflaştırması İle İlgili Sonuçlar

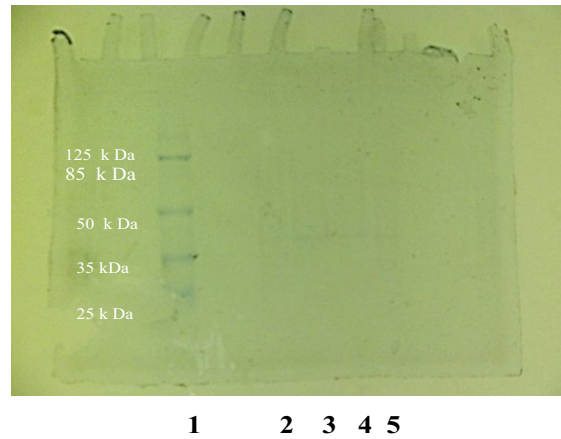
Hazırlanan homojenat 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna yüklendi. Daha sonra gradientli elüsyon gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 1'de gösterildi.

Tablo 1. Hindi karaciğer mitokondriyal tioredoksin redüktaz enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırma sonuçları

Numune Türü	Toplam Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EÜ)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	60	1888,2	5,94	0,0031	100	1
2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi	8	0,0397	0,122	3,07	2,05	990

3.3. Hindi Karaciğeri Mitokondriyal Tioredoksin Redüktaz Enziminin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü

2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisinden elde edilen elüatlardaki enzimlerin saflığını kontrol etmek için kesikli SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 3'de gösterildi.

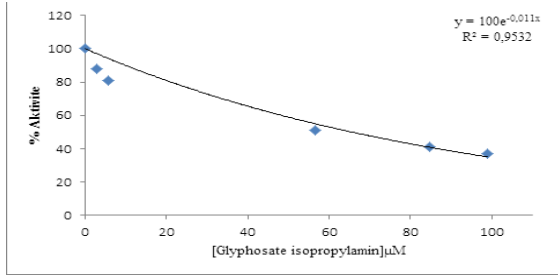


Şekil 3. 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonundan elü edilen hindi karaciğeri mitokondriyal tioredoksin redüktaz enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü.

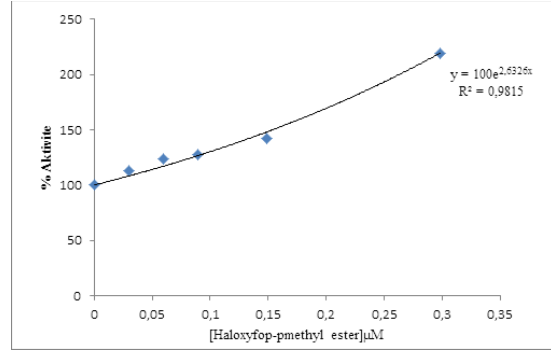
*1. kuyu: standart proteinler (β -galaktosidaz: 120 kDa, BSA: 85 kDa, ovalbumin: 50 kDa, CA: 35 kDa, β -laktoglobulin: 25 kDa) 2,3, 4ve 5. kuyu: Afinite kolonundan alınan tioredoksin redüktaz enzimi.

3.4. Hindi karaciğeri mitokondriyal tioredoksin redüktaz enzimi üzerine bazı ilaçların etkilerinin belirlenmesine ait çalışma sonuçları

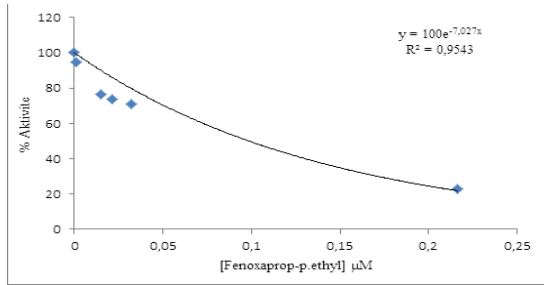
Hindi karaciğeri mitokondriyal tioredoksin redüktaz enzimi aktivitesi üzerine bazı pestisitlerin etkilerini belirleyebilmek için bu pestisitlerin stok çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden değişik konsantrasyonlarda alınarak hindi karaciğer tioredoksin redüktaz enzimi aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Çalışmalar sonucu kullanılan pestisit konsantrasyonuna karşı % Aktivite grafikleri Şekil 4- 11'de verildi.



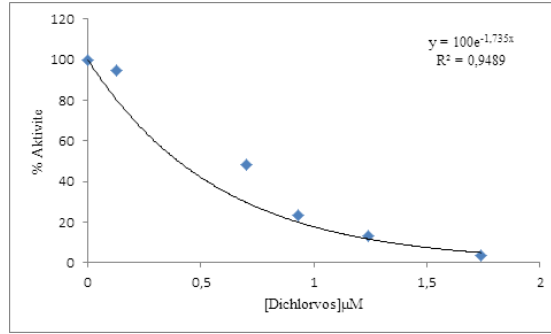
Şekil 4. Hindi karaciğeri mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enzimi üzerine etken maddesi glifosfat izopropilamin olan herbisitinin etkisi



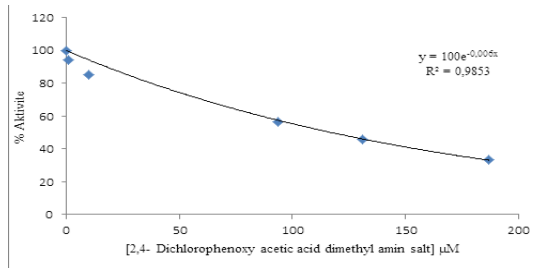
Şekil 7. Hindi karaciğeri mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enzimi üzerine etken maddesi haloxyfop-p-metil ester olan herbisitinin etkisi



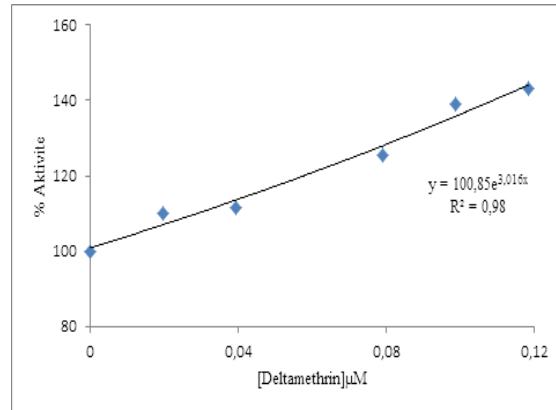
Şekil 5. Hindi karaciğeri mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enzimi üzerine etken maddesi fenoksaprop-p-etil olan herbisitinin etkisi



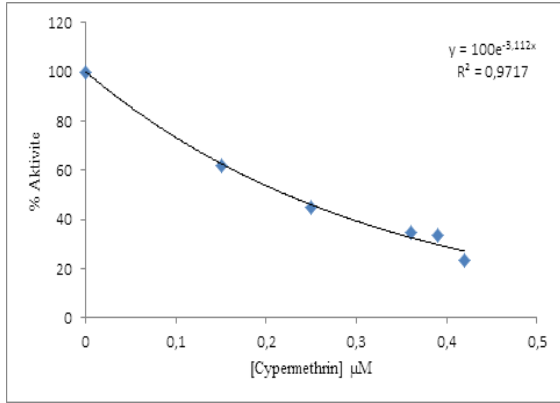
Şekil 8. Hindi karaciğeri mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enzimi üzerine etken maddesi diklorvos olan insektisitinin etkisi



Şekil 6. Hindi karaciğeri mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enzimi üzerine etken maddesi 2,4-diklorofenoksi asetik asit dimetilamin tuzu olan herbisitinin etkisi



Şekil 9. Hindi karaciğeri mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enzimi üzerine etken maddesi deltametrin olan insektisitinin etkisi



Şekil 10. Hindi karaciğeri mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enzimi üzerine etken maddesi sipermetrin olan insektisitinin etkisi

Tablo 2. Hindi karaciğeri mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz enzimi için bulunan IC₅₀ değerleri.

İLAÇLAR	IC ₅₀ Değerleri (µM)
Fenoksaprop-p-etil	0,112
Glifosatzopropil amin	63,18
Diklorvos	0,397
2,4-diklorofenoksiasetik asit dimetilamin tuzu	115,8
Klorpirifos	0,015
Sipermetrin	0,222

Çalışmada kullanılan 8 pestisitden 6 tanesine ait IC₅₀ değerleri fenoksaprop-p-etil için 0,112 glifosatzopropilamini için 63,18, 2,4-diklorofenoksiasetik asit dimetilamin tuzu için 115,8, diklorvos için 0,397, sipermetrin için 0,222 ve klorpirifos için 0,015 µM olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan pestisitlerin büyük bir bölümünün enzimi tamamen inhibe etmesinden dolayı bu bileşikler, Trx/TrxR sistemiyle ilişkilendirilen tümör, kanser, AIDS ve değişik immün sistem rahatsızlıklarında Trx/TrxR salınımını azaltma amaçlı ilaçların hazırlanmasında fikir verici olabilir. Aynı zamanda bu toksik maddeler toprağa suya, bitkilere ve hayvanlara ve oradan da insan sindirim sistemine erişmesi durumunda ya da doğrudan bu maddelere maruz kalınması durumunda Trx/TrxR sistemi geri dönüşümsüz inhibe olacağından dolayı organizmada büyük hasarlara yol açabilir.

5. KAYNAKÇA

- [1]. Arner, E. S. and Holmgren, A., Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase, *Eur. J. Biochem.*, 267, 6102-6109, 2000.
- [2]. Söderberg, A., Sahaf, B., Rosen, A., Thioredoxin reductase, a redox -active selenoprotein, is secreted by normal and neoplastic cells: presence in human plasma, *Cancer research*, 60, 2281-2289, 2000.
- [3]. Lincoln, D.T., Emadi, E.M., Tonissen, K.F., Clarke FM. The thioredoxin-thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer, *Anticancer Res.*, 23(3B), 2425-33, 2003.
- [4]. Williams, C.H. Jr, Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase, and mercuric ion reductase, a family of flavoenzyme transhydrogenases, In *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes* (Müller, F., ed.), CRC Press, Boca Raton, FL., 3, 121-211, 1992.
- [5]. Powis, G., Montfort, W.R., Properties and biological activities of thioredoxin, *Pharmacol Toxicol*, 41, 261-295, 2001.
- [6]. Mustacich, D., Powis, G., Thioredoxin reductase. *Biochem J.* 346, 1-8, 2000.
- [7]. Gallegos, A., Berggren, M.I., Gasdaska, J.R. and Powis, G., Mechanisms of the regulation of thioredoxin reductase activity in cancer cells by the chemopreventive agent selenium, *Cancer Res.*, 57, 4965-4970, 1997.
- [8]. Ayene, I.S., Stamato, T.D., Mauldin, S.K., Biaglow, J.E., Tuttle, S.W., Jenkins, S.F., Mutation in the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene lead to inactivation of kudna binding during oxidative stress, *J Biol Chem.*, 277, 9929-35, 2002.
- [9]. Turanov, A., Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N., Characterization of Protein Targets of Mammalian Thioredoxin Reductase, *Methods enzymol.* 474, 245-254, 2010.
- [10]. Nishinaka, Y., Nakamura, H., Masutani, H., Yodoi, J., Redox control of cellular function by thioredoxin: a new therapeutic direction in host defence, *Arch Immunol Their Exp.*, 49, 285-92, 2001.
- [11]. Arner, E.S.J., Nordberg, J. And Holmgren, A., Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 225, 268-274, 1996.

- [12]. Björnstedt, M., Hamberg, M., Kumar, S., Xue, J. and Holmgren, A., Human thioredoxin reduces lipid hydro peroxides by NADPH and seleno cysteine strongly stimulates these action via catalytically generated selenols, *J.Biol.Chem.*, 270, 11761-11764, 1995.
- [13]. Arner, E.S.J. and Holmgren, A., Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase, *Eur. J. Biochem.*, 267, 6102-6109, 2000.
- [14]. Holmgren, A., Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action, *Eur. J. Biochem.*, 254, 9113-9119, 1979.
- [15]. Rigobello, M.P., Callegaro, M.T., Barzon, E., Benetti, M. and Bindoli, A., Purification of mitochondrial thioredoxin reductase and its involvement in the regulation of membran permeability, *Free Radical Biology-Medicine*, 24, 370-376, 1998.
- [16]. May, J.M., Mendiratta, S., Hill, K.E. and Burk, R.F., Reduction of dehydro ascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase, *J. Biol. Chem.*, 272, 22607-22610, 1997.
- [17]. May, J.M., Cobb, C.E., Mendiratta, S., Hill, K.E. and Burk, R.F., Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase, *J. Biol. Chem.*, 273, 23039-23045, 1998.
- [18]. Jordan, A., Reichard, P., Ribonucleotide reductases, *Annu Rev Biochem*, 67, 71-98, 1998.
- [19]. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72, 248-251, 1976.
- [20]. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685, 1970.
- [21]. Baker, A., Payne, C.M., Briehi, M.M. and Powis, G., Thioredoxin a gene found over expressed in human cancer, inhibits apoptosis *invitro* and *in vivo*, *Cancer Res.*, 57, 5162-5167, 1997.
- [22]. Thelander, L., Thioredoxin reductase. Characterization of a homogenous preparation from *Escherichia coli B.*, *J Biol Chem* 242, 852-859, 1967.
- [23]. Luthman, M., Holmgren, A., Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization, *Biochemistry*, 21, 6628-6633, 1982.
- [24]. Holmgren, A., Bovine thioredoxin system. Purification of thioredoxin reductase from calf liver and thymus and studies of its function in disulfide reduction, *J Biol. Chem.*, 252, 4600-4606, 1977.
- [25]. Gonzales, P.P., Baldesten, A., Reichard, P., Purification of a thioredoxin system from yeast, *Journal of Biochem.*, 245, 2363-2370, 1970.
- [26]. Tanaka, R. Kosugi, K., Mizukami, M., Ishibashi, M., Tokunaga, H. and Tokunagaa, M. Expression and purification of thioredoxin and thioredoxin reductase from *Brevibacillus choshinensis*, *Protein Expression and Purification*, 37, 385-391. 2004.
- [27]. Dai, C., And Wang, M.H., Characterization of tomato Trx h and NTR proteins. Kangwon National University, Chuncheon 200-701, 2011.
- [28]. T a n d o g a n , B . A n d Ulusu, N.N., Thioredoxin reductase, *Hacettepe J. Biol. Chem.*, 39, 87-92, 2011.
- [29]. Carvalho, C., Et. Al, Biomarkers of adverse response to mercury: histopathology versus thioredoxin reductase activity, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 359879-359888, 2012.
- [30]. Wittle, A.B., Anestal, K., Jerremalm, E., Ehrsson, H., Arner, E.S.J., Inhibition of trxr but not of gr by the major classes of alkylating and platinum-containing anticancer compounds, *Free Radical Biology Medicine*, 39, 696-703, 2005.
- [31]. Kemerdere, R., Glial Tümörlerde Tiyoredoksin Redüktaz Değerleri (Uzmanlık Tezi), İstanbul Üniversitesi Cerrah Paşa Tıp Fakültesi Nöroşirürji ABD, İstanbul, 2008.