T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI DEJENERATİF DEMANS HASTALARINDA OKSİDATİF HASAR: ALZHEIMER HASTALIĞINDA OKSİDATİF MAKROMOLEKÜL HASARININ VE ONARIMININ İNCELENMESİ

GAMZE TUNA

BİYOKİMYA

DOKTORA TEZİ

İZMİR-2013

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2009970006

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI DEJENERATİF DEMANS HASTALARINDA OKSİDATİF HASAR: ALZHEIMER HASTALIĞINDA OKSİDATİF MAKROMOLEKÜL HASARININ VE ONARIMININ İNCELENMESİ

BİYOKİMYA

DOKTORA TEZİ

GAMZE TUNA

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. G. HÜRAY İŞLEKEL

İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. F. Güldal KIRKALI

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2009.KB.SAG.009 sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2009970006

DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2009.KB.SAG.009 sayı ile desteklenen, 21.08.2008 tarih ve 04/17/2008 no'lu toplantısında, 298/2008 protokol numaralı etik kurul onayıyla sunulan "Farklı Dejeneratif Demans Hastalarında Oksidatif Hasar" isimli projede, Fronto-temporal demans, Lewy cisimcikli demans ve Alzheimer hastalarından oluşan üç farklı dejeneratif demans hasta grubu ile çalışmalar gerçekleştirildi. Projenin, Alzheimer hastalarını içeren bölümü bu tez çalışmasının konusunu oluşturmaktadır.

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Biyokimya Doktora programı öğrencisi Gamze TUNA **"FARKLI DEJENERATİF DEMANS HASTALARINDA OKSİDATİF HASAR: ALZHEIMER HASTALIĞINDA OKSİDATİF MAKROMOLEKÜL HASARININ VE ONARIMININ İNCELENMESİ"** isimli Doktora tezini 28/06/2013 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Prof. Dr. G. Hüray İŞLEKEL

BAŞKAN

Prof. Dr. Canan ÇOKER

ÜYE

Prof. Dr. Gülgün OKTAY

ÜYE

Prof. Dr. Görsev YENER

ÜYE

Prof. Dr. Zeliha KERRY

ÜYE

Yard. Doç. Dr. Tuncay KÜME

YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Taner ONAT

YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

İÇİNDEKİLER i

TABLO DİZİNİ v

ŞEKİL DİZİNİ vi

KISALTMALAR x

TEŞEKKÜR xii

ÖZET 1

ABSTRACT 3

1. GİRİŞ VE AMAÇ 5

2. GENEL BİLGİLER 7

2.1. DEMANSIN TANIMI VE ÖZELLİKLERİ 7

2.2. ALZHEIMER HASTALIĞI 9

2.2.1. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi 9

2.2.2. Alzheimer Hastalığının Patolojisi 9

2.2.3. Alzheimer Hastalığının Genetiği 12

2.2.4. Alzheimer Hastalığının Tanısı 13

2.2.5. Alzheimer Hastalığı ve Oksidatif Stres 17

2.3. OKSİDATİF HASAR 21

2.3.1. Serbest Radikaller 21

2.3.2. Serbest Radikal Kaynakları ve Reaktif Oksijen Türleri 22

2.3.3. Biyolojik Sistemlerde Oluşan Serbest Radikaller ve Etkileri 23

2.3.4. Oksidatif Makromolekül Hasarı 27

2.3.4.1. Protein Hasarı 28

2.3.4.2. Lipid Hasarı 30

2.3.4.3. Karbohidrat Hasarı 32

2.3.4.4. DNA Hasarı 35

2.3.4.4.1. DNA Baz Hasarı 37

2.3.4.4.2. Şeker Hasarı 42
2.3.4.4.3. 8-5'-siklopürin-2'-deoksinüklozidler 43
2.3.4.4.4. DNA-protein çapraz bağlanmaları 44
2.3.4.4.5. Abazik bölgeler 45
2.3.4.4.6. Tek ve çift zincir kırıkları 45
2.4. DNA ONARIMI 45
2.4.1. Baz Kesme-Çıkarma Onarımı 47
2.4.1.1. OGG1 Geni 51
2.4.1.2. NEIL1 Geni 52
2.5. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR 52
2.5.1. Jelatinazlar (MMP-2, MMP-9) 54
2.5.1.1. Matriks Metalloproteinaz-2 54
2.5.1.2. Matriks Metalloproteinaz-9 55
2.5.2. Matriks Metalloproteinazların Spesifik Doku İnhibitörleri 55
2.5.2.1. Metalloprotenaz doku inhibitörü-1 55
2.5.2.2. Metalloprotenaz doku inhibitörü -2 56
3. GEREÇ VE YÖNTEM 57
3.1. Araştırmanın Tipi 57
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı 57
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları 57
3.4. Çalışma Materyali 59
3.5. Araştırmanın Değişkenleri 59
3.6. Veri Toplama Araçları 59
3.6.1. Demografik ve Nöropsikolojik Veri Toplama 59
3.6.2. Kullanılan Kimyasallar, Malzemeler ve Cihazlar 60
3.6.3. Örneklerin Toplanması ve Saklanması 64
3.6.4. DNA Baz Hasarı Çalışmaları 64
3.6.4.1. Lökosit İzolasyonu 65
3.6.4.2. DNA İzolasyonu 65
3.6.4.3. Gaz Kromatografi - Sıralı Kütle Spektrometre ile DNA Baz Hasarı Ölçümü 65
3.6.4.3.1. Ölçüm Öncesi Hazırlıklar 73

3.6.4.3.2. Ölçüm Yöntemi 75
3.6.5. DNA Onarım Enzimleri Ekspresyon Düzeyi Çalışmaları 76
3.6.5.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu 76
3.6.5.2. RNA İzolasyonu 79
3.6.5.3. RNA'nın % 1 Formaldehit Agaroz Jelde Görüntülenmesi 80
3.6.5.4. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi 82
3.6.5.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Çalışmaları 83
3.6.5.6. % 1,5'lik Agaroz Jel Elektroforezi 85
3.6.5.7. OGG1 ve NEIL1 mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi 86
3.6.6. Matriks Metalloproteinazlar ve İnhibitörlerinin Analizi 86
3.6.7. Lipid Hasarı Çalışmaları 89
3.6.7.1. HPLC yöntemi ile MDA Ölçümünün Temel İlkesi 89
3.6.7.2. Analiz Koşulları 90
3.6.8. Protein Hasarı Çalışmaları 91
3.6.9. Karbohidrat Hasarı Çalışmaları 93
3.6.9.1. HPLC yöntemi ile N^{ε}-Karboksimetillizin Ölçümünün Temel İlkesi 93
3.6.9.2. Analiz Koşulları 93
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi 95
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi 95
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları 96
3.10.Etik Kurul Onayı 96
4. BULGULAR 97
4.1. Çalışma Gruplarını Tanımlayıcı Bulgular 97
4.2. DNA Baz Hasarı Bulguları 97
4.2.1. FapyAdenin Hasarı Bulguları 98
4.2.2. FapyGuanin Hasarı Bulguları 100
4.2.3. 8-Hidroksi-Guanin Hasarı Bulguları 101
4.2.4. 5-Hidroksi-5-Metil-Hidantoin Hasarı Bulguları 103
4.2.5. 5-Hidroksi-Sitozin Hasarı Bulguları 104
4.2.6. Timin-glikol, 5-Hidroksi-metil-urasil, 5-Hidroksi-urasil, 5,6-dihidroksi-urasil Hasarları Bulguları 106
4.2.7. Korelasyon Analizleri 106

4.3. DNA Onarım Enzimleri Ekspresyon Düzeyleri 106
4.3.1. RNA Örneklerinin %1,2 Formaldehit Agaroz Jelde Görüntülenmesi 106
4.3.2. OGG1 ve NEIL1 mRNA Ekspresyon Analizi Bulguları 107
4.3.3. Korelasyon Analizleri 112
4.4. Matriks Metalloproteinazlar ve İnhibitörlerinin Ölçümü 113
4.4.1. MMP2 Düzeyi 113
4.4.2. MMP9 Düzeyi 113
4.4.3. TIMP1 Düzeyi 114
4.4.4. TIMP2 Düzeyi 115
4.4.5. Korelasyon Analizleri 116
4.5. Malondialdehit Düzeyi Bulguları 117
4.5.1. Korelasyon Analizleri 117
4.6. Nitrotirozin Düzeyi Bulguları 118
4.6.1. Korelasyon Analizleri 118
4.7. N^{ε}-Karboksimetillizin Düzeyi Bulguları 118
4.7.1. Korelasyon Analizleri 119
5. TARTIŞMA 122
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 134
7. KAYNAKLAR 136
8. EKLER 154

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa no

Tablo 1. Demans sınıflandırması 8

Tablo 2. E.*coli* ve insan DNA glikozilazlarının substratları 48

Tablo 3. MMP'lerin sınıflandırılması 53

Tablo 4. Çalışmaya dahil etme ve dışlama kriterleri 58

Tablo 5. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve malzemeler 60

Tablo 6. Çalışmada kullanılan cihazlar 63

Tablo 7. % 1 Formaldehit agaroz jel yönteminde kullanılan çözeltiler 81

Tablo 8. Primer dizileri ve PCR ürün uzunlukları 83

Tablo 9. RT-PCR Master mix içeriği 84

Tablo 10. RT-PCR protokolü 84

Tablo 11. % 1,5 agaroz jel yönteminde kullanılan çözeltiler 85

Tablo 12. Hasta ve kontrol gruplarını tanımlayıcı bulgular 97

Tablo 13. Hasta ve kontrol gruplarına ait tüm veriler 120

Tablo 14. Alzheimer hastalarına ait korelasyon analizi bulguları 121

Tablo 15. Primer dizileri ve PCR ürün uzunlukları 159

Tablo 16. RT-PCR çalışma protokolü 160

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa no

Şekil 1. Normal ve Alzheimer'lı hasta beyin kesitleri 10

Şekil 2. Nörofibriler yumaklara ait mikroskobik kesit fotoğrafı 11

Şekil 3. Amiloid plaklara ait mikroskobik kesit fotoğrafı 12

Şekil 4. Alzheimer hastalığı kan oksidatif stres biyobelirteçlerinin kaynağı 14

Şekil 5. Oksidatif stresle ilişkili durumlar 17

Şekil 6. Alzheimer hastalarının beyinlerinde Aβ'nın indüklediği oksidatif stres 18

Şekil 7. Atomun iç yapısı 21

Şekil 8. Oksijen molekülünün suya indirgenmesi ve oksijen kaynaklı radikallerin oluşumu 24

Şekil 9. Süperoksit radikalinin moleküler yapısı 24

Şekil 10. Serbest radikal hasar ürünleri 28

Şekil 11. Nitrotirozin oluşum mekanizması 30

Şekil 12. Nitrotirozin molekülü 30

Şekil 13. ROT oluşum yolları, lipid peroksidasyonu, glutatyon ve diğer antioksidanların rolü 32

Şekil 14. AGE oluşumu 34

Şekil 15. İleri glikasyon son ürünleri 34

Şekil 16. DNA üzerinde $^{\bullet}$OH radikalinin atak yaptığı bölgeler 36

Şekil 17. $^{\bullet}$OH radikalinin pürinlerle reaksiyonları 38

Şekil 18. Guanin C8-OH-eklenti radikalinin reaksiyonları 39

Şekil 19. Guanin bazı üzerinde iyonize radyasyonun direk ve indirek etkisi 39

Şekil 20. $^{\bullet}$OH radikalinin timinle reaksiyonları 40

Şekil 21. $^{\bullet}$OH radikalinin sitozinle reaksiyonları 40

Şekil 22. Oksidatif hasara uğramış DNA bazları 42

Şekil 23. Oksidatif hasara uğramış şeker ürünleri 43

Şekil 24. 8-5'-siklopürin-2'-deoksinüklozidlerin oluşum mekanizması 44

Şekil 25. Kromatinde timin-tirozin çapraz bağının oluşumu 45

Şekil 26. Guanin lezyonunun tamiri ve replikasyona katılması 47

Şekil 27. DNA glikozilazların işleyiş mekanizması 49

Şekil 28. Baz kesme-çıkarma onarım yolağının şematik diyagramı 50

Şekil 29. OGG1 geninin 3. kromozomdaki lokalizasyonu 51

Şekil 30. NEIL1 geninin 15. kromozomdaki lokalizasyonu 52

Şekil 31. MMP enzimlerinin moleküler yapısı 54

Şekil 32. Gaz kromatografisi cihazının temel kısımları 67

Şekil 33. Kütle spektrometre ana bileşenleri 69

Şekil 34. GC-MS/MS cihazı 69

Şekil 35. 4,6-diamino-5-formamidopirimidin'in trimetilsillil türevinin elektron çarpışma kütle spektrumu 71

Şekil 36. MRM modunda seçilen ana iyon/ürün iyon ikilisinin izlenmesi 71

Şekil 37. 8-OHGua ve 8-OH-Gua-$^{15}N_5$ iyon kromatogramları 72

Şekil 38. Bileşik miktarı ile iyon-akım profilindeki sinyal alanı arasındaki ilişki 73

Şekil 39. DNA okside bazı 8-hidoksiguanin'in trimetilsilayon ile derivatizasyonu 74

Şekil 40. Polimeraz zincir reaksiyonu basamakları 77

Şekil 41. SYBR® Green I boyası etki mekanizması 78

Şekil 42. MMP2 çalışması standart eğrisi 88

Şekil 43. MMP9 çalışması standart eğrisi 88

Şekil 44. TIMP1 çalışması standart eğrisi 89

Şekil 45. TIMP2 çalışması standart eğrisi 89

Şekil 46. MDA çalışması standart eğrisi ve örnek analiz çalışması 91

Şekil 47. Nitrotirozin çalışması standart eğrisi 92

Şekil 48. CML çalışması standart eğrisi 95

Şekil 49. Analizi yapılan lezyonlar 98

Şekil 50. FapyAde ve FapyAde-$^{13}C,^{15}N_2$ iyon kromatogramları 99

Şekil 51. AH ve kontrol grupları FapyAde düzeyleri kutu nokta grafiği 99

Şekil 52. FapyGua ve FapyGua-$^{13}C,^{15}N_2$ iyon kromatogramları 100

Şekil 53. AH ve kontrol grupları FapyGua düzeyleri kutu nokta grafiği 101

Şekil 54. 8-OH-Gua ve 8-OH-Gua,$^{15}N_5$ iyon kromatogramları 102

Şekil 55. AH ve kontrol grupları 8-OHGua düzeyleri kutu nokta grafiği 102

Şekil 56. 5-OH-5-MeHyd ve 5-OH-5-MeHyd,$^{13}C,^{15}N_2$ iyon kromatogramları 103

Şekil 57. AH ve kontrol grupları 5-OH-5MeHyd düzeyleri kutu nokta grafiği 104

Şekil 58. 5-OH-Cyt ve 5-OH-Cyt,$^{13}C,^{15}N_2$ iyon kromatogramları 105

Şekil 59. AH ve kontrol grupları 5-OH-Cyt düzeyleri kutu nokta grafiği 105

Şekil 60. RNA jel görüntüsü 107

Şekil 61. Hasta ve kontrol örneklerinde OGG1, NEIL1 ve β-Aktin genlerine ait erime eğrisi analizi örneği 108

Şekil 62. NEIL1 ve OGG1ekspresyon profilleri grafiği 109

Şekil 63. Hasta ve kontrol örneklerinde NEIL 1 (300 bps) RT-PCR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüsü 109

Şekil 64. Hasta ve kontrol örneklerinde OGG 1 (182 bps) ve β-aktin (99 bps) RT-PCR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüsü 110

Şekil 65. Hasta örneklerinin OGG1 ekspresyon profili grafiği 111

Şekil 66. Hasta örneklerinin NEIL1 ekspresyon profili 112

Şekil 67. Hasta ve kontrol grupları MMP2 düzeyleri kutu nokta grafiği 113

Şekil 68. AH ve kontrol grupları MMP9 düzeyleri kutu nokta grafiği 114

Şekil 69. AH ve kontrol grupları TIMP1 düzeyleri kutu nokta grafiği 115

Şekil 70. AH ve kontrol grupları TIMP2 düzeyleri kutu nokta grafiği 116

Şekil 71. AH ve kontrol grupları MDA düzeyleri kutu nokta grafiği 117

Şekil 72. AH ve kontrol grupları nitrotirozin düzeyleri kutu nokta grafiği 118

Şekil 73. AH ve kontrol grupları CML düzeyleri kutu nokta grafiği 119

Şekil 74. Kontrol (K35) ve hasta (H65) örneklerine ait OGG1 (955a-b, 385a-b, 253 a-b primerleri) erime eğrisi analizi 162

Şekil 75. NEIL1(3 a-b, 192 a-b), OGG1 (253 a-b, 385 a-b, 955 a-b) primerleri ile gerçekleştirilen RT-PCR çalışması ürünlerinin %1,5'luk agaroz jel elektroforezi görüntüsü 163

Şekil 76. Kontrol (K35) ve hasta (H65) örneklerine ait NEIL1 (192a-b, 3a-b primerleri) erime eğrisi analizi 162

Şekil 77. Kontrol (K35) ve hasta (H65) örneklerine ait NEIL1 (GK111a-b primerleri) ve β-Aktin erime eğrisi analizi 164

Şekil 78. NEIL1 (GK111 a-b) ve β-Aktin primerleri ile gerçekleştirilen RT-PCR çalışması ürünlerinin %1,5'luk agaroz jel elektroforezi görüntüsü 164

KISALTMALAR

AH: Alzheimer hastalığı	**8-OH-Ade:** 8-hidroksiadenin
DNA: Deoksiribonükleik asit	**8-OH-Gua:** 8-hidroksiguanin
DSM-IV: Amerikan Psikiyatri Birliği Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı	**FapyAde:**4,6-diamino-5-formamidopirimidin
NFY: Nörofibriller yumaklar	**FapyGua:**2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin
Aβ: amiloid β-peptid	**5-OH-MeUra:** 5-hidroksimetilurasil
AβPP: Aβ prekürsor proteinin	**8-OH-Gua:** 8-hidroksiguanin
ApoE: Apolipoprotein E	**FapyAde:**4,6-diamino-5-formamidopirimidin
MTL: Medial temporal lob	**FapyGua:**2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin
BOS: Beyin omurilik sıvısı	**5-OH-MeUra:** 5-hidroksimetilurasil
NINCDS-ADRDA: National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association	**5,6-diOH-Ura:** 5,6-dihidroksi-urasil
MMDT: Mini Mental Durum Testi	**FapyAde:**4,6-diamino-5-formamidopirimidin
GBÖ: Global Bozulma Ölçeği	**5-FoUra:** 5-formilurasil
ROT: Reaktif oksijen türleri	**5-OH-5-Mehyd:** 5-hidroksi-5-metilhidantoin
ÇDYA: Çoklu doymamış yağ asitleri	**Ura gly:** Urasil glikol
NO: Nitrik oksit	**5-OH-Cyt:** 5-hidroksi-sitozin
GPx: Glutatyon peroksidaz	**5-OH-Ura:** 5-hidroksi urasil
AGE: İleri glikozilasyon son ürünleri	**cdG:** 8,5'-siklo-2'-deoksiguanozin
SOD-1: Süperoksit dismutaz-1	**cdA:** 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozin
MDA: Malondialdehit	**BER:** Baz kesme-çıkarma onarımı
ATP: Adenozin trifosfat	**Fpg:** Formamidopirimidin glikozilaz
NAD: Nikotin adenin dinükleotid	**Nth:** Endonükleaz III
FMN: Flavin mononükleotid	**Nei:** Endonükleaz VIII
FAD: flavin adenin dinükleotid	**OGG1:** 8-hidroksiguanin-DNA glikozilaz
$O_2^{\bullet-}$: Süperoksit radikali	**NTH1:** Endonükleaz III benzeri protein
$^{\bullet}OH$: Hidroksil radikali	**NEIL1:** Endonükleaz VIII benzeri protein1
H_2O_2: Hidrojen peroksit	**NEIL2:** Endonükleaz VIII benzeri protein2
$HO_2^{\bullet}$: Peroksi radikali	**NEIL3:** Endonükleaz VIII benzeri protein3

RNA: Ribonükleik asit	**APE1:** Apürinik endonükleaz 1
$^{\bullet}$NO: Peroksinitrit	**XRCC1:**X-ray cross complementing enzyme
$^{1}O_2$: Singlet oksijen	**PARP-1:** Poli ADP-riboz polimeraz-1
NO: Nitrik oksit	**MMP:** Matriks metalloproteinaz
$ONOO^-$: Peroksinitrit anyonu	**TIMP:** Metalloprotenaz doku inhibitör
NO_3: Nitrat	**8-OHdG:** 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
NO_2: Nitrojen dioksit	**SYBR Green I:** N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine
NT: Nitrotirozin	**SDS:** Sodyum dodesil sülfat
4-HNE: 4- hidroksinonenal	**FMOC:** 9-fluorenylethoxycarbonyl
CML: N^{ε}-karboksimetillizin	**LC-MS/MS:** Sıvı kromatografi-sıralı kütle spektrometre
ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay	**Tm:** Erime sıcaklığı
HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografi	**Ct:** Treshold cycle
RT-PCR: Gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu	**TBA:** Tiobarbütirik asit
NIST: National Institute of Standards and Technology	**IS:** İnternal standard
CDR: Klinik Evreleme Ölçeği	**ThyGly:** Timin-glikol
NPI: Nöropsikiyatrik Envanter	**PCR:** Polimeraz zincir reaksiyonu
EDTA: Etilendiamin tetra asetikasit	**mRNA:** Haberci ribonükleik asit
cDNA: Komplementer DNA	**EI:** Elektron çarpışma iyonizasyonu
GC-MS/MS: Gaz kromatografi-sıralı kütle spektrometre	**SIM:** Seçilmiş iyon monitorizasyonu
PBS: İzotonik fosfat tamponu	**MRM:** Çoklu reaksiyon izleme
NaCl: Sodyum klorür	**BSTFA:** N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroasetamid
GC/MS: Gaz kromatografi-kütle spektrometre	**MSTFA:** N-metil-N-trimetilsililtrifluoroasetamid
TMS: Trimetilsilil	**m/z:** Kütle/yük

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca, tez çalışmamın planlanması, uygulanması ve sonuçlandırılması aşamalarında beni daima destekleyen, engin deneyim ve bilgilerinden yararlanmaktan mutluluk duyduğum, eğitimimin her adımında ilgi, sevgi ve yardımlarını benden esirgemeyen, değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Güldal KIRKALI'ya,

Eğitimim süresince bilimsel birikimini benimle paylaşan ve manevi desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hüray İŞLEKEL'e,

Biyokimya doktora eğitimim sırasında bana her türlü yardım ve katkıda bulunan D.E.Ü.T.F. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Canan ÇOKER'e, değerli öğretim üyelerine ve çalışanlarına,

Yurtdışı çalışmalarım sırasında laboratuvarının tüm olanaklarını paylaşan ve her zaman manevi desteğini hissettiğim Sayın Dr. Miral DİZDAROĞLU'na, deneysel çalışmalarım sırasındaki yardımları için Sayın Dr. Pawel JARUGA'ya,

Tez izleme komitemde yer alarak deneyim ve bilgilerini esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Gülgün OKTAY'a ve Sayın Prof. Dr. Görsev YENER'e,

Bilimsel ve manevi tüm desteklerinden dolayı Sayın Prof. Dr. Halil RESMİ'ye, Sayın Doç. Dr. Ogün SERCAN'a, Sayın Prof. Dr. Gazanfer AKSAKOĞLU'na ve Sayın Prof. Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN'a,

Deneysel çalışmalarımın yürütülmesinde desteklerini gördüğüm Sayın Dr. Memduh BÜLBÜL'e ve tüm ARLAB çalışanlarına, projenin mali kaynağını sağlayan üniversitemiz Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na,

Doktora tezim süresince dostluklarını ve mesleki dayanışmalarını her zaman hissettiren dostlarım Melis KANT, Ebru TAYLAN, Feriha ÖZKAYA, Merve AKIŞ'a ve tüm asistan arkadaşlarıma,

Bana gösterdikleri sevgi, anlayış ve her türlü destekleri için aileme, eşime ve doğacak olan bebeğime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

FARKLI DEJENERATİF DEMANS HASTALARINDA OKSİDATİF HASAR: ALZHEIMER HASTALIĞINDA OKSİDATİF MAKROMOLEKÜL HASARININ VE ONARIMININ İNCELENMESİ

Gamze TUNA

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,35340 İnciraltı-İzmir

Giriş ve amaç: Alzheimer hastalığı yaşlılarda en sık görülen nörodejeneratif bozukluktur. Klinik olarak ilerleyici, geri dönüşümsüz hafıza kaybı ve bilişsel bozukluklarla karakterizedir. Serbest oksijen radikalleri aracılı oksidatif makromolekül hasarı, Alzheimer hastalığında temel nörodejeneratif mekanizmalarda rol almaktadır. Bu tez çalışmasında Alzheimer hastalarında ve sağlıklı gönüllü kişilerde, oksidatif hasarın makromoleküler (DNA, lipid, protein, karbohidrat) düzeyde incelenmesi ve DNA hasarının onarımında rol oynayan bazı enzimlerin araştırılması amaçlandı. Bunun yanısıra radikal hasar ve Alzheimer hastalığı üzerine etkilerini araştırmak amacıyla, matriks metalloproteinazlar (MMP2, MMP9) ve metalloproteinazların spesifik doku inhibitörleri (TIMP1, TIMP2) düzeylerinin de incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve yöntem: Çalışma, 44 Alzheimer hastası ve 45 sağlıklı gönüllü bireylerden alınan periferal kan örneklerinde gerçekleştirildi. DNA baz hasarı çalışmaları izotop dilüsyonlu GC-MS/MS tekniği ile gerçekleştirildi. DNA baz hasarı onarım enzimlerinden NEIL1 ve OGG1 glikozilaz enzimlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR tekniği ile belirlendi. Protein oksidasyonu belirteci 3-Nitrotirozin düzeyi ve MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü. Lipid peroksidasyon ürünlerinden malondialdehit ve ileri glikasyon son ürünü olan N^{ε}-karboksimetillizin düzeyleri ise HPLC yöntemi ile incelendi.

Bulgular: Alzheimer hastaları DNA örneklerinde incelenen DNA baz hasarı lezyonlarından, FapyAde /10^6 DNA baz hasarı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0,00). 8-OHGua/10^6 DNA bazı, FapyGua/10^6 DNA bazı, 5-OH-5-MeHyd/10^6 DNA bazı ve 5-OHCyt/10^6 DNA bazı düzeylerinde ise anlamlı farklılık gözlenmedi. ThyGly, 5-OH-MeUra, 5-OH-Ura, 5,6-diOH-Ura hasarları ise hasta ve kontrol örneklerinde saptanmadı. DNA onarım enzimlerinden NEIL1 ekspresyonu Alzheimer hastalarında kontrol

grubuna göre 0,21 kat artmış olarak bulundu. OGG1 ekspresyonu ise hasta grubunda kontrol grubuna göre 0,02 kat azalmış olarak bulundu. Ancak her iki enzimdeki değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildi. Alzheimer hastaları ile kontrol grubu arasında nitrotirozin ve N^{ε}-karboksimetillizin düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmazken, Alzheimer hastalarına ait MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0,000). Alzheimer hastalarında MMP2, TIMP1 düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılıkta düşük iken (sırasıyla p=0,000, 0,003) TIMP2 ve MMP9 düzeyleri açısından kontrol grubu ile arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Sonuç: Bu çalışma Alzheimer hastalarında oksidatif makromolekül hasarı belirteçlerinin ve DNA onarım enzim ekspresyonlarının ilk kez bu kadar geniş bir biçimde araştırılmış olması açısından önem taşımaktadır. Oksidatif maromolekül hasarı, Alzheimer hastalığının patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Bu sürece hangi moleküllerin ne derece dahil olduğunun bilinmesi hastalığın etiyolojisinde ve tedavisinde uygulanacak metodların seçiminde önem taşımaktadır. Aynı zamanda matriks metalloproteinazların ve inhibitörlerin Alzheimer hastalığının patogenezinden sorumlu Aβ peptidlerin katabolizmasında rol aldıklarını destekleyici bulguların da elde edilmesinin literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Alzheimer hastalığı, oksidatif makromolekül hasarı, DNA onarımı, matriks metalloproteinazlar ve metalloproteinazların doku inhibitörleri

ABSTRACT

OXIDATIVE DAMAGE IN DIFFERENT DEGENERATIVE DEMENTIA PATIENTS: EVALUATION OF THE OXIDATIVE MACROMOLECULAR DAMAGE AND REPAIR IN ALZHEIMER'S DISEASE

Gamze TUNA

Dokuz Eylul University, Health Sciences Institute, 35340 Inciraltı-Izmir-TURKEY

Objective: Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder of the elderly. It is characterized by its progressive clinical course, irreversable memory loss and cognitive disorders. Free radical-mediated oxidatively induced macromolecular damage plays a role in basic neurodegenerative mechanisms in Alzheimer's disease. In this thesis, enyzmes which play a role in DNA repair mechanism and oxidative damage in macromolecular level (DNA, lipid, protein, carbohydrate) was studied in Alzheimer's disease patients and healthy volunteers. In addition, matrix metalloproteinases (MMP2, MMP9) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP1, TIMP2) levels were investigated to see their effects on the radical damage and Alzheimer's disease.

Method: The study was carried out with periferal blood samples taken from 44 Alzheimer's disease patients and 45 controls. DNA base damage was determined by isotope dilution GC-MS/MS. The mRNA expression levels of the two major DNA base excision repair enzymes, (NEIL1 and OGG1 glycosylases) were determined by RT-PCR. The levels of protein oxidation marker 3-Nitrotyrosine and MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 were measured with ELISA. Malondialdehyde, one of the lipid peroxidation products and N^{ε}-carboxymethyllysine, an advanced glycation end product, levels were investigated with HPLC methods.

Results: The level of FapyAde/10^6 bases, a lesion of base damage, were significantly higher in AD patients compared to those in control subjects (p=0,00). There were no statistically significant difference between AD patients and the control group in 8-OHGua/10^6 DNA bases, FapyGua/10^6 DNA bases, 5-OH-5-MeHyd/10^6 DNA bases and 5-OHCyt/10^6 DNA bases. The ThyGly, 5-OH-MeUra, 5-OH-Ura, 5,6-diOH-Ura damages were not detected neither in AD patients nor in the control group. The level of NEIL1 expression, one of the DNA repair enzymes was found to be 0,21 times more in AD patients compared with the

control group. However; this increase was not statistically significant. OGG1 expression level was found to be 0,02 times less in patients than in control group. This decrease also was not significant. Where there were no statistically significant difference between AD patients and control group in 3-Nitrotyrosine and N^{ε}-carboxymethyllysine levels, the levels of malondialdehyde were significantly higher in AD patients compared to those in control subjects (p=0,000). The MMP2 and TIMP1 levels were significantly lower in the AD group than the control group (p= 0,000 and 0,003 respectively). On the other hand, there were no statistically significant difference between AD patients and control group in TIMP2 and MMP9 levels.

Conclusion: This study is noteworthy since markers of oxidative macromolecular damage and expressions of DNA base excision repair enzymes has been studied extensively in AD patients. Oxidative macromolecular damage plays an important role in pathogenesis of Alzheimer's disease. It is vey important to be able to detect which molecule is involved at which level of this process, in understanding the etiology and selection of treatment strategies for this disease. Furthermore, it is postulated that, gathering supporting evidence about the role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in Aβ peptids catabolism which is responsible for the Alzheimer's disease pathogenesis will contribute to the literature.

Key Words: Alzheimer's disease, oxidative macromolecular damage, DNA repair, matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Demans, erişkin çağda bilişsel yıkım sonucu gelişen işlevsellik kaybıdır. En sık demans nedeni olan ve tüm vakalarının %50-70'ini oluşturan Alzheimer hastalığı (AH) 65 yaş üzeri kişilerde %3-11, 85 yaş üzerinde ise %20-47 gibi yüksek bir prevalansa sahiptir (1). AH'nın bilişsel yıkım ve davranış bozukluklarının nedeni olan iki patolojik göstergesi vardır. Bunlar özellikle neokorteks ve hipokampusta yoğun olarak bulunan nörofibriler yumaklar ve amiloid plaklardır (24). Mendelien kalıtım olguların yaklaşık %5'inde görülür. Ayrıca apoE4 alleli taşıyan bireylerde doz bağımlı yatkınlık artışı vardır (27).

Alzheimer hastalığının patolojisinde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı ileri sürülmektedir. Beyinde oksidatif stres; artan protein oksidasyonu, lipid peroksidasyonu, DNA ve RNA oksidasyonu ile ifade edilmektedir (3).

Serbest radikaller direkt olarak aminoasitlerin yan zincirlerini okside ederek, ya da lipit peroksidasyonu, glikasyon ürünleri gibi oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent olarak bağlanması ile proteinlerde hasara neden olabilirler. Oksidatif olarak değişikliğe uğrayan ve fonksiyonunu kaybetmiş çapraz bağlar oluşturan proteinler proteozomal yıkıma yönlendirilerek veya nörodejeneratif hastalıklarda görülen protein birikimlerini oluşturarak hücresel hasarlara neden olurlar (2,3). Çalışmalarda β-amiloid plakların, serbest radikaller aracılığı ile oksidatif stres oluşumuna neden olduğu ve Alzheimer hastalığının patolojisine katkıda bulundugu ileri sürülmektedir (4,5,6).

Lipid peroksidasyonu olarak adlandırılan ve serbest radikaller tarafından membran lipidlerinde başlatılan hasar, zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olay olarak tanımlanmaktadır. Beyin doymamış yağ asitlerince zengin olduğundan serbest radikallerin neden olduğu lipit peroksidasyonundan daha çok etkilenir (3).

Son çalışmalar Alzheimer hastalarından alınan dokularda oksidatif DNA hasarının yüksek olduğunu göstermektedir (7,8). Yüksek düzeydeki DNA hasarı özellikle çoğalarak kendisini yenileyemeyen post-mitotik hücrelerde son derecede zararlıdır. Bu nedenle nükleer ve mitokondriyal oksidatif baz değişiklikleri hasarlı nörönların selektif kaybına sebep olmakta, memelilerde nörodejenerasyon ve yaşlanmada önemli rol oynamaktadır (9). Okside olmuş bazların düzeyi, sadece oksidatif DNA hasarının arttığı durumlarda değil, aynı zamanda onarım oranındaki farklılıklara göre de değişiklikler gösterir (10). Bu bakımdan

DNA onarım enzimlerindeki bir bozukluktan dolayı kusurlu onarımın, DNA hasarına katkısı ihmal edilmemelidir. Beyin, yüksek oksijen tüketim hızına, yüksek enerji gereksinimine, doymamış yağ asitlerinden ve lipidlerden zengin olmasına ve diğer organlara kıyasla daha kısıtlı antioksidan sisteme sahip olması özelliklerinden dolayı oksidatif hasara karşı daha duyarlıdır (11).

Bu tez çalışmasında Alzheimer hastalarından ve sağlıklı gönüllü kişilerden alınan periferal kan örneklerinde, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarın makromoleküler (DNA, lipid, protein, karbohidrat) düzeyde incelenmesi ve DNA baz hasarının onarımında rol oynayan bazı enzimlerin araştırılması amaçlandı. Bunun yanısıra radikal hasar ve Alzheimer hastalığı üzerine etkilerini araştırmak amacıyla, ekspresyonu serbest radikaller, büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından düzenlenen matriks metalloproteinazlar (MMP2, MMP9) ve metalloproteinazların spesifik doku inhibitörleri (TIMP1, TIMP2) düzeylerinin de incelenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DEMANSIN TANIMI VE ÖZELLİKLERİ

Demans terimi bir sendroma karşılık olarak kullanılmaktadır ve açık bir bilinç düzeyinde başta bellek olmak üzere zihinsel ve sosyal yeteneklerin kişinin günlük yaşam aktivitelerini etkileyecek derecede gerilemesi şeklinde tanımlanabilir. Amerikan Psikiyatri Birliği Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı (DSM-IV)'nda demans, bilinçte bozulma olmaksızın bellek yıkımını da içeren birçok bilişsel bozukluğun bulunması şeklinde tanımlanır (12). Demansta etkilenen bilişsel işlevler genel zeka, öğrenme ve bellek, dil, problem çözme, yönelim, algı, dikkat, yargılama ve sosyal yeteneklerdir.

Demans, gerek yüksek morbidite, artmış mortalite oranı ve gerekse hastaya bakan kişilere yüklediği ağır yük nedeniyle önemli bir halk sağlığı problemidir (13). Hafıza problemleri hastalar ve yakınları tarafından sıklıkla yaşlanmanın doğal bir sonucu olarak düşünülmekte, bu sebeple erken evreleri gözden kaçabilmektedir. Demans kronik beyin hastalıkları veya ensefalopati sonucu gelişen bilişsel ve davranışsal bozuklukları içeren bir klinik tablodur. Demans sendromları beynin progresif dejeneratif hastalıkları ve vasküler hastalıklar sonucu oluşmaktadır. Ayırıcı tanıda ise travma, hipoksi ve metabolik sebeplerden oluşan kronik ensefalopati göz önünde bulundurulmalıdır. Demans değerlendirmesi ve tanısı güçlükler içeren bir konudur. Tanı için hastanın önceki durumuna göre bilişsel fonksiyonunda düşüş olmalı, günlük yaşamını etkilemiş olmalı ve hafıza bozukluğunun yanı sıra birden fazla bilişsel alanda (afazi, agnozi, apraksi, yürütücü işlev bozukluğu) bozukluk olmalıdır (14).

Tablo 1. Demans sınıflandırması (15)

Primer (Dejeneratif)	Sekonder
Alzheimer hastalığı	Vasküler demans
Lewy cisimcikli demans	Multi-infarkt demans
Fronto-temporal demans	Binswanger hastalığı
FTD-davranışsal varyant	Stratejik infarkt demansı
İlerleyici tutuk afazi	CADASIL
Semantik demans	Normal basınçlı hidrosefali
FTD-ALS	Toksik-metabolik demanslar
Hareket bozukluğuyla birlikte	Wernicke-Korsakoff hastalığı
Parkinson hastalığı demansı	B12 vitamin eksikliği
Kortiko-bazal dejenerasyon	Hipotiroidi
Progresif supranükleer paralizi	Kronik karaciğer hastalığı
Huntington hastalığı	Organik çözücülere maruz kalma
Multi-sistem atrofiler	İlaçlar
Wilson hastalığı	İnfeksiyonlar
Nöroakantositoz	Herpes simpleks ensefaliti
Prion hastalıkları	Nörosifilis
Creutzfeldt-Jacob hastalığı	Kronik menenjitler
Gerstmann-Sträussler-Scheinker hastalığı	HIV-demans kompleksi
	Whipple hastalığı
Fatal familyal insomni	Kafa içi yer kaplayıcı hastalıklar
Çeşitli pediyatrik demanslar	Neoplastik durumlar
Kufs hastalığı	Subdural hematom
Metakromatik lökodistrofi	Otoimmun-inflamatuar hastalıklar
Gaucher hastalığı	Multipl skleroz
Niemann-Pick hastalığı	Behçet hastalığı
Diğer ender demanslar	Paraneoplastik limbik ensefalit
Limbik demans	VGKC ve NMDAR kanalopatileri
Poliglukozan cisimcik hastalığı	Granülomatöz anjitis
Arjirofilik tahıl hastalığı	Primer sinir sistemi vasküliti
	NAIM sendromu

Tüm demans vakalarının %50-60'ını Alzheimer hastalığı oluşturmaktadır. Vasküler demans %10-25 sıklıkta görülmekteyken geriye kalan %5-10 daha az sıklıkta rastlanan diğer sebeplerdir. Demans sınıflandırması primer ve sekonder olarak yapılmaktadır (Tablo 1.)

Demansın en sık nedeni olan Alzheimer hastalığı, hafif-orta-ağır bellek bozukluğu ile beraber dil, idarecilik, karar verme işlevlerinde, dikkatte, oryantasyonda ve kişilikte bozukluklar, edinilmiş entelektüel becerilerde progresif bir kayıp ile kendini gösteren

ilerleyici ve ölümcül nörodejeneratif bir hastalıktır (14). İlerleyici, ciddi morbidite ve mortaliteye, günlük yaşam aktivitelerinde bozulmaya, davranışsal semptomlara sebep olan bir hastalık olması, erken evrede tedavi alanlarda bilişsel fonksiyonların ve hayat kalitesinin daha uzun süre korunuyor olması nedeniyle hastalığın erken evrede tanınması, gözden kaçırılmaması önem arz etmektedir (15,16,17).

2.2. ALZHEIMER HASTALIĞI

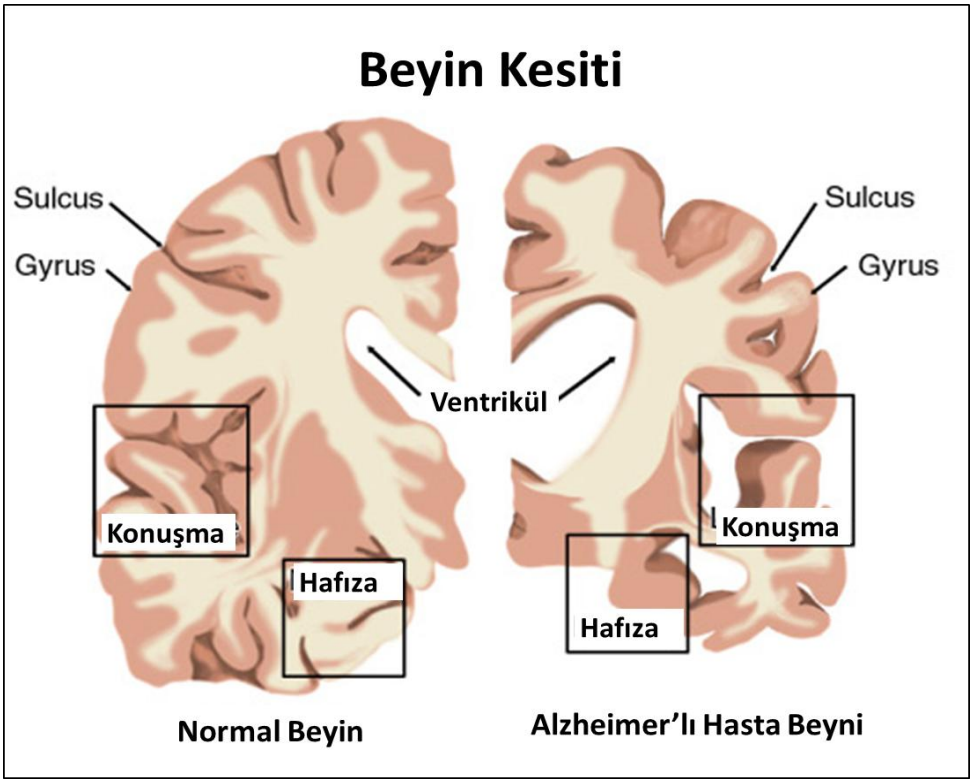
Alzheimer Hastalığı ilk kez 1907 yılında Alman psikiyatrist ve nöropatolog Dr. Alois Alzheimer tarafından tanımlanmıştır. Alzheimer Hastalığı yaşa bağımlı ve geri dönüşümsüz bir beyin hastalığıdır. Yaşlılarda, demans türleri arasında en sık görülenidir. Hastalığın başlangıcında kısa dönemli hafızada aşamalı ve ilerleyici yıkım görülür ve bu yıkım davranış ve karakter değişiklikleri ile ilerleyerek, düşünme, karar verme ve konuşma gibi diğer bilişsel alanları da etkileyerek en sonunda zihinsel fonksiyonun yitirilmesine, bireyin günlük aktivitelerini yapamaz hale gelmesine neden olur (18, 19).

2.2.1. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi

AH tüm demans sendromlarının %50 ile 60'ını oluşturmaktadır (20). AH'ın insidansı 1952 yılında Sjögren ve arkadaşları tarafından %0,1, 1985 yılında ise Sulkava ve Schoenberg tarafından %0,03-0,05 olarak saptanmıştır (21). İstanbul'un Kadıköy ilçesinde gerçekleştirilen Türkiye Alzhemier Hastalığı Prevalansı Çalışması'nda 70 yaş üzerindekiler arasında AH prevalansının %11 olduğu saptanmıştır. Bu prevalans değerine göre Türkiye'de 250-300 bin AH'li hasta olduğu varsayılmaktadır (22) Hastalığın 65 yaş üzerinde sıklığı yüzde beş iken, bu oran 85 yaş üzerinde %50'ye çıkmaktadır. Bilişsel fonksiyonlarda kayıplar arasında bellek bozukluğu en önemli klinik bulgudur. Bu bulgulara ileri dönemde fiziksel fonksiyonlarda kayıplar eklenir. Kafa travması, düşük eğitim seviyesi, sigara, doğumdaki anne ve babanın yaşının büyük olması, Down sendromu AH için risk faktörleridir. Yaşam süresi belirtiler başladıktan sonra 4-16 yıl (ortalama 10 yıl) arasında değişmektedir (23).

2.2.2. Alzheimer Hastalığının Patolojisi

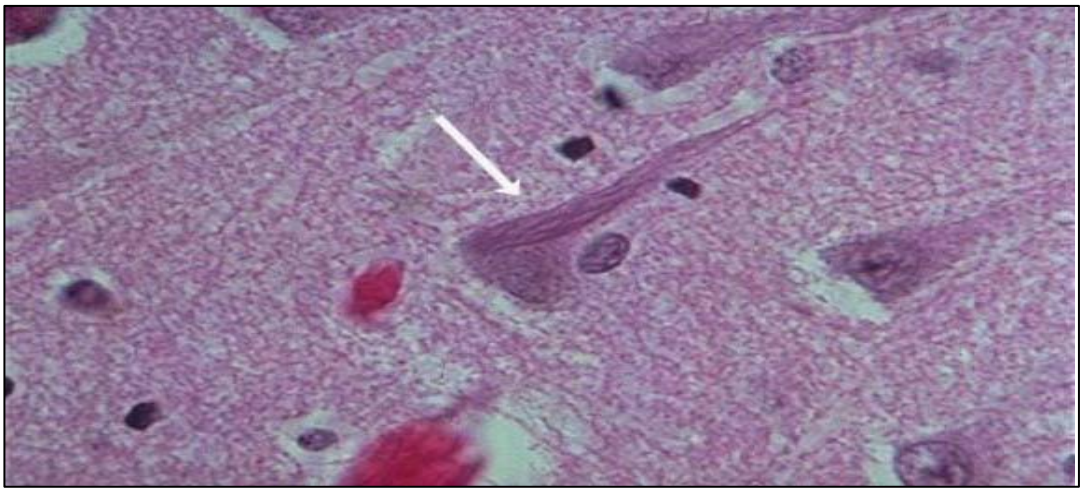
Alzheimer hastalığının patolojisi incelendiğinde beyinde nöronal hücrelerde bozulma, hiperfosforile olmuş tau proteinleri kaynaklı intraselüler nörofibriller yumaklar (NFY) ve ekstraselüler amiloid β-peptid (Aβ) agregatlarının bulunduğu gözlenmektedir (Şekil 1.) (24)



Şekil 1. Normal ve Alzheimer'lı hasta beyin kesitleri

Nörofibriller yumaklar

NFY'ların temel yapısını fosforile tau proteinleri oluşturmaktadır. Tau, mikrotübüllere bağlıdır ve mikrotübüllerin stabilizasyonunda, hücre iskeletinin bütünlüğünün korunmasında, aksonal transportta önemli rol oynar. AH sürecinde tau, fazla fosforile olur ve mikrotübüllere bağlanma kapasitesi azalır. Bağlanmayan tau proteini, çift sarmallı lifler halinde hücre içine çökerek NFY'ları oluştururlar (Şekil 2.). Akson ve denritik çıkıntılarda bulunan NFY'lar nöropil iplikler olarak adlandırılırlar. Bu lezyonlarda amiloid plaklar da yer aldığında nöritik plak ortaya çıkmış olur. Hücre içi oluşumlar olan NFY'lar hücre içine artık sığmayacak derecede biriktiğinde hücreyi parçalarlar ve hücre dışına yayılırlar. Bunlara 'hayalet yumak' adı verilir (25,26) NFY'ların ilk görüldükleri yer entorihinal-transentorihinal korteks bölgesidir. Zamanla hipokampus-amigdala, parahipokampal girus, inferiyor temporal girus, fusiform girus, posteriyor paryetal ve prefrontal korteksler ile en nihayet primer motor-duysal alanlar ekseninde yayılırlar (26).



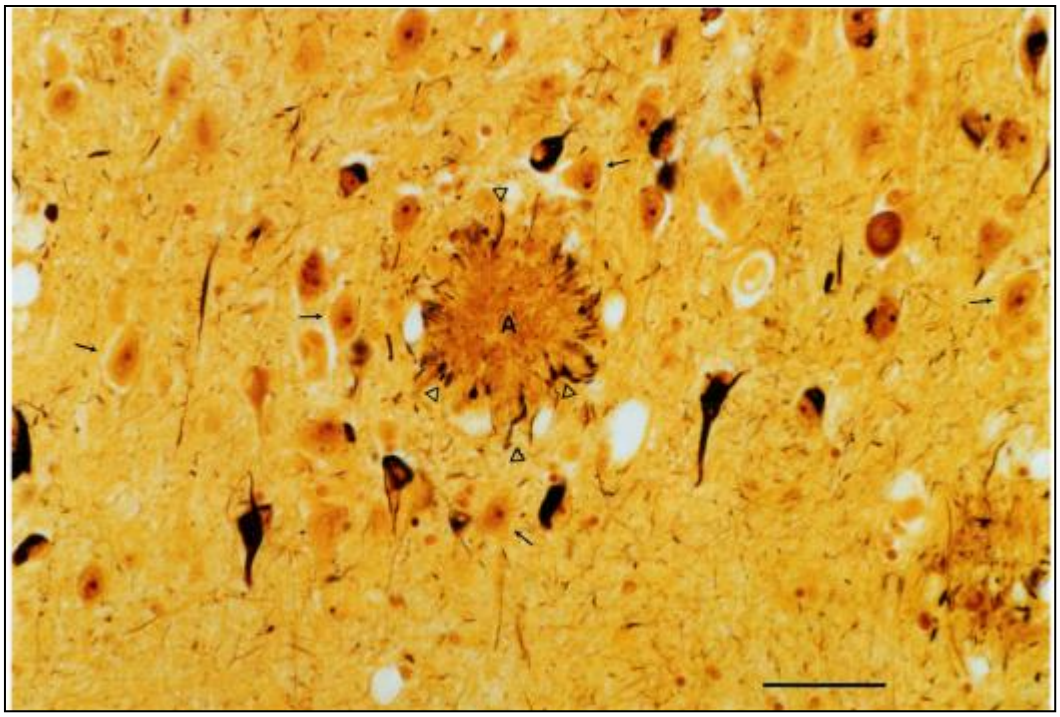
Şekil 2. Nörofibriller yumaklara ait mikroskobik kesit fotoğrafı (Hematoksilen eozin boyası ile boyanmıştır)

Amiloid Plaklar

Amiloid plakların temel yapısını Aβ peptidi oluşturur. Aβ peptidi, bir ucu hücre içinde diğeri hücre dışında olmak üzere hücre zarını enlemesine geçen Aβ prekürsor proteinin (AβPP), çözünür olmayan parçalarıdır. AβPP'nin işlevi yeterince bilinmemektedir. AβPP metabolizması α, β, γ sekretaz olmak üzere üç enzim tarafından gerçekleştirilir. Alfa-sekretazlar Aβ peptidini orta noktalarından keserler ve böylece hücre dışında, çözünebilir olan APP parçası ortaya çıkarırlar. Beta ve gamma sekretazlar tarafından ortaya çıkan ürünler ise çözünürlüğü olmayan, amiloid plakların oluşumunda rol oynayan hücre dışı parçalardır. Normal yaşlanmada α-sekretaz aktivitesi baskınken, AH'de denge β-sekretaz aktivitesi yönüne kaymaktadır (25,26) (Şekil 3.).

Amiloid plakların, içerdikleri Aβ peptidinin yapısı ve toksisite potansiyeline göre bazı türleri vardır: diffüz, kompakt ve nöritik plak. Diffüz plaklar, toksik etkisi çok sınırlı olan ya da olmayan plaklardır. Pre-amiloid plaklar olarak kabul edilirler ve demansı olmayan yaşlı bireyler de sıklıkla bulunurlar. Diffüz plaklar çeşitli nedenlerle (inflamasyon, serbest radikallerin etkisi, oksidatif stres vs.) kompakt plaklara dönüşebilirler. Kompakt plaklar toksik etkilidir ve nöron dejenerasyonuna yol açarlar. Nöritik plaklar, dejenere olmuş Aβ peptid içeren dentrit ve akson parçalarından oluşur ve çoğu nörofibriller yumak da içerir. Hem kompakt hem de nöritik plaklar AH'li hastalarda yaygın olarak bulunur (25,26).

Toksik olup olmama potansiyeline bakılmaksızın, plaklar, serebral korteksin limbik yapılarından ziyade neokortikal bölgelerinde yerleşme eğilimindedirler (25,26).



Şekil 3. Amiloid plaklara ait mikroskobik kesit fotoğrafı (Gümüş boyama ile diffüz veya yoğun amiloid birikimleri koyu kahverengi olarak boyanmıştır)

2.2.3. Alzheimer Hastalığının Genetiği

Otozomal dominant geçişten sorumlu olan 3 ayrı genin bulunduğu rapor edilmektedir Bunlar amiloid prekürsör protein, Presenilin-1, Presenilin-2 genleridir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, amiloid prekürsör protein (APP), Presenilin-1 ve Presenilin-2 genlerindeki mutasyonların, toplamın %5'i kadar olguda hastalığın nedeni olduğu ileri sürülmektedir (27). Yirmibirinci kromozomdaki APP gen mutasyonu familyal erken başlangıçlı %10 kadar vakada gözlenir. Presenilin-1 geni 14. kromozom üzerinde yerleşmiştir ve bu genin mutasyonu ile Aβ üretimi artar, nöronlar apopitoza karşı duyarlı hale gelir (28). Presenilin-2, 1. kromozom üzerinde yerleşir, APP'nin proteolitik yıkım şeklini değiştirip Aβ üretimini arttırır ve bazı çalışmalarda presenilin-2'nin apoptoz ile ilişkili olduğu bildirilmektedir.

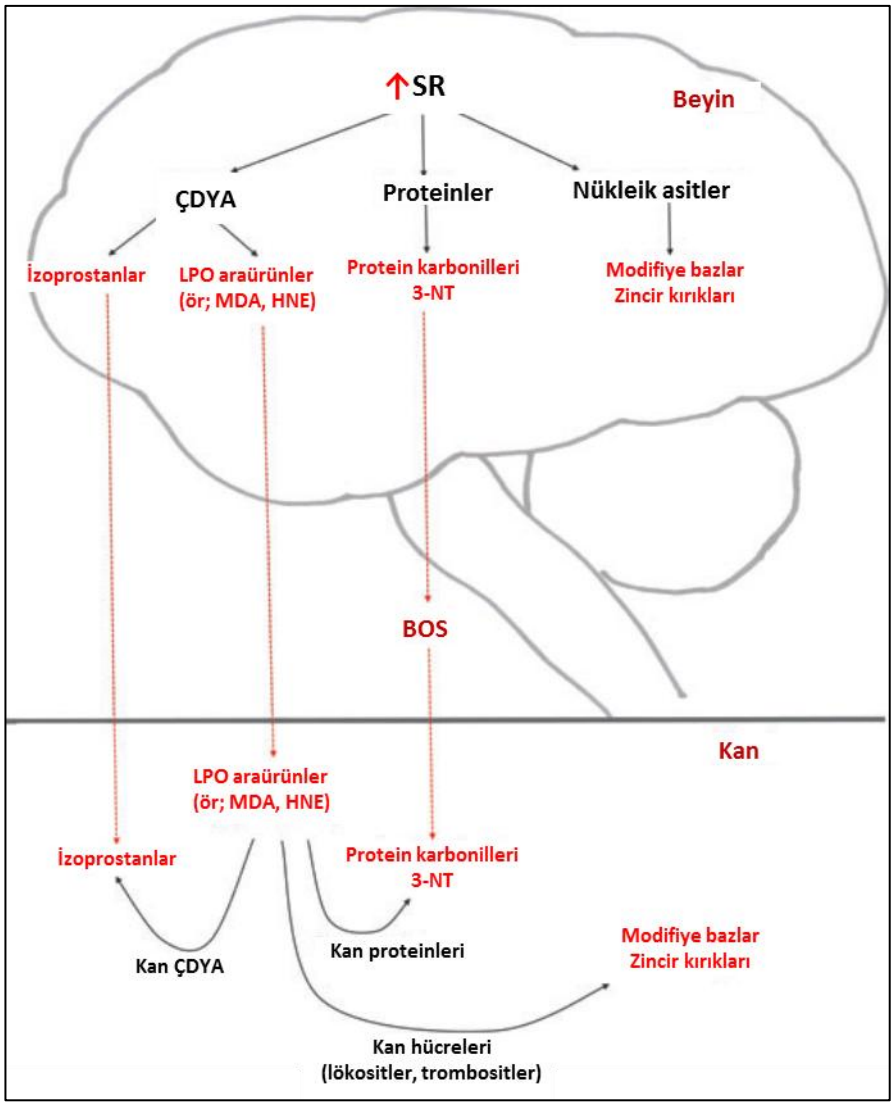
Sporadik geçişli AH'de risk faktörü olarak Apolipoprotein E (ApoE) geni bulunmaktadır. ApoE, 19. kromozomda kodlanmaktadır. Bu alanda ϵ2, ϵ3 ve ϵ4 allelleri ile 3 adet apoE izoformu (E2, E3, E4) kodlanır. Geç başlangıçlı AH geliştirme riskinin ϵ4 allelinde

belirgin artışla (yaklaşık 2,5 kez), ϵ2 allelinde ise azalma ile ilişkili olduğunun saptandığı bildirilmektedir. ApoEϵ4 AH'de görülen vasküler ve plak amiloidlerinde ko-lokalize olarak bulunur. ApoE, amiloid-β (Aβ) peptid yapısına bağlanır ve özellikle E4 izoformu Aβ peptid yapısının polimerizasyonu ile amiloid fibril formuna dönüşmesine yardım eder (29,30).

2.2.4. Alzheimer Hastalığının Tanısı

Son yıllarda hastalığın tanısına, ante-mortem dönemde katkı sağlamak amacıyla pek çok diagnostik testin geçerliliği yoğun olarak araştırılmaktadır. AH tanı kriterleri 2007 yılında yeniden gözden geçirilmiş ve içleme kriteri arasına manyetik rezonans inceleme (MRİ)'de saptanan medial temporal lob (MTL) atrofisi ve beyin omurilik sıvısı (BOS) biyobelirteçleri girmiştir (31). AH tanı kriterleri arasında yer alan BOS bulgusu ise artmış fosforile tau (f-tau) ve azalmış Amiloid β (Aβ-42)'dır (31). Hem görüntüleme hem de BOS biyobelirteçleri AH tanısını destekleyici özelliktedir. Bu nedenle halen AH'nın kesin tanısında kullanılacak biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. BOS'un elde edilme zorluğu nedeniyle günümüzde AH'nın tanısına katkı sağlayacak biyobelirteç arayışları hem BOS örneklerinde hem de periferik kan örneklerinde devam etmektedir.

Alzheimer hastalarının beyinlerinde serbest radikal üretiminin artması ile lipid peroksidasyonu, protein ve nükleik asit oksidasyonu gibi sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Lipid peroksidasyon ürünleri (izoprostanlar, lipid hidroperoksidler, aldehidler) küçük ve lipofilik bileşikler olduğundan kana geçiş yapabilirler ve bu ürünlerin kanda ölçümü mümkün olabilmektedir. Protein oksidasyon ürünleri (protein karbonil grupları, 3-Nitrotirozin) ise beyin omurilik sıvısına sekrete edilebilir ve kan tarafından absorbsiyonu mümkündür. Aynı zamanda oksidatif stres ürünleri direkt olarak kana da geçiş yapabilmektedir. Lipid peroksidasyonu ara ürünleri de kan proteinlerine ve çoklu doymamış yağ asitlerine etki edebilir ya da kan hücrelerinde nükleik asit hasarına neden olabilir (Şekil 4.) (32).



Şekil 4. AH kan oksidatif stres biyobelirteçlerinin kaynağı (32) *SR: Serbest radikaller, ÇDYA: Çoklu doymamış yağ asitleri, 3-NT: 3-Nitrotirozin, LPO: Lipid peroksidasyonu*

AH'nin tanı kriteri olarak günümüzde yaygın biçimde NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) kullanılır. NINCDS-ADRDA kriterleri bellek veya lisan görsel-uzaysal yetiler veya yürütücü işlevler gibi bilişsel işlevlerde bozulmayı şart koşar (33). Kriterlerin gerçekleştirildiği tipik tabloya NINCDS-ADRDA ile 'Muhtemel Alzheimer Hastalığı' (MAH) denmektedir.

NINCDS-ADRDA Alzheimer Hastalığı Klinik Tanı Kriterleri (33,34):

I. Muhtemel Alzheimer Hastalığı klinik tanı kriterleri şunları içerir:

• Klinik muayene ile saptanan, Mini-Mental Test, Blessed Demans Ölçeği ya da benzer bir test ile dokümante edilen ve nöropsikolojik testlerle de doğrulanan demans tablosu;

• İki ya da daha fazla bilişsel süreçte bozulma;

• Bilinç bozukluğu yok;

• Başlangıç 40-90 yaşları arasında, büyük sıklıkla da 65 yaşından sonra;

• Bellek ya da diğer bilişsel süreçlerde ilerleyici bozukluğa yol açabilecek sistemik ya da beyne ait başka bir hastalık yok.

II. Muhtemel Alzheimer Hastalığı tanısı şunlarla desteklenir:

• Dil (afazi), motor yetenekler (apraksi) ve algı (agnozi) gibi özgül bilişsel işlevlerde ilerleyici bozulma;

• Günlük yaşam aktivitelerinde bozulma ve davranış biçiminde değişme;

• Ailede benzer bozukluk öyküsü (özellikle patolojik olarak kanıtlanmışsa);

• Laboratuvarda: standart tekniklerle normal lomber ponksiyon, EEG'nin normal olması ya da yavaş dalga aktivitesinde artış gibi non-spesifik değişiklikler, BT'de serebral atrofiye ilişkin bulgular ve seri incelemelerde bu bulguların ilerleyişi.

III. Alzheimer hastalığı dışındaki nedenler dışlandıktan sonra, Muhtemel Alzheimer Hastalığı tanısı ile uyumlu olabilecek diğer klinik özellikler şunlardır:

• Hastalığın seyrinde platolar;

• Depresyon, uykusuzluk, inkontinans, hezeyan, illüzyon ve halüsinasyonlar, verbal, emosyonel ya da fiziksel katastrofik patlamalar, cinsel bozukluklar ve kilo kaybı gibi eşlikçi bulgular;

• Bazı hastalarda, özellikle hastalığın ileri dönemlerinde, kas tonusunda artış, miyoklonus ya da yürüme güçlüğü gibi diğer nörolojik bozukluklar;

• Hastalığın ileri evresinde nöbetler;

• Yaş için normal BT.

IV. Muhtemel Alzheimer Hastalığı tanısını belirsizleştiren ya da ihtimal dışına çıkaran özellikler şunlardır:

• İnme tarzında ani başlangıç;

• Hemiparezi, duysal kayıp, görme alanı defektleri ve inkoordinasyon gibi lokal nörolojik bulguların hastalığın erken evrelerin de bulunması;

• Nöbetler ya da yürüyüş bozukluklarının, daha başlangıçta ya da hastalığın çok erken evrelerinde bulunması;

V. Mümkün Alzheimer Hastalığı tanı kriterleri şunlardır:

• Demansa neden olabilecek diğer nörolojik, psikiyatrik ya da sistemik bozukluklar olmaksızın, başlangıç, prezentasyon ya da klinik seyirde varyasyonların bulunması durumunda konulabilir;

• Demansa neden olabilecek, ancak demansın nedeni gibi görünmeyen ikinci bir sistemik ya da beyin hastalığının bulunması durumunda konulabilir;

• Diğer belirlenebilir nedenlerinin dışlandığı, tek ve yavaş ilerleyici bir bilişsel bozukluğun bulunması durumunda, araştırma çalışması amaçlı olarak kullanılabilir.

VI. Kesin Alzheimer Hastalığı tanısı kriterleri şunlardır:

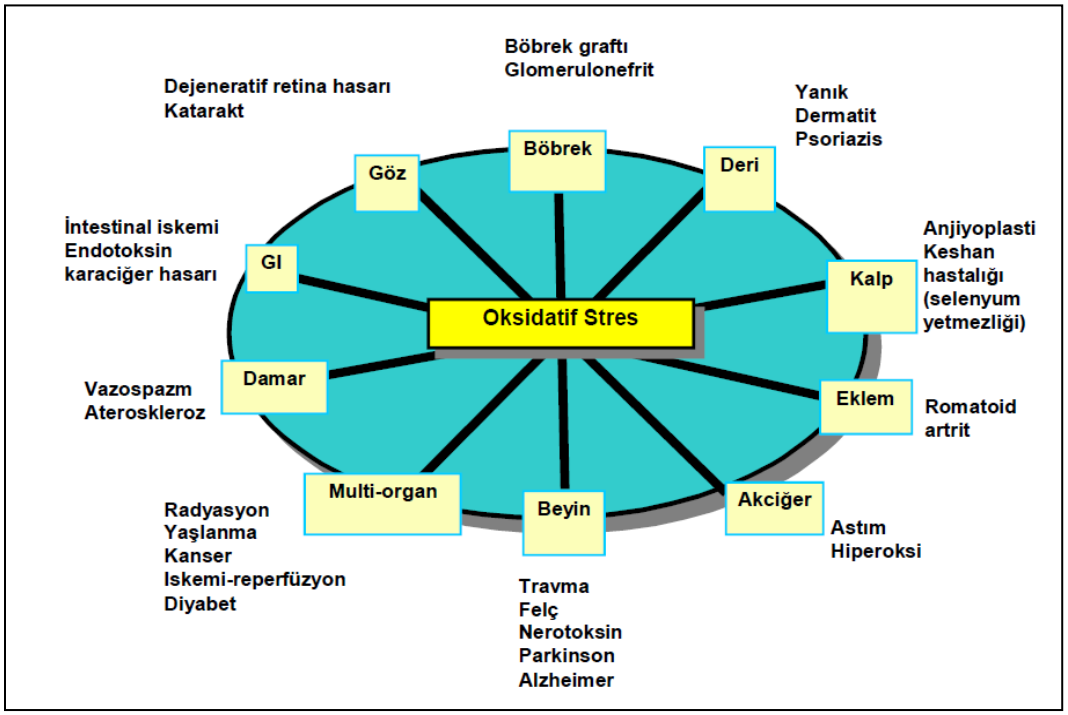
• Muhtemel Alzheimer Hastalığı klinik kriterleri;

• Biyopsi ya da otopsiyle elde edilen histopatolojik kanıtlar

AH tanısını koymada işlevselliği ve davranış bozukluğunu yansıtan öykü ile bilişsel bakı çok önemlidir. İzlemde kullanılan birkaç standart test ve ölçek arasında en yaygın olanları ‘Mini Mental Durum Testi’ (MMDT) (35), ‘Blessed Demans Skalası’ (36) ve Reisberg’in ‘Global Bozulma Ölçeği’ (GBÖ) dir (37). Bu testler, demans veya bilişsel bozukluk için bir tarama aracı olabilir ve zaman içinde entellektüel durumdaki kötüleşmenin bir ölçütü olarak işlev görür.

2.2.5. Alzheimer Hastalığı ve Oksidatif Stres

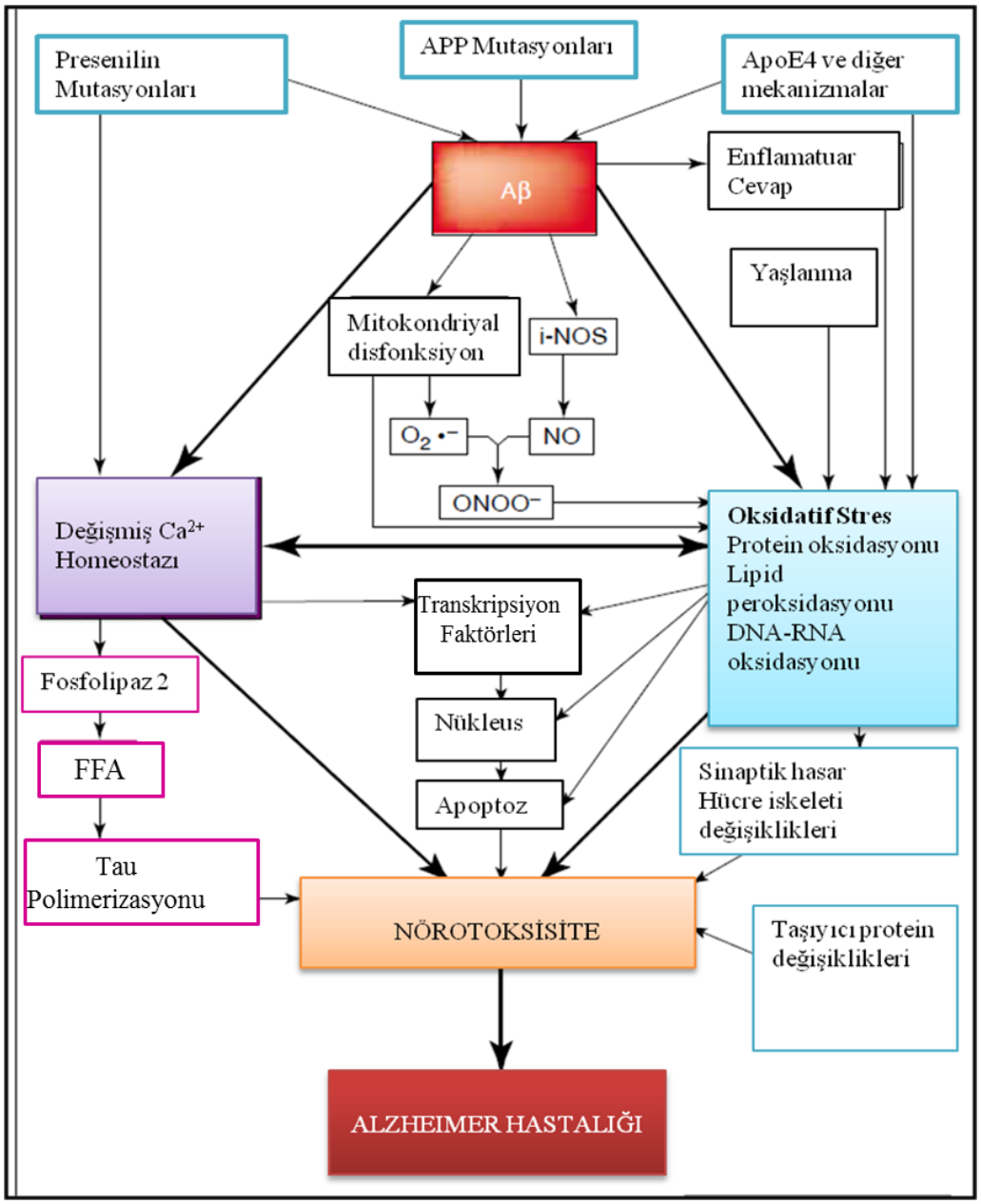
Hücreler başta mitokondri elektron taşıyıcı sistem olmak üzere ksenobiyotik metabolizması, fagositik aktivasyon, inflamasyon, radyasyon, geçiş metallerinin katalizlediği reaksiyonlar, çeşitli sentez ve yıkım reaksiyonları ve diğer faktörlerden reaktif oksijen türlerine maruz kalmaktadır (38). Bunlara ek olarak romatoid artrit gibi bazı hastalıklarda inflamatuar cevapta makrofajlar tarafından reaktif oksijenlerin programlı salınımı da olası oksidatif DNA hasar nedenlerindendir. Oksidatif DNA hasarının yaşlanmada, Alzheimer hastalığında, diyabette, aterosklerozda, romatoid artrit ve sistemik lupus eritematozus gibi otoimmün inflamatuar hastalıklarda ve kanserde arttığını gösteren birçok araştırma bulunmaktadır (39) (Şekil 5.).



Şekil 5. Oksidatif stresle ilişkili durumlar

Oksijen radikalleri (reaktif oksijen türleri, ROT) kimyasal olarak dengeli olmayan, aşırı reaktif bileşikler olup, hücre ve dokularda aerobik metabolizma sırasında elektron transport zincirinin normal bir parçası olarak üretilmektedir. Serbest oksijen radikallerinin reaktivite özellikleri nedeniyle organizmada herhangi bir zamanda oluşturduğu hücre ve doku hasarı oksidatif hasar olarak isimlendirilmektedir (40). Serbest oksijen radikalleri aracılı oksidatif hasar AH'daki temel nörodejeneratif mekanizmalardandır. Tüm beynin özellikle nörofibriller

yumakların yoğun bir oksidatif stresle karşılaşması AH'nın patogenezinde yer almaktadır (41,42). AH'de beyinde serbest radikal kaynakları +2 değerlikli demir, aktive mikroglialar, amiloid beta, ileri glikasyon ürünleri, mitokondrial anormallikler olarak yer almaktadır (41,16). AH'da kolinerjik, dopaminerjik ve noradrenerjik nöronlarda kayıp vardır ve bu patolojinin serbest radikal birikimi, lipid peroksidayonu ve nöronal hasar ile gerçekleştiği ve oksidatif faktörlerin bir risk faktörü olduğu bildirilmektedir (43).



Şekil 6. Alzheimer hastalarının beyinlerinde Aβ'nın indüklediği oksidatif stres (44)

Aβ peptidlerinin genetik ve diğer mekanizmalarla (oksidatif stres gibi) oluşumu sonucu Aβ-ilişkili serbest radikal hasarının oluşumu söz konusudur. Oluşan oksidatif stres beyinde makromoleküler hasara neden olmaktadır. Diğer taraftan Aβ'nın indüklediği oksidatif stres, tau polimerizasyonuna neden olan serbest yağ asitlerinin salınımı, değişmiş Ca^{2+} homeostazı, mitokondriyal fonksiyon değişiklikleri, peroksinitrit oluşumu, apoptozis ve diğer hücresel olayların ortaya çıkmasına da neden olmaktadır. Tüm bunların sonucunda beyinde nöronların kaybı gerçekleşmektedir (44) (Şekil 6.)

Beyin oksidatif strese yatkın bir organdır. Beynin oksidatif strese yatkınlığının nedenleri şu şekilde özetlenebilir (45, 46, 47, 48, 60);

· Beyin vücut ağırlığının sadece % 2'lik kısmını oluşturmasına rağmen; solunan oksijenin % 50'sini kullanır. Hücreler tarafından kullanılan oksijenin yaklaşık % 5'i ROT'a redükte olur, daha az oksijen kullanan dokulara kıyasla beyin daha fazla ROT üretir.

· Beyin çift bağları nedeniyle ROT hasarına yatkın olan çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA) açısından zengindir.

· Beyin omurilik sıvısı (BOS), oldukça reaktif hidroksil radikalleri oluşumunu katalizleyen demir ve bakır kompleksleri içerir. Bunun yanında, bu geçiş metallerini bağlayan ve ayıran antioksidanlardan, transferrin ve seruloplazminden de fakirdir.

· Glutamat gibi eksitatör nörotransmiterlerin salınımı postsinaptik nöronlarda ROT oluşumu ile sonuçlanan bir dizi reaksiyonu tetikler. Bu nöronların yoğunluğuna bağlı olarak; sinir sisteminde lokalize lezyonlar oluşabilir. Amiloid-β-peptid aracılı kalsiyum sinyalleri ile artan glutamat toksisitesi; ROT oluşumuna ve oksidatif strese katkıda bulunabilir. Glutamat NMDA reseptör aktivasyonunu; örneğin lipooksijenaz yolu ile araşidonik asit salınımı ve metabolizmasını uyarabilir. Araşidonik asit kaskatı-lipooksijenaz yolu esnasında üretilen 12-HETE ve 12-HPETE gibi araşidonik asit hidroperoksitleri sadece ikinci mesajcılar olarak değil aynı zamanda ROT kaynağı olarak da görev yapar.

· Dopaminerjik nöronlarda, dopaminin monoamin oksidaz ile oksidasyonu sırasında ROT açığa çıkması substansia nigra gibi beyin bölümlerinde artmış oksidatif strese yol açar. Bunun yine bir nörodejeneratif hastalık olan Parkinson hastalığının etiyolojisinde rol aldığı düşünülmektedir.

· Nitrik oksit (NO) ve süperoksid radikalinin etkileşimi normal nöron metabolizmasıyla ilişkili olduğu kadar nöron dejenerasyonu ile de ilişkilidir.

· Beyinde diğer organlara kıyasla (karaciğer gibi) katalaz aktivitesi ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi daha azdır.

· Pineal bezde üretilen, iyi bir ROT tutucu olan melatoninin sekresyonu yaşla belirgin olarak azalır.

· Nöronlar replike olmayan hücrelerdir. Beyin dokusundaki herhangi bir ROT hasarı zaman içinde kümülatif olur.

Aynı zamanda AH'de artan oksidatif stresi destekleyen bir takım kanıtlar mevcuttur (49-52);

· Serbest radikal oluşumunu uyarma yeteneğine sahip demir, alüminyum ve civanın beyinde artmış konsantrasyonları

· Alzheimer beyninde artmış lipid peroksidasyonu, azalan ÇDYA miktarı ve AH'nda ventriküler sıvıda lipid peroksidasyonunun aldehid ürünü olan 4- hidroksinonenal miktarında artma

· AH beyninde artmış protein ve DNA oksidasyonu

· AH beyninde bozulmuş enerji metabolizması ve azalmış sitokrom oksidaz c düzeyi

· Nörofibriler yumakta saptanan AGE (ileri glikozilasyon son ürünleri), malondialdehid (MDA), karbonil grubu, peroksinitrit, hem oksijenaz-I, süperoksit dismutaz-1 (SOD-1) ve bunun yanında amiloid plaklarda saptanan AGE, hem oksijenaz-I, SOD-1

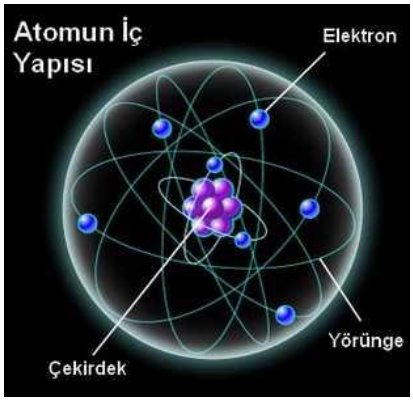
· Alzheimer hastalığı etyopatogenezinde temel patolojik belirleyici olan ekstraselüler amiloid beta plakaları ve intraselüler nörofibriler yumakların yanısıra, glutamat toksisitesi, eser element toksisitesi ve antioksidan savunma mekanizması bozukluğundan oluşan oksidatif stres hipotezi son yıllarda yoğun bir şekilde tartışılmaktadır. Oksidatif imbalans; protein oksidasyonu, DNA oksidasyonu veya lipid peroksidasyonu şeklinde görülür. AH'li beyinde bu üç tip oksidatif hasara da rastlanmaktadır (49). Ancak yüksek lipid konsantrasyonu ve

oksidasyona duyarlı poliansatüre yağ asitlerinin yoğunluğu nedeniyle beyinde oksidatif stres kendini öncelikle lipid peroksidasyonu olarak gösterir (50-52).

2.3. OKSİDATİF HASAR

2.3.1. Serbest Radikaller

Atom yapısı, bir çekirdek ve çevresinde bulunan değişik sayıda elektronlardan oluşmaktadır. Enerji düzeylerine göre belirli bir düzende yerleşen elektronlar, orbital adı verilen yörüngelerde hareket etmektedirler (53) (Şekil 7.).



Şekil 7. Atomun iç yapısı

Stabil moleküllerin çoğundaki elektronlar ortaklanmıştır. Her bir yörüngede zıt yönde dönen iki elektron içerirler. Bu orbitaller kovalent bağları oluşturmak için birleşebilir veya sudaki oksijen atomunda olduğu gibi bağlanmamış çiftler olarak kalabilir. Bununla birlikte elektronun ortaklanmadığı veya yörüngesinde tek başına olduğu kimyasal türler de vardır. Bu reaktif özellik taşıyan kimyasal türler radikal veya serbest radikaller olarak adlandırılır (54). Radikaller genom instabilitesi, yaşlanma, dejeneratif hastalıklar ve kanser gibi pek çok olayda rol almaktadır (55).

Serbest radikal atomik veya moleküler yapısından dolayı son derece kararsız durumda olan bir atom, molekül veya bileşiktir. Daha kararlı bir duruma ulaşmak için serbest radikaller, hücrelerde bulunan diğer atomlar veya moleküllerle tepkimeye girerler. Serbest radikaller tarafından gerçekleştirilen bu tepkimeler temel olarak dört şekilde gerçekleşir (56).

- Serbest radikaller serbest bir hidrojen atomuna sahip olan bir molekül ile etkileşir. Radikal hidrojen atomu bağlar ve kararlı duruma geçer. Diğer molekül serbest radikale dönüşür.

- Bir radikal stabil bir molekül ile reksiyona girer ve tepkime sonunda yine bir radikal oluşur.
- İki serbest radikalin birbiri ile tepkimeye girmesi sonucunda kararlı bir bileşik oluşur.
- Benzer iki radikalin birbirleri ile tepkimeye girmesi sonucunda her ikiside kararlı halde olan iki farklı molekül oluşturur.

2.3.2. Serbest Radikal Kaynakları ve Reaktif Oksijen Türleri

Radikaller, yapılarında bulunan temel atomlara bağlı olarak (75);

- Karbon (C) merkezli radikaller
- Nitrojen (N) merkezli radikaller
- Sülfür (S) merkezli radikaller
- Oksijen (O) merkezli radikaller şeklinde belirtilirler

Yaşayan hücrelerde serbest radikaller normal metabolik olayların seyri sırasında meydana geldiği gibi, organizmanın çeşitli dış etkenlere maruz kalmasıyla da oluşabilmektedir. Bu nedenle serbest radikal kaynakları, endojen ve ekzojen olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır (57).

Ekzojen kaynaklar;

- İyonize radyasyon
- İlaçlar
- Hava kirliliği
- Sigara
- Alkol
- Diyette yüksek miktarda alınan bakır ve demir

Endojen serbest radikal kaynakları;

- Mitokondriyal elektron transport zinciri; aerobik hayvan hücrelerinde süperoksidin en önemli kaynağıdır. Mitokondride indirgenen O_2'nin %1-3'ü süperoksit radikaline dönüşmektedir (58).
- Endoplazmik retikulum sitokrom P450 enzim sistem; yaklaşık olarak 500'ün üzerinde gen tarafından kodlanır. İlaçlar, ksenobiyotikler, araşidonik asit, kolesterol, vitamin D3 ve

retinoik asit metabolizmasında görev alır. Moleküllere bir elektron ekleyerek veya molekülden bir elektron çıkararak toksik metabolitleri normal ürünlere çevirir. Bu yükseltgenme ve indirgenme olayları sırasında elektronlar moleküler oksijene aktarılarak superoksit radikali oluşturmaktadır (59).

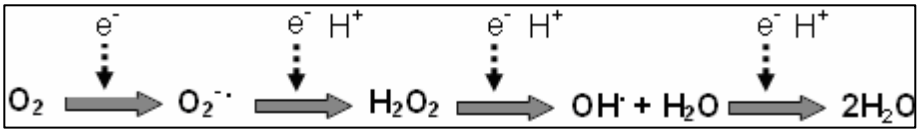
- Fagositik hücrelerin savunma mekanizmaları; Nötrofiller, mikroorganizmalara karşı ilk savunma hattını oluşturmaları nedeni ile yangısal yanıtta en önemli rolü oynayan kan hücreleridir. Nötrofillerin membranında bulunan NADPH oksidaz enzim sistemi süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$) oluşumu için önemli bir kaynaktır. Solunum patlaması olarak bilinen bu olay fagositlerin mikroorganizmaları yok etmelerinde temel mekanizmadır. $O_2^{\bullet-}$ ise SOD enzimi ile hidrojen peroksite indirgenir. Nötrofillerde bulunan miyeloperoksidaz enzimi hidrojen peroksit ve klorür iyonunu hipoklorik asite (OHCl) dönüştürerek bakterisidal etki yaratmaktadır (60).
- Oksidan enzimler; ksantin oksidaz, indolamin dioksijenaz, triptofan dioksijenaz, siklooksijenaz, lipooksijenaz ve monoaminooksidaz hücrede önemli serbest radikal kaynaklarıdır (61).
- Oto-oksidasyon reaksiyonları; tiyoller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, tetrahidrobiyopterinler, askorbik asit gibi bazı bileşiklerin oto-oksidasyonu ile $O_2^{\bullet-}$ oluşmaktadır (62).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (63). Reaktif oksijen türleri (ROT); hem okside edici ajanlar veya kolaylıkla radikallere dönüşebilen (HOCl, O_3, $ONOO^-$, O_2, H_2O_2) radikal olmadığı bilinen türler hem de oksijen radikallerini içeren ortak bir terimdir. Reaktif terimi; yalnızca birkaç molekülle hızlı bir şekilde tepkimeye giren H_2O_2, NO^- ve $O_2^{\bullet-}$ için her zaman uygun bir terim değilken, hemen hemen her türlü yapı ile hızlı bir şekilde tepkimeye giren $^{\bullet}OH$ için her zaman uygundur. $LO_2^{\bullet-}$ $LO^{\bullet}$, HOCl, $NO_2^{\bullet}$, $ONOO^-$, ve O_3 orta düzeyde reaktiviteye sahiptirler (64).

2.3.3. Biyolojik Sistemlerde Oluşan Serbest Radikaller ve Etkileri

Oksijen, aerobik organizmalara karbohidratlar, yağlar ve proteinler gibi gıda maddelerinde depolanmış enerjiyi kullanma imkanı sağlayan evrensel bir elektron alıcısıdır. Hayvan hücreleri tarafından plazmadan alınan oksijenin %85-90'ı mitokondri tarafından adenozin trifosfat (ATP) üretiminde kullanılır. Metabolik enerji üretiminin temeli; nikotin adenin dinükleotid (NAD), flavin mononükleotid (FMN), flavin adenin dinükleotid (FAD)

gibi elektron taşıyıcıları tarafından alınan elektronların kaybını içeren, besin maddelerinin oksidasyonudur. İndirgenmiş halde bulunan bu ürünler mitokondride ATP üretmek için oksijen tarafından sırasıyla tekrar okside edilirler. Sitokrom oksidaz elektron taşıma zincirindeki son enzimdir ve oksijene 4 elektron ekler. Bu katabolik olaylar zincirinin süperoksid ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi ROT ve serbest radikaller oluşturacağı deneysel olarak kanıtlanmıştır. Normal fizyolojik şartlar altında reaktif oksijen türlerinin büyük çoğunluğu; vücut tarafından kullanılan oksijenin %90'ı mitokondride suya indirgendiği için, mitokondriyal elektron transport zincirinde üretilir (65,66) (Şekil 8.).

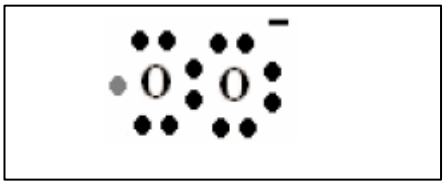


Şekil 8. Oksijen molekülünün suya indirgenmesi ve oksijen kaynaklı radikallerin oluşumu

<u>Süperoksit $O_2^{\bullet-}$ radikali</u>

Moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucunda süperoksit anyon radikali oluşur (67) (Şekil 9.).

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$$



Şekil 9. Süperoksit radikalinin moleküler yapısı

Başlıca süperoksit radikal kaynakları; elektron transport zinciri, aktive fagositler, ksantin oksidaz ve flavoenzimlerdir (68). Süperoksit; katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) gibi bazı antioksidan enzimlerin ve NADH dehidrogenaz gibi enerji metabolizmasında rol oynayan birkaç enzimin aktivitesini azaltabilir. Deoksiribonükleik asit (DNA) sentezi için gerekli öncülleri üreten ribonükleotid redüktaz da süperoksit hasarının bir diğer enzimatik hedefidir. Direkt olarak hasar oluşturmasının yanında süperoksit, hidrojen peroksit gibi diğer reaktif türleri oluşturabilir. Süperoksit radikali bir dereceye kadar zararsızdır fakat fizyolojik

pH'da yaklaşık olarak %1'i protonlanır ve daha reaktif olan peroksi radikali oluşur. En basit peroksi radikali ($HO_2^{\bullet}$), hidroperoksi veya perhidroksi radikali olarak adlandırılır (69).

Artmış süperoksit radikal düzeyleri demir depo proteini olan feriritinden az miktarda demirin serbestleşmesine neden olabilir (70).

$$O_2^{\bullet-} + \text{ferritin } (Fe^{3+})_n \rightarrow \text{ferritin } (Fe^{3+})_{n-1} + Fe^{2+} + O_2$$

$O_2^{\bullet-}$ radikalleri oksidatif strese yol açabilen bir dizi reaksiyonları başlatabilir. Bu reaksiyonların en önemlilerinden biri Haber-Weiss reaksiyonudur. Bu reaksiyonda O_2 ve H_2O_2, Fe^{2+} varlığında etkileşerek oldukça reaktif olan hidroksil ($^{\bullet}OH$**)** radikallerini oluşturmaktadır. Üretilen bu hidroksil radikalleri oldukça reaktif olup, DNA gibi yapılarla reaksiyonlara girerek önemli hasarlara yol açabilmektedir.

$$Fe^{3+} + O_2^{\bullet-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + {}^{\bullet}OH$$

Net reaksiyon: $H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \rightarrow {}^{\bullet}OH + OH^- + O_2$ (Haber-Weiss reaksiyonu)

<u>Hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$)</u>

Hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$), biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü serbest radikaldir (71). H_2O_2' nin Fe^{2+} veya Cu^{2+} ile reaksiyona girmesiyle $^{\bullet}OH$ oluşmaktadır. H_2O_2 toksisitesinin büyük çoğunluğunun temelinde, bu oluşan $^{\bullet}OH$ radikalinin olduğu düşünülmektedir. Bu reaksiyon ilk defa 1894 yılında Fenton tarafından gözlenmiştir ve günümüzde de Fenton reaksiyonu olarak bilinmektedir.

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + {}^{\bullet}OH$$

$$Cu^{+} + H_2O_2 \rightarrow Cu^{2+} + OH^- + {}^{\bullet}OH$$

Hidroksil radikalleri başta lipid, protein ve nükleik asitler (DNA ve RNA) olmak üzere hemen hemen bütün hücresel moleküllerle reaksiyona girebilmektedirler. $^{\bullet}OH$ radikallerinin, DNA' da bulunan deoksiriboz molekülüne etki ederek çeşitli ürünler oluşturduğu ve oluşan bu ürünlerin bazılarının mutajenik oldukları bilinmektedir. Yine $^{\bullet}OH$ radikalleri aromatik halkaya katılma özelliği gösterdiğinden, DNA ve RNA' da bulunan pürin ve pirimidin bazlarına katılarak, radikal oluşumuna neden olurlar. Bu gibi bir dizi reaksiyona katılabilen

$^{\bullet}$OH radikali, DNA'nın baz ve şeker yapılarında da ciddi hasarlar oluşturarak DNA üzerinde zincir kırıkları meydana getirirler. Hasarın çok kapsamlı olması durumunda, oluşan hasar hücresel koruyucu sistemler tarafından tamir edilemeyebilir ve bunun sonucunda mutasyonlar ve hücre ölümleri meydana gelebilir. Proteinlerdeki aminoasit kalıntıları hidroksil radikalinin hedefidir. Okside olan lipidler, lipid peroksidasyonunu başlatabilir. Bu durum membran proteinlerinin hasarlanmasına yol açabilir (72).

Hidrojen peroksit (H_2O_2)

H_2O_2; moleküler oksijenin 2, süperoksit radikalinin 1 elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. Askorbik asidin süperoksit tarafından oksidasyonu da H_2O_2 oluşumu ile sonuçlanır (73,74).

$$O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$

$$O_2^{\bullet-} + 2H^+ + e^- \rightarrow H_2O_2$$

$$\text{Askorbik asit} + O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow \text{Askorbik asit radikali} + H_2O_2$$

Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen bileşikleri kapsamına girer. Çünkü Fe^{2+} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu, $O_2^{\bullet-}$ varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan $^{\bullet}$OH oluşturur (71).

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + OH^- \text{ (Fenton reaksiyonu)}$$

$$H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \rightarrow {}^{\bullet}OH + OH^- + O_2 \text{ (Haber-Weiss reaksiyonu)}$$

H_2O_2, radikal üreten reaksiyonlara katıldığı için pro-oksidan olarak adlandırılır (75). H_2O_2, demir ve bakır gibi geçiş metalleri ile etkileşerek hidroksil ($^{\bullet}$OH) ve peroksinitrit ($^{\bullet}$NO) gibi daha zararlı radikaller oluşturur. H_2O_2 molekülü diğer reaktif oksijen türlerine oranla oldukça kararlı ve yüksüzdür. Hücre içine ve hücreler arasına kolaylıkla geçebilir. Bu özellikleri hidrojen peroksitin ikinci haberci olarak rol oynamasında etkili olabilir (76). Bu özellikler aynı zamanda H_2O_2'nin toksik etkilerini arttırır. Ayrıca hidrojen peroksitin nörotransmitter veya glial ve nöronal hücreler arasındaki haberci olarak rol oynayabileceği ileri sürülmektedir (77).

Singlet oksijen ($^1O_2$)

Singlet oksijen; oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönde olan başka bir orbitale yer değiştirmesi ile oluşur. Singlet oksijen, eşlenmemiş elektron içermez bu nedenle serbest radikal değildir fakat güçlü bir oksidandır. Çoklu doymamış yağ asitlerini de içeren pek çok molekülü çok hızlı bir şekilde okside edebilir (64).

Nitrik oksit (NO)

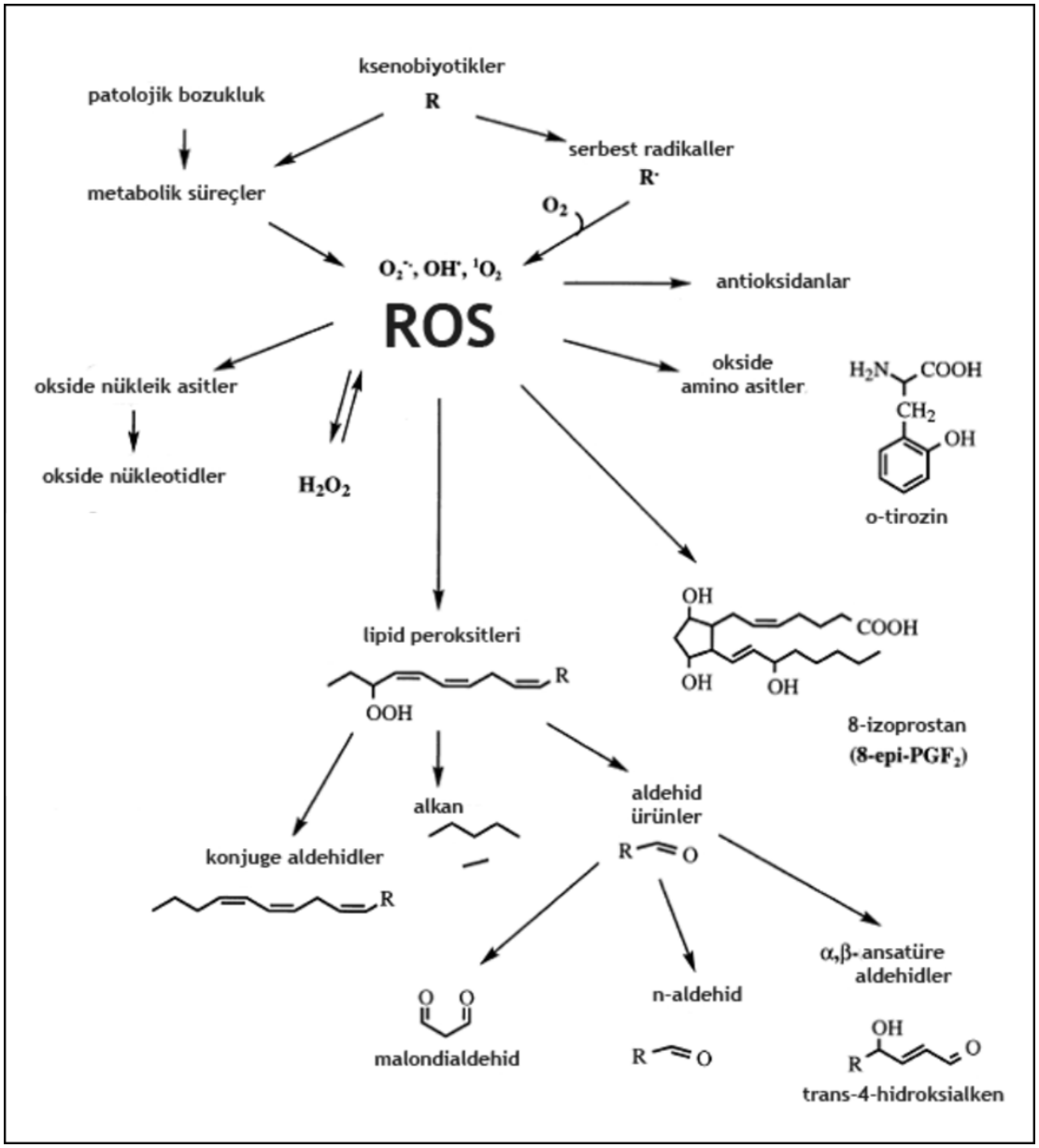
Nitrik oksit; yapısında eşlenmemiş elektron bulundurmasından dolayı bir radikal olarak kabul edilir. Nitrik oksit biyolojik dokularda arjinininden sitrüllin oluşumunu katalizleyen nitrik oksit sentaz enzimi tarafından üretilir. Nöronal iletiyi de içeren çok farklı fizyolojik süreçlerde sinyal molekülü olarak, kan basıncının düzenlenmesi, savunma mekanizmaları, düz kas gevşemesi, immun düzenlemede rol oynayan ve bol miktarda bulunan bir radikaldir (78). Nitrik oksitin süperoksit anyonu ile tepkimeye girmesi oksidatif olarak çok daha fazla aktif olan peroksinitrit anyonu (ONOO-) oluşumuna neden olur. Peroksinitrit anyonu DNA'nın kırılmasına ve lipid oksidasyonuna neden olan güçlü bir oksidandır.

$$NO + O_2^{\bullet-} \rightarrow ONOO^-$$

Peroksinitrit; nitrat (NO_3), OH ve nitrojen dioksit (NO_2) oluşturabilir (79). Reaktif nitrojen türlerinin fazla miktarda üretimi nitrozatif stres olarak adlandırılır (80).

2.3.4. Oksidatif Makromolekül Hasarı

Oksijenli solunum yapan hücrelerde, reaktif türlerin oluşumu antioksidan savunma sistemleri ile denge halindedir. Bu denge reaktif türler lehine bozulursa oksidatif hasar meydana gelir. Hasar elektron yönünden zengin hücresel makromoleküller olan protein, lipid, karbohidrat ve DNA'yı hedef almaktadır (81) (Şekil 10.).



Şekil 10. Serbest radikal hasar ürünleri. Serbest radikaller farklı hücresel elemanlarla reaksiyona girebilmeleri (DNA, lipid ve protein gib) sonucunda farklı ürünler oluşur (82).

2.3.4.1. Protein Hasarı

Proteinler özellikle enzim şeklinde, hücredeki pekçok hayati fonksiyonun sürdürülmesinde rol oynarlar. Proteinler reaktif oksijen türlerine karşı farklı duyarlılıkta olan yaklaşık 20 aminoasitten oluşur. Örneğin; özellikle sistein, metiyonin ve histidin hidroksil radikalinin oksidasyonuna ve etkisine daha duyarlıdır Enzim yapısında fonksiyonel pozisyonda yer alan aminoasitler reaktif oksijen türleri ile etkileşir ve enzim inaktif konuma

geçer. ROT tarafından oluşturulan protein oksidasyonu, proteinlerin çapraz bağları, agregasyonu, fragmentasyonu yanında üç boyutlu yapısında da değişikliklere neden olmaktadır. Protein oksidasyonu sıklıkla; proteini, hücrelerde hasarlı proteinlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan hücresel sistemler tarafından yıkıma daha açık hale getirecektir. Proteinler serbest radikal etkilerine lipidlere oranla daha az hassastırlar (83).

Proteinlerin oksidasyonu doğrudan reaktif oksijen türleri ile etkileşime girerek (birincil modifikasyon) oluşabildiği gibi indirekt olarak (ikincil modifikasyon) karbohidrat ve lipidlerin oksidatif stres sonucu oluşan ürünleri ile etkileşime girmesi sonucu da oluşabilmektedir (84).

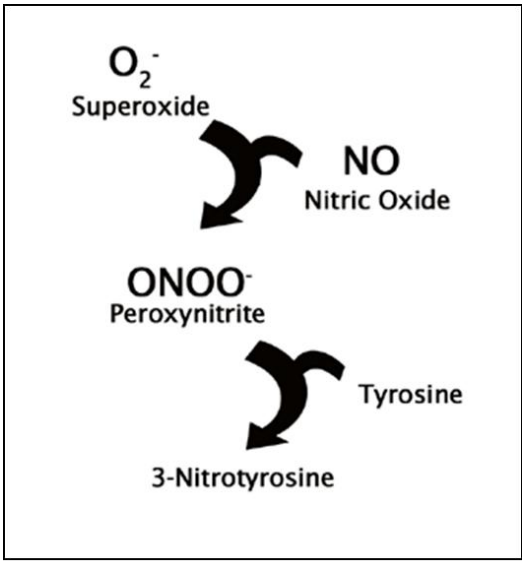
Polipeptid omurgasındaki α karbon atomundan $^{\bullet}OH$ radikali ile α hidrojen atomunun çıkarılması sonucunda amino asit kalıntısı karbon merkezli radikale dönüşür. Oluşan karbon merkezli radikal bir başka karbon merkezli radikal ile etkileşerek protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna yol açar (85). ROT tarafından proteinlerin peptid bağlarının yıkılması sonucu karbonil grupları ortaya çıkar. Karbonil grupları; proteinlerin ana yapısının oksidasyonu sırasında oluşan proteinlerin, alkil peroksit türevleri ve alkoksil radikalleri ile peptid bağının, diamid veya α amidasyon yoluyla yıkılması sırasında ortaya çıkmaktadır. Karbonil grupları metal katalizli oksidasyon sistemleri ile bazı proteinlerin yan zincirlerinin oksidasyonu sonucunda da oluşabilmektedir (86,87).

Sekonder modifikasyon reaksiyonları, proteinlerin karbohidrat ve lipid oksidasyon ürünleri ile reaksiyonlarını içermektedir. Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan aldehitler [4-hidroksi 2-nonenal, malondialdehit (MDA)], indirgen şekerler veya bu şekerlerin oksidasyon ürünlerinin proteinlerdeki lizin kalıntıları ile reaksiyonu (glikasyon ve glikozidasyon) proteinlerin yapısına karbonil gruplarının katılmasına yol açar (86).

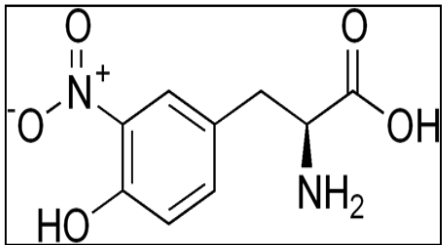
Nitrotirozin (NT) oluşumu protein oksidasyonuna yol açan diğer bir mekanizmadır. Peroksinitrit ($ONOO^{-}$), nitrik oksidin (NO), süperoksit radikali ile reaksiyonu sonucunda oluşan bir ürünüdür. Peroksinitritin proteinler üzerine saldırısının ana ürünü tirozinin orto pozisyonundan nitrolanması ile oluşan NT'dir (Şekil 11, 12.). Enzimleri, proteinleri, DNA'yı, lipidleri ve tiyol gruplarını okside edebilmesinden dolayı yüksek toksisiteye sahiptir (88).

NT'nin, $ONOO^{-}$ oksidasyonunun stabil son ürünü olmasına bağlı olarak, NT konsantrasyonu NO bağımlı in vivo hasarın tespitinde kullanışlı bir belirteçtir (89). Bugünkü

bilgilere göre, $ONOO^{-}$ tek basına nitrik oksitten ve süperoksit radikalinden daha güçlü bir oksidan ve sitotoksik mediatördür.



Şekil 11. Nitrotirozin oluşum mekanizması



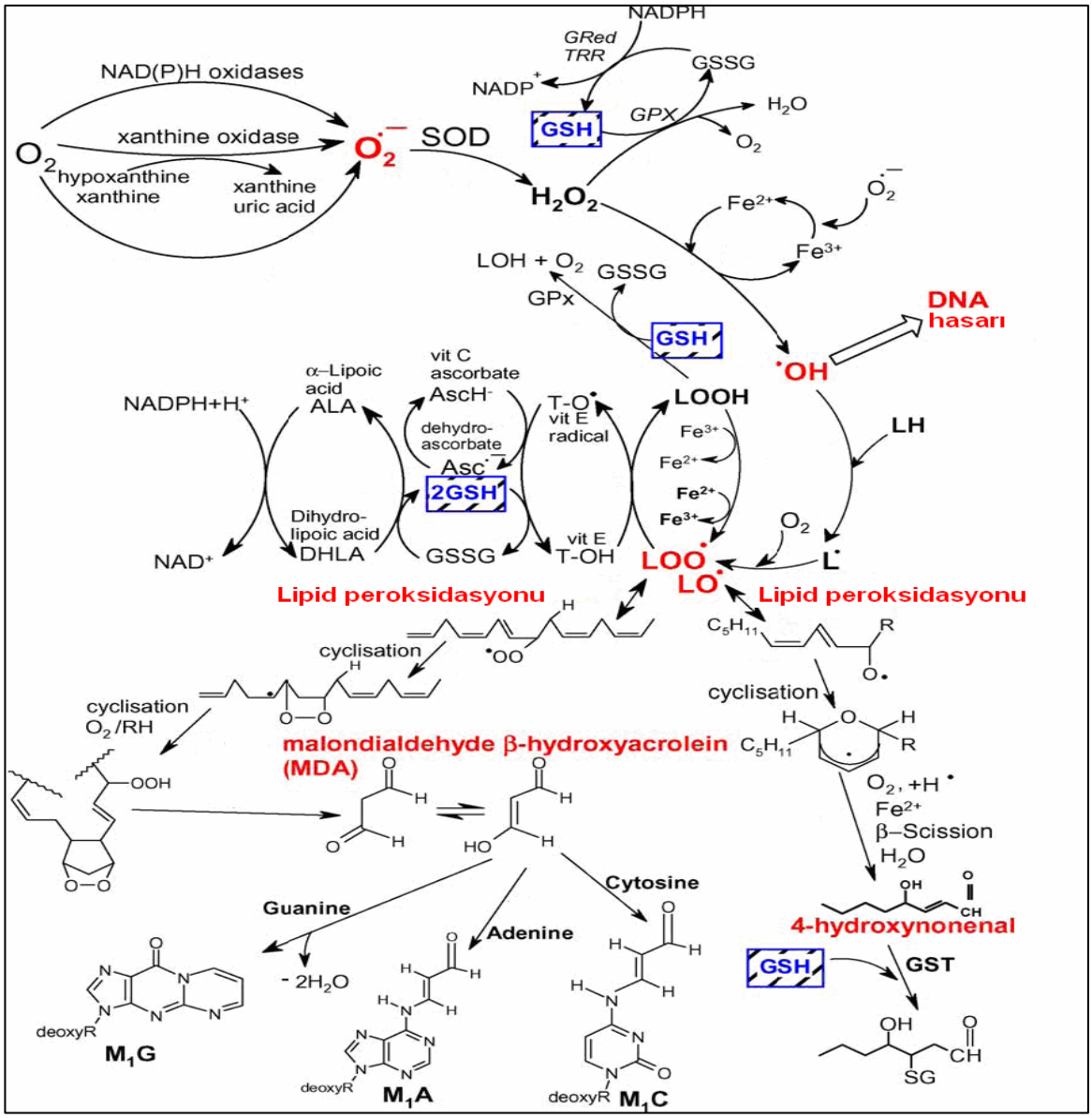
Şekil 12. Nitrotirozin molekülü

2.3.4.2. Lipid Hasarı

Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan poliansature yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucunda yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle dien konjugatları ve daha sonra lipid radikalinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksil radikali meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansature yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin

oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder. Lipidlerin içerdiği fosfolipidler mitokondri, nukleus gibi diğer hücresel yapıların yanında hücreleri çevreleyen membranların temel bileşenidir. Fosfolipidlerin bozulması sonucunda hücre ömrü kısalacaktır. Lipidlerin degradasyonu (peroksidasyon) oksidatif hasarın belirtisidir. Fosfolipidlerde bulunan çoklu doymamış yağ asitleri, hidroksil radikali ve diğer oksidanlara karşı duyarlıdır. Tek bir hidroksil radikali birçok çoklu doymamış yağ asit molekülünün peroksidasyonuna neden olabilir. Çünkü bu tepkimeler zincir tepkimelerinin bir kısmını oluşturan bu süreçte rol oynarlar. Bu duruma ek olarak membran hasarı ve lipid peroksidasyonu sonucu tahrip olan hücreler, reaktif ürünlerin oluşmasına neden olur ve bu maddeler de protein ve DNA ile etkileşebilirler (54).

Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesiyle sonlanır. Bu ürünlerin başlıcaları malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal'dir (4-HNE). MDA lipid peroksidasyonun değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan parametrelerden biridir. MDA ve 4-HNE nükleik asitlerle tepkimeye girer, bu nedenle genetik değişime ve kanser gelişimine neden olabilirler (90-93) (Şekil 13.).



Şekil 13. ROT oluşum yolları, lipid peroksidasyonu, glutatyon ve diğer antioksidanların rolü (83)

2.3.4.3. Karbohidrat Hasarı

Monosakkaridlerin otooksidasyonu sonucu H_2O_2, peroksitler ve okzoaldehitler oluşur. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece, kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar (94-96).

Serbest radikallerin karbohidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Okside olan glukoz, proteinlerin amino gruplarıyla, lipidlerle ve nükleik asitlerle non enzimatik etkileşime girerek

(Maillard reaksiyonu) Schiff bazları ve amadori ürünleriyle ileri glikasyon son ürünlerini (AGE) oluşturur (97).

Maillard reaksiyonu erken, ara ve geç olmak üzere başlıca 3 evreye ayrılabilir (98,99).

Erken evrede; glukoz (veya diğer indirgeyici şekerler vb.) ile protein (N-terminal amino asitlerinin α- amino grupları ve/veya ε- amino grupları ile), lipid ve nükleik asit gibi moleküller ile nonenzimatik olarak reaksiyona girerek aldimin yapıdaki dayanıksız Schiff baz meydana gelir**.**

Ara evrede; yeniden düzenlenme reaksiyonları sonucunda daha stabil ve geri dönüşümlü olan ketoamin yapıdaki Amadori ürünü oluşur (Örneğin HbA1c ve fruktozamin). Amadori ürünü oksidasyon ve dehidrasyon reaksiyonları aracılığıyla farklı dikarbonil (α-okzoaldehidler) yapılarına yıkılır (glioksal, metilglioksal ve deoksiglukazonlar).

Geç evrede; ara evrede oluşan yapıların oksidasyon, dehidrasyon, siklizasyon ve yeniden düzenlenme reaksiyonları ile sarı-kahverengi, sıklıkla floresan veren, çözünmez ve geri-dönüşümsüz ileri glikasyon son ürünleri oluşur. Oksidasyon süreci birçok AGE yapısının oluşumunda önemlidir (Şekil 14.).

İleri glikasyon son ürünlerinin oluşumunda proteinlerin turnover hızı, hiperglisemi derecesi ve çevresel oksidan stres düzeyi gibi faktörler önemli anahtar role sahiptir. Oksidatif stres AGE oluşumuna neden olurken AGE de oksidatif stresi artırabilmektedir.

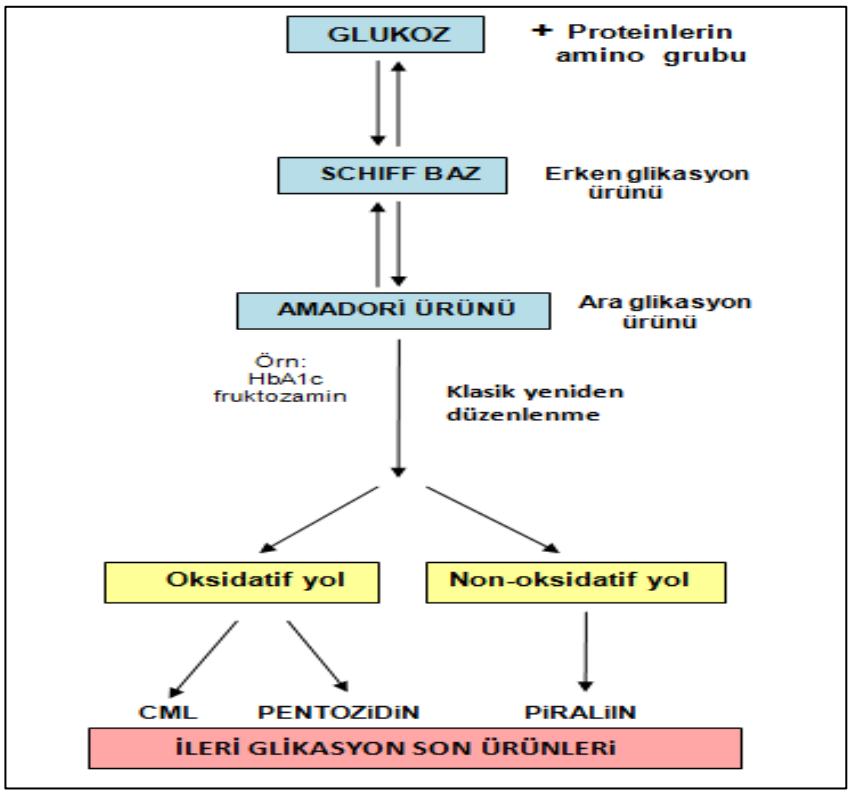
Yavaş oluşumları nedeniyle yalnızca uzun ömürlü ekstrasellüler proteinlerde AGE'in oluştuğu kabul edilirken, yeni çalışmalarda kısa ömürlü moleküllerde ve hatta büyüme faktörlerinde bile oluştuğu gösterilmiştir. Dokularda düzinelerce AGE saptanabilir ve başlıca 3 kategori halinde incelenebilir (97) (Şekil 15.).

a) Çapraz bağlı floresan AGE'ler; Pentosidin, Crossline, Vesperlizin, Pentodilizin.

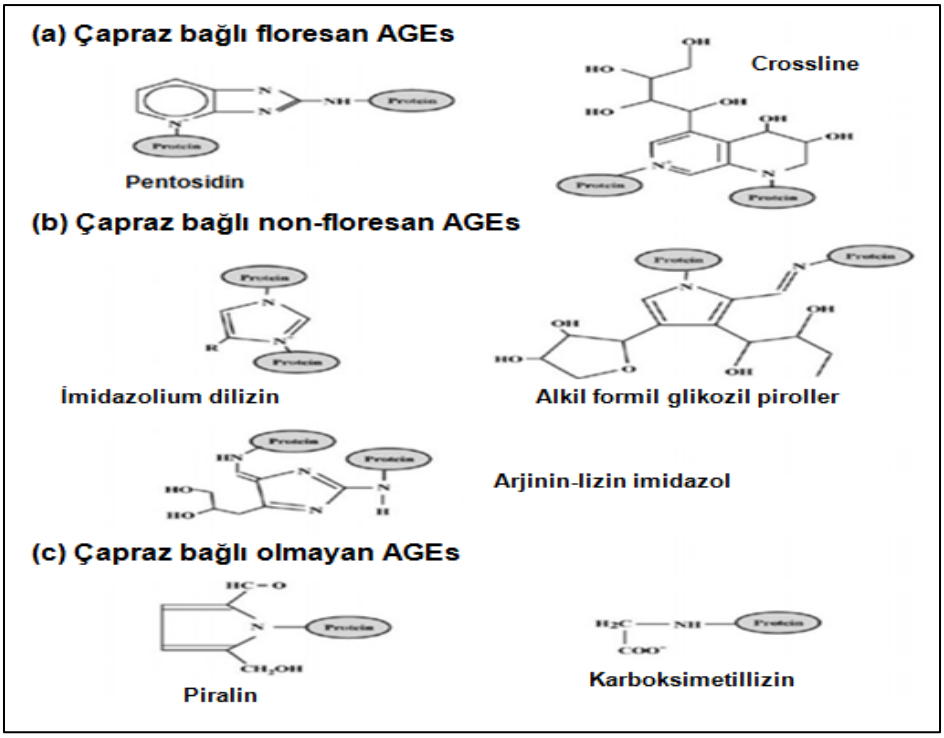
b) Çapraz bağlı floresan olmayan AGE'ler; İmidazolium dilizin, Alkil formil glikozil piroller, Arjinin-lizin imidazoller

c) Çapraz bağlı olmayan AGE'ler; Piralin, N^{ε}-karboksimetillizin (CML), İmidazolon

Bu 3 çeşit AGE tipleri doku, serum ve idrar örneklerinde izole edilmektedir (100,101).



Şekil 14. AGE oluşumu



Şekil 15. İleri glikasyon son ürünleri

Glikasyon, dolayısıyla AGE'lerin oluşumu daha çok diyabette hiperglisemi varlığında meydana gelmektedir. Ancak normal kan glukoz seviyelerinde de glikasyon gerçekleşmekte ve yavaş bir hızda vücutta AGE birikimi olmaktadır. Yaşlanmayla birlikte dolaşımda AGE miktarı artarken, böbreklerden AGE atılımı azalmaktadır. Bu nedenle yaşlanmayla birlikte vücutta AGE birikmektedir. İleri glikasyon son ürünlerinin oluşumu daha cok hiperglisemik serumda olduğu için özellikle diyabetin komplikasyonlarının etyopatogenezinden sorumlu tutulmuşlar ve araştırmalar daha çok bu yönde olmuştur. Ancak AGE'lerin birçok kronik hastalığın gelişiminde de rol oynadığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda diyabet dışında bazı hastalıklarda (atheroskleroz, hiperlipidemi, enflamasyon, böbrek yetmezliği, alzheimer gibi norodejeneratif hastalıklar) AGE'lerin oluşumları ve birikimlerinin hızlandığı görülmüştür (102).

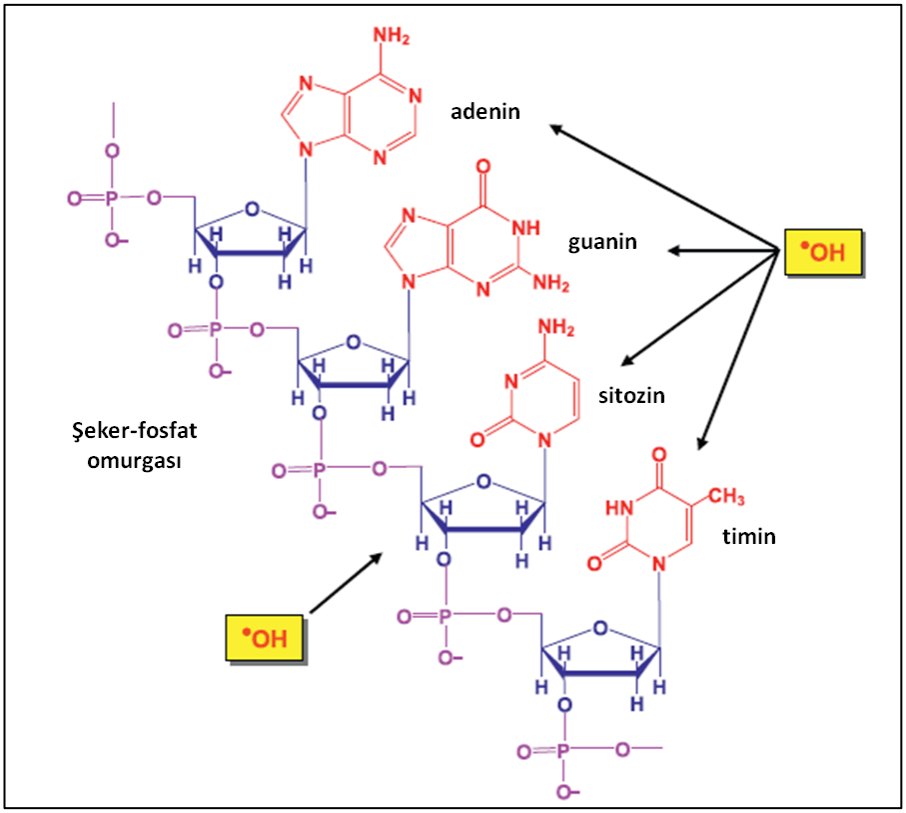
Son çalışmalar AGE'lerin yaşlanmadaki vasküler komplikasyonların gelişmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir (103). Yaşlanma ve ilişkili olaylarda beynin farklı bölgelerinde AGE'lerin birikimi sözkonusudur. Nörofibriller yumakların ve amiloid plakların yapısında bulunan proteinlerin, uzun dönemde, çok düşük düzeyde glukozla bile oluşabilen ve neticede AGE oluşumuna sebep olan glikasyon için ideal substratlar olduğu belirtilmektedir (104). CML, piralin ve hegzitollizine karşı spesifik antikorlarla yapılan immunohistokimyasal analizlerle nörofibriller yumaklarda AGE'lerin lokalize olduğu gösterilmektedir (105).

2.3.4.4. DNA Hasarı

DNA hücrenin kalıtım materyalidir ve sürekli DNA hasarı DNA tarafından kodlanan proteinlerde değişikliğe yol açar. DNA zincirinin kırılmasına, nükleotid kaybına ve nükleotidlerdeki organik bazlarda çok farklı modifikasyonlara yol açan DNA hasarının ana kaynağı reaktif oksijen türleridir. Her ne kadar hücreler DNA'da meydana gelen değişiklikleri doğal olarak onarabilecek mekanizmalara sahip olsalar da reaktif oksijen türleri veya diğer ajanlar tarafından oluşturulan aşırı hasar DNA yapısında kalıcı hasara ya da değişikliğe neden olabilir. Hücrede yan etkiler ortaya çıkabilir. Oksidatif hasar sonucunda genetik materyalin sürekli olarak modifikasyonu; mutagenez, karsinogenez ve yaşlanmanın ilk basamağını teşkil eder (83,63). İnsan vucudunun her hücresindeki DNA'nın günde 10^3 kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmektedir (106). DNA hasarı ve onarımı arasındaki denge nedeniyle, çok düşük düzeylerde hasar, sağlıklı bireylerde de saptanmaktadır.

DNA hasarı bazı nörodejeneratif hastalıkların patojenezinde önem taşımaktadır (107). Daha önceki çalışmalarda AH'li beyinlerde oksitlenmiş DNA bazlarının fazla olduğu bulunmuştur (108). Bu hasarın periferal hücrelere yansıması da araştırılmış ve AH'da yine yüksek olduğu gösterilmiştir (109). AH hastalarının lökosit ve lenfositlerinde kontrollere göre yüksek konsantrasyonda okside pürin ve pirimidin bazları saptanmıştır (7,8). Son yapılan bu çalışmalarda AH'ın erken döneminde sitopatolojik değişiklikler meydana gelmeden önce beyin ve lökositlerde oksidatif baz hasarının gelişmeye başladığı ve hastalığın patogenezine katıldığı savunulmaktadır (110,111).

Yüksek reaktiviteye sahip olduğu bilinen hidroksil radikali (•OH) başta olma üzere oksijenden türev alan serbest radikaller, DNA'nın bileşenleri ile reaksiyona girerek DNA'nın yapısını bozarlar (112). DNA'nın bu tipteki hasarı **'oksidatif DNA hasarı'** olarak adlandırılmaktadır (113) (Şekil 16.).



Şekil 16. DNA üzerinde •OH radikalinin atak yaptığı bölgeler (114)

Oksidatif DNA hasarı 6 alt başlıkta değerlendirilebilir.

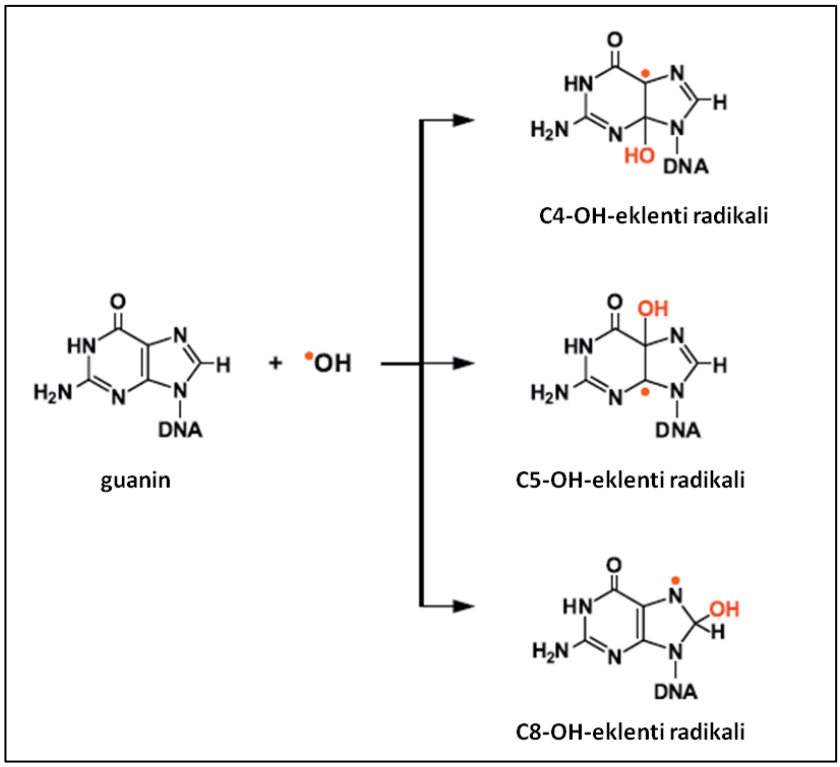
- DNA baz hasarı
- DNA şeker hasarı
- 8-5'-siklopürin-2'-deoksinüklozidler
- DNA protein çapraz bağları
- Abazik bölgeler
- Tek ve çift DNA zincir kırıkları

2.3.4.4.1. DNA Baz Hasarı

Başta hidroksil ($^{\bullet}OH$) olmak üzere tüm serbest radikaller organik bileşikler ile ekleme veya çıkarma reaksiyonu gerçekleştirirler. Hidroksil radikali pürin ve pirimidin bazlarının çift bağlarına difüzyon-kontrollü olarak bağlanır. Hidroksil radikallerinin saldırılarının yaygınlığı oksidasyona uğrayacak molekülün elektron yoğunluğuna bağlıdır. Elektrofilik doğası nedeniyle $^{\bullet}OH$ tercihen en yüksek elektron yoğunluğu olan bölgeye eklenir (114).

Pürin Hasarı

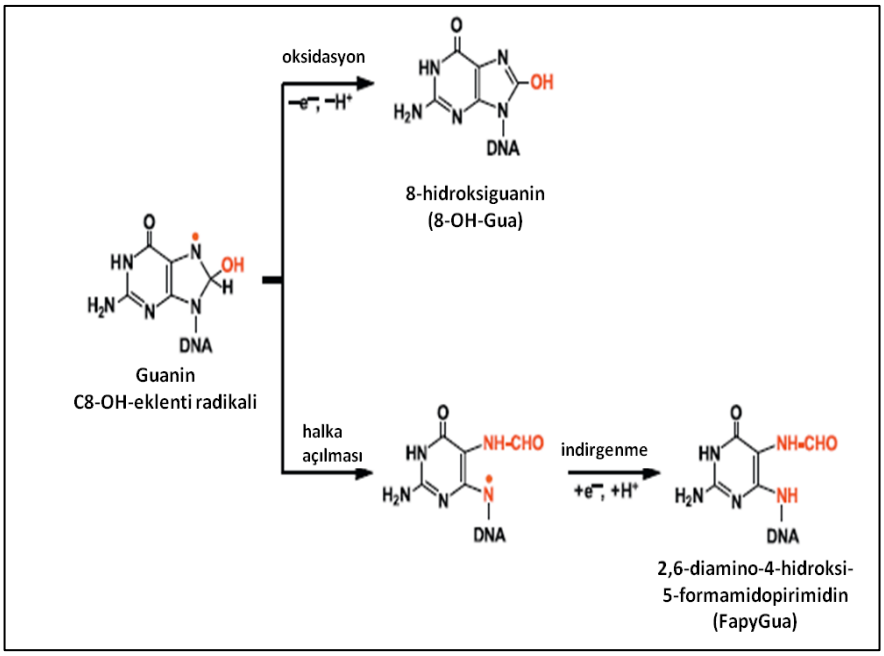
Pürin bazlarından guaninde C4-, C5- ve C8-pozisyonlarına $^{\bullet}OH$ radikalinin eklenmesi sonucu guaninin C4-OH, C5-OH ve C8-OH-eklenti radikalleri oluşur (Şekil 17.). $^{\bullet}OH$ radikalinin eklenmesi sonucu adeninde ise C4-OH ve C8-OH-eklenti radikalleri oluşur. Adeninde C5-OH-eklenti radikalinin oluşması %5'den daha azdır. Pürinler, OH-eklenti radikalleri açısından farklılık gösterirler. C4-OH-eklenti radikali oksidasyona uğrarken, C5-OH- ve C8-OH-eklenti radikali indirgenir. C4-OH ve C5-OH-eklenti radikallerinin dehidrasyonu sonucu nötral pürin $(-H)^{\bullet}$ radikalleri (örneğin, Guanin $(-H)^{\bullet}$) oluşur ve bu reaksiyonu protonlanma izler ve pürin radikal katyonlarının oluşumu gerçekleşir (örneğin, Guanin$^{\bullet+}$) (115-118).



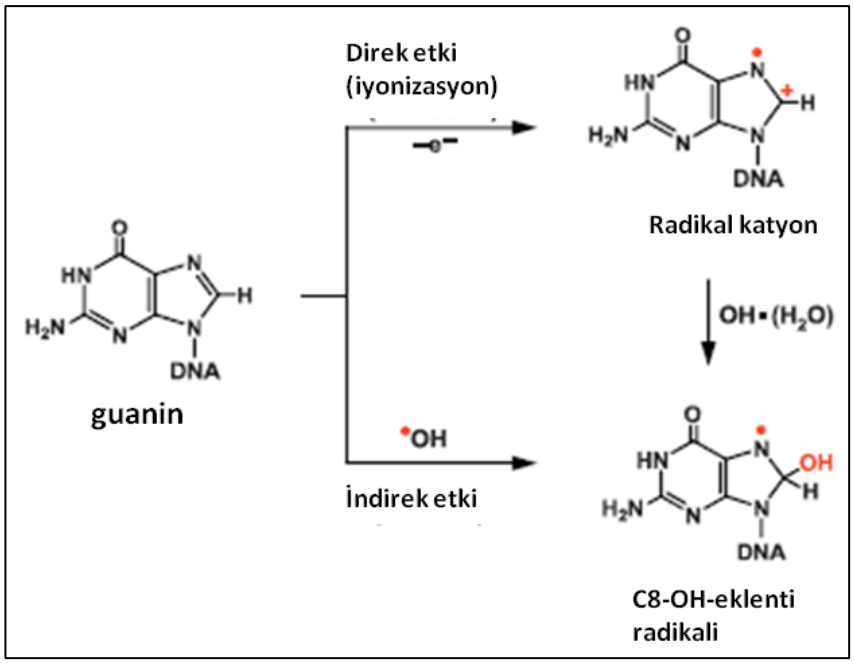
Şekil 17. •OH radikalinin pürinlerle reaksiyonları (114)

Oksijenin pürin OH-eklenti radikalleri ile reaksiyonları farklı hızlarda gerçekleşir. C4-OH-eklenti radikali ile reaksiyonu yavaştır. Buna rağmen C8-OH eklenti radikali ve Guanin (-H)• ile reaksiyonları ise difüzyon kontrollüdür (114). Guanin (-H)• radikalinden imidazolon ve oksazolon türevleri oluşur. Pürin C8-OH-eklenti radikalleri yükseltgenebilir ya da indirgenebilir. Ayrıca bu radikallerin imidazol halkasının C8-N7 bağının açılması da söz konusu olabilmektedir. C8-OH eklenti pürin radikallerinden bir elektron oksidasyonu sonucu 8-hidroksiadenin (8-OH-Ade) ve 8-hidroksiguanin (8-OH-Gua) oluşumu gerçekleşir. Diğer taraftan, imidazol halkasının açılması ve bir elektron indirgenmesi sonucu 4,6-diamino-5-formamidopirimidin (FapyAde) ve 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin (FapyGua) bileşikleri oluşur (Şekil 18.). Farklı verimlerde olsa da her iki tip ürünün oluşumu oksijen varlığında ve yokluğunda gerçekleşebilir. Aynı zamanda iyonize radyasyonun etkisi ile pürinlerin iyonizasyonu sonucu bir radikal katyon oluşabilir ve bu radikal katyonun hidrasyonu ile C8-OH-eklenti radikali oluşabilir (Şekil 19.) (114).

Son dönemlerde kolay ölçümü ve güçlü mutajenik etkisi nedeniyle dikkati en çok çeken bileşik 8-OH-Gua'dır. Ancak bu durum diğer eşit derecede önemli DNA lezyonlarının biyolojik etkilerinin ve yapılarının yetersiz derecede araştırılmasına neden olmaktadır.



Şekil 18. Guanin C8-OH-eklenti radikalinin reaksiyonları (114)

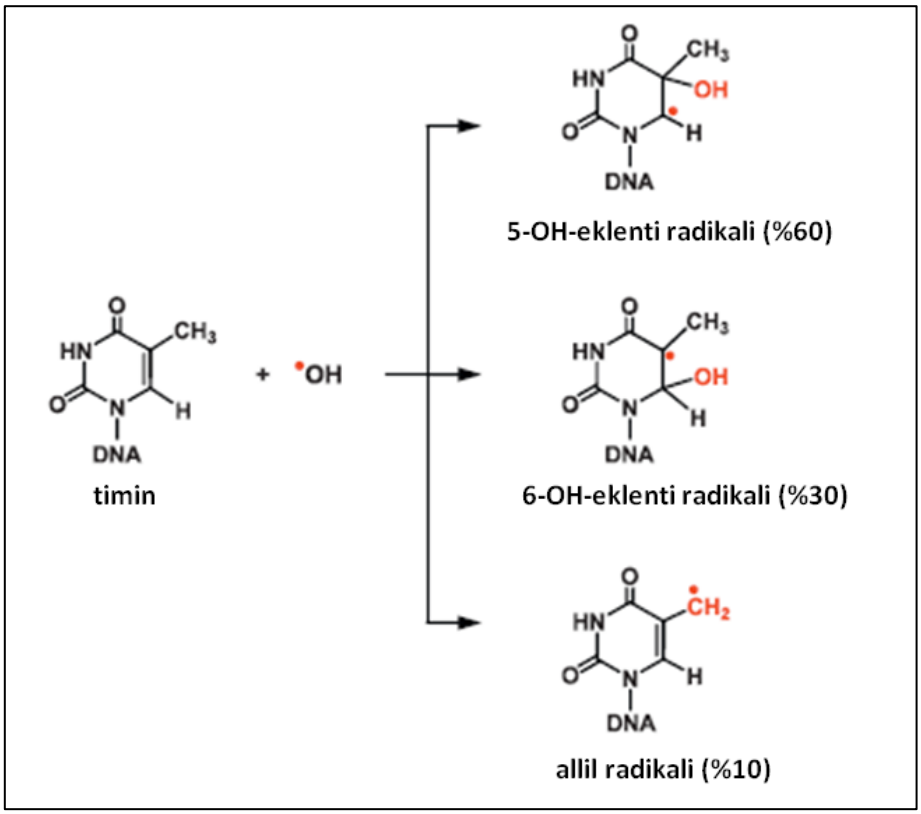


Şekil 19. Guanin bazı üzerinde iyonize radyasyonun direk ve indirek etkisi (114)

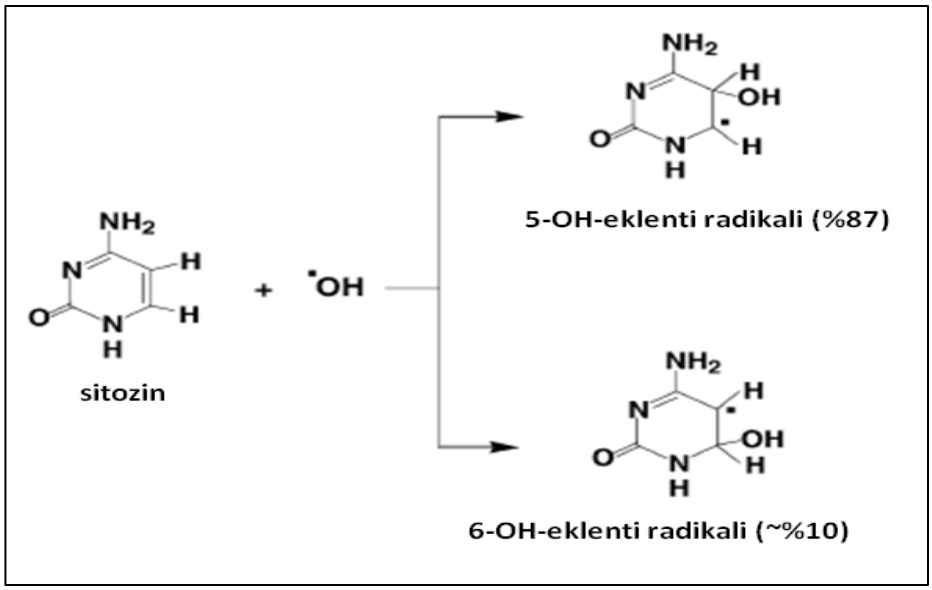
Pirimidin Hasarı

Hidroksil radikalinin C5=C6 çift bağına eklenmesi sonucu sitozin ve timinin C5-OH- ve C6-OH- eklenti radikalleri oluşur. H'nin uzaklaşması ile ise timinin allil radikali oluşur (Şekil 20, 21.). Sitozinde eklenme 5.Karbon (C5)'da %87, 6.Karbon (C6)'da % 10 oranında

gerçekleşir. Timinde ise bu oran sırasıyla % 60 ve % 30 şeklindedir. ˙OH'ın yaklaşık olarak %10'u metil grubundan H atomunu uzaklaştırır (114).



Şekil 20. •OH radikalinin timinle reaksiyonları (114)



Şekil 21. •OH radikalinin sitozinle reaksiyonları (114)

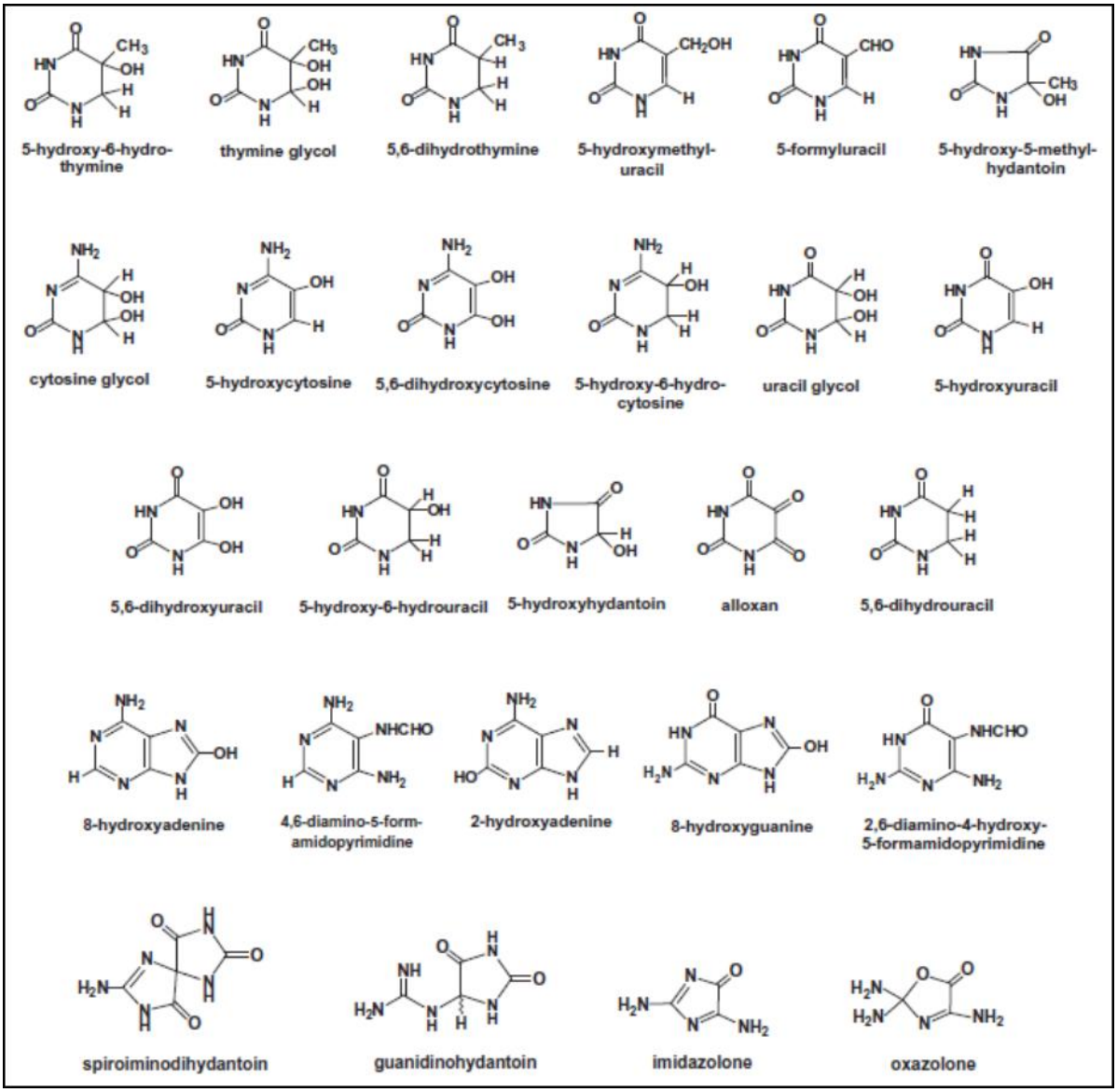
Pirimidinlerin OH-eklenti ve allil radikalleri redoks özelliklerine, redoks ortamına ve reaksiyon eşlerine göre yükseltgenerek veya indirgenerek çeşitli ürünler verirler (120, 121, 122) Oksijen ve diğer oksidanlar, indirgeyici ajanlar ve diğer deneysel koşullar ürünlerin tipini ve verimini son derece etkilemektedir (121,122). Sitozin ve timinin C5-OH-eklenti radikallerinin oksidasyonu sonucu oluşan sitozin glikol (Cyt gly) ve timin glikol (Thy gly) oluşumunu oksijen yokluğunda OH^- eklenmesi veya protonun uzaklaştırılmasının izlediği su eklenmesi takip eder (119, 120, 122, 123). Timinin allil radikalinin oksidasyonu sonucu ise 5-hidroksimetilurasil (5-OH-MeUra) oluşur.

Moleküler oksijenin varlığında, oksijen C5-OH-eklenti radikaline difüzyon kontrollü hızlarda bağlanır ve C5-OH-6-peroksil radikalini oluşturur. Bu radikal daha sonra süperoksit anyon radikalini ($O2^{\cdot -}$) yok eder ve su ile reaksiyona girerek sitozin glikol ve timin glikol ürünlerini oluşturur (119,124). Oksijenin allil radikaline eklenmesi benzer mekanizma ile 5-OHMeUra ve 5-formilurasil (5-FoUra) oluşumuna yol açar.

Ayrıca pirimidin peroksil radikalleri önce indirgenip daha sonra protonlanarak hidroksihidroperoksitleri oluştururlar (124). Bu bileşiklerin dekompozisyonu sonucu 5,6-dihidroksisitozin, dialürik asit, alloksan, 5-hidroksi-5-metilhidantoin (5-OH-5-Mehyd) ve 5-hidroksihidantoin ürünleri oluşur (114).

Sitozin ürünleri deaminasyona ve dehidrasyona uğrayabilirler. Sitozin glikolün deaminasyonu ve dehidrasyonu sonucu urasil glikol (Ura gly), 5-hidroksi-sitozin (5-OH-Cyt), 5-hidroksi urasil (5-OH-Ura), 5-hidroksi-6-hidrourasil ve 5,6-dihidroksiurasil (izodialürik asit) ortaya çıkar (114).

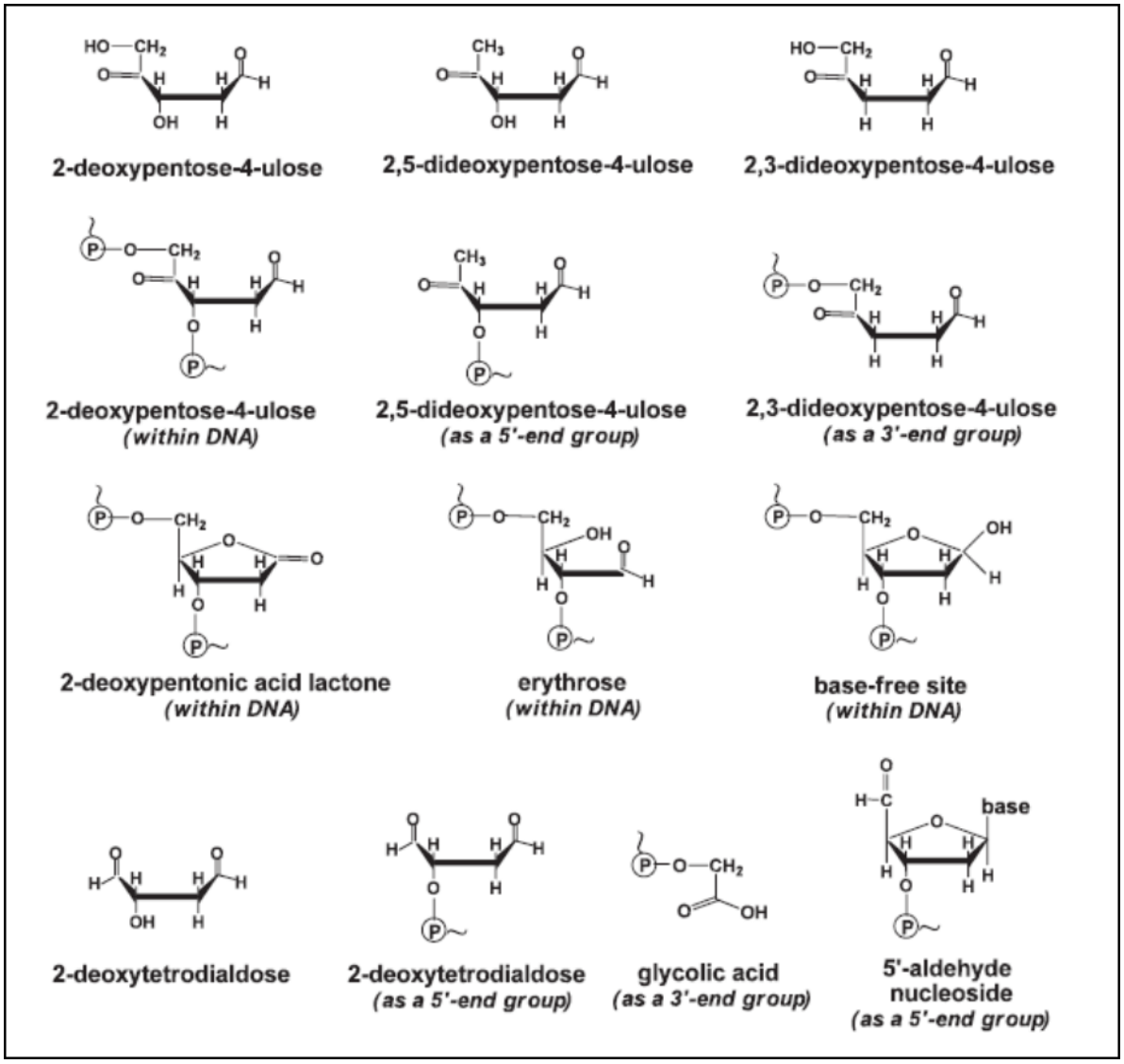
Şekil 22.'de DNA'da tanımlanan bazı ürünlerin yapıları gösterilmektedir.



Şekil 22. Oksidatif hasara uğramış DNA bazları (114)

2.3.4.4.2. Şeker Hasarı

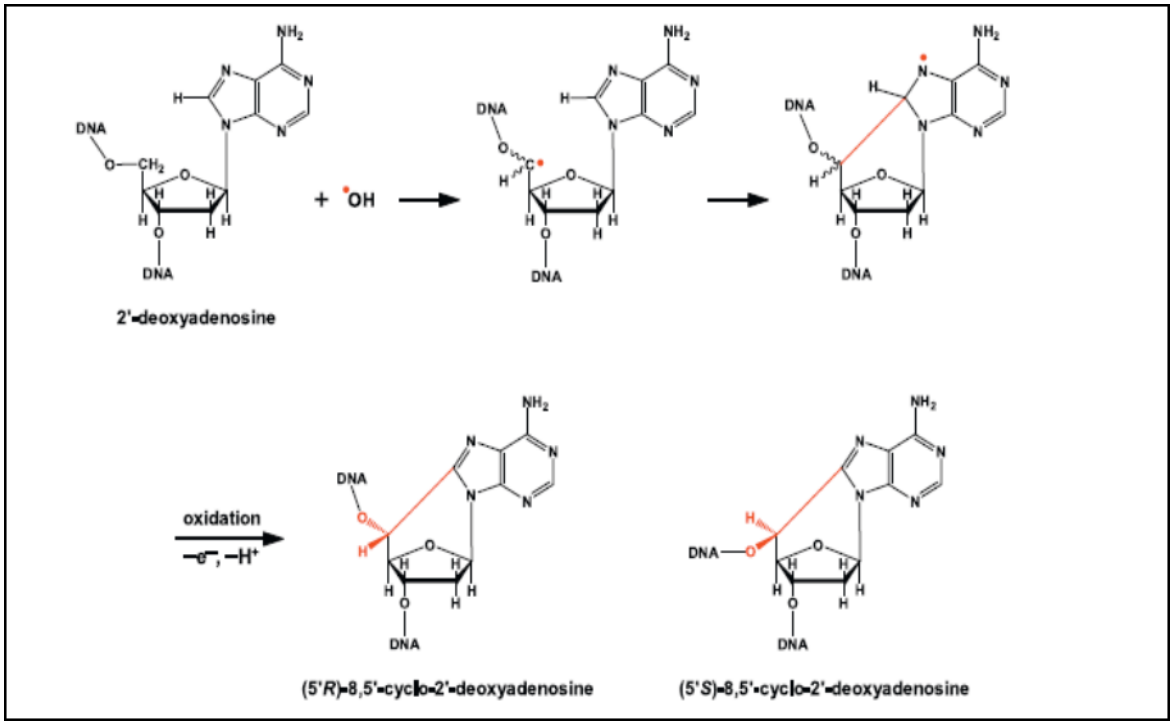
Hidroksil radikali DNA'daki şeker artıklarının her bir karbon atomundan bir H atomunu uzaklaştırarak C-merkezli radikaller oluşturur. Bu radikaller daha ileri reaksiyonlar ile çeşitli şeker modifikasyonlarına yol açarlar (114) (Şekil 23.).



Şekil 23. Oksidatif hasara uğramış şeker ürünleri (114)

2.3.4.4.3. 8-5'-siklopürin-2'-deoksinüklozidler

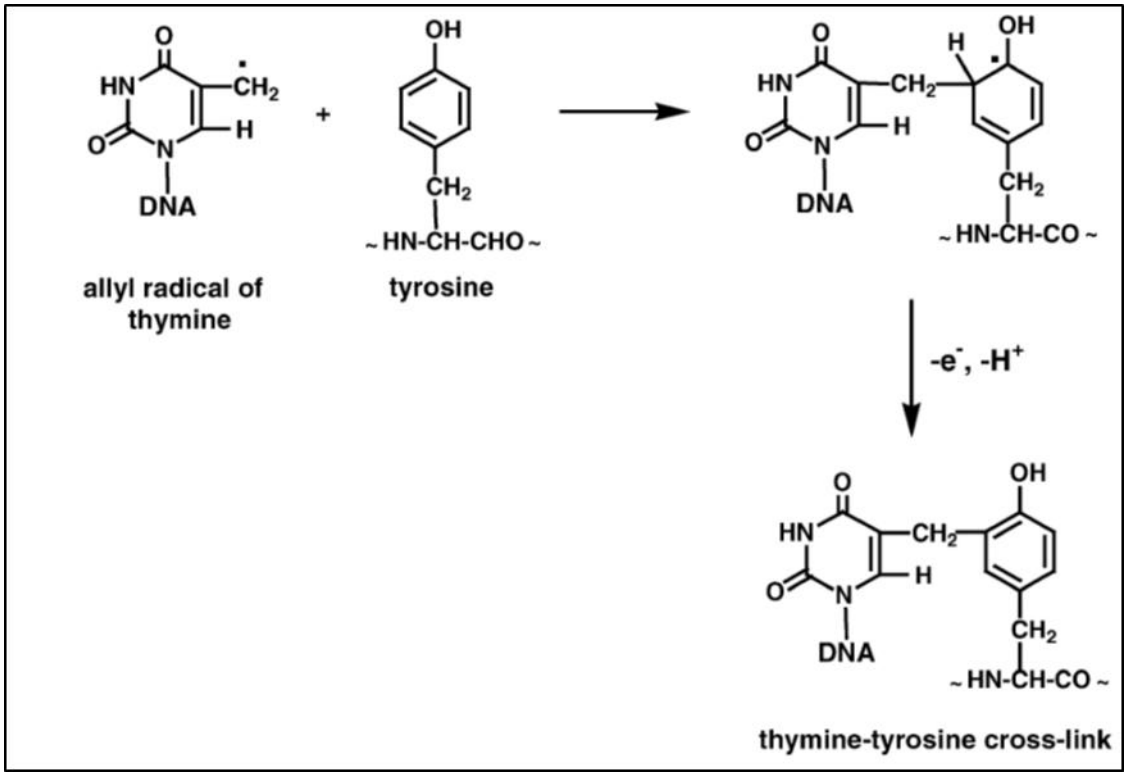
Bu lezyonlar, C5'-merkezli şeker radikalinin aynı pürin nükleozidindeki C8 pozisyonuna eklenmesi ile oluşurlar. Bu molekül içi halkalanmayı oksidasyon takip eder ve 8,5'-siklo-2'-deoksiguanozin (cdG) ve 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozin (cdA) ardışık lezyonları oluşur (Şekil 24.). Bu lezyonların oluşumu DNA'da hem baz hem de şeker artıklarının hasarına neden olur. Oksijenin varlığında üretilmezler çünkü oksijenin C5'-merkezli radikal ile yaptığı difüzyon kontrollü reaksiyon önceliklidir (114).



Şekil 24. 8-5'-siklopürin-2'-deoksinüklozidlerin oluşum mekanizması (114)

2.3.4.4.4. DNA-protein çapraz bağlanmaları

Hücrelerin iyonize radyasyon gibi serbest radikal üreten sistemlere maruz kalmaları sonucu kovalent DNA-protein çapraz bağlanmaları oluşur. Reaksiyon ya DNA baz radikalinin proteinin aromatik aminoasidine eklenmesi ile ya da DNA baz radikali ile bir amino asit radikalinin kombinasyonu sonucu oluşur (114) (Şekil 25.).



Şekil 25. Kromatinde timin-tirozin çapraz bağının oluşumu (114)

2.3.4.4.5. Abazik bölgeler

Modifiye şekerlere ek olarak, DNA içinde bulunan şeker parçasına bağlanan modifiye bazların zayıflamış glikozidik bağlardan koparak uzaklaşması ve o bölgede boşluk oluşturmasıdır (125).

2.3.4.4.6. Tek ve çift zincir kırıkları

Zincir kırıkları, DNA onarımı sırasında nükleaz aktivitesi ile de oluşabileceğinden her zaman oksidatif DNA hasarını göstermez. Tek zincir kırıklarında, diğer zincirdaki bilgi doğru okunarak hasarlı zincir onarıcı enzimlerle onarılabildiğinden çift zincir kırıklarındaki hasar daha önemlidir (126).

2.4. DNA ONARIMI

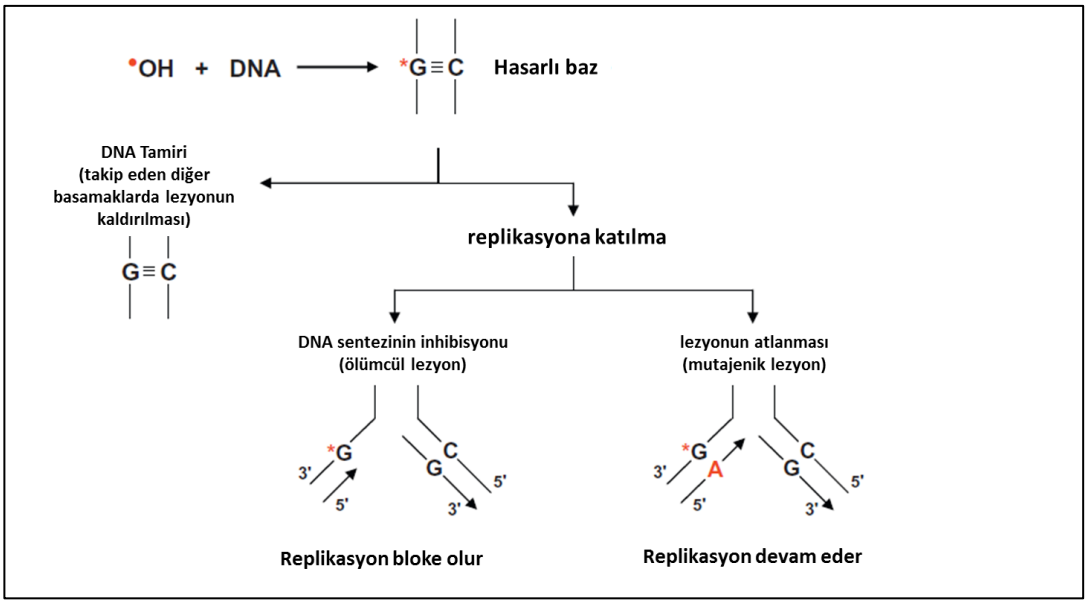
Okside olmuş bazların düzeyi, sadece oksidatif DNA hasarının arttığı durumlarda değil aynı zamanda onarım oranındaki farklılıklara göre de değişiklikler gösterir. Bu bakımdan DNA onarım enzimlerindeki bir defektten dolayı kusurlu onarımın, DNA hasarına katkısı ihmal edilmemelidir (10).

Normal hücreler, ROT üretimine karşı enzimatik ve enzimatik olmayan savunma mekanizmalarına sahiptir. Ancak bu hücrelerde 'oksidatif stres' durumunda hücresel hasar düzeyi artmaktadır (127). Bu lezyonlar farklı fakat pek çok durumda birbiri ile örtüşen tamir mekanizmaları ile uzaklaştırılmaktadır. Canlı hücrelerde oksidatif DNA lezyonları, tamir mekanizmalarında iş gören enzimlerdeki hasarlar veya bu enzimlerin aktivitelerindeki azalmalar onarılmadığı takdirde genomik kararsızlığı artıran mutasyonlara neden olmaktadır (128). Dolayısıyla tamir mekanizmaları oksidatif hasara bağlı pek çok hastalıkla yakından ilişkilidir.

Hücreler genomlarının bütünlüğünü korumak için hasarlı DNA'yı onaran mekanizmalar geliştirmişlerdir. DNA onarım mekanizmaları şu başlıklar altında toplanabilir (129).

- Doğrudan onarım
- Baz kesip çıkarma onarımı
- Nükleotid kesip çıkarma onarımı
- Yanlış eş (mismatch) onarımı
- DNA çift zincir kırığı onarımı
- Zincirler arası çapraz bağların onarımı

Hasarlı bir DNA lezyonu çeşitli onarım mekanizmaları ile ortadan kaldırılabilir ve DNA yapısının orjinal hali bu şekilde korunabilir. Onarılmayan DNA lezyonları mutagenez, sitotoksisite, hücre ölümü ve kansere neden olabilmektedir. Eğer, DNA lezyonu replikasyondan önce onarılmazsa, bu lezyon replikasyona katılabilir. Sonuç olarak DNA sentezi bloke olabilir ya da DNA polimeraz enzimlerince tolere edilebilir ve bu durum yanlış eşleşmelere neden olabilir (Şekil 26.) (114).



Şekil 26. Guanin lezyonunun tamiri ve replikasyona katılması (114)

Oksidatif hasar sonucu oluşan modifiye bazlar baz kesip çıkarma onarımı ile düzeltilirler (125).

2.4.1. Baz Kesme-Çıkarma Onarımı (Base Excision Repair-BER)

Baz kesme-çıkarma onarımı dört temel basamakta gerçekleşir (Şekil 28.);

- hasarlı bazın uzaklaştırılması
- apürinik/apirimidinik bölgenin oluşturulması
- doğru bazın yerleştirilmesi
- ligasyon

Bu tamir mekanizmasının ilk basamağı, hasarlı bölgenin DNA glikozilaz enzimi tarafından tanınma aşamasıdır. Her hücre, belirli DNA kusurlarını tanıyan DNA glikozilaz enzimlerini içerir. *Escherichia coli*'de **formamidopirimidin glikozilaz (Fpg veya MutM)**, **endonükleaz III (Nth)** ve **endonükleaz VIII (Nei)** adında üç ayrı DNA glikozilaz, MutM, Nth ve Nei genlerinden kodlanmaktadırlar. İnsanda ise bu üç genle homolog olan DNA tamir genlerinin ekspresyonu ile oluşan sırasıyla **8-hidroksiguanin-DNA glikozilaz (OGG1)**, **Endonükleaz III benzeri protein (NTH1)** ve **Endonükleaz VIII benzeri protein (NEIL1, NEIL2 ve NEIL3)** olarak adlandırılan substrat spesifik glikozilazlar bulunmaktadır (114). Endonükleaz VIII benzeri proteinlerinden NEIL1 ve NEIL2'nin biyokimyasal olarak

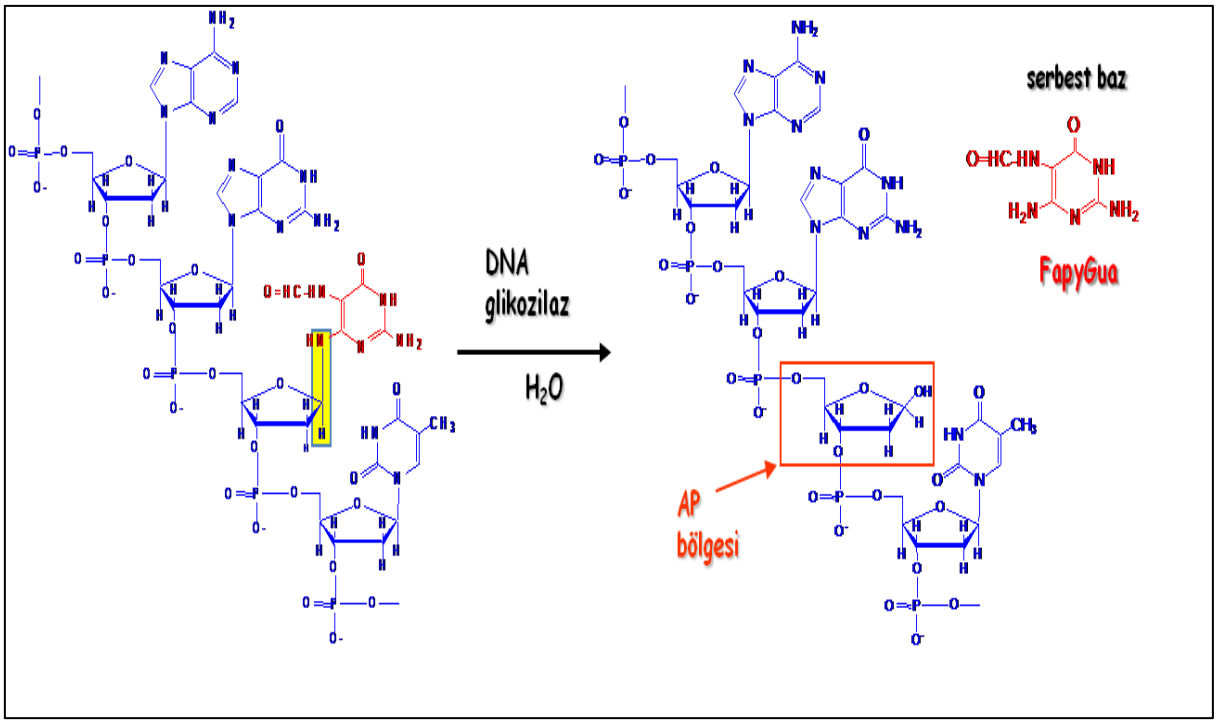
saflaştırıldığı ve karakterize edildiği bilinmektedir. NEIL3 ise diğer NEIL homologlarından anlaşılması en zor olanıdır. Halen bu enzim üzerinde araştırmalar devam etmektedir. NEIL1 enzimi birçok replikasyon proteini ile ilişkilidr ve replikasyon sırasında potansiyel mutajenik lezyonların eliminasyonundan sorumludur. Buna zıt olarak NEIL2 transkripsiyon bağımlı onarımda rol alır. NEIL2 tek zincirli DNA'daki ve transkripsiyon baloncuğundaki lezyonları hedef alır, RNA polimeraz II dahil birçok transkripsiyon faktörü ile ilişkilidir. NEIL3'ün ise tek zincirli DNA'daki lezyonlar için spresifik olduğu bilinmektedir (130).

OGG1 proteininin ise α-OGG1 ve β-OGG1 olarak isimlendirilen 2 farklı izoformu bulunmaktadır. α-OGG1 izoformu nukleusta, β-OGG1 ise mitokondride lokalizedir (140).

E.*coli* ve insan DNA glikozilazlarının substratları Tablo 2.'de gösterilmektedir.

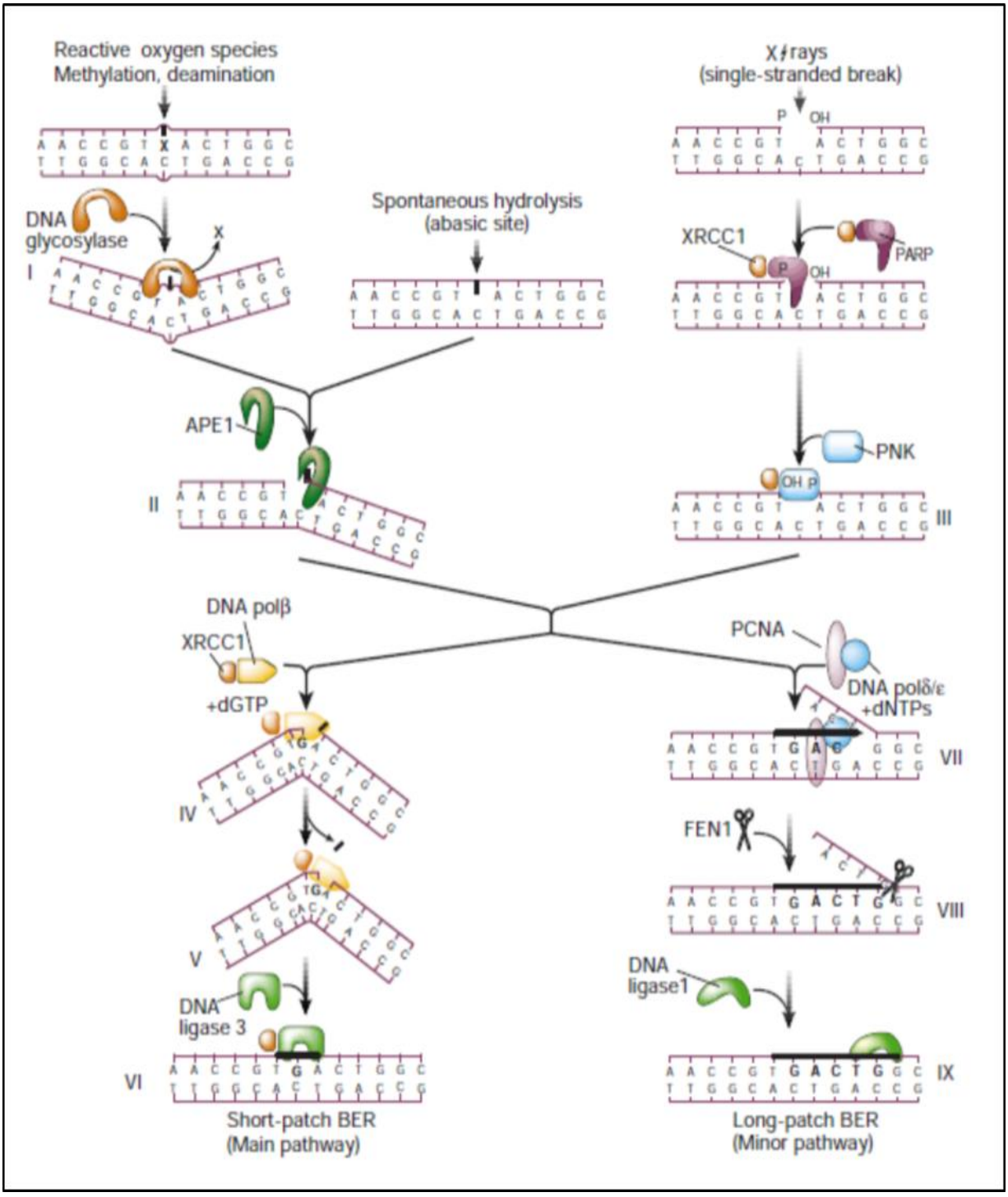
Tablo 2. E.*coli* ve insan DNA glikozilazlarının substratları (114)

E.*coli* DNA glikozilazları	**Substratları**	**İnsan DNA glikozilazları**	**Substratları**
Fpg	FapyAde, FapyGua, 8-OHGua	**OGG1**	FapyGua, 8-OHGua
Nth	Pirimidin lezyonları, FapyAde	**NTH1**	Pirimidin lezyonları (5-OH-Ura, Thygly, 5,6-diOH-Cyt, 5-OH-6-Hyd-Thy, 5-OHCyt)
Nei	Pirimidin lezyonları, FapyAde	**NEIL1**	FapyAde, FapyGua, pirimidin lezyonları (5-OH-5-MeHyd, Thygly)
		NEIL2	5-OH-Ura, 5-OHCyt, 5,6 diOH-Ura
		NEIL3	FapyAde, FapyGua, 5-OH-5-MeHyd, Thygly, 5-OH-Ura, 5-OHCyt,



Şekil 27. DNA glikozilazların işleyiş mekanizması

DNA glikozilaz enzimi hasarlı bölgeyi tanımak için DNA' nın küçük oyuğuna yerleşir ve hasar gören baz ile nükleotidin şeker birimi arasında bulunan N-β glikozidik bağını kırarak bazın polinükleotitden ayrılmasını gerçekleştirir (Şekil 27.). Sadece glikozilaz aktivitesi gösteren tek fonksiyonlu glikozilazlar, DNA ürününe bağlı kalarak abazik bölgeyi olası zincir kırılmalarına karşı korurlar. OGG1, NEIL1 gibi iki fonksiyonlu glikozilazlar ise modifiye bazı uzaklaştırdıktan sonra AP liyaz aktivitesi gösterirler. Bu şekilde β- veya β,δ-eliminasyon reaksiyonları yoluyla DNA iskeletini 3'ucundan kırarak DNA'da tek zincir kırılmasına yol açarlar. Bu kırık, polimerizasyon ve ligasyon öncesinde temizlenmesi ve normal bir 3'hidroksil grubuna dönüştürülmesi gereken bir 3'-α,β-doymamış aldehid veya 3'-fosfat bulundurmaktadır. DNA glikozilazın hasarlı bazı ayırmasından sonra oluşan bazsız bölge apürinik/apirimidinik bölge (AP bölgesi) olarak adlandırılır. Memelilerde bu aşamadan sonra BER yolağında **apürinik endonükleaz 1 (APE1)** devreye girerek derhal abazik bölgeyi 5' ucundan kırar ve özellikle 3'-α,β-doymamış aldehid olmak üzere engelleyici 3' ucunu uzaklaştırır (131-135).



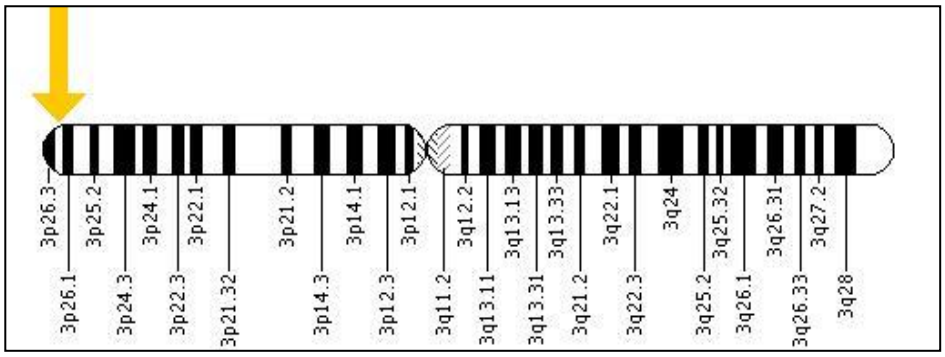
Şekil 28. Baz kesme-çıkarma onarım yolağının şematik diyagramı (136)

XRCC1 enzimi (X-ray cross complementing enzyme) ise hasarlı bölgede DNA glikozilaz enziminin APE1 ile yer değiştirmesini sağlar ve hasarlı bazın çıkarılmasını hızlandırır. AP bölgesindeki fosfodiester bağlarının APE1 tarafından yıkılmasının ardından poli ADP-riboz polimeraz-1 (PARP-1) enzimi kırık DNA uçlarına bağlanarak bu uçları

yıkımdan korumaktadır. PARP-1 kendisini ADP-ribozilasyonla aktifleştirmektedir. PARP-1 aktive olduktan sonra BER mekanizmasında fonksiyon gören enzimlerin aktivasyonunu sağlamaktadır. PARP-1 tarafından aktive edilen XRCC1 enzimi, APE1 enziminin polimeraz β ile bağlantısını sağlayarak polimerizasyon ve bağlama basamağının aktivite kazanmasını sağlamaktadır. Bu aşama sonrasında tamir, kısa ve uzun olmak üzere iki alternatif yolaktan devam eder. Memelilerde, kısa yolakta sadece bir hatalı nükleotid, uzun yolakta ise 2-12 nükleotidden oluşan fragmentler kesilip çıkartılır. AP bölgesinin bağlanması kısa yolakta DNA polimeraz β tarafından gerçekleştirilir. BER' in en son basamağında ise oluşan boşluk DNA polimeraz β ile doldurulur ve DNA ligaz ile fosfodiester bağının oluşumu katalizlenir. Kısa BER yolağında Ligaz 3, uzun BER yolağında ise Ligaz 1 adı verilen DNA ligaz enzimleri görev almaktadır (137-139) (Şekil 28.).

2.4.1.1. OGG1 Geni

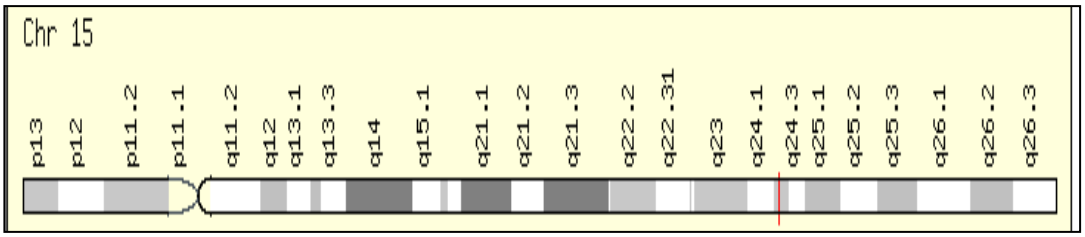
OGG1 geni kromozom 3p26.2 bölgesinde lokalizedir (Şekil 29.). 424 aminoasit uzunluğunda, 47 kDa ağırlığında olan β-OGG1 ve 345 aminoasit uzunluğunda, 39 kDa ağırlığında olan α-OGG1 DNA glikozilazları kodlamaktadır (140,141). Yapılan çalışmalar OGG1 gen ürününün ekspresyonunun en fazla beyinde olduğunu belirtmektedir (142). Literatürde bugüne kadar OGG1 geni ile ilişkili farklı polimorfizimler tanımlanmış olup bunlardan kodon 326'da bulunan Ser326Cys polimorfizminin fonksiyonel enzimin aktivitesinde değişikliğe neden oldugu bildirilmiştir. Ser/Cys veya Cys/Cys OGG1 genotiplerinin DNA tamir kapasiteleri Ser/Ser OGG1 genotipine göre daha düşüktür (143).



Şekil 29. OGG1 geninin 3. kromozomdaki lokalizasyonu

2.4.1.2. NEIL1 Geni

Kromozom 15q22-q24'de lokalize olan insan NEIL1 genomik DNA'sı ~7.5 kb uzunluğundadır (Şekil 30.). 9 ekzon ve 10 intron bölgesi olan NEIL1 genin kodladığı NEIL1'in moleküler ağırlığı 43.7 kD. ve toplam 390 amino asitden oluşmaktadır (144).



Şekil 30. NEIL1 geninin 15. kromozomdaki lokalizasyonu

Hemen hemen her dokuda bulunan NEIL1 ekspresyonu dokudan dokuya değişiklik göstermektedir. İnsanda en çok timus, pankreas, karaciğer, böbrek, kas, bağırsak ve beyin gibi dokularda tanımlanmaktadır (145).

2.5. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR

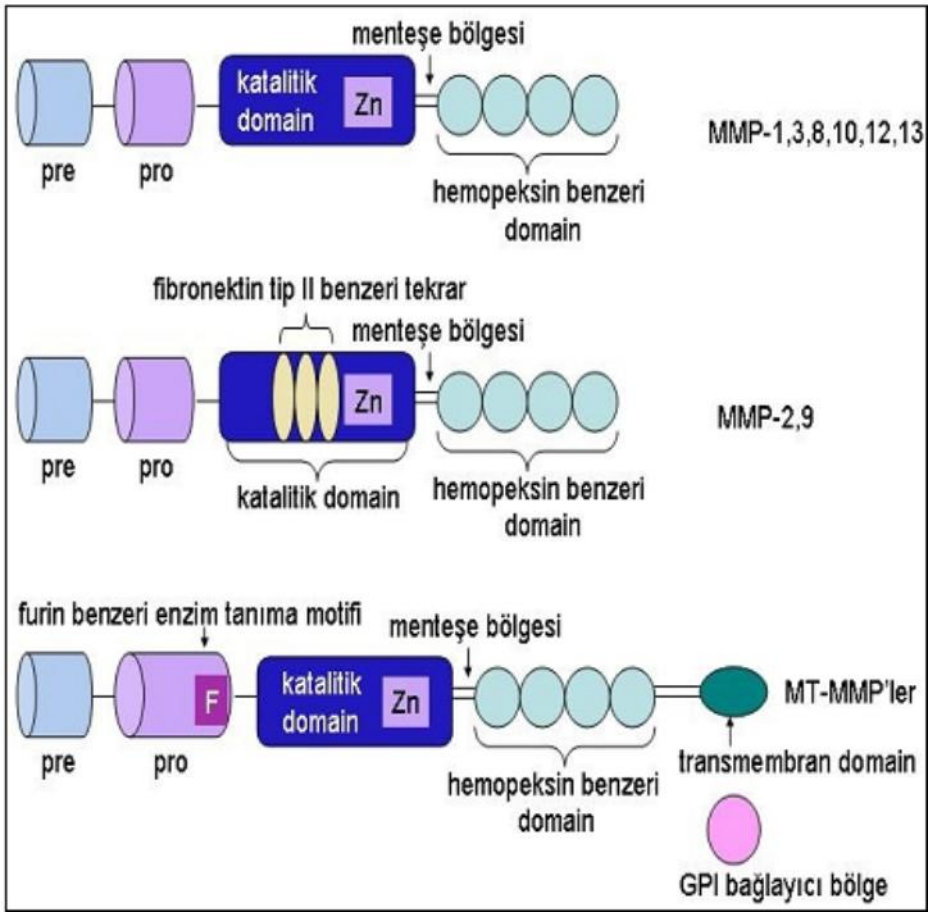
Hücre ve matriks etkileşmeleri ekstraselluler matriks (ESM) bileşenlerinin hidrolizinden sorumlu olan proteolitik enzimler tarafından düzenlenir. Bu enzimler ESM yapısının bileşimini ve bütünlüğünü düzenleyerek matriks molekülleri tarafından oluşturulan sinyallerin kontrolü, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve ölümünde de temel rol oynar (146,147). Bu enzim sistemlerinin içinde matriks metalloproteinazlar (MMP) önemli bir grubu oluşturmaktadır. Türlerine göre endotel hücreleri, fibroblast, trombositler, T lenfositler, kondrositler, epitel hücreleri, nötrofiller gibi oldukça çeşitli hücrelerden eksprese edilirler (148). Organizmada fizyolojik olayların sürdürülmesinde MMP aktivitesi ile onların spesifik endojen doku inhibitörleri (TIMP) arasında sürekli bir denge söz konusudur. MMP'ler ve TIMP'ler normal dokularda düşük düzeyde eksprese edilirler ve birçok biyolojik süreçte rol oynarlar. Bunlar arasında kemiğin yeniden yapılanması, yara iyileşmesi, embriyogenezis, anjiogenez, inflamasyon, apoptozis, immun cevap gelişimi sayılabilir.

MMP'lar bazı ortak yapısal özelliklere sahiptirler. MMP'lar predomain, prodomain, katalitik domain, menteşe bölgesi, hemopeksin/vitronektin benzeri domain bölümlerini içerirler (149,150) (Şekil 31.).

MMP'ler substrat özgüllüklerine göre 6 sınıfta toplanmaktadırlar (151). Tablo 3.'de bu sınıflandırma gösterilmektedir.

Tablo 3. MMP'lerin sınıflandırılması

ENZİM	MMP
Kollejenazlar	
- İnterstisyel kollajenaz (kollejenaz I)	- MMP-1
- Nötrofil kollajenaz (kollajenaz 2)	- MMP-18
- Kolejenaz 3	- MMP13
Jelatinazlar	
- Jelatinaz A	- MMP-2
- Jelatinaz B	- MMP-9
Stromelizinler	
- Stromelizin 1	- MMP-3
- Stromelizin 2	- MMP-10
- Stromelizin 3	- MMP-11
Matrilizinler	
- Matrilizin 1	- MMP-7
- Matrilizin 2	- MMP-26
Membran tipi MMP'ler	
(A) Transmembran tip	
- MT1-MMP	- MMP14
- MT2-MMP	- MMP15
- MT3-MMP	- MMP16
- MT5-MMP	- MMP24
(B) GPI anchored	
- MT4-MMP	- MMP17
- MT6-MMP	
	- MMP25
Diğerleri	
- Makrofaj metalloelastaz	- MMP-12
- -	- MMP-19
- Enamelizin	- MMP-20
- XMMP	- MMP-21
- -	- MMP-23
- CMMP	- MMP-27
- Epilizin	- MMP-28



Şekil 31. MMP enzimlerinin moleküler yapısı (149)

2.5.1. Jelatinazlar (MMP-2, MMP-9)

Jelatinaz enzimleri, diğer MMP'lardan farklı olarak katalitik bölgede 3 tane fibronektin tip II benzeri ilave bir domain bulundururlar. Bu kısım jelatin ve kollajene yüksek afinite ile bağlanmayı sağlayarak proteolitik aktiviteyi arttırır, ayrıca elastolitik aktivite için de temeldir. Jelatinazlar, Tip IV, V, VII, X, XI ve XIV kollajen, jelatin, elastin, proteoglikan kor proteinleri, myelin temel protein, fibronektin, fibrillin-1 gibi proteinleri yıkma özelliğine sahiptirler (152,153). Diğer MMP'ler gibi inaktif proformlar olarak salınırlar ve ekstrasellüler olarak aktive edilirler. Alfa-2 makroglobulin ve TIMP'lar tarafından inhibe ederler.

2.5.1.1. Matriks Metalloproteinaz 2 (Jelatinaz A)

Jelatinaz A olarak da isimlendirilir. Latent formu 72 kDa, aktif formu 66 kDa ağırlığındadır (154). Keratinositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, kondrositler, osteoblastlar, monositler gibi birçok hücre ve transforme olmuş değişik hücrelerden salınırlar. MMP-2

solusyonlarda MMP-1 ve diğer kollajenazlara göre daha zayıf kollajenolitik aktivite gösterir. Çünkü proMMP-2 hücre yüzeyine yerleşmiştir ve membran tipi MT-MMP'lar tarafından aktive edilir. ProMMP-2 perisellüler alanda birikebilir ve lokal kollajenolitik aktiviteye neden olabilir. MMP-2, TIMP-2, -3, -4 ve α 2 makroglobulin tarafından inhibe edilir (155).

2.5.1.2. Matriks Metalloproteinaz 9 (Jelatinaz B)

Jelatinaz B olarak da adlandırılır. Latent formu 92 kDa, aktif formu 84 kDa ağırlığındadır (156). MMP-9, akciğer dokusunda infeksiyon veya inflamatuar hastalıklar sırasında uyarılan bronş epitel hücreleri, *clara* hücreleri, alveolar tip II hücreleri, fibroblast, düz kas hücreleri ve endotel hücrelerinden üretilir. Lökosit, lenfosit, eosinofil, makrofaj, NK hücreleri, dentritik hücreler ve mast hücreleri tarafından da üretilir. MMP-9, TIMP-1,-3,-4 ve α2 makroglobulin tarafından inhibe edilir (157).

2.5.2. Matriks Metalloproteinazların Spesifik Doku İnhibitörleri

MMP aktivitesinin kontrolünde spesifik doku inhibitörleri (TIMP) anahtar rol oynar. Bunun yanı sıra α2 makroglobulin, heparin, tetrasiklinler, C reaktif protein ve sentetik inhibitörler aktif MMP inhibisyonu yaparlar (158). TIMP'ler bağ dokusu metabolizmasının düzenlenmesinde temel proteinlerdir (148). Endotel hücresi, vasküler kas hücresi, makrofajlar, kan hücreleri ve bağ dokusu hücrelerinden salınırlar. Günümüzde TIMP-1,-2,-3,-4 olmak üzere tanımlanmış 4 TIMP türü vardır (148). TIMP'lar, MMP enzim aktivitesini ve MMP/TIMP dengesini kontrol altında tutarlar.

2.5.2.1. Metalloproteinaz doku inhibitörü-1

Metalloproteinaz doku inhibitörü-1 (TIMP1)'in aktif formu 28 kDa ağırlığında bir siyaloproteindir (160). Özellikle makrofajlar olmak üzere birçok hücrede üretilir ve salgılanır, trombositlerde rezidü olarak bulunur (159). TIMP-1, proMMP-9'a bağlanarak proMMP-9/TIMP-1 kompleksini oluşturur. Bu kompleks bütün aktif MMP'ları inhibe eder ve daha aktif stabil form olan proMMP-9/TIMP-1/MMP kompleksini oluşturur. MMP'lar üzerine inhibitör etkileriyle tümör büyümesini, invazyon ve metastazını inhibe ederler (161).

2.5.2.2. Metalloproteinaz doku inhibitörü-2

Metalloproteinaz doku inhibitörü-2 (TIMP-2) 21 kDa ağırlığında glikolize olmamış bir proteindir (162). Spesifik olarak MMP-2'yi inhibe eder. Alveoler epitelyum hücreleri ve özellikle tip II pnömositlerden, hava yolu düz kas hücrelerinden salınır (163). Fibroblastlarda proMMP-2 ile birlikte sekrete edilir.

MMP'lerin nöronal hücre ölümüne neden olduğu ve akut ve kronik nörodejeneratif bozukluklar, AH ve multiple sklerozun patofizyolojisinde rol oynadığı düşünülmektedir Ancak fonsiyonlarının koruyucu mu yoksa yıkıcı yönde mi olduğu henüz net değildir (164, 167). MMP'lerin ekspresyonu büyüme faktörleri, sitokinler ve serbest radikaller tarafından düzenlenmektedir (165). AH ve Parkinson hastalarında bazı MMP'lerin ve inhibitörlerinin postmortem beyin dokusunda artış gösterdiği bildirilmiştir (166).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma, olgu-kontrol tipinde, deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu çalışma, Eylül 2009-Ağustos 2012 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ve Nöroloji Anabilim Dalı tarafından ortaklaşa yürütüldü. Çalışma kapsamında yapılan ELISA deneyleri ile lökositlerden DNA izolasyonları ve mRNA izolasyonları Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratvuarı'nda, yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) ve gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile yapılan çalışmalar Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı'nda (ARLAB) ve kütle spektrometri çalışmaları National Institute of Standards and Technology (NIST) kurumunun Biomolecular Measurement Bölümü'nün DNA Ölçümleri Grubu Laboratuvarı'nda (Maryland, U.S.A) gerçekleştirildi.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Çalışmanın örneklem grubunu, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Nöroloji Anabilim Dalı Demans Polikliniği'nde izlenmekte olan NINCDS-ADRDA kriterlerine göre muhtemel Alzheimer tanısı almış 44 Alzheimer hastası; kontrol grubunu ise, yaş, eğitim ve cinsiyet eşleştirmesi yapılan, herhangi bir demansiyel yakınması ve bulgusu olmayan hasta yakınlarından ve Narlıdere Huzurevi Yaşlı Bakım ve Rehabilitasyon Merkezi sakinlerinden 45 sağlıklı gönüllü birey oluşturdu.

Her olguyla yüz yüze görüşme yapıldı ve depresyon, madde kullanımı, herhangi başka psikiyatrik hastalık, şiddetli kafa travması öyküsü olan olgular çalışmaya dahil edilmedi. Tüm olgular bilişsel ve sistemik bakıdan geçirildi. AH olgularına beyin görüntüleme (BT veya MRG) ve rutin laboratuvar inceleme (Kan şekeri, elektrolitler, böbrek ve karaciğer fonksiyon testleri, tam kan sayımı, tiroid hormon testleri ve B12 vitamin düzeyi, eritrosit sedimentasyon hızı) testleri uygulandı.

Olgu ve kontrol gruplarına tanıya yönelik olarak, Minimental Durum Değerlendirme Testi (MMDT) uygulandı. Çalışmaya dahil edilme ve dışlama kriterleri Tablo 4.'de gösterilmektedir.

Tablo 4. Çalışmaya dahil etme ve dışlama kriterleri

	Çalışmaya dahil edilme kriterleri	**Çalışmadan dışlama kriterleri**
Olgu Grubu	Çalışmaya katılmayı kabul etme	Çalışmaya katılmayı kabul etmeme
	Demans tanısının DSM-IVR kriterlerine göre klinik olarak konulması	Olguların 45 yaş altı-90 yaş üzeri olması
	NINCDS-ADRDA tanı kriterlerine göre "muhtemel AH" tanısı almış kişiler	Başka nöropsikiyatrik hastalık öyküsünün, travma ya da bağımlılık öyküsünün olması
		Son 5 yıldır sigara alışkanlığı, aşırı alkol kullanımı, majör organ yetmezliği öyküsü, kontrolsüz diyabet, kronik obstrüktif akciğer hastalığının varlığı, demir-antioksidan suplemant alım öyküsü, romatizmal bir hastalığın ve/veya aneminin olması
Kontrol Grubu	Çalışmaya katılmayı kabul etme	Çalışmaya katılmayı kabul etmeme
	Herhangi bir demansiyel yakınması ve bulgusu olmayan kişiler	Kişilerin 45 yaş altı-90 yaş üzeri olması
		Herhangi bir nöropsikiyatrik hastalık öyküsünün, travma ya da bağımlılık öyküsünün olması
		Son 5 yıldır sigara alışkanlığı, aşırı alkol kullanımı, majör organ yetmezliği öyküsü, kontrolsüz diyabet, kronik obstrüktif akciğer hastalığının varlığı, demir-antioksidan suplemant alım öyküsü, romatizmal bir hastalığın ve/veya aneminin olması

3.4. Çalışma Materyali:

Etik Kurul onayını (EK-5) takiben hasta ve kontrol gruplarındaki katılımcıların kendileri ve/veya yakınları çalışma hakkında bilgilendirildi ve çalışmaya katıldıklarını kabul ettiklerine dair onam formu imzalatıldı (EK-1 ve EK-2).

Araştırmada kullanılan materyal hasta ve kontrol gruplarından alınan kan örnekleri ve kan hücrelerinden elde edilen DNA ve RNA molekülleridir.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri:

Bağımlı değişken; Alzheimer hastalığı

Bağımsız değişken; Serbest radikal hasarı ve oksidatif stres göstergesi olan makromoleküler hasar belirteçleri ve DNA onarım enzim ekspresyon düzeyleri

• Yaş: Hasta ve/veya yakınlarına ve kontrollere yüz yüze görüşme sırasında sorularak elde edildi.

• Cins: Kadın ve erkek olarak belirtildi.

• Bilişsel durum: Minimental Durum Değerlendirme Testi ile değerlendirildi. MMDT özellikle demanslı yaşlıların muayenesinde uygulaması kısa sürede uygulanan bilişsel bir değerlendirme aracıdır. Yönelim, kayıt hafızası, dikkat ve hesaplama, hatırlama ve lisan olarak beş ana başlık altında toplanmış 19 maddeden oluşmaktadır. Toplam skor 30 üzerinden değerlendirilmektedir (168) (EK-3).

3.6. Veri Toplama Araçları:

3.6.1. Demografik ve Nöropsikolojik Veri Toplama

Hastaların ve kontrollerin verileri 10.09.2009-01.04.2011 tarihleri arasında yüz yüze görüşme ile toplanarak nöropsikolojik değerlendirmeleri yapıldı.

3.6.2. Kullanılan Kimyasallar, Malzemeler ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler Tablo 5.'te belirtilmektedir.

Tablo 5. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve malzemeler

Kimyasal/Malzeme Adı	**Marka-Katalog Numarası-Üretici Firma**
Histopak 1119	Sigma 11191 (St. Louis, MO, USA)
Fosfat Tamponlu Salin (PBS)	BiochromAG L-1820 (Berlin, ALMANYA)
Tris Tamponu	Sigma 252859 (St. Louis, MO, USA)
EDTA	Sigma ED2P (St. Louis, MO, USA)
Sodyum Klorür	Sigma S-3014 (St. Louis, MO, USA)
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma L-4390 (St. Louis, MO, USA)
Proteinaz K	Sigma P-2308 (St. Louis, MO, USA)
Absolute Etanol	Merck 1.00971.2500 (Darmstadt, ALMANYA)
8-OH-Gua-$^{15}N_5$ internal standardı	Cambridge Isotope Laboratories (Cambridge, MA, USA)
FapyAde- $^{13}C,^{15}N_2$ internal standardı	Cambridge Isotope Laboratories (Cambridge, MA, USA)
FapyGua- $^{13}C,^{15}N_2$ internal standardı	Cambridge Isotope Laboratories (Cambridge, MA, USA)
5-OH-5-MeHyd-$^{13}C,^{15}N_2$ internal standardı	Cambridge Isotope Laboratories (Cambridge, MA, USA)
5-OH-Cyt-$^{13}C,^{15}N_2$ internal standardı	Cambridge Isotope Laboratories (Cambridge, MA, USA)
ThyGly-d_4 internal standardı	Cambridge Isotope Laboratories (Cambridge, MA, USA)
5-OHMeUra-$^{13}C_2,d_2$ internal standardı	Cambridge Isotope Laboratories (Cambridge, MA, USA)
5-OH-Ura-$^{13}C_4,^{15}N_2$ internal standardı	Cambridge Isotope Laboratories (Cambridge, MA, USA)
5,6-diOH-Ura-$^{13}C,^{15}N_2$ internal standardı	Cambridge Isotope Laboratories (Cambridge, MA, USA)
Sodyum Fosfat Dibazik Dihidrat ($Na_2HPO_4.2H_2O$)	Fluka 71638 (St. Louis, MO, USA)
Sodyum Fosfat Monobazik Dihidrat ($Na_2HPO_4.2H_2O$)	Sigma 71505 (St. Louis, MO, USA)
Potasyum Klorür (KCl)	Sigma P9541 (St. Louis, MO, USA)

Ditiyoeritritol	Sigma D8161 (St. Louis, MO, USA)
N,O-Bistrimetilsililtrifloroasetamid (BSTFA) + %1 Trimetilklorosilan	Fluka 15238 (St. Louis, MO, USA)
Susuz Piridin	Sigma 270970 (St. Louis, MO, USA)
β-Merkaptoetanol	Sigma M7154 (St. Louis, MO, USA)
3-(N-morfolino)propan sülfonik asit (MOPS)	Sigma M1254 (St. Louis, MO, USA)
Sodyum asetat (CH_3COONa)	Sigma S8750 (St. Louis, MO, USA)
% 37 Formaldehit (12.3M)	Sigma F1635 (St. Louis, MO, USA)
Gliserol	GPR 284546F (Lutterworth, İNGİLTERE)
Bromfenol mavisi	Sigma 114391 (St. Louis, MO, USA)
N,N-Dimetil formamide	Sigma D8654 (St. Louis, MO, USA)
Etidyum Bromür	Sigma E8751 (St. Louis, MO, USA)
Agaroz LE	Roche Applied Science 11685660001 (Penzberg, ALMANYA)
Potasyum Fosfat Monobazik (KH_2PO_4)	Sigma P0662 (St. Louis, MO, USA)
Potasyum Fosfat Dibazik (K_2HPO_4)	Sigma 04248 (St. Louis, MO, USA)
Metanol	Sigma 179337 (St. Louis, MO, USA)
MDA standartı (1,1,3,3 tetraetoksipropan)	Sigma T-9889 (St. Louis, MO, USA)
Bütilhidroksitoluen (BHT)	Sigma W-218405 (St. Louis, MO, USA)
Tiobarbütirik asit (TBA)	Sigma T-5500 (St. Louis, MO, USA)
Bütanol	Sigma B-7906 (St. Louis, MO, USA)
Asetonitril	Sigma 674907 (St. Louis, MO, USA)
N^{ε}-Karboksimetillizin standardı	SyMOChem (Eindoven-HOLLANDA)
Trikloroasetikasit (CCl_3COOH)	Carlo-Erba 200-927-2 (Milano, İTALYA)
Hidroklorik asit (HCl)	Sigma H1758 (St. Louis, MO, USA)
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma S-5881 (St. Louis, MO, USA)
Asetik Asit (CH_3CO_2H)	Sigma 242853 (St. Louis, MO, USA)
Sodyum tetraborat dekahidrat ($Na_2B_4O_7.10H_2O$)	Baker Analyzed 3568-01 (Center Valley, PA, USA)
9-Floroenilmetoksikarbonil (FMOC)	Fluka 23186 (St. Louis, MO, USA)
GeneJet RNA Purification Kit	Fermentas K0731 (Waltham, MA, USA)
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas K1611 (Waltham, MA, USA)

Dream Taq Green PCR Master Mix Kit	Fermentas K1089 (Waltham, MA, USA)
Maxima SybrGreen qPCR Master Mix Kit (2X)	Fermentas K0252 (Waltham, MA, USA)
DNA Molecular Weight Marker XIV (100 bp ladder)	Roche Applied Science 11721933001 (Penzberg, ALMANYA)
OGG1 primer seti (253 a-b)	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
OGG1 primer seti (385 a-b)	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
OGG1 primer seti (955 a-b)	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Neil1 primer seti (3 a-b)	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Neil1 primer seti (192 a-b)	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
β-Aktin primer seti (3 a-b)	TIB-Molbiol (Berlin-ALMANYA)
MMP2 ELISA Kit	RayBio-Human MMP-2 ELISA Kit ELH-MMP2-001 (Norcross, GA, USA)
MMP9 ELISA Kit	RayBio-Human MMP-9 ELISA Kit ELH-MMP9-001 (Norcross, GA, USA)
TIMP1 ELISA Kit	RayBio-Human TIMP -1 ELISA Kit ELH-TIMP1-001 (Norcross, GA, USA)
TIMP2 ELISA Kit	RayBio-Human TIMP -2 ELISA Kit ELH-TIMP2-001 (Norcross, GA, USA)
Nitrotirozin ELISA Kit	Oxis Research-Bioxytech Nitrotyrosine-EIA Kit 21055 (Portland, OR, USA)
EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit)'lı Tüp	Vacuette (Frickenhausen, ALMANYA)
Heparin'li Tüp	Vacuette (Frickenhausen, ALMANYA)
Polipropilen Tüp (15 mL'lik)	Isolab (Wertheim, ALMANYA)
Eppendorf Tüp	Isolab
Cam vialler	Thermo Scientific Chromacol 10003264 (Waltham, MA, USA)
İnsert vialler	Fisher 401BS-530 (Waltham, MA, USA)
RT-PCR Kapiller Tüpleri (20 µL)	Roche Applied Science 04929292001 (Penzberg, ALMANYA)

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 6.'da belirtilmektedir.

Tablo 6. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz adı	**Marka**	**Model**	**Üretici Firma**
Saf su cihazı	Milipore Mili-Q	ZLX55003Y	Hettich Co, Almanya
Santrifüj	Heraeus	Biofuge stratos	Heraeus, Almanya
Santrifüj	Heraeus	Omnifuge 2.0 RS	Heraeus, Almanya
Otomatik pipet	Eppendorf	Eppendorf Research	Research Eppendorf, USA
Derin dondurucu	Thermo	VLT1740-5-V40	Thermo Electron Co, USA
Spektrofotometre	PG	T80	PG Instruments Ltd., İngiltere
Freeze-Dryer (Liyofilizatör)	FTS	Flexi-Dry	MP SP İndustries İnc, USA
GC-MS/MS	Agilent Technologies	7000 GC/MS Triple Quad (pozitif elektron iyonizasyon moduna sahip) 7890A Gaz Kromatografi Cihazı 7693 Autosampler	Agilent Technologies, Inc., USA
Yüksek çözünürlüklü erimiş-silika kapiler kolon	Agilent Technologies	HP-Ultra 12.5 m, 0.2 mm, 0.33µm film kalınlığı	Agilent Technologies, Inc., USA
SpeedVac	Savant ISS 110	SC210A SpeedVac Plus ve RVT 4104 soğutulmuş buhar tuzağı	Thermo- Savant, USA
Real-Time PCR Cihazı	Roche	Light Cycler 1.5	Roche Applied Science
Jel Elektroforez Sistemi	Thermo	EasyCast-B1	Thermo Electron Co, USA
Güç Kaynağı	Thermo	EC 300 XL	Thermo Electron Co, USA
Thermal Block Cycler PCR Cihazı	MJ Research	PTC 200	MJ Research, Kanada
Görüntüleme Cihazı	Vilber Lourmat	ECX	Vilber Lourmat, Fransa
Buzdolabı	Uğur	USS 748 DIKL	Uğur Tic., Türkiye
Derin Dondurucu	Uğur	UFR 370 GD	Uğur Tic., Türkiye

Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Stuart	SB162	Bibby Scientific Limited, UK
Vortex	WiseMix-Wisd	VM 10	Labortechnik GmbH, Almanya
Isıtıcı Blok	Wisd	HB-48	Labortechnik GmbH, Almanya
ELISA Okuyucu	Biotek	ELX 800	BioTek, USA
ELISA Plate Karıştırıcı	Labnet	Wortemp 56	Labnet, USA
Su Banyosu	Memmert	One 10	Memmert GmbH, Almanya
pH Metre	JP selecta	PH-2005	JP Selecta S.A., İspanya
Hassas terazi	Precisa	XB 220A	Precisa, İsviçre
Pastör fırını	Nüve	FN500	Nüve, Türkiye
HPLC Cihazı	Shimadzu	VP serisi	Schimadzu, Japonya

3.6.3. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Hasta ve kontrollerin periferal kan örnekleri 15 (5mL ve 10 mL) mL'lik EDTA'lı ve 5 mL'lik Li-heparin antikoagülanlı tüplere alındı. Kan tüpleri soğuk zincir ile DEÜTF Biyokimya AD. Laboratuvarı'na getirildi. 5 mL'lik heparinli ve 5 mL'lik EDTA'lı tüplerin 10 dakika +4°C'de 3000 rpm'de santrifüj edilip plazmaları ayrıldı. Ayrılan plazma örnekleri eppendorf tüplere bölündü. Aynı zamanda EDTA'lı kan örneklerinden total RNA izolasyonları da aynı gün içerisinde gerçekleştirildi. RNA örnekleri komplementer DNA (cDNA)'ya çevrildi. 10 mL'lik EDTA'lı tüplere alınan örneklerden lökosit izolasyonu yapıldı. Lökositler, plazma ve cDNA örnekleri -80 °C' de çalışılacakları güne kadar saklandı.

3.6.4 DNA Baz Hasarı Çalışmaları

Çalışmada Alzheimer hastalarında ve kontrol grubu DNA örneklerinde DNA lezyonları incelendi. Analizler, izotop dilüsyonlu gaz kromatografi-sıralı kütle spektrometre (GC-MS/MS) ile gerçekleştirildi. DNA hasarı ölçümleri National Institute of Standards and Technology (NIST) kurumunun Biomolecular Measurement Bölümü'nün DNA Ölçümleri Grubu Laboratuvarı'nda (Maryland, U.S.A) gerçekleştirildi.

3.6.4.1 Lökosit İzolasyonu

Lökositler EDTA'lı kandan dansite gradiyent santrifüj yöntemi (169) kullanılarak izole edildi. Lökosit izolasyonu için 15 mL'lik polipropilen tüplere sırası ile 5 mL histopak 1119 ve 5 mL tam kan tabakalandırıldı. Polipropilen tüp 750 x g'de 30 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tabakalanan lökosit kümeleri pastör pipeti yardımı ile temiz bir tüpe aktarıldı. Aktarılan hücre kümesi üç kez 10'ar mL izotonik fosfat tamponu (PBS) ile 500 x g'de 20 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Lökosit sedimentinin üzerinde kalan süpernatan atıldı ve lökosit kümesi DNA izolasyonu yapılıncaya kadar -80 °C'de saklandı.

3.6.4.2 DNA İzolasyonu

Lökositlerin saklandıkları -80°C'lik dondurucudan çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığında çözünmesi sağlandı. Lökositlerden tuzla çöktürme metodu (170) ile DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen lökosit kümelerinin bulunduğu 15 mL'lik polipropilen tüplerin içerisine 1 mL lizis tamponu (0.5M Tris pH:8.0, 20mM EDTA pH:8.0, 10mM NaCl, %1'lik sodyum dodesil sülfat, 0.5 mg/mL proteinaz K) konularak 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün lizatın üzerine 0,5 mL doymuş NaCl çözeltisi eklendi. 15 saniye vorteks ile karıştırıldıktan sonra, 56 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Örnekler oda sıcaklığında, 5000 x g'de, 30 dakika santrifüj edildikten sonra DNA'yı içeren supernatan 3 adet ependorf tüpüne 0,5 mL'lik alikotlar halinde protein tabakasını almaktan kaçınarak transfer edildi. Süpernatanın üzerine hacminin iki katı kadar soğuk susuz etanol konuldu ve yavaşça karıştırılarak DNA'nın görünür hale gelmesi beklendi. DNA 3000 x g'de 15 dakika santrifüj edilerek toplandı. DNA pelletleri saf su içerisinde tekrar çözünmeleri için +4 °C'de 48 saat bekletildi. Çözünen DNA molekülü yaklaşık 1/20 oranında seyreltildikten sonra 200-350 nm arasında spektral analizi yapıldı. 260 nm dalga boyundaki absorbans kullanılarak (ABS260 x 50 x Dilüsyon Faktörü = ….. µg/mL) DNA miktarı ölçüldü. DNA örnekleri liyofilizatörde kurutuldu ve içerisine 50 µL % 70'lik etanol eklenerek analiz zamanına kadar +4 °C'de saklandı (176).

3.6.4.3 Gaz Kromatografi - Sıralı Kütle Spektrometre (GC-MS/MS) ile DNA Baz Hasarı Ölçümü (171-175)

Gaz kromatografi-sıralı kütle spektrometrisi iki tekniğin birleştirilmesiyle oluşturulmuş kimyasal karışımların analizi için kullanılan yöntemdir.

Kromatografi bir karışımı bileşenlerine ayırırken kütle spektrometrisi ayrılan bu bileşenleri karakterize eder. Gaz kromatografisi, uçucu veya yarı uçucu maddelerin ayırımı için kullanılan kromatografik bir tekniktir. Ayırım, analitin sabit fazda (kolon) dağılımına ve hareketli faz olarak kullanılan inert bir gaz yardımıyla sabit fazda taşınmasına dayanır. Gaz kromatografisinde hareketli faz olarak genellikle helyum, azot veya hidrojen gibi gazlar kullanılır. Gazın içerisinde bulunan su ve oksijen, sabit fazın bozulmasına neden olduğu için kullanılan gazlar oldukça saf olmalı, su ve oksijen içermemelidir.

Karışımı oluşturan bileşenler kolonda yer alan durgun faz ile etkileşimleri temelinde birbirlerinden ayrılırlar. Kromatografide temel kural etkileşimi çok olan bileşenin kolonu geç terk etmesidir. Kolondan çıkan bileşenler, yine kolondan çıkış sıralarına göre detektöre ulaşarak, burada miktarı ile orantılı bir sinyal oluştururlar. Dolayısı ile bileşenin kolondan çıkış zamanı (ya da kolon tarafından tutulması; retansiyon/alıkonma zamanı) ve maddenin oluşturduğu sinyalin büyüklüğü (pik yüksekliği/pik alanı) bileşenin tanımlanması ve kantite edilmesi için iki önemli parametredir.

Temel olarak bir gaz kromatografi cihazı, aşağıda belitilen kısımlardan oluşmaktadır (Şekil 32.)

1- Hareketli faz olarak kullanılan gazı sağlayan bir gaz tüpü

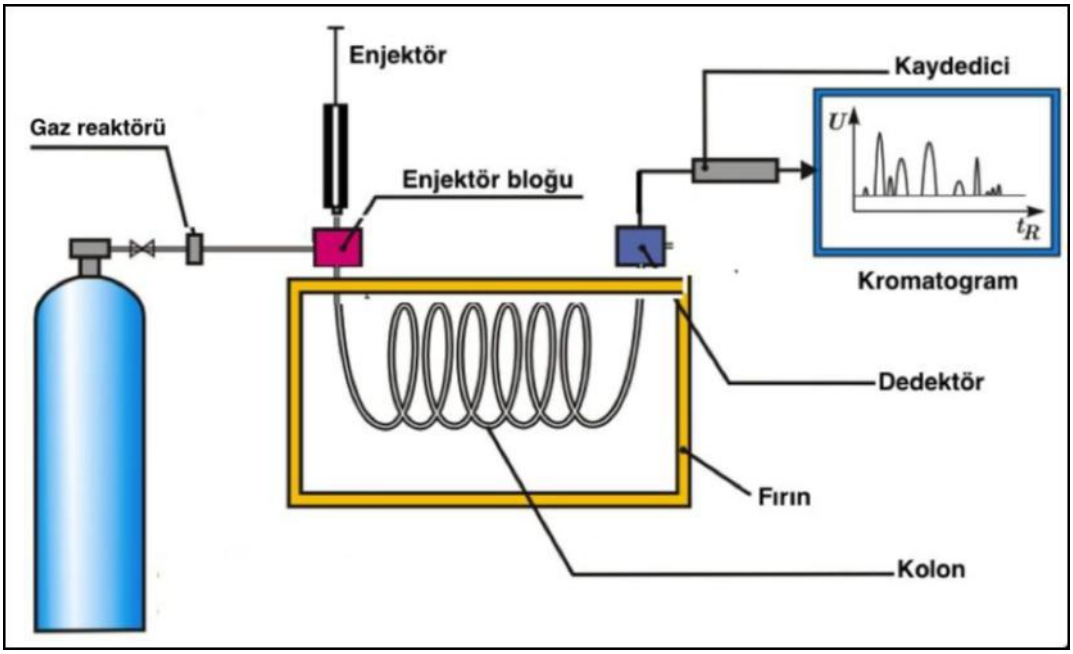
2- Numunenin kolona verildiği numune giriş kısmı

3- Kromatografik ayırımın gerçekleştiği kolon

4- Termostat olarak görev yapan ve kolonun yer aldığı kolon fırını

5- Madde sinyalini saptayan dedektör

6- Sonuçları kaydedecek ve bu sonuçları kromatogramlara dönüştürecek veri sistemi



Şekil 32. Gaz kromatografisi cihazının temel kısımları

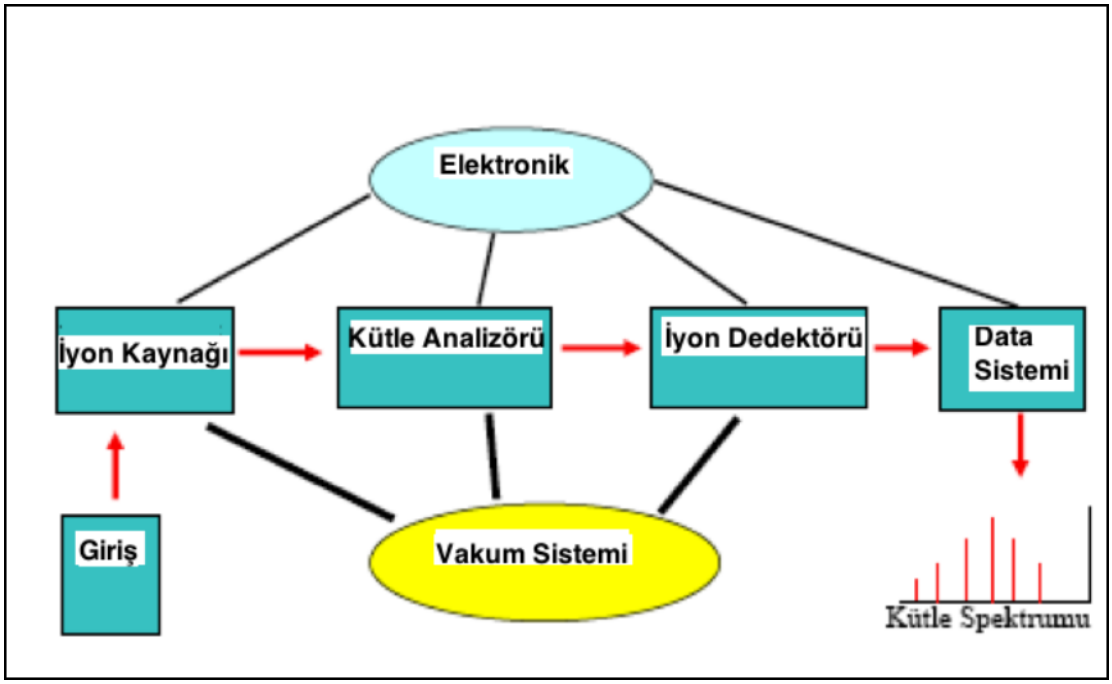
Derivatizasyon, gaz kromatografisinde sıkça kullanılan bir yöntemdir. Bir kimyasal bileşiğin türevleri olarak adlandırılan benzer kimyasal yapılara sahip ürünlere dönüştürülmesi olarak tanımlanmaktadır. Genellikle, spesifik fonksiyonel bir grup derivatizasyon reaksiyonunda, reaksiyona giren bileşiği reaktivite, çözünürlük, kaynama noktası, erime noktası veya kimyasal kompozisyon açısından farklanmış türevlere dönüştürür. Kimyasal bileşiklere derivatizasyon ile uçuculuk gibi karakterlerin kazandırılması GC/MS ve GC-MS/MS analizlerinde bu tekniğin kullanılmasının en büyük sebebidir. Sililasyon, oldukça yaygın olarak kullanılan bir derivatizasyon yöntemidir. Gaz kromatografisinde, ayırma esnasında problem yaratan tüm fonksiyonel gruplar (hidroksil, karboksilik asit, amin, tiyol, fosfat) silasyon reaktifleri ile derivatize edilebilirler. Sililasyon, bileşikteki asidik bir hidrojenin yerine -SiMe3 gibi bir alkilsilil grubunun geçmesinden ibarettir. Oluşan ürünler genellikle daha az polar, daha uçucu ve termal olarak daha dayanıklıdır. Sililasyonda en yaygın olarak kullanılan kimyasallar trimetilsilil (TMS) reaktifleridir. Geniş çapta uygulanabilirlik ve kullanım kolaylığı sağlayan pek çok TMS reaktifi mevcuttur. En yaygın kullanılan TMS reaktiflerinin başında BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroasetamid), BSA (N,O-bis(trimetilsilil)asetamid) ve MSTFA (N-metil-N-trimetilsililtrifluoroasetamid) gelmektedir.

Gaz kromatografisi, uçucu veya yarı uçucu maddelerin analizini iyi ayırıcılık ve etkinlikle gerçekleştirir, fakat tanımlanmasını yapamaz. Buna karşın kütle spektrometresi ayrıntılı yapısal bilgi sağlayabilir. Her iki teknik de çalışılan faz açısından birbirleriyle uyumludur. Her iki teknikte örnek gaz fazındadır ve aynı miktarda örnekle ilgilenir (tipik olarak 1 ng`dan az). Ancak iki teknik arasında çalışma basıncı uyumsuzluğu vardır. Gaz kromatografisinde örneği taşıyan gazın basıncı yaklaşık 760 torr iken kütle spektrometresi 10^{-6} ve 10^{-5} torr'luk bir basınçla çalışır. Aradaki bu basınç farkını azaltmak için GC ile MS ara bağlantı noktası bulunur. Bu ara bağlantı, GC'den gelen elüentin 760 torr basıncını 10^{-6} ve 10^{-5} torr basınca düşürmekte ve aynı zamanda seçimli olarak analitin önemli bir kısmının kütle spektrometresine aktarımını sağlamaktadır. Bu ara bağlantı noktası, taşıyıcı gaz ile organik molekülleri birbirinden ayırmaktadır. Taşıyıcı gaz daima helyum, hidrojen gibi difüzyon katsayısı yüksek olan küçük moleküllerdir. Buna karşın organik moleküllerin difüzyon katsayısı düşüktür.

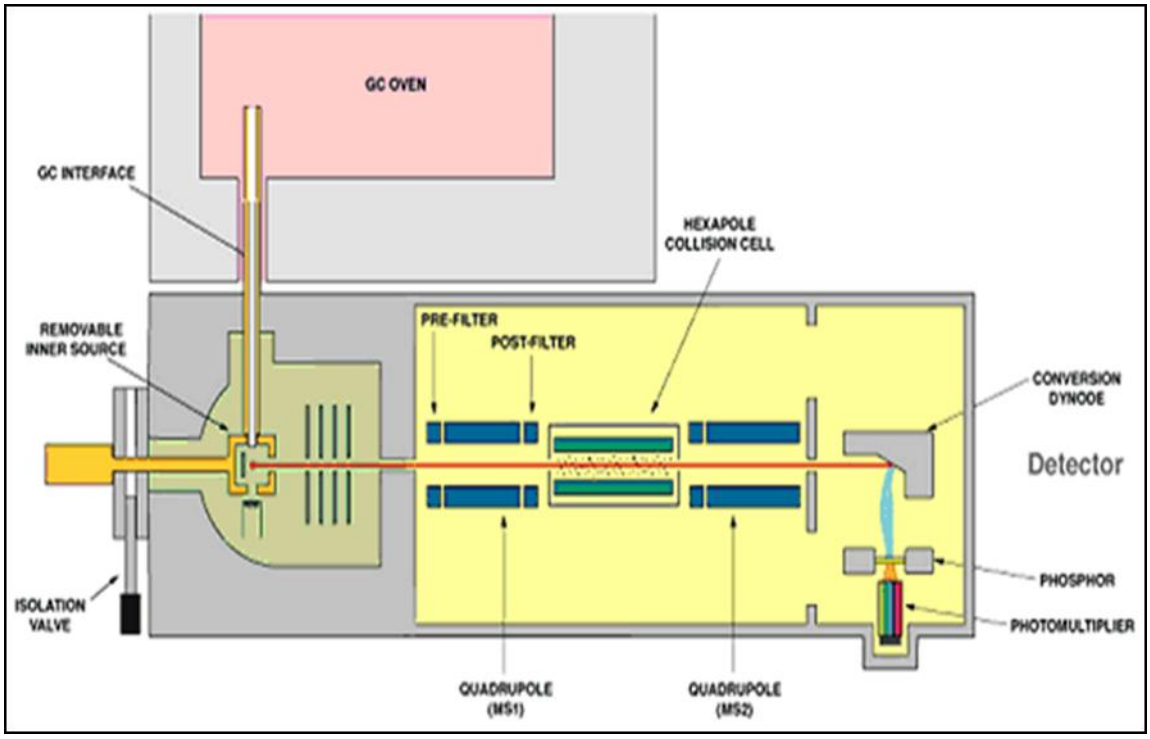
Kütle spektrometresi, molekülün buharlaştırılması, iyonlaştırılması ve oluşan iyonların kütle/yük (m/z) oranına göre ayrılması esasına dayanır. Moleküllerin farklı zamanlarda kolondan çıkması kütle spektrometresinin bu molekülleri ayrı ayrı yakalamasına, iyonlaştırmasına, hız kazandırmasına, yönünü değiştirmesine ve saptamasına izin verir. Kütle spektrometresi, bunu her bir molekülü iyonize parçalara ayırarak ve bu parçaların m/z oranını kullanarak yapar. İki kütle analizörünün ard arda geldiği sisteme sıralı kütle analizörü (Tandem MS) adı verilir (Şekil 34.).

Genellikle bir kütle spektrometrik analiz aşağıdaki şu basamakları kapsar:

- Gaz fazındaki örnek moleküller iyon kaynağında iyonize edilir ve yüklü partiküller (iyonlar) oluşur.
- İyonlar elektriksel alan yaratılarak hızlandırılır. Elektromanyetik alandan geçerken iyonların hareket özelliklerine göre m/z değerleri hesaplanır.
- m/z değerlerine göre ayrılmış olarak dedektörden geçen iyon akımı, elektriksel sinyale dönüştürülerek tespit edilir.
- Veri sistemi bu elektriksel sinyallerin büyüklüklerini m/z olarak kaydeder ve bu veriyi kütle spektrumuna dönüştürür (Şekil 33.).



Şekil 33. Kütle spektrometre ana bileşenleri



Şekil 34. GC-MS/MS cihazı

Kütle spektrometrisinde iyonlaşma farklı yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Elektron çarpışma iyonizasyonu (electron-impact ionization-EI), GC-MS/MS'de kullanılan en yaygın

iyonlaştırma şeklidir. Bu yöntemde örnek kütle spektrometresinin iyon kaynağının içine gaz halinde gönderilir ve burada molekülü iyonlaştıracak kadar enerjiye sahip bir elektron demeti ile çarpışır.

Reaksiyon aşağıdaki gibi gösterilebilir:

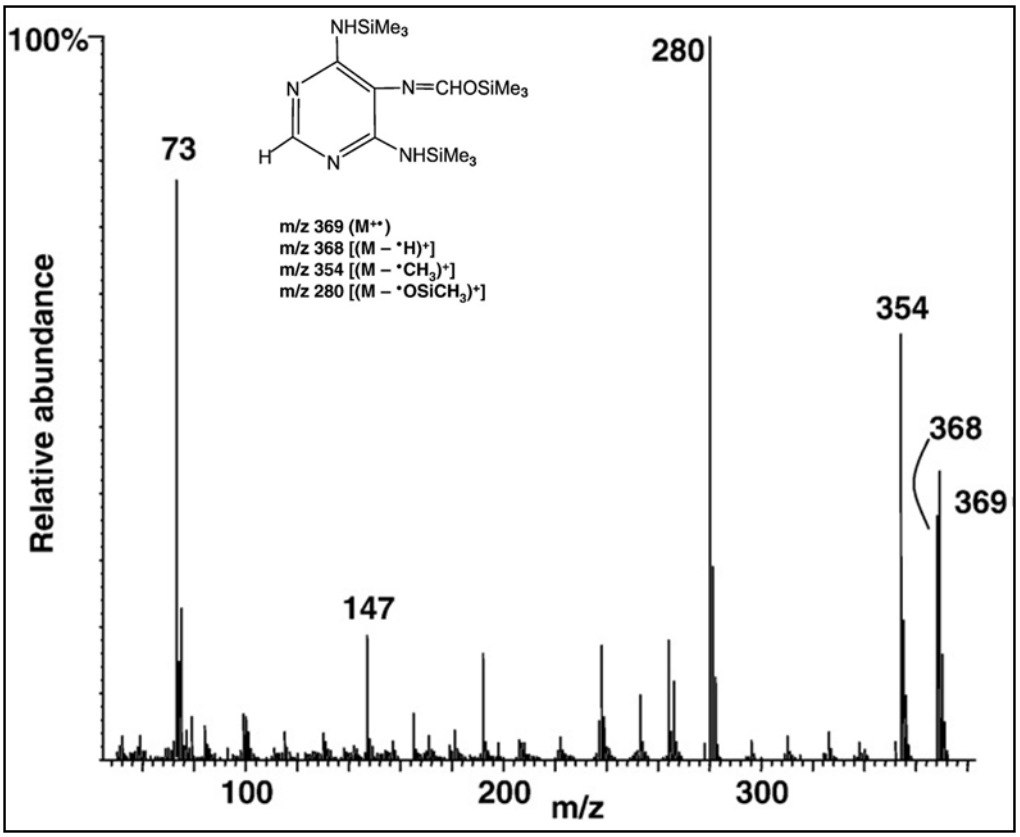
$$M\,(g) + e^{-} \rightarrow M^{+\bullet}\,(g) + 2\,e^{-}$$

Burada oluşan $M^{+\bullet}$ moleküler iyonu aynı zamanda bir radikaldir ve kararsız yapısından dolayı parçalanma eğilimindedir.

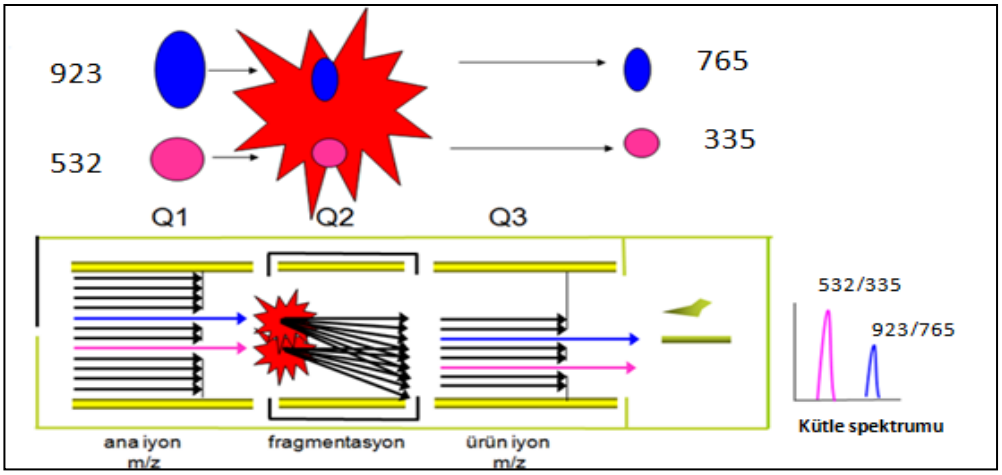
$$M_{1}^{+\bullet} \rightarrow M_{2}^{+} + M\,n$$

Yukarıdaki reaksiyon sonucu yapısal olarak karakteristik ve saptanabilir parçalar oluşur ve kütle analizörü tarafından tanınır.

GC/MS (Gaz kromatografi kütle spektrometre) ile düşük konsantrasyonlarda DNA hasarının ölçülmesinde seçilmiş iyon monitorizasyonu (Selected Ion Monitoring-SIM) kullanılır. Bu yöntemle kompleks bir karışımda düşük konsantrasyonda olan bileşikler tanımlanır ve miktarları belirlenir. Bu yöntemin kullanılması için bileşiğin kütle spektrumunun ve kolonda alıkonma zamanının bilinmesi gerekir. Bileşiğin bir takım karakteristik iyonu bileşik GC kolonundan elüe oldukça kütle spektrometresi tarafından eş zamanlı olarak görüntülenir. Eğer bileşik karışım içinde mevcutsa, uygun yoğunluktaki iyonların sinyalleri bilinen tutulma zamanlarında görüntülenir. Pozitif tanımlama için görüntülenen iyonların sinyalleri ve yoğunlukları bileşiğin bilinen bir kütle spektrumu ile karşılaştırılır (176) (Şekil 35.).



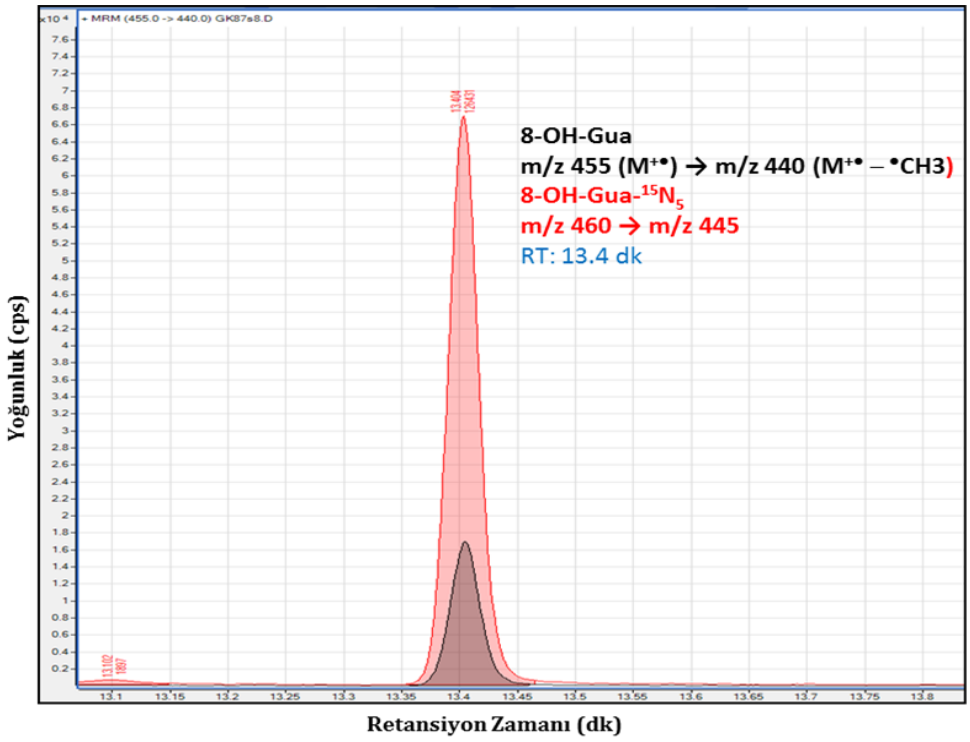
Şekil 35. 4,6-diamino-5-formamidopirimidin'in trimetilsillil türevinin elektron çarpışma kütle spektrumu (176)



Şekil 36. MRM modunda seçilen ana iyon/ürün iyon ikilisinin izlenmesi

GC-MS/MS'de SIM yöntemine dayalı olarak geliştirilen çoklu reaksiyon izleme (MRM- Multiple Reaction Monitoring) metodu kullanılmaktadır. Analitin GC'deki kromatografik ayrımlanma zamanı bilgisine ek olarak, MRM ile MS/MS'de o analite özgü ve

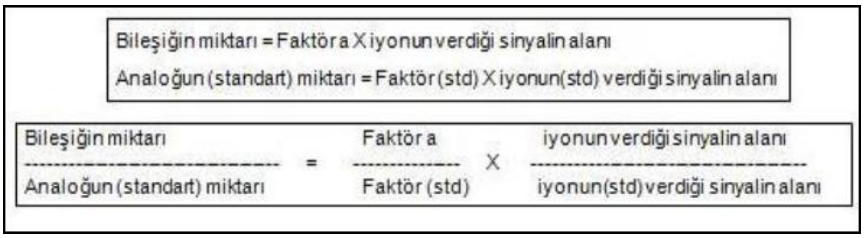
daha önceden tanımlanmış birden fazla ana iyon/ürün iyon(lar) ikilisinin (transition) izlenmesi ile kantitasyonun kesinliği arttırılmış olur (177) (Şekil 36.).



Şekil 37. 8-OHGua ve 8-OH-Gua-$^{15}N_5$ iyon kromatogramları

Bu yöntemde ayrıca, kantitasyonun güvenirliliğini arttırmak amacıyla çalışmanın başında her bir örneğe belirli konsantrasyondaki stabil izotoplarla işaretlenmiş internal standart (IS) eklenmesiyle MS öncesi (ekstraksiyon, GC enjeksiyonu vb.) ve MS koşullarında (iyonizasyon vb.) oluşabilecek değişiklikler normalize edilmiş olur. Analizden önce DNA örneğine uygun internal standartlar eklenerek kompleks karışımdaki bileşenlerin miktarı belirlenebilir. İnternal standartlar ^{13}C, ^{15}N veya ^{2}H (döteryum) ile işaretlenebilir. Stabil izotop işaretli IS'ların kimyasal özelliği, kromatografik ayrımlanma özellikleri, iyonizasyon etkinliği ve fragment iyon dağılımı hedef analit ile aynıdır. IS'ın hedef analitten tek farkı ^{12}C yerine ^{13}C ün, ^{14}N yerine ^{15}N in ve ^{1}H atomu yerine ^{2}H (döteryum) atomunun geçmesi nedeniyle daha yüksek moleküler kütleye sahip olmasıdır (Şekil 37.). Tek bir GC-MS/MS deneyi sırasında birden çok analitin ölçümü mümkündür. Karışım içerisindeki bileşiğin miktarı, karakteristik iyonların ve onların işaretli analoglarının oluşturdukları sinyal alanlarının ölçülmesi ile hesaplanır. Bileşiğin miktarı ile karakteristik iyonunun sinyal alanı arasındaki ilişki Şekil 38'deki gibidir. Bileşiğin ve işaretli standardının fiziksel ve kimyasal

özelliklerinin aynı olması, sadece kütlelerinin farklı olması sebebiyle, şekildeki formülde yer alan "Faktör a / Faktör (std)" oranı 1'e eşit olmaktadır.



Şekil 38. Bileşik miktarı ile iyon-akım profilindeki sinyal alanı arasındaki ilişki

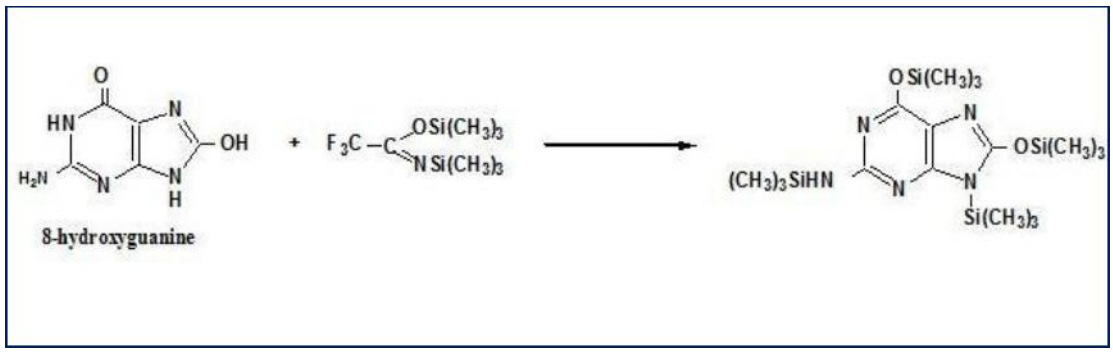
3.6.4.3.1. Ölçüm Öncesi Hazırlıklar

Alzheimer hastalarında ve kontrol grubunda, 8-Hidroksiguanin (8-OH-Gua), 4,6-diamino-5-formamidopirimidin (FapyAde), 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin (FapyGua), 5-hidroksi-5-metil-hidantoin (5-OH-5MeHyd), 5-Hidroksi-sitozin (5-OH-Cyt), Timin-glikol (ThyGly), 5-Hidroksi-metil-urasil (5-OHMeUra), 5-Hidroksi-urasil (5-OH-Ura), 5,6-dihidroksi-urasil (5,6-diOH-Ura) değişmiş DNA bazlarının ölçümleri izotop dilüsyonlu gaz kromatografi-sıralı kütle spektrometre (GC-MS/MS) ile gerçekleştirildi. Modifiye bazların kantitatif ölçümü, DNA örneklerine hidroliz öncesi stabil izotop işaretli analoglar eklenerek gerçekleştirildi.

Çalışma basamakları;

- DNA örnekleri (50 μg) üzerine belirli konsantrasyonlarda stabil izotop işaretli analoglar eklenerek gece boyu Speed Vac'de kurutuldu. İnternal standart olarak eklenen stabil izotop işaretli analoglar;
  - 8-OH-Gua-$^{15}N_5$ (0,206 mM)
  - FapyAde- $^{13}C,^{15}N_2$ (0,229 mM)
  - FapyGua- $^{13}C,^{15}N_2$ (0,156 mM)
  - 5-OH-5-MeHyd-$^{13}C,^{15}N_2$ (0,093 mM)
  - 5-OH-Cyt-$^{13}C,^{15}N_2$ (0,227 mM)
  - ThyGly-d_4 (0,104 mM)
  - 5-OHMeUra-$^{13}C_2,d_2$ (0,099 mM)
  - 5-OH-Ura-$^{13}C_4,^{15}N_2$ (0,128 mM)
  - 5,6-diOH-Ura-$^{13}C,^{15}N_2$ (0,121 mM)

- Ertesi gün kuruyan örnekler 50 µL inkübasyon tamponu (50 mM Fosfat tamponu (pH 7.4), 100 mM KCl, 1 mM EDTA ve 0.1 mM ditiyotreitol) içerisinde çözüldü.
- Çözülen örnekler üzerine 2 µg Nth (5.5 µg/ µL) ve 2 µg Fpg (4.0 µg/ µL) enzimleri eklendi ve hidroliz için su banyosunda 37 °C'de 1 saat boyunca inkübe edildi. Fpg ve Nth literatürde tanımlandığı gibi izole edildi (112, 178).
- Örneklerin üzerine reaksiyonun durdurulması için 150 µL soğuk susuz etanol eklendi ve -20 °C'de 1 saat boyunca bekletildi.
- Dondurucudan alınan örnekler 14000 rpm'de +4 °C'de 30 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatan cam ampullere aktarıldı. Speed-vac'da etanolün uzaklaşması sağlandı (~45-60 dakika).
- Etanolü uzaklaşmış örneklerin üzerine 200 µL saf su eklendi. Ampullerin üzeri kağıt bez ile kapatılarak paket lastiği ile sabitlendi. Sıvı azot yardımıyla örnekler donduruldu ve gece boyunca Freeze-dry'da liyofilize edildi. İkinci gün bu örneklerde derivatizasyon işlemi gerçekleştirildi (Şekil 39.).
- Liyofilize edilmiş süpernatan fraksiyonlarının üzerine çeker ocak altında 30 µL BSTFA (% 1, v/v) ve 30 µL piridin (1:1, v/v) eklendi. Örneklerin üzerinden azot gazı geçirildi ve kapaklar mühürlenerek kapatıldı. 120 °C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra soğutulan örnekler hamilton enjektörü ile kapakları açılmadan enjeksiyon ampullerine (insert vialler) aktarıldı. Bu ampullerin de ağzı mühürlenerek sıkıca kapatıldıktan sonra GC-MS/MS cihazına yüklendi.



Şekil 39. DNA okside bazı 8-hidoksiguanin'in trimetilsilayon ile derivatizasyonu

3.6.4.3.2. Ölçüm Yöntemi

Modifiye bazların karakteristik iyonları arasından seçilen ana iyon-ürün iyon çiftleri (transitions) MRM (Multiple Reaction Monitoring) modunda monitorize edildi. Bileşiklerin kantitasyonu, iyonlara ait sinyal alanlarının integrasyonuyla gerçekleştirildi. Sonuçlar lezyon sayısı/10^6 DNA bazı olarak ifade edildi.

Her ürün için belirlenen ana iyon-ürün iyon çiftleri;

- FapyAde, m/z 369 ($M^{+\bullet}$) → m/z 354 ($M^{+\bullet} - {}^{\bullet}CH_3$); FapyAde- $^{13}C,^{15}N_2$, m/z 372 → m/z 357
- FapyGua, m/z 457 ($M^{+\bullet}$) → m/z 368 ($M^{+\bullet}$ − $TMSO^{\bullet}$); FapyGua- $^{13}C,^{15}N_2$; m/z 460 → m/z 371
- 8-OH-Gua, m/z 455 ($M^{+\bullet}$) → m/z 440 ($M^{+\bullet} - {}^{\bullet}CH_3$); 8-OH-Gua-$^{15}N_5$, m/z 460 → m/z 445
- 5-OH-5-MeHyd, m/z 346 ($M^{+\bullet}$) → m/z 331 ($M^{+\bullet} - {}^{\bullet}CH_3$); 5-OH-5-MeHyd-$^{13}C,^{15}N_2$, m/z 349 → m/z 334
- ThyGly, m/z 448 ($M^{+\bullet}$) → m/z 259 ($M^{+\bullet}$ − $TMSO^{\bullet}$); ThyGly-d_4, m/z 452 → m/z 262
- 5-OH-Cyt, m/z 343 ($M^{+\bullet}$) → m/z 342 ($M^{+\bullet} - {}^{\bullet}H$); 5-OH-Cyt-$^{13}C,^{15}N_2$, m/z 346 → m/z 345
- 5-OHMeUra, m/z 358 ($M^{+\bullet}$) → m/z 343 ($M^{+\bullet} - {}^{\bullet}CH_3$); 5-OHMeUra-$^{13}C_2,d_2$, m/z 362 → m/z 347
- 5-OH-Ura, m/z 344 ($M^{+\bullet}$) → m/z 329 ($M^{+\bullet} - {}^{\bullet}CH_3$); 5-OH-Ura-$^{13}C_4,^{15}N_2$, m/z 350 → m/z 335
- 5,6-diOH-Ura, m/z 432 ($M^{+\bullet}$) → m/z 417 ($M^{+\bullet} - {}^{\bullet}CH_3$); 5,6-diOH-Ura-$^{13}C,^{15}N_2$, m/z 435 → m/z 420

Analizlerde % 5 çapraz bağlı fenilmetilsilikon kaplı (0.33 μm) yüksek çözünürlükte erimiş-silika kapiller kolon (12.5 m, 0.2 mm i.d) sabit faz, aşırı saflıktaki helyum gazı ise taşıyıcı faz olarak kullanıldı. Enjeksiyon portu ve GC-MS/MS arayüzü sırasıyla 250 ve 280 °C'de tutuldu. Kolon başı basıncı ise 65 kPa olarak ayarlandı. Derivatize edilmiş örneklerin 4 μL'si otomatik enjektör ile GC kolununa enjekte edildi. Bölünme oranı elektronik olarak 1:10'a ayarlandı. Kütle spektrometresi ile yapılan analizler e^- iyonizasyon modunda 70 eV'da gerçekleştirildi. Gaz kromatografisinin fırın sıcaklığı 130 °C'den 280 °C'ye (ilk iki dakika

130 °C'de, sonrasında 8 °C/dakika hızla artacak şekilde) ayarlandı. Septum gazı akış hızı 3 mL/dak. olarak ayarlandı. İyon kaynağının sıcaklıkları sırasıyla Quad 1 ve Quad 2 için 230 °C, 150 °C ve 150 °C olarak ayarlandı. Triple Quad Collision hücresindeki "He quench" gaz ve "N_2 collision" gazlarının akışları sırası ile 2.25 mL/dak and 1.5 mL/dak olacak şekilde ayarlandı (165).

3.6.5 DNA Onarım Enzimleri Ekspresyon Düzeyi Çalışmaları

3.6.5.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

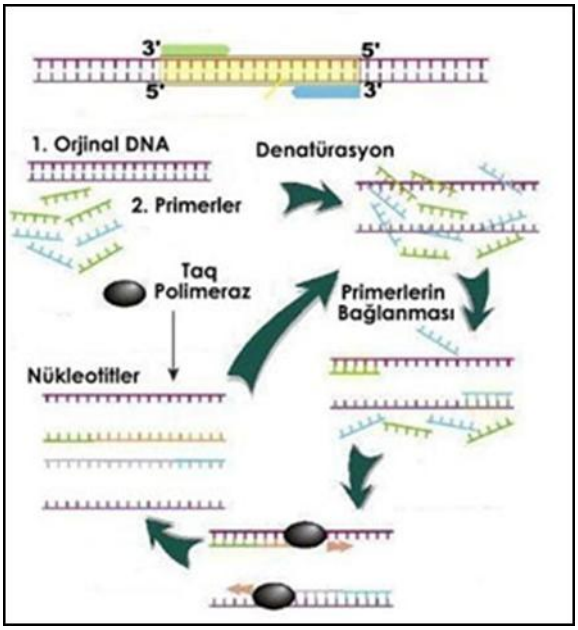
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction - PCR), DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir. PCR yaygın olarak tıbbi ve biyolojik araştırma laboratuvarlarında kalıtsal hastalıkların teşhisi, genetik parmak izlerinin tanımlanması, bulaşıcı hastalıkların teşhisi, genlerin klonlanması, babalık testi ve DNA hesaplaması vb. gibi değişik konularda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

PCR işlemi, genel olarak 30-40 döngüden oluşur ve her bir döngüde üç temel basamak bulunmaktadır (Şekil 40.).

1) Denatürasyon basamağı (90-95 °C): Denatürasyon basamağında, çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir ve bütün enzimatik reaksiyonlar durur (örneğin, bir önceki döngünün uzama basamağı)

2) Primer bağlanması (50-70 °C): Bu basamakta sıcaklık 50-70°C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler çoğaltılacak DNA kısmının uçlarındaki tamamlayıcı dizilere özgül olarak bağlanarak kalıp DNA'nın sentezi için başlangıç görevi yapar.

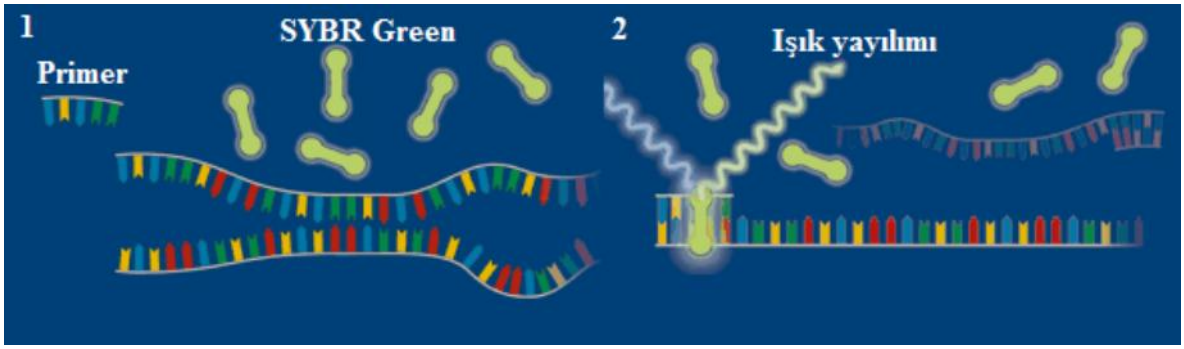
3) Elongasyon (Uzama) (70-75 °C): Bağlanma süresi bitince sıcaklık 70-75°C'ye çıkarılarak, sistem içerisinde bulunan ve sıcağa dayanıklı DNA polimeraz (Taq polimeraz) enzimi, DNA zincirini 5′→3′ doğrultusunda ortamdaki deoksinükleosid trifosfatları (dNTP) kullanarak, primerlerin 3′ ucuna nükleotidleri yerleştirir. Böylelikle zincir uzaması sağlanır ve hedef DNA sekansının bir kopyası elde edilir.



Şekil 40. Polimeraz zincir reaksiyonu basamakları

Ard arda tekrarlanan denatürasyon, primer bağlanması ve uzama basamaklarıyla DNA sekansları üssel olarak artar. Bu üssel artışın nedeni bir döngü sonucu sentezlenen ürünün ardışık döngüde primer için kalıp görevi görmesidir. Böylece her PCR döngüsü DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır.

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) özellikle gen ekspresyon çalışmalarında kullanımı yerleşmiş bir yöntemdir (179). RT-PCR, döngüler sırasında reaksiyonlardan floresan sinyal toplayarak sürekli analize olanak verir. Ekspresyonun yanı sıra amplifikasyonlar, delesyonlar ve nokta mutasyonlarının da çalışılmasına olanak sağlayan bu yöntemin üstünlüğü hızında ve ürünlerin birikiminin gerçek zamanlı izlenebilmesinde yatmaktadır (180). RT-PCR tekniği kullanılarak gen ekspresyonu analizi yapılabilmesi için öncelikle total RNA veya mRNA izolasyonu, daha sonra reverse transkriptaz tarafından komplementer DNA (cDNA) sentezi ve son olarak RT-PCR işleminin uygulanması gereklidir. Floresan kaynağı olarak primerlere bağlı ya da onlardan bağımsız floresan işaretleyiciler kullanılır. En sık kullanılanlar arasında hidroliz probları, hibridizayon probları, TaqMan® probları, Molecular Beacon® probları ve SYBR® Green I boyası bulunmaktadır.



Şekil 41. SYBR® Green I boyası etki mekanizması

SYBR® Green I boyası reaksiyonda çoğalan her türlü çift zincirli DNA'ya nonspesifik olarak bağlanır ve çift zincirli DNA'nın artışıyla orantılı olarak floresan sinyal verir (180) (Şekil 41.). Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan SYBR® Green I miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir. PCR reaksiyonunda amplifikasyon ürünlerinin elongasyonu (uzaması) esnasında SYBR® Green I ürünlere bağlanır ve elongasyon safhasının sonunda maksimuma ulaşır. Bu safhada 530 nm de florasan degeri okunur ve ürün miktarı belirlenir. SYBR® Green I oldukça stabil bir boyadır, 30 amplifikasyon döngüsü sonunda sadece % 6 oranında aktivite kaybı gösterir.

SYBR® Green I boyası sekans spesifik olmayıp, herhangi bir çift sarmal DNA ya bağlandığından yöntemin kısıtlılığı non-spesifik ürünlerin alınan sinyal değerlerine katılabilmesidir. Ayrıca, çift sarmal DNA'ya entegre olan SYBR® Green I ortamda hedef moleküller olmadığında, primerlerin kendi aralarındaki bağlanmalar (primer dimer) sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz faktörü gidermek için amplifikasyon ürünlerinin melting curve (erime eğrisi) analizi yapılmaktadır. Her çift sarmal DNA, kendine özgü erime sıcaklığı (Tm, çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale gelmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir. PCR çoğalmasının ardından sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek, belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı kaydedilir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirinden ayrılmaya başlayınca SYBR® Green I boya serbest kalmakta ve floresans miktarı azalmaktadır. Denatürasyon olduğunda floresans sinyal aniden düşmektedir. Erime eğrisinden yararlanılarak amplikonun Tm derecesi saptanabilmektedir. İncelenen örneğe ait Tm derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün Tm derecesiyle karşılaştırılarak, PCR sonucunun doğru veya hatalı olduğuna karar verilmektedir.

Ayrıca çoğaltılan fragmana uygun değerde tek bir pik alınması da reaksiyonda spesifik olmayan ürünlerin olmadığını göstermektedir. Aynı zamanda elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde yürütülmeli ve spesifik olmayan ürünlerin olup olmadığı teyid edilmelidir.

RT-PCR analizlerinde genel olarak mutlak (*absolute*) ya da göreceli (*relative*) olmak üzere iki kantitatif ölçüm stratejisi izlenebilir. Mutlak kantitatif ölçümde elde edilen sinyaller önceden hazırlanmış bir kalibrasyon eğrisi yardımıyla kopya sayısına göre hesaplanarak sonuç verir. Göreceli kantitatif ölçümde ise, belli bir RNA'nın ekspresyon seviyelerindeki değişimin bir başka RNA'nın ekspresyon seviyesine göre oranının ölçülmesine dayanır. Göreceli ölçümde kesin konsantrasyonları bilinen standartlara ya da kalibrasyon eğrisine ihtiyaç yoktur, dizisi bilindiği sürece her türlü transkript referans olarak kullanılabilir. En sık kullanılan referanslar sabit ekspresyonu bilinen genler (*house-keeping* genler) ve evrensel ya da yapay kontrol RNA/DNA molekülleridir. Göreceli kantitatif ölçümde bir basamak daha eklenerek bu göreceli sonuçlar bir kontrol örneğe, tedavisiz bir örneğe ya da olgunun sıfır anındaki örneğine oranlanabilir. Bu basamağa normalizasyon adı verilir (181).

3.6.5.2. RNA İzolasyonu

Örneklerde total RNA izolasyonu GeneJet RNA Purification Kit (Fermentas, MA, USA) ile gerçekleştirildi. Gruplardan alınan EDTA'lı kan örnekleri aynı gün içerisinde çalışıldı. Toplam 500 µL EDTA'lı tam kan örneği kullanıldı.

Kit içeriği;

- Proteinaz K
- Lizis tamponu
- Yıkama tamponu 1 (Kullanım öncesi üzerine 10 mL %96-100'lük etanol eklenir)
- Yıkama tamponu 2 (Kullanım öncesi üzerine 39 mL %96-100'lük etanol eklenir)
- Nükleaz içermeyen su
- GeneJET RNA purifikasyon kolonları
- Toplama tüpleri (1.5 ve 2 mL'lik)

Uygulama Basamakları

- 500 µL EDTA'lı tam kan 400xg'de 5 dak. +4˚C' de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası üstte kalan plazma kısmı atıldı.

- Pellet 600 µL lizis tamponu (12 µL 14.3 M β-Merkaptoetanol içeren) içinde pipetaj yaparak çözüldü.
- Üzerine 450 µL %96-100'lük etanol eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Lizatın 700 µL'si kitin içerisinde varolan GeneJet RNA purifikasyon kolonuna aktarıldı. Kolon oda sıcaklığında 12000xg'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Kolonun altında kalan kısım atıldı ve kolonun üzerine tekrar kalan lizat eklendi. Kolon oda sıcaklığında 12000xg'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Kolon yeni bir toplama tüpü üzerine konuldu.
- Kolon üzerine 700 µL "yıkama tamponu 1" eklendi. Kolon oda sıcaklığında 12000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü içerisinde kalan kısım atıldı.
- Kolon üzerine 600 µL "yıkama tamponu 2" eklendi. Kolon oda sıcaklığında 12000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü içerisinde kalan kısım atıldı.
- Kolon üzerine 250 µL "yıkama tamponu 2" eklendi. Kolon oda sıcaklığında 12000xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü içerisinde kalan kısım atıldı.
- Kolonun alt kısmında bulunan toplama tüpü atıldı ve yerine eppendorf tüp konuldu. Kolon üzerine 50 µL "nuclease içermeyen su" eklendi. Kolon oda sıcaklığında 12000xg'de 1 dakika santrifüj edilerek RNA içeren kısmın eppendorf tüpte kalması sağlandı. Kolon kısmı atıldı ve izole edilen RNA örnekleri buz üzerine alınıp saflık ve miktar tayinleri yapıldı.
- RNA örnekleri cDNA işlemi gerçekleştirilene kadar -80 ˚C de saklandı.

Spektrofotometre cihazı ile örneklerin 260 nm ve 280 nm'de absorbansları ölçüldü. RNA konsantrasyonu aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

Konsantrasyon= A260nm x Seyreltme faktörü x 40 µg/mL

3.6.5.3. RNA'nın % 1 Formaldehit Agaroz Jelde Görüntülenmesi

İzole edilen RNA örneklerinin bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla, RNA örnekleri % 1 Formaldehit agaroz jelde görüntülendi. Çoğu RNA'lar intramoleküler baz eşleşmesinden dolayı sekonder yapılar oluştururlar. Bu durum elektroforez sırasında molekül boyutuna göre örneklerin doğru bir şekilde göç etmesine engel olur. Bu nedenle RNA örnekleri görüntülenirken jele, yürütme tamponuna ve örnek yükleme tamponuna denatürasyon ajanı olan formaldehit eklenir ayrıca örneklerin ısıyla denatürasyonu sağlanır.

İzole Edilen RNA Örneklerinin Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

Uygulama Basamakları;

1. RNA örnek yükleme tamponu ile RNA örnekleri karıştırılarak her kuyucukta 2 µg RNA olacak şekilde hazırlandı.

2. Hazırlanan örnekler 65°C'de 15 dakika inkübe edildi ve bu süre sonunda hızla buz içerisine alındı.

3. Daha önce hazırlanan % 1 formaldehit agaroz jel, elektroforez sistemine yerleştirildi ve üzerine 1X FA yürütme tamponu konuldu.

4. Taraklar jelden dikkatlice çıkarıldıktan sonra örnekler kuyucuklara yüklendi.

5. 80V sabit direnç ve 50mA akımda 30-45 dakika elektroforez uygulandı ve jeller görüntüleme cihazında (Vilber Lourmat, Fransa) görüntülendi.

Kullanılan çözeltiler ve özellikleri Tablo 7.'de gösterildi.

Tablo 7. % 1 Formaldehit agaroz jel yönteminde kullanılan çözeltiler

Çözeltiler	**Özellikleri**
5X Formaldehit (FA) Jel Tamponu	5 mM EDTA, pH 8.0, 100 mM MOPS 40 mM Sodyum Asetat
%1'lik Agaroz Jel (75 mL için)	0,75 gr agaroz, 1X FA Jel Tamponu 2.2 M %37 Formaldehit 46,65 mL RNaz içermeyen dH_2O
RNA Örnek Yükleme Tamponu	1 mM EDTA pH 8,0 % 37 Formaldehit % 50 Gliserol % 0,25 Bromfenol Blue Formamid 5X FA Jel Tamponu 1 µg/mL Etidyum Bromür
1X FA Yürütme Tamponu	120 mL 5X FA Jel Tamponu 480 mL RNaz içermeyen dH_2O

3.6.5.4. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

RNA örneklerinden cDNA eldesi First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, MA, USA) ile gerçekleştirildi. Konsantrasyonu 2,5 µg /mL olan RNA örneği kullanıldı.

Master Mix içeriği;

Oligo$(dt)_{18}$ primer	1 µL
Total RNA örneği	2.5 µg /mL

Toplam hacim "nuclease free water" ile 11 µL'ye tamamlandı ve RNA sekonder yapılarının denatürasyonu amacıyla tüpler, Thermal Block Cycler PCR cihazında 65°C'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler hemen buza alındı.

5x reaction buffer	4 µL
RNase inhibitor (20 u/µL)	1 µL
10 mM DNTP	2 µL
M-MulV Reverse Transcriptase (20 u/µL)	2 µL

Örnekler buz üzerinde iken yukarıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımının içeriği her bir örnek için; 4µL reaksiyon tamponu (5x), 1 µL RNase inhibitor (20 u/µL), 2 µL 10 mM DNTP ve 2 µL M-MulV Reverse Transcriptase (20 u/µL). Bu reaksiyon karışımından her bir örneğe 9µL eklendi.

Örneklerden termal cyclerda 37 ºC de 60 dak, 70 ºC de 5 dak ve 4 C° ∞ zaman olarak kurulan PCR protokolüyle cDNA işlemi gerçekleştirildi. cDNA ürünlerinin kontrolü Dream Taq Green PCR Master Mix (Fermentas, MA, USA) kiti ile gerçekleştirildi.

Kullanılan GAPDH (Glukoz 6-Fosfat dehidrohenaz) primerleri (10 µM);

Forward:

5'-CAAGGTCAATCCATGACAACCTTTG-3'

Reverse:

5'- GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'

Örnekler çalışılıncaya kadar -80ºC de saklandı.

3.6.5.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Çalışmaları

RT-PCR çalışmaları Maxima Sybr Green qPCR Master Mix (2x) (Fermentas, MA, USA) kiti ile gerçekleştirildi. OGG1 ve NEIL1 ekspresyonlarının belirlenmesi için üçer farklı primer seti (OGG1 253a-b, 385 a-b, 955a-b, NEIL1 3a-b, 192a-b, GK111a-b) ile optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. β-aktin "housekeeping gen" olarak kullanıldı. Optimizasyon çalışmalarına ait bulgular EK-4'te verilmektedir.

Optimizasyon çalışmaları sonucunda hem RT-PCR erime eğrisi analizinde tek pik veren hem de agaroz jel elektoroforezinde tek bant olarak görülen ürünleri çoğaltmak için kullanılan uygun OGG1, NEIL1 primer setlerinden biri (OGG1 için 955a-b primer seti, NEIL1 için GK111a-b primer seti) ile asıl çalışmalar gerçekleştirildi. Örnek sayısına göre Master mix hazırlandı (Tablo 9.). RT-PCR çalışması için uygun PCR protokolü (Tablo 10.) optimize edildi.

Kullanılan primerlerin dizileri ve amplikon uzunlukları Tablo 8.'de verilmiştir.

Tablo 8. Primer dizileri ve PCR ürün uzunlukları

Primer Adı	Primer Dizisi	PCR Ürün Uzunluğu
OGG1 (955a)-F	5' -CCGAGGAGACAAGAGCCAGG- 3'	182 bps
OGG1 (955b)-R	5' -CGATGGGGTCTTGTCGCAGC- 3'	
NEIL1(GK111a)-F	5' -CGGCGGCTGCGTGGAGAAGTC- 3'	300 bps
NEIL1(GK111b)-R	5' -GTCCCAGCGGCCGAACCGGC- 3'	
β-AKTİN-F	5' -CCACACTGTGCCCATCTACG- 3'	99 bps
β-AKTİN-R	5' -AGGATCTTCATGAGGTAGTCAGTCAG- 3'	

Tablo 9. RT-PCR Master mix içeriği

Reaktifler	***Tek örnek için miktar***
PCR grade dH_2O	4,5 µL
Forward Primer (5 µM)	1,5 µL
Reverse Primer (5 µM)	1,5 µL
Sybr green PCR Mmix	12,5 µL
cDNA örneği	5 µL
Toplam	25 µL

Mastermix ve cDNA örneği önceden soğutulmuş kapiller tüplere konuldu. Kapiller tüpler 800 rpm'de 30 saniye spin yapılarak karışımın kapillerin dibinde toplanması sağlandı. Kapiller tüpler cihaz rotoruna yerleştirildi. Amplifikasyon LightCycler 1.5 RT-PCR cihazında gerçekleştirildi. Her bir örnek uygun PCR protokolüyle 3'er kez çalışıldı. Çıkan sonuçların ortalamaları hesaplandı.

Tablo 10. RT-PCR Protokolü

	İşlem	**Sıcaklık**	**Süre**	**Artış (°C/s)**	**Veri Alımı**
1.Denatürasyon (1 siklus)	İlk denatürasyon	95 °C	5'	20	-
2.Amplifikasyon (40 siklus)	Denatürasyon	95 °C	15''	20	-
	Bağlanma	65 °C	10''	20	-
	Uzama	72 °C	30''	20	Tek
3.Erime eğrisi (1 siklus)	Denatürasyon	95 °C	0	20	-
	"Reannealing"	65 °C	15''	20	-
	Denatürasyon	95 °C	0	0,1	Sürekli
4.Soğuma	Soğuma	40 °C	30''	20	-

3.6.5.6. % 1,5'lik Agaroz Jel Elektroforezi

RT- PCR sonucunda beklenen ürünün elde edilip edilmediğini anlayabilmek için her bir reaksiyonun 10 µL'si, %1,5'lik agaroz jelde yürütülerek bantlar kontrol edildi. Kullanılan çözeltiler Tablo 11.'de gösterildi.

Tablo 11. % 1,5 agaroz jel yönteminde kullanılan çözeltiler

Çözeltiler	**Özellikleri**
TAE 50X Tamponu (1 L için)	242 gr Trizma Baz 57,1 mL Glasiyel asetik asit 100 mL 0.5 M EDTA (pH:8,0)
%1,5 Agaroz Jel (50 mL için)	0,75 gr Agaroz 10 µL Etidyum bromür (1 mg/mL) 1000 µL TAE 50x 50 mL'ye dH_2O ile tamamlanır.
5X Örnek Yükleme Tamponu	250 mg Bromfenol mavisi 3 mL Gliserol 7 mL dH_2O
1X TAE Yürütme Tamponu	12 mL TAE 50X Tamponu 600 mL'ye dH_2O ile tamamlanır.

Uygulama Basamakları;

1. Daha önce hazırlanan % 1,5 agaroz jel, elektroforez sistemine yerleştirildi ve üzerine 1X TAE yürütme tamponu konuldu.

2. 5X örnek yükleme tamponu (2 µL) ile örnekler (10 µL) karıştırıldı.

3. Aynı zamanda "DNA Molecular Weight Marker XIV (100 bp ladder)" da örneklerle birlikte jele yüklendi. 2 µL 5X örnek yükleme tamponu ile 2 µL marker karıştırıldı.

4. Taraklar jelden dikkatlice çıkarıldıktan sonra örnekler ve marker kuyucuklara yüklendi.

5. 80V sabit potansiyel, 50mA akımda 30-45 dakika elektroforez uygulandı ve jeller Vilber Lourmat cihazında görüntülendi.

3.6.5.7. OGG1 ve NEIL1 mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

RT-PCR işleminde elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde genellikle kullanılan iki yöntemden birisi olan göreceli kantifikasyon (karşılaştırmalı Ct) metodu ile; bir internal kontrol (örn: bir başka gen lokusu) kullanılarak, PCR'nin üstel fazında amplifikasyonları karşılaştırılarak gen ekspresyon düzeyleri yorumlandı. Ct (treshold cycle) değeri eşik değere ulaşmak için gerekli döngü sayısı olarak tanımlanmaktadır (182).

Kontrol (referans) ile araştırılan gen bölgesinin arasındaki Ct (cycle of treshold) değer farklılığı "housekeeping gen" ile normalize edilip ΔΔCt oranı hesaplanarak bulundu.

[delta] [delta] Ct = [delta] Ct, örnek - [delta] Ct, referans

Bu formüle göre; [delta] Ct örnek, ilgilenilen örneğe ait Ct değeri ile housekeeping genin Ct değer farklılığı hesaplanarak, [delta] Ct referans ise, kontrole ait Ct değeri ile housekeeping genin Ct değer farklılığı hesaplanarak bulundu. Karşılaştırmalı Ct metoduna göre gen ekspresyon düzeyleri, elde edilen bu değerlerin $2^{-[\text{delta}]\ [\text{delta}]\ Ct}$ formülünde yerine konulması ile yorumlandı (182,183).

3.6.6. Matriks Metalloproteinazlar ve İnhibitörlerinin Analizi

Heparinli plazma örneklerinde MMP2, MMP9, TIMP1 ve TIMP2 düzeyleri sandwich ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (RayBio Human MMP-2, MMP9, TIMP1 ve TIMP2 ELISA Kitleri-Norcross, GA, USA) yöntemi ile ölçüldü.

ELISA yöntemine göre, standartlar ve örnekler immobilize poliklonal antikorlar ve HRP (horseradish peroxidase) ile konjuge poliklonal spesifik antikorlar arasında sandviçlendi. Bağlanmamış materyallerin yıkama ile uzaklaştırılmasından sonra HRP enzim substratının (perborate/3,3',5,5'–tetramethylbenzidine) eklenmesinden bir süre sonra işlem durdurularak oluşan renk 450 nm. dalga boyunda ölçüldü. MMP'ler ve inhibitörlerinin değerleri, çizilen standart grafikten yararlanılarak, ng/mL olarak hesaplandı.

TIMP1 ve TIMP2 çalışmasında örnekler dilüsyon tamponu ile 1/300 oranında, MMP9 çalışmasında 1/200 oranında dilüe edilerek, MMP2 çalışmasında ise örnekler dilüsyonsuz çalışıldı. Saptanan değerler dilüsyon katsayısı ile çarpılarak gerçek değerlere ulaşıldı.

Std. Konsantrasyonları:

- MMP2: 800, 320, 128, 51.2, 20.5, 8.2, 3.3 ng/mL
- MMP9: 18000, 6000, 2000, 666.7, 222.2, 74.07, 24.69, 8.23 pg/mL
- TIMP1: 18000, 6000, 2000, 666.7, 222.2, 74.07, 24.69 pg/mL
- TIMP2: 1200, 400, 133.3, 44.4, 14.8, 4.9, 1.6 pg/mL

Uygulama Adımları

1. 96 kuyucuklu bir mikroplak üzerine kör, standart ve örneklerden 100'er µL konuldu ve plağın üzeri kapatıldı.

2. 2,5 saat oda sıcaklığında mikroplak çalkalayıcıda hafifçe karıştırılarak inkübe edildi.

3. Kuyucuklardaki çözelti döküldü ve yıkama tamponu ile 4 kere yıkama yapıldı.

4. Her kuyucuğa 100'er µL biyotinlenmiş antikor konuldu ve hafifçe karıştırılarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

5. Kuyucuklardaki çözelti döküldü ve yıkama tamponu ile 4 kez yıkama yapıldı.

6. Her kuyucuğa 100'er µL HRP-Streptavidin çözeltisi konuldu ve hafifçe karıştırılarak oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edildi.

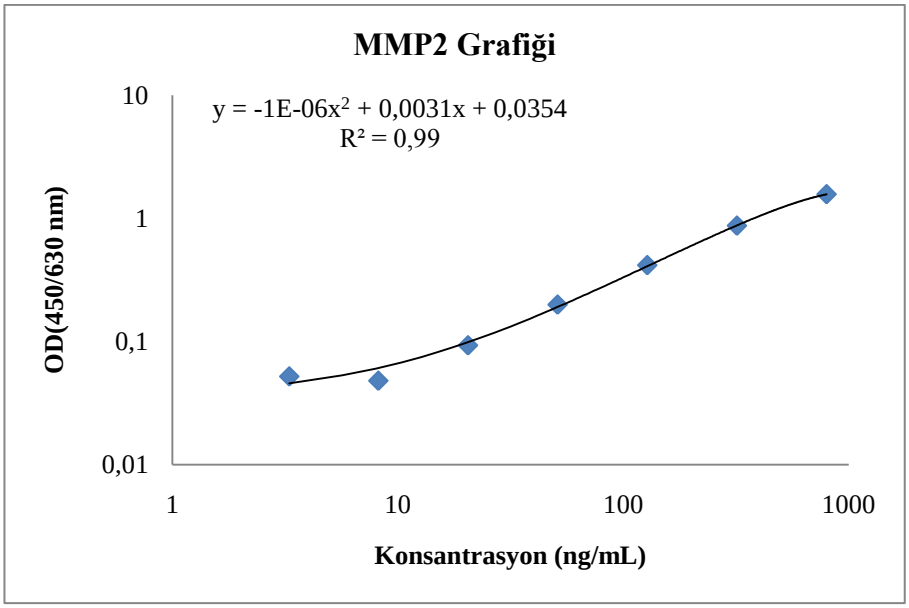
7. Kuyucuklardaki çözelti döküldü ve yıkama tamponu ile 4 kere yıkama yapıldı.

8. Her kuyucuğa 100'er µL "TMB-One Step Substrate" reaktifi konuldu ve hafifçe karıştırılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.

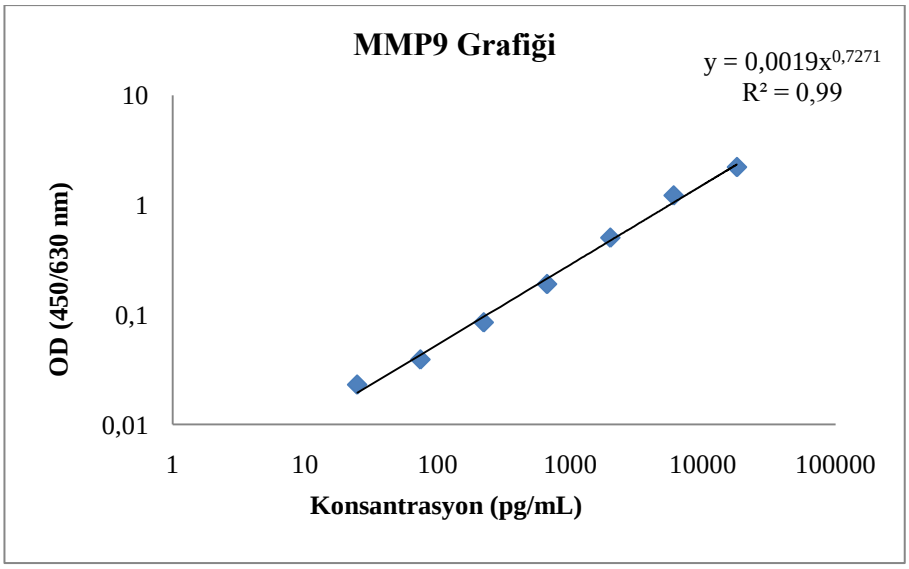
9. Daha sonra her kuyucuğa 50'şer µL "Stop Solution" eklendi

10. ELISA okuyucuda 450/630 nm'de örnek ve standartların absorbans değerleri okundu.

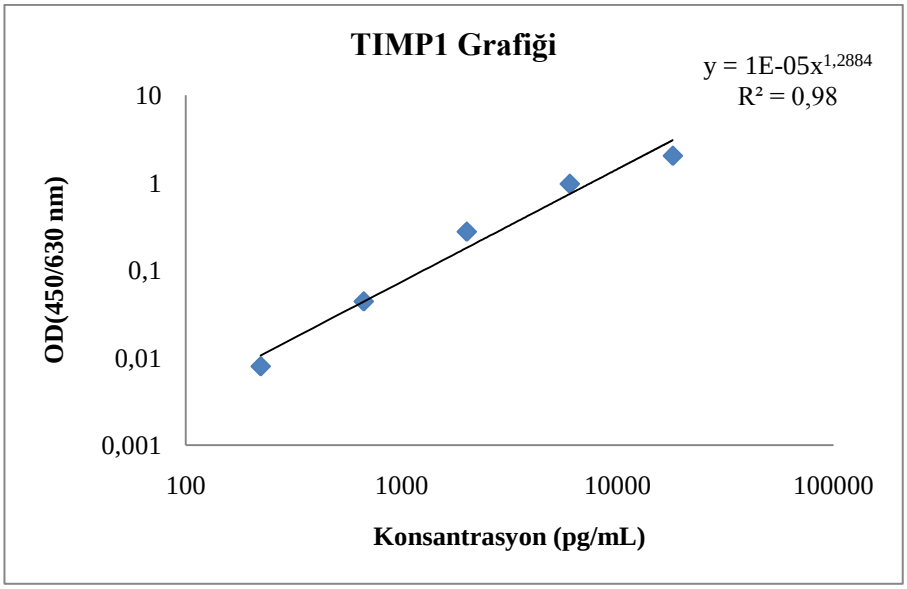
11. Elde edilen absorbans verileri ve karşılık gelen standart konsantrasyonları kullanılarak logaritmik skalada 4 ayrı ELISA çalışması için standart grafikler çizildi (Şekil 42, 43, 44, 45.) ve bu grafiklerden yararlanılarak örneklerin total MMP2, MMP9, TIMP1 ve TIMP2 konsantrasyonları hesaplandı. Tüm sonuçlar ng/mL olarak ifade edildi.



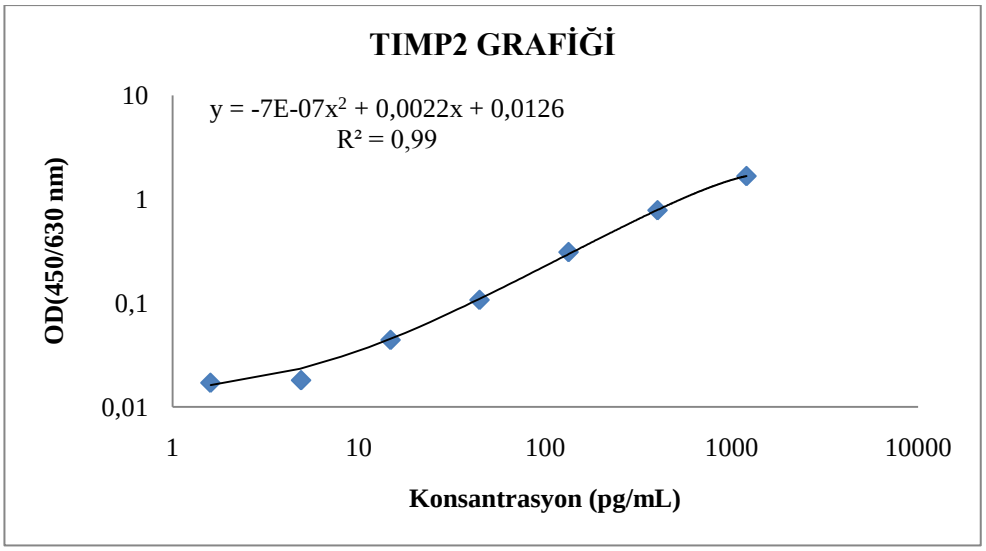
Şekil 42. MMP2 çalışması standart eğrisi



Şekil 43. MMP9 çalışması standart eğrisi



Şekil 44. TIMP1 çalışması standart eğrisi



Şekil 45. TIMP2 çalışması standart eğrisi

3.6.7. Lipid Hasarı Çalışmaları

Alzheimer hasta ve kontrol gruplarında oksidatif stres sonucu oluşan lipid hasarını araştırmak için malondialdehit (MDA) düzeyi ölçümü yapıldı.

3.6.7.1. HPLC Yöntemi ile MDA Ölçümünün Temel İlkesi

MDA analizi yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) tekniği ile gerçekleştirildi. MDA, 95 °C'de tiobarbütirik asit (TBA) ile inkübe edilince TBA-MDA bileşiği oluşur ve

oluşan bu yapı 515 nm'de eksitasyon 553 nm'de ise emisyon verir. Bilinen konsantrasyonlara karşı ölçülen piklerin altındaki alan ile oluşturulmuş standart eğri, örneklerdeki MDA miktarını belirlemede kullanıldı (Şekil 46.). MDA konsantrasyonu µmol/L olarak ifade edildi. Herbir örnek ve standartlar duplike çalışıldı.

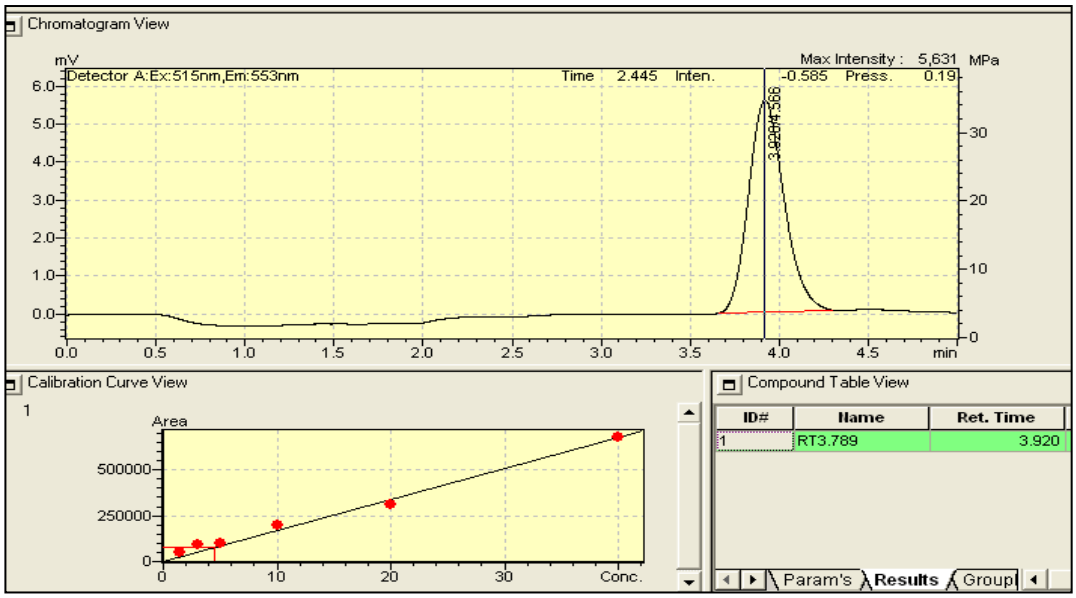
3.6.7.2. Analiz Koşulları

Kolon: 150x 4,6mm 5µM tanecik çapında C18 kolon (GL Sciences/Inertsil ODS-3) kullanıldı.
Mobil faz: KH_2PO_4(0,01M) ve K_2HPO_4(0,01M) %30 metanol içerecek şekilde hazırlandı. Potasyum fosfat tamponu pH:7 olacak şekilde ayarlandı. Mobil faz 0,2 µm çapında filtreden geçirilerek süzüldü.
Mobil faz akış hızı 0,8 mL/dakika, fırın sıcaklığı 30 °C, gradiyent programı izokratik olarak ayarlandı.
Dedektör: Floresans (eksitasyon 515 nm, emisyon 553 nm)
Standart için çözgen: Saf su kullanıldı.

<u>Uygulama basamakları;</u>

- 40 µL, örnek (plazma) veya standart (1,1,3,3 tetraethoxy propane %97 d=0.92 sigma T 9889) kapaklı cam tüplere kondu.
- 100 µL saf su ilave edildi.
- 20 µL, 2,8 mmol/L bütillenmiş hidroksi toluen (BHT, etanolde) ilave edildi.
- 40 µL, % 8,1'lik SDS eklendi. 600 µL TBA eklendi. (8 g/L TBA+Asetik asit karışımı ilave edildi. TBA, 200 mL/L asetik asid ile 1:1 dilue edildi, 2 M NaOH ile pH 3.5'e ayarlandı)
- 95 ˚C'de su banyosunda 1 saat bekletildi. Su banyosundan çıkarıldıktan sonra örnekler buz üzerinde soğutuldu.
- 200 µL saf su, 1000 µL bütanol:piridin (15:1) ilave edildi ve tam 1 dakika vortekslenerek karıştırıldı. Tüpler 2-3 dakika bekletildi.
- Renkli üst (organik) fazın kendiliğinden ayrıldığı gözlendi. Üst fazlar eppendorf tüplerine alındı. 10000 rpm'de 5-10 dakika santrifüj edildi.
- HPLC cihazına 10 µL enjeksiyon yapıldı.

- 0.75, 1.5, 3, 5, 10, 20, 40 µmol/L konsantrasyonlara karşı ölçülen piklerin altındaki alan ile oluşturulmuş standart eğri kullanılarak örneklerdeki MDA miktarları belirlendi (Şekil 46.).
- Sonuçlar µmol/L olarak ifade edildi.



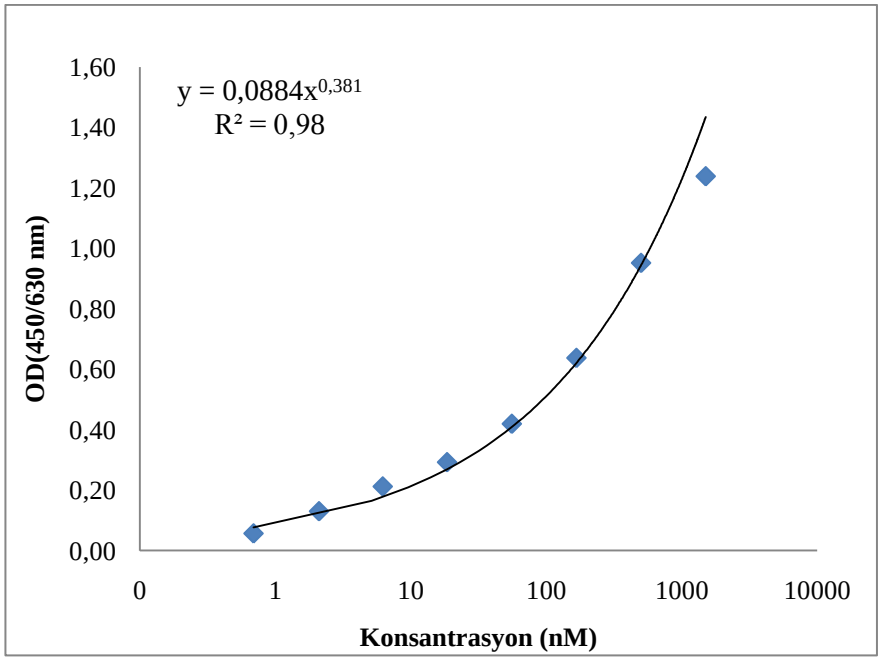
Şekil 46. MDA çalışması standart eğrisi ve örnek analiz çalışması

3.6.8. Protein Hasarı Çalışmaları

Heparinli plazma örneklerinde nitrotirozin düzeyi sandwich ELISA (OxisResearch-Bioxytech ELISA Kit, USA) yöntemi ile ölçüldü. Ön çalışma sonuçları doğrultusunda örnekler dilüe edilmeden çalışıldı.

Std. Konsantrasyon Değerleri; 1500, 500, 166.7, 55.6, 18.5, 6.2, 2.1, 0.69 nM

Elde edilen ön çalışma bulgularına göre bazı örneklerin kit prosedüründe belirtilen standart konsantrasyon değerleri aralığının (1500-2,1 nM) altında kaldığı gözlendi. O nedenle kit içerisinde bulunan stok standart çözeltisi seri dilüsyonla 1500-0,69 nM aralığında olacak şekilde dilüe edilerek standart örnekler hazırlandı. Hasta ve kontrol örneklerine ait asıl çalışmalar bu aralıkta hazırlanan standartlarla birlikte gerçekleştirildi.



Şekil 47. Nitrotirozin çalışması standart eğrisi

Uygulama Basamakları;

1. 96 kuyucuklu bir mikroplak üzerine kör, standart ve örneklerden 100'er µL konuldu ve plağın üzeri kapatıldı.

2. 1 saat oda sıcaklığında mikroplak karıştırıcıda hafifçe karıştırılarak inkübe edildi.

3. Kuyucuklardaki çözelti döküldü ve yıkama tamponu ile 4 kere yıkama yapıldı.

4. Her kuyucuğa 100'er µL nitrotirozin antikoru pipetlendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

5. Kuyucuklardaki çözelti döküldü ve yıkama tamponu ile 4 kere yıkama yapıldı.

6. Her kuyucuğa 100'er µL Streptavidin Peroksidaz çözeltisi pipetlendi oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

7. Kuyucuklardaki çözelti döküldü ve yıkama tamponu ile 4 kere yıkama yapıldı.

8. Her kuyucuğa 100'er µL "TMB Substrate" reaktifi pipetlendi ve oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.

9. Daha sonra her kuyucuğa 100'er µL "Stop Solution" eklendi.

10. ELISA okuyucuda 450/630 nm'de örnek ve standartların absorbans değerleri okundu.

11. Elde edilen absorbans verileri ve karşılık gelen standart konsantrasyonları kullanılarak standart grafik çizildi ve bu grafikten yararlanılarak (Şekil 47.) örneklerin nitrotirozin konsantrasyonları hesaplandı. Sonuçlar nM olarak ifade edildi.

3.6.9. Karbohidrat Hasarı Çalışmaları

Alzheimer hastalarında oksidatif stres sonucu oluşan karbohidrat hasarını araştırmak için kontrol ve hasta örneklerinde N^{ε}-Karboksimetillizin (CML) ölçümü yapıldı.

3.6.9.1. HPLC yöntemi ile N^{ε}-Karboksimetillizin Ölçümünün Temel İlkesi

Deneysel prosedür, plazma proteinlerinin trikloroasetikasit ile çöktürülmesi ve asidik koşullar altında hidrolizi basamaklarından oluşmaktadır. Hidroliz sonucu, N^{ε}-Karboksimetillizin (CML) ürünü FMOC (9-fluorenylethoxycarbonyl) ile türevlendirilir ve HPLC yöntemi ile ayrımlanır. Bilinen konsantrasyonlara karşı ölçülen piklerin altındaki alan ile oluşturulmuş standart eğri, plazma örneklerindeki CML miktarını belirlemede kullanıldı. CML konsantrasyonu μg/mL olarak ifade edildi. Herbir örnek ve standart duplike çalışıldı.

3.6.9.2. Analiz Koşulları

Kolon: Zorbax Stable Bond (Agilent) C8 kolonu (150x4.6, 3.5 μm)

Mobil faz:

A= 25 mM Potasyum Fosfat Tamponu pH:2.0

B= Asetonitril

Analit Elüsyonu: Gradiyent program

0-17.5 dak. %80 A, %20 B

17.5-22.5 dak arası %15 A, %85 B

22.5-35 dak arası %80A, %20 B

Akış hızı: 1.3 mL/dak

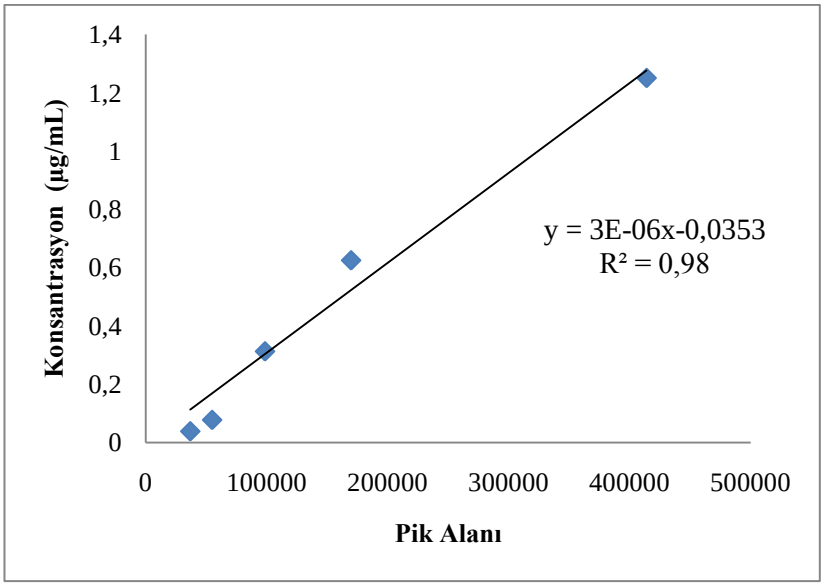
Enjeksiyon hacmi: 10 µL

Dedektör: Floresans- eksitasyon 260 nm, emisyon 310 nm olacak şekilde ayarlandı.

Kullanılan Standart: N^{ε}-Karboksimetillizin (500 mg) standardı 10 mg olarak tartıldı ve 1 mL distile suda çözülerek stok standart çözelti hazırlandı (10 mg/mL).

Uygulama Basamakları;

- 200 µL plazma + 1000 µL %10'luk çözünmüş trikloro asetik asit 10 mL'lik cam tüpe pipetlendi. 10 dak inkübasyona bırakıldı.
- Örnekler 3300 x g de 10 dak. santrifüjlendi. Süpernatan atıldı.
- Kalan pellet 1000 µL 6M hidroklorik asitte çözüldü.
- Örnekler azot gazı altından geçirildi ve 110 ˚C'de 20 saat hidroliz edildi.
- Oda sıcaklığına gelen örneklerin üzerine 1000 µL 5 M NaOH eklendi, vortekslendi. 3300 x g de 10 dak santrifüjlendi.
- Santrifüj sonucu süpernatan başka tüpe alındı. Elde edilen süpernatandan 20 µL yeni bir tüpe alındı ve üzerine 180 µL sodyum borat tamponu (pH: 10.4) pipetlendi.
- Hazırlanan karışımdan 20 µL alındı ve üzerine 180 µL sodyum borat tamponu (pH: 10.4) pipetlendi.
- Üzerine 10 µL 1 mg/mL FMOC solusyonu eklendi ve vortekslendi. Örnek insert viale pipetlendi ve cihaza enjeksiyonu yapıldı.
- 0.039, 0.078, 0.313, 0.625, 1.25 µg/mL konsantrasyonlara karşı ölçülen piklerin altındaki alan ile oluşturulmuş standart eğri kullanılarak örneklerdeki CML miktarları belirlendi (Şekil 48.). CML konsantrasyonları µg/mL olarak ifade edildi. Herbir örnek ve standart çift çalışıldı.



Şekil 48. CML çalışması standart eğrisi

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Hasta ve kontrol örneklerinin toplanması	Eylül 2009- Nisan 2011
DNA baz hasarı çalışmaları	Eylül 2009- Haziran 2012
DNA onarım enzimlerinin ekspresyon çalışmaları	Mart 2010- Ekim 2011
MMP'ler ve inhibitörlerinin ölçümü ve analizi	Haziran 2011-Temmuz 2011
Malondialdehit öçümü ve analizi	Ağustos 2011-Eylül 2011
Nitrotirozin ölçümü ve analizi	Kasım 2011-Aralık 2011
N^{ε}-Karboksimetillizin ölçümü ve analizi	Ocak 2012-Mart 2012
Tez yazımı	Kasım 2012- Mayıs 2013

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Analizlerden elde edilen veriler "Microsoft Excel 2007 ve 2010" programları kullanılarak kaydedildi. İstatistiksel değerlendirmeler, verilerin tablolar ile gösteriminde "SPSS for Microsoft Windows 15,0 (SPSS Inc, Chicago, IL)" kullanıldı. Bağımsız gruplar arası değerlendirme non parametrik veriler için Mann-Whitney U testi ile parametrik veriler için t testi ile gerçekleştirildi. Hasta ve kontrol grupları arasındaki cinsiyet dağılımı Ki-kare

testi ile analiz edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendi. İstatistiksel olarak p değeri < 0,05 ise anlamlı olarak değerlendirildi. Alzheimer ve kontrol gruplarına ait değerler ortalama±standart hata (SEM) olarak ifade edildi. Hem verileri birbiri ile karşılaştırarak, gruplar arasında fark olup olmadığı incelenmek istendiği için hem de tüm parametrelere ait ortalama verilerinin güvenilirlik sınırları içinde olması nedeniyle bulgularda "ortalama ± standart hata" değerleri kullanıldı. Değişkenler arasındaki ilişkinin incelenmesinde parametrik veriler için Pearson korelasyon testi, parametrik olmayan veriler için Spearman korelasyon testi uygulandı. Korelasyonun gücü, 0,00-0,24 arasında ise zayıf; 0,25-0,49 arasında ise orta; 0,50-0,74 arasında ise güçlü ve 0,75-1,00 arasında ise çok güçlü olarak değerlendirildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Toplanan 44 hasta ve 45 kontrol grubundan DNA hasarı ölçümleri için örneklerden elde edilen lökosit ve DNA miktarı hem GC-MS/MS hem de LC-MS/MS ölçümleri için yeterli olamadı. Bu nedenle sadece GC-MS/MS ile ölçümü yapılabilen DNA baz hasarı düzeyleri incelendi. LC-MS/MS ile nükleozit hasarı düzeyleri ölçülen örnek sayısı Alzheimer grubunda 10, kontrol grubunda ise 3 olduğundan istatistiksel hesaplama yapılamadı.

Ayrıca hastalarda enzim ekspresyon düzeylerinin belirlenmesine, DNA baz hasarı düzeyleri belirlendikten sonra elde edilen sonuçlar doğrultusunda karar verilmesinden dolayı, bu parametrelerin çalışılmaya başlanması ilk grup GC-MS/MS ölçümlerinden sonra gerçekleşti. RNA izolasyonu için taze kan örneğiyle çalışma zorunluluğu olması nedeniyle ilk grup hasta ve kontrollerde enzim ekspresyonları çalışılmadı. Ancak daha sonraki serideki toplam 15 hasta ve 20 kontrol olgusundan kan alınıp çalışılabildi.

Tez çalışmasını destekleyen projenin maliyetini aşması nedeniyle MMP'ler ve inhibitörlerinin analizinde kullanılan ELISA kitleri, 30 Alzheimer hastasının ve 30 kontrol olgusunun plazma örneklerinde çalışılabilecek kadar temin edilebildi.

3.10. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma için, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu'ndan 21.08.2008 tarihli ve 298/2008 protokol numaralı 299 karar numarası ile etik kurul onayı alındı (EK-5).

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Gruplarını Tanımlayıcı Bulgular

Tablo 12. Hasta ve kontrol gruplarını tanımlayıcı bulgular

	Alzheimer Grubu	**Kontrol Grubu**
Örnek sayısı (n)	44	45
Ortalama yaş ± SD (Yıl)	77,34 ± 7,9	74,02 ± 6,7
Cinsiyet (E/K)	18/26	20/25
Ortalama MMDT ± SD	15,98 ± 7,7	28,09 ± 1,3

SD: Standart sapma, E: Erkek, K: Kadın, MMDT: Minimental Durum Testi

Alzheimer ve kontrol gruplarının cinsiyet dağılımları arasında anlamlı fark bulunmadı (p= 0,74).

Hasta gruplarının MMDT ortalamaları kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu (p= 0,00).

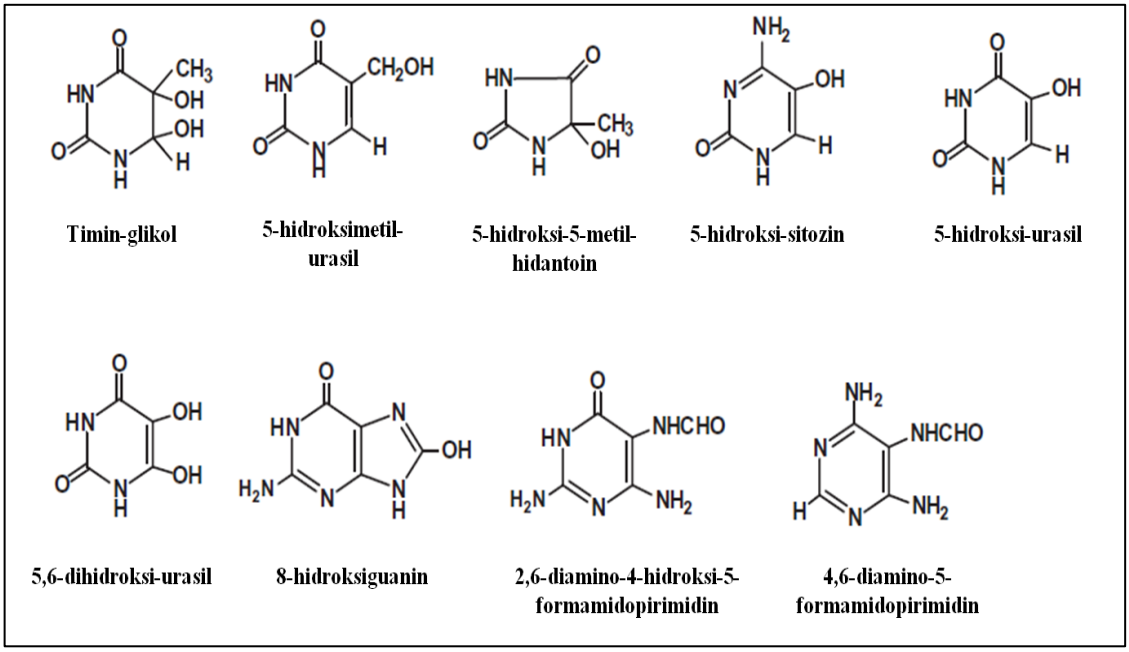
4.2. DNA Baz Hasarı Bulguları

Toplamda 44 AH ve 45 kontrol grubu lökosit örnekleri DNA izolasyonunda kullanıldı. AH grubunda 33, kontrol grubunda ise 37 örneğin DNA izolasyonu gerçekleştirilebildi.

Kan alımı sırasında bazı kişilerden ileri yaşları sebebiyle yeterli düzeyde kan alınamaması ve DNA izolasyonu için kullanılan kan lökosit miktarının kişiden kişiye değişmesi sebebiyle baz hasarı düzeyi çalışılamayan örneklerden yeterli düzeyde DNA (50 μg) elde edilemedi.

Alzheimer hastalarında ve kontrol grubunda, 8-OH-Gua, FapyAde, FapyGua, 5-OH-5MeHyd, 5-OH-Cyt, ThyGly, 5-OH-MeUra, 5-OH-Ura, 5,6-diOH-Ura DNA lezyonlarının ölçümleri izotop dilüsyonlu gaz kromatografi-sıralı kütle spektrometre (GC-MS/MS) ile gerçekleştirildi. Lezyon düzeylerinin GC-MS/MS ile tayini örneklerin cihaza 3'er kez yüklenmesi sonrasında elde edilen sinyal alanlarının, üç farklı proje çalışanı tarafından integrasyonu sonucu elde edilen sayıların ortalaması alınarak gerçekleştirildi.

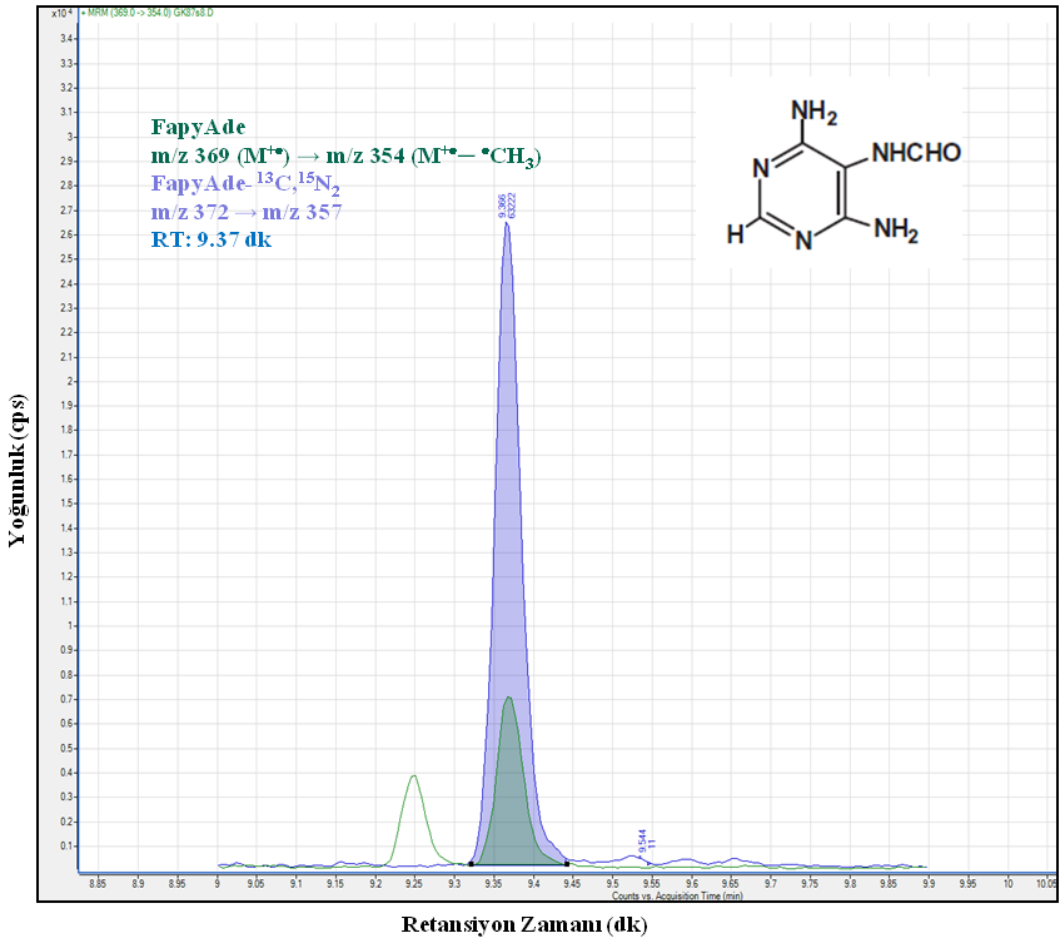
Çalışmada analizi yapılan lezyonların kimyasal yapıları Şekil 49.'da gösterilmektedir.



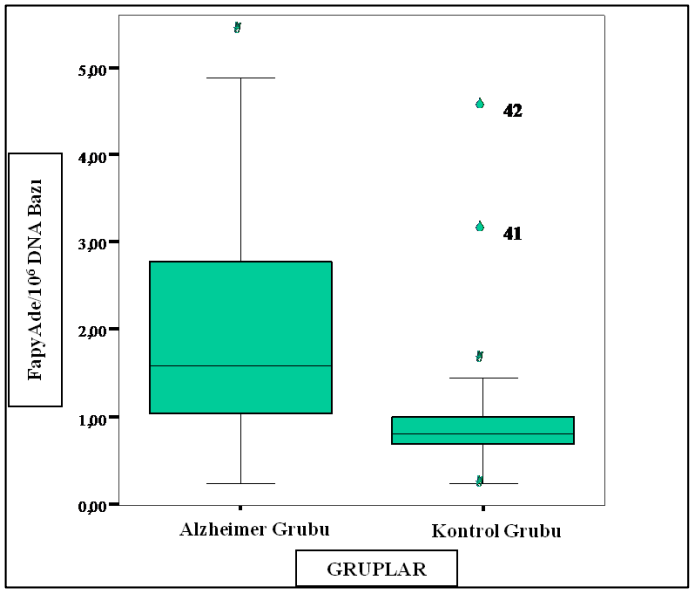
Şekil 49. Analizi yapılan lezyonlar

4.2.1. FapyAdenin Hasarı Bulguları

FapyAde/10^6 DNA bazı düzeyleri ortalaması AH grubunda 2,00±0,24 hasar/10^6 DNA bazı, kontrol grubunda ise 0,95±0,13 hasar/10^6 DNA bazı olarak saptandı. Alzheimer hastalarında FapyAde/10^6 DNA bazı düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (p=0,000) (Şekil 50,51.).



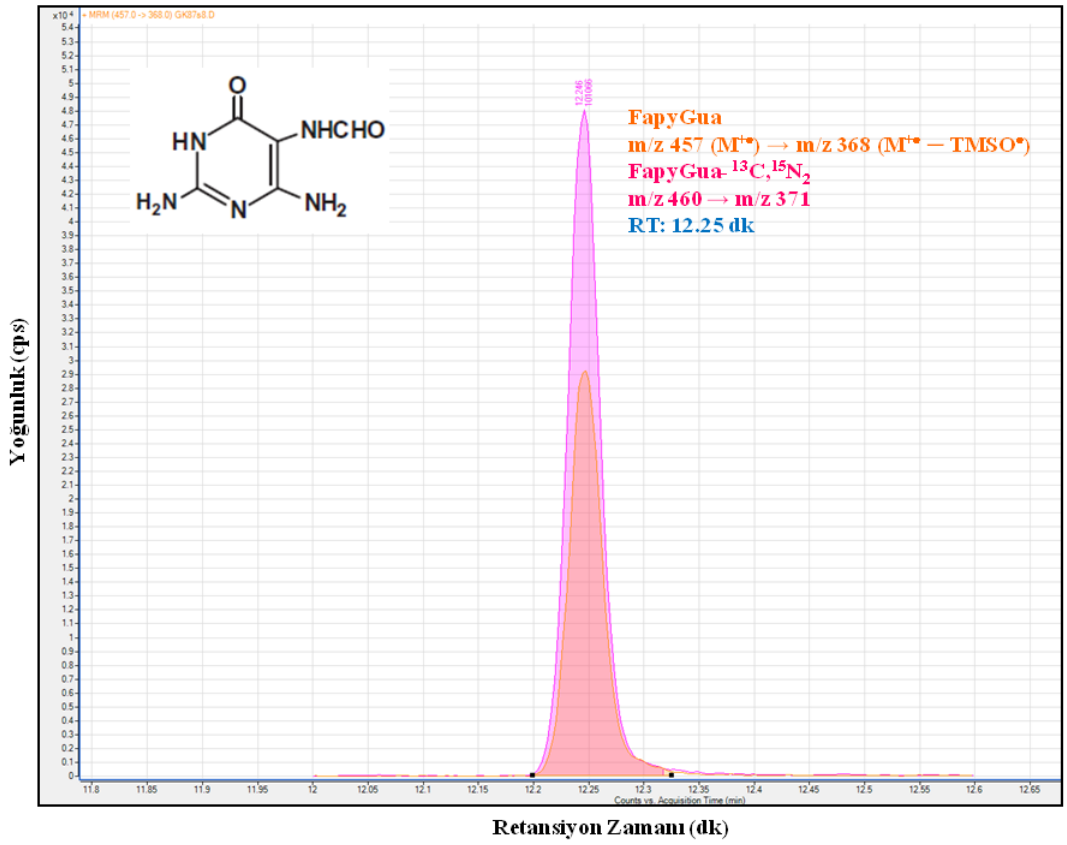
Şekil 50. FapyAde ve FapyAde-$^{13}C,^{15}N_2$ iyon kromatogramları



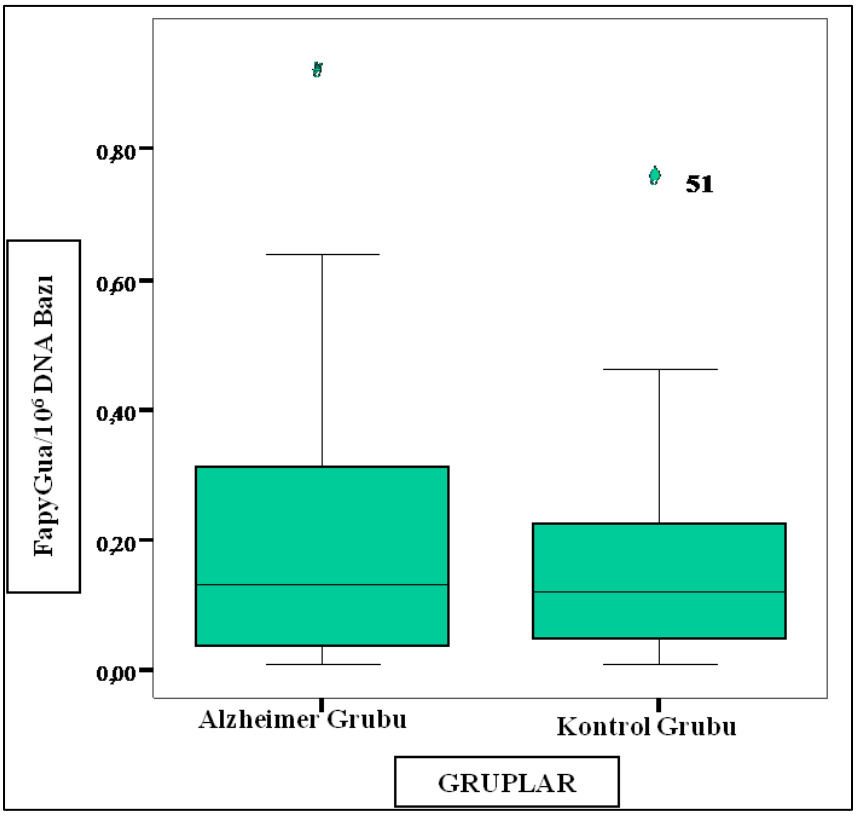
Şekil 51. AH ve kontrol grupları FapyAde düzeyleri kutu nokta grafiği

4.2.2. FapyGuanin Hasarı Bulguları

FapyGua/10^6 DNA bazı düzeyleri ortalaması AH grubunda 0,22±0,05 hasar/10^6 DNA bazı, kontrol grubunda ise 0,17±0,03 hasar/10^6 DNA bazı olarak saptandı. Alzheimer hastaları ve kontrol grupları arasında FapyGua/10^6 DNA bazı düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0,892) (Şekil 52,53.).



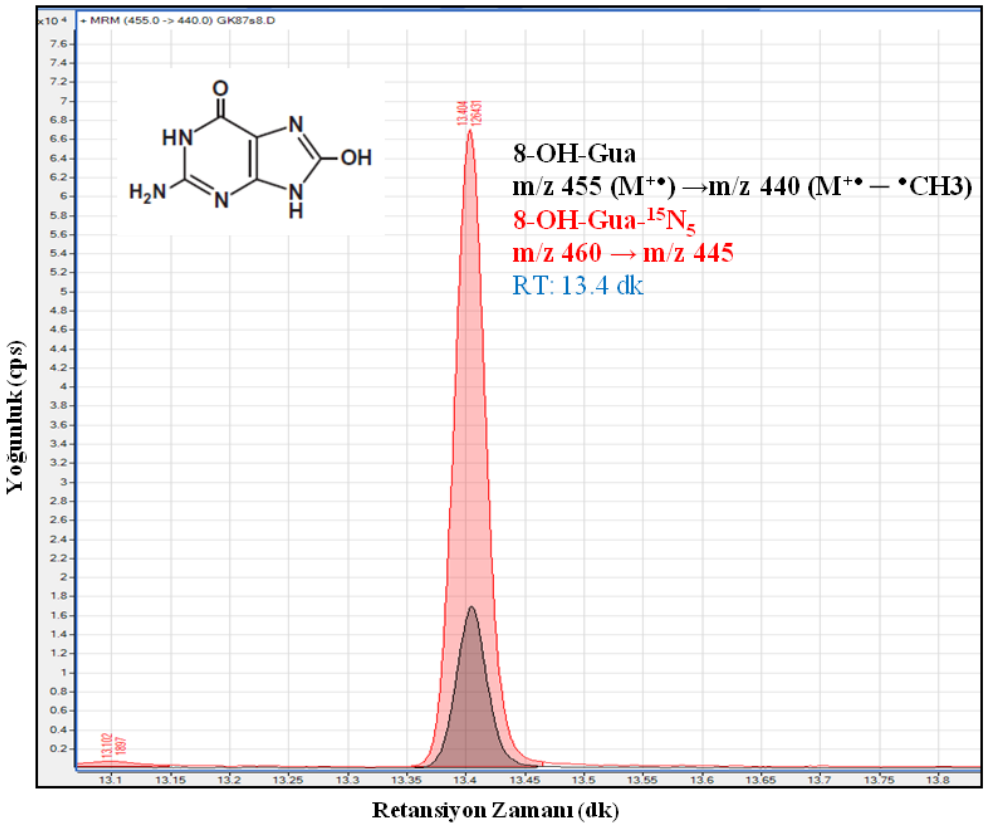
Şekil 52. FapyGua ve FapyGua-$^{13}C,^{15}N_2$ iyon kromatogramları



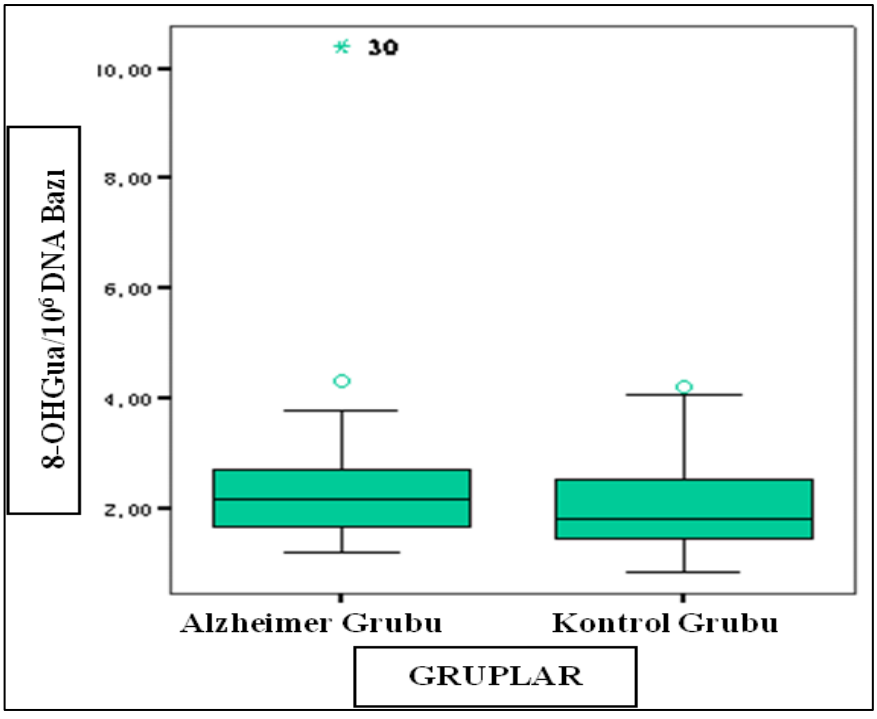
Şekil 53. AH ve kontrol grupları FapyGua düzeyleri kutu nokta grafiği

4.2.3. 8-Hidroksi-Guanin Hasarı Bulguları

8-OHGua/10^6 DNA bazı düzeyleri ortalaması AH grubunda 2,50±0,28 hasar/10^6 DNA bazı, kontrol grubunda ise 2,03±0,13 hasar/10^6 DNA bazı olarak saptandı. Alzheimer hastaları ve kontrol grupları arasında 8-OHGua/10^6 DNA bazı düzeyleri açısından istatistiksel yönden anlamlı bir fark bulunmadı (p=0,12) (Şekil 54, 55.).



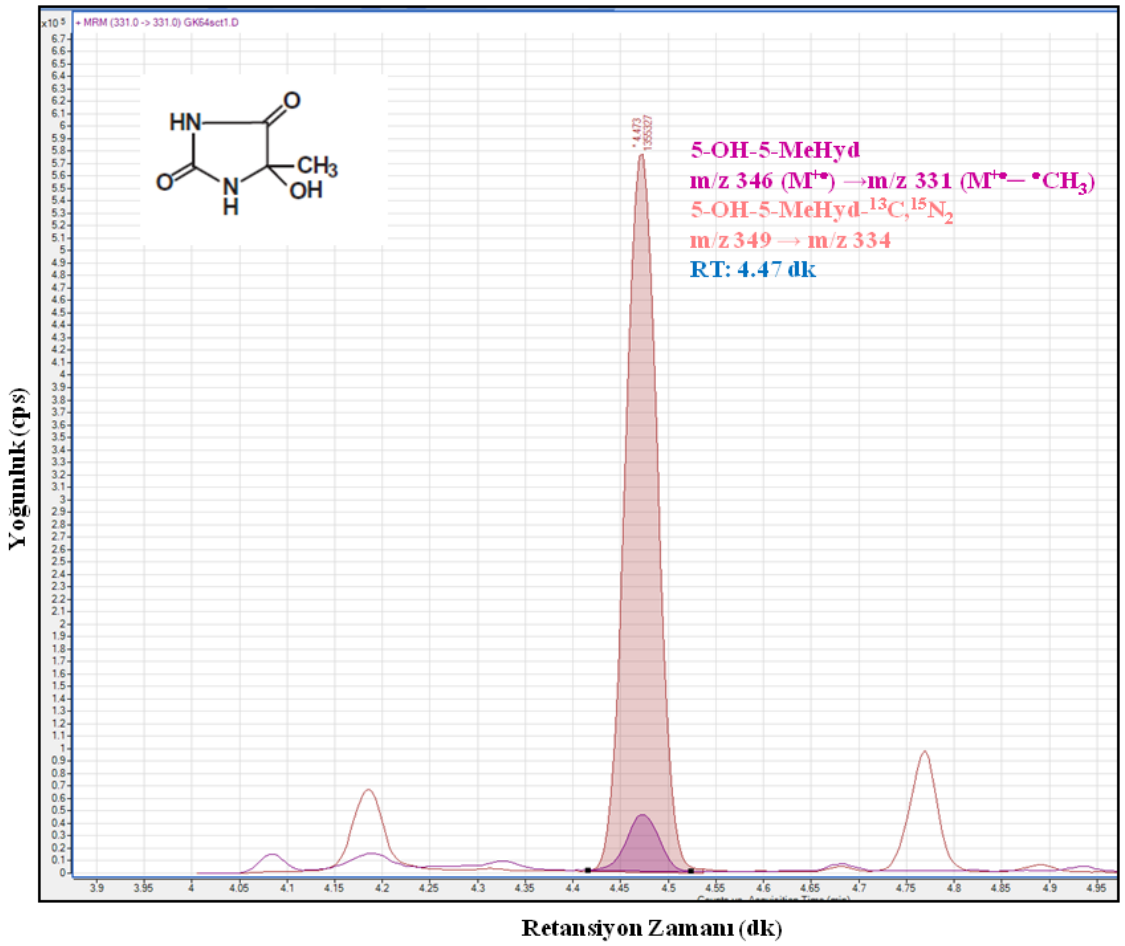
Şekil 54. 8-OH-Gua ve 8-OH-Gua,$^{15}N_5$ iyon kromatogramları



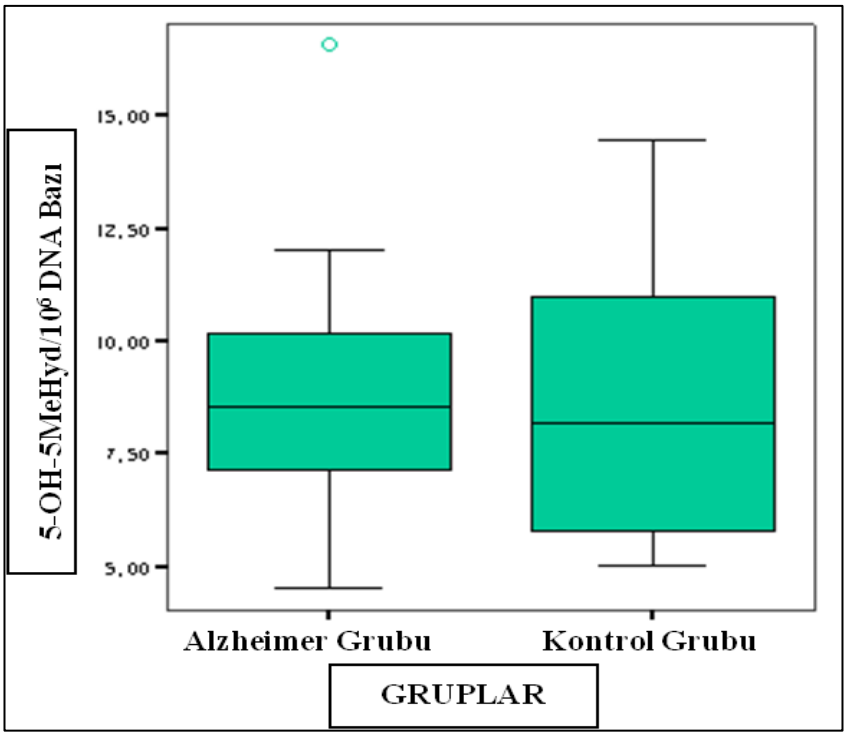
Şekil 55. AH ve kontrol grupları 8-OHGua düzeyleri kutu nokta grafiği

4.2.4. 5-Hidroksi-5-Metil-Hidantoin Hasarı Bulguları

5-OH-5MeHyd/10^6 DNA bazı düzeyleri ortalaması AH grubunda 8,85±0,79 hasar/10^6 DNA bazı, kontrol grubunda ise 8,90±0,83 hasar/10^6 DNA bazı olarak saptandı. Alzheimer hastaları ve kontrol grupları arasında 5-OH-5MeHyd /10^6 DNA bazı düzeylerinde de istatistiksel açıdan anlamlı fark gözlenmedi (p=0,902) (Şekil 56, 57.).



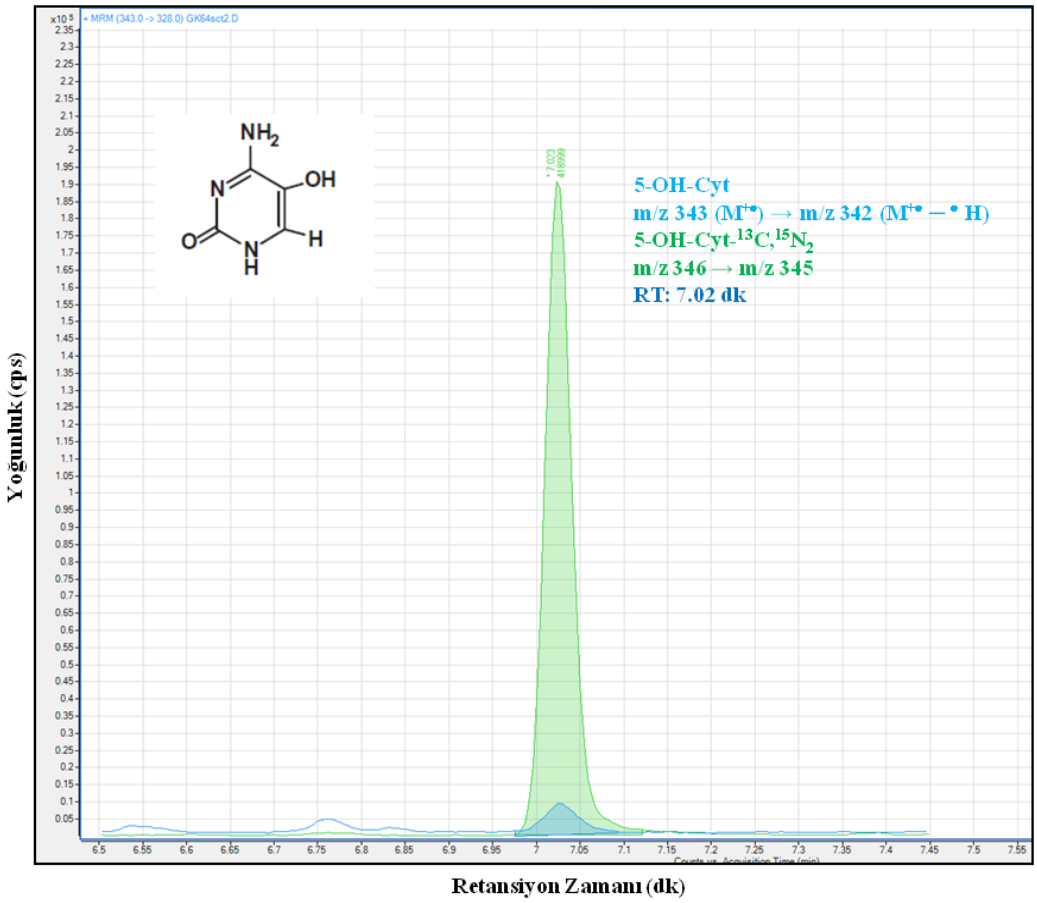
Şekil 56. 5-OH-5-MeHyd ve 5-OH-5-MeHyd,$^{13}C,^{15}N_2$ iyon kromatogramları



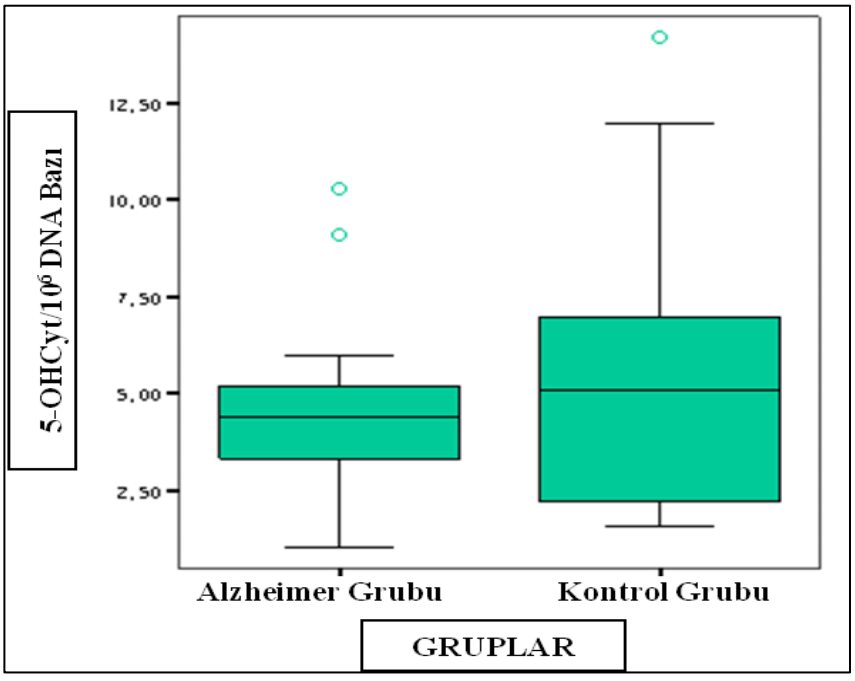
Şekil 57. AH ve kontrol grupları 5-OH-5MeHyd düzeyleri kutu nokta grafiği

4.2.5. 5-Hidroksi-Sitozin Hasarı Bulguları

5-OH-Cyt/10^6 DNA bazı düzeyleri ortalaması AH grubunda 4,47±0,31 hasar/10^6 DNA bazı, kontrol grubunda ise 5,27±0,55 hasar/10^6 DNA bazı olarak saptandı. Alzheimer hastaları ve kontrol grupları arasında 5-OH-Cyt /10^6 DNA bazı düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0,711) (Şekil 58, 59.).



Şekil 58. 5-OH-Cyt ve 5-OH-Cyt,$^{13}C,^{15}N_2$ iyon kromatogramları



Şekil 59. AH ve kontrol grupları 5-OH-Cyt düzeyleri kutu nokta grafiği

4.2.6. Timin-glikol, 5-Hidroksi-metil-urasil, 5-Hidroksi-urasil, 5,6-dihidroksi-urasil Hasarları Bulguları

Ölçümü yapılan ThyGly, 5-OHMeUra, 5-OH-Ura, 5,6-diOH-Ura modifiye bazları düzeyleri hem hasta hem de kontrol grubu örneklerinde ölçülebilecek düzeyde saptanmadı.

4.2.7. Korelasyon Analizleri

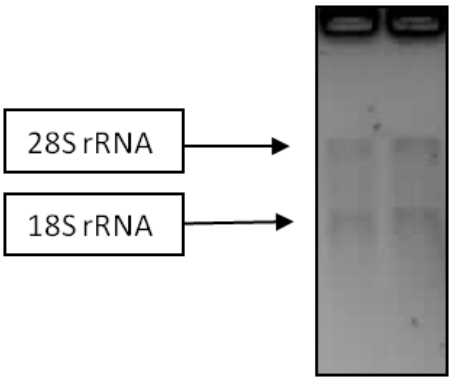
Alzheimer hastalarında tanımlanan DNA lezyonları ile hastaların minimental durum değerlendirme testleri arasında ilişki incelendi. MMDT değerleri ile FapyAde/10^6 DNA bazı düzeyleri arasında olumsuz yönde, zayıf, anlamlı olmayan ($r= -0,028$, $p>0,05$), FapyGua/10^6 DNA bazı düzeyleri arasında olumlu yönde, zayıf, anlamlı olmayan ($\rho= 0,046$ $p>0,05$), 8-OHGua/10^6 DNA bazı düzeyleri arasında olumlu yönde, zayıf, anlamlı olmayan ($\rho= 0,224$, $p>0,05$), 5-OH-5MeHyd/10^6 DNA bazı düzeyleri arasında olumsuz yönde, zayıf, anlamlı olmayan ($\rho= -0,207$, $p>0,05$), 5-OH-Cyt/10^6 DNA bazı düzeyleri arasında olumsuz yönde, orta düzeyde, anlamlı olmayan bir ilişki bulundu ($r= -0,28$, $p>0,05$).

4.3. DNA Onarım Enzimleri Ekspresyon Düzeyleri

Hasta ve kontrol gruplarında GC-MS/MS çalışma sonuçları doğrultusunda bulunan hasarlı bazların onarımında rol alan OGG1 ve NEIL1 enzimlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri ölçüldü.

4.3.1. RNA Örneklerinin %1,2 Formaldehit Agaroz Jelde Görüntülenmesi

İzole edilen RNA örneklerinin intakt olup olmadığını belirlemek amacıyla denatüre koşullar altında agaroz jel elektroforezi uygulandı. Bu jel görüntülerine göre, intakt RNA örnekleri (28S ve 18S‘de keskin bant veren) Real Time PCR (RT-PCR) çalışmalarında kullanıldı (Şekil 60.).



Şekil 60. RNA jel görüntüsü

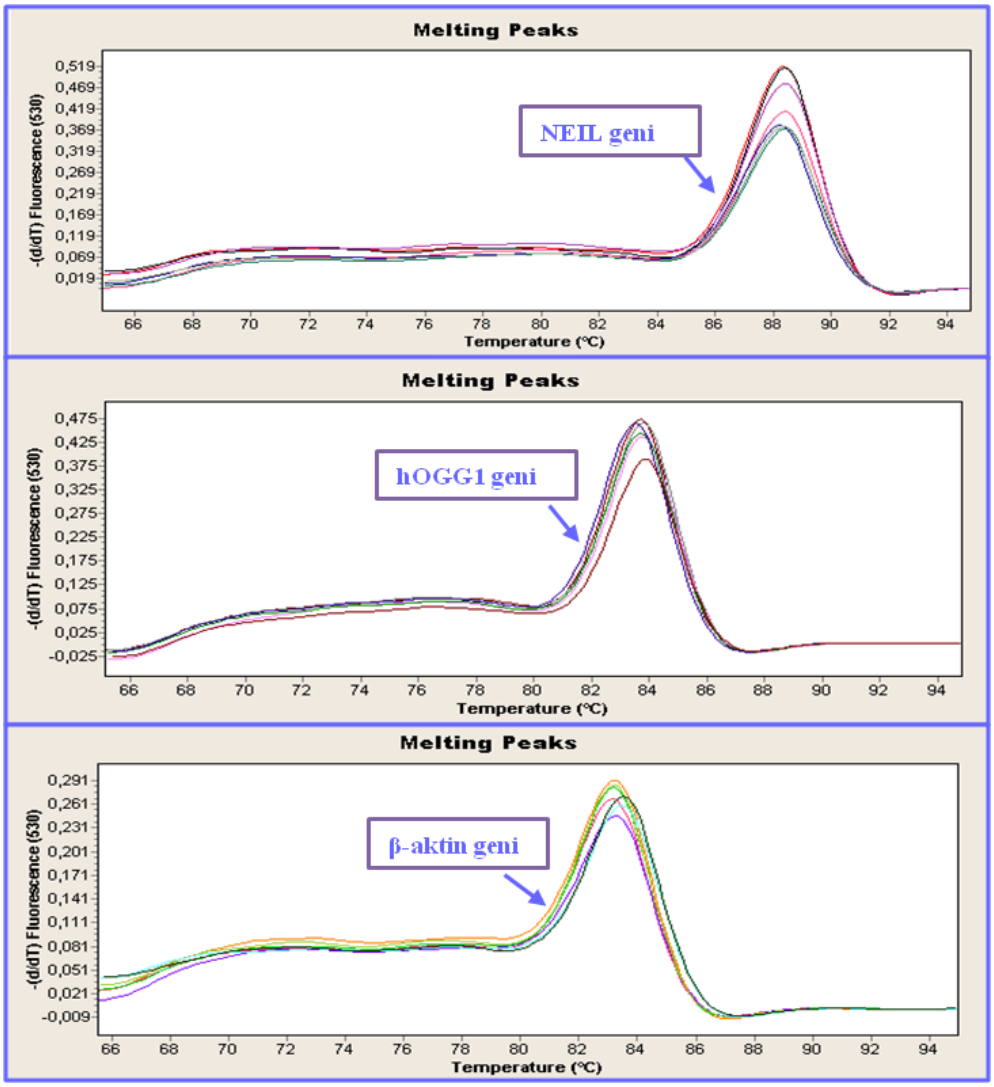
4.3.2. OGG1 ve NEIL1 mRNA Ekspresyon Analizi Bulguları

AH grubundan 15 ve kontrol grubundan 20 örneğe ait NEIL1 ve OGG1 mRNA ekspresyon düzeyleri ölçüldü. Hasta ve kontrol gruplarındaki NEIL1, OGG1 ve β-aktin mRNA ekspresyon düzeyleri, Light Cycler Software 1.5 (Roche Diagnostic, Almanya) kullanılarak belirlendi. Erime eğrisi analizi ile spesifik olmayan piklerin kontrolü yapıldı (Şekil 61.) "Relative Quantification-Monocolor" analizi ile NEIL1 ve OGG1 ekspresyonları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoduna göre hesaplandı (Şekil 62.).

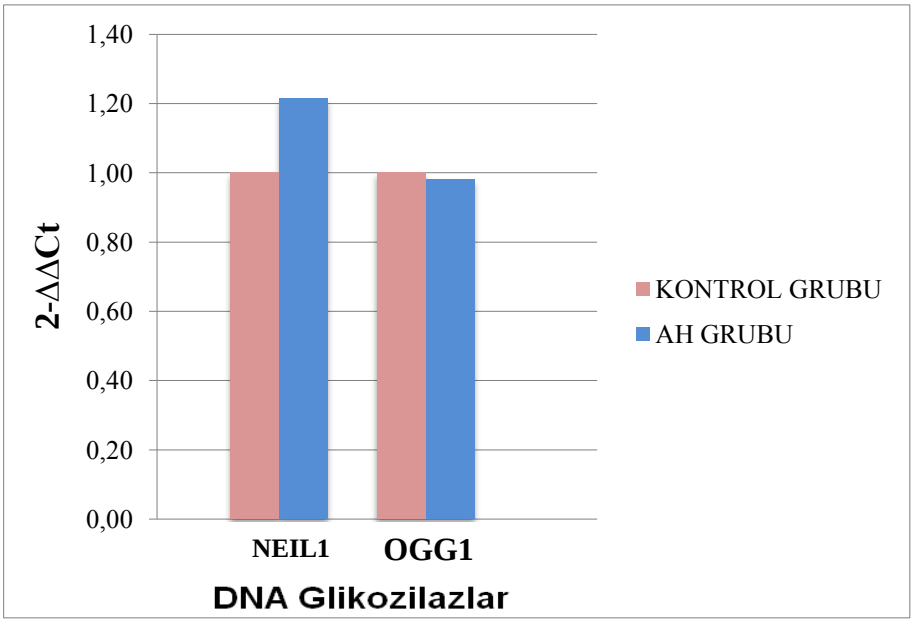
RT- PCR sonucunda beklenen ürünün elde edilip edilmediğini anlayabilmek için her bir reaksiyonun 10 μL'si, % 1,5'lik agaroz jelde yürütülerek bantlar kontrol edildi (Şekil 63. ve 64.). Hasta ve kontrollere ait NEIL1, OGG1 ve β-aktin ekspresyonların ölçümlerinin üçer kez tekrarı sonucu elde edilen % CV değerleri, NEIL1 için 0.6, β-aktin için 1.5 ve OGG1 için 1.2 olarak hesaplandı.

AH grubunda NEIL1 ekspresyonu kontrol grubuna göre 0,21 kat artmış olarak bulundu. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0,877).

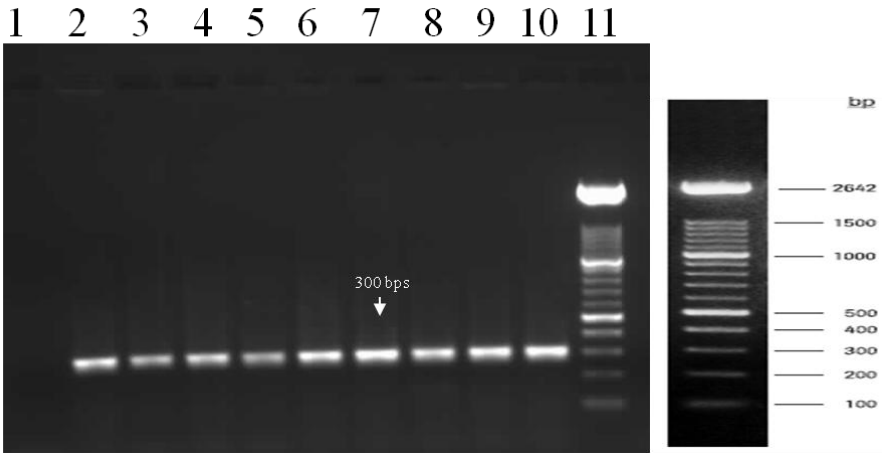
AH grubunda OGG1 ekspresyonu kontrol grubuna göre 0,02 kat azalmış olarak bulundu. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0,755).



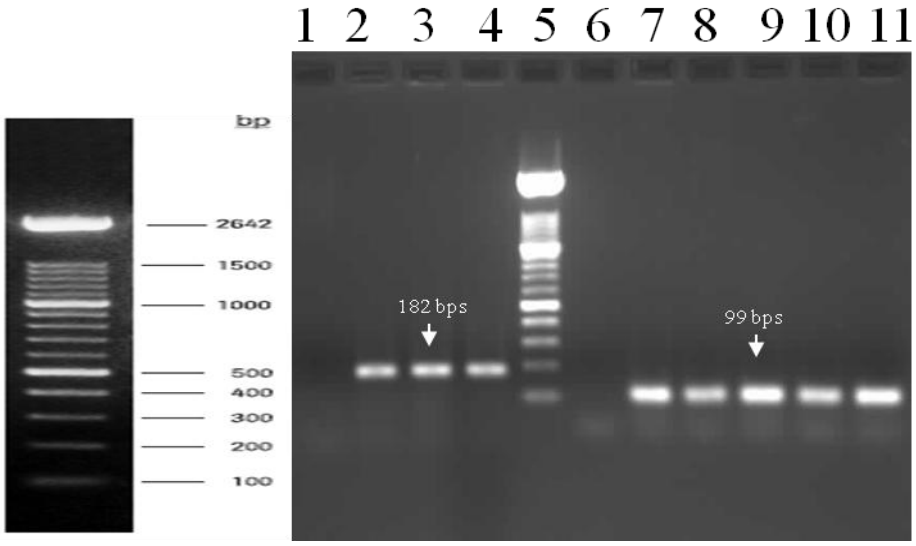
Şekil 61. Hasta ve kontrol örneklerinde OGG1, NEIL1 ve β-Aktin genlerine ait erime eğrisi analizi örneği



Şekil 62. NEIL1 ve OGG1ekspresyon profilleri grafiği

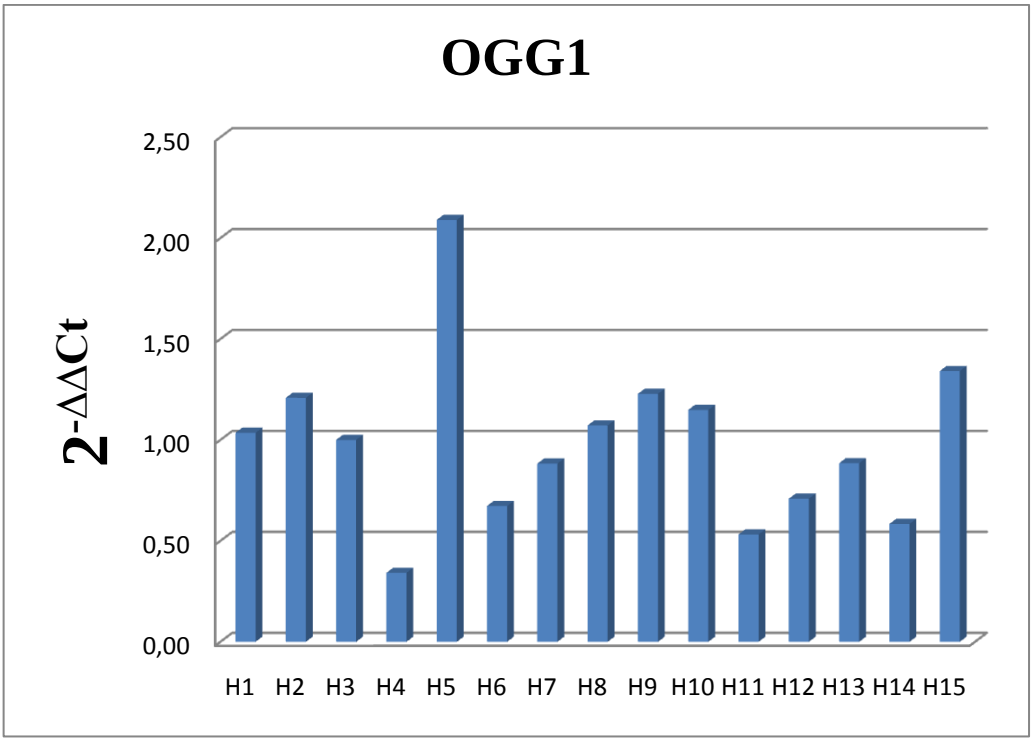


Şekil 63. Hasta ve kontrol örneklerinde NEIL 1 (300 bps) RT-PCR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüsü (1. kuyucuk negatif kontrol, 11.kuyucuk DNA marker - Roche Applied Science, Almanya-, diğer kuyucuklar hasta ve kontrol örnekleridir)



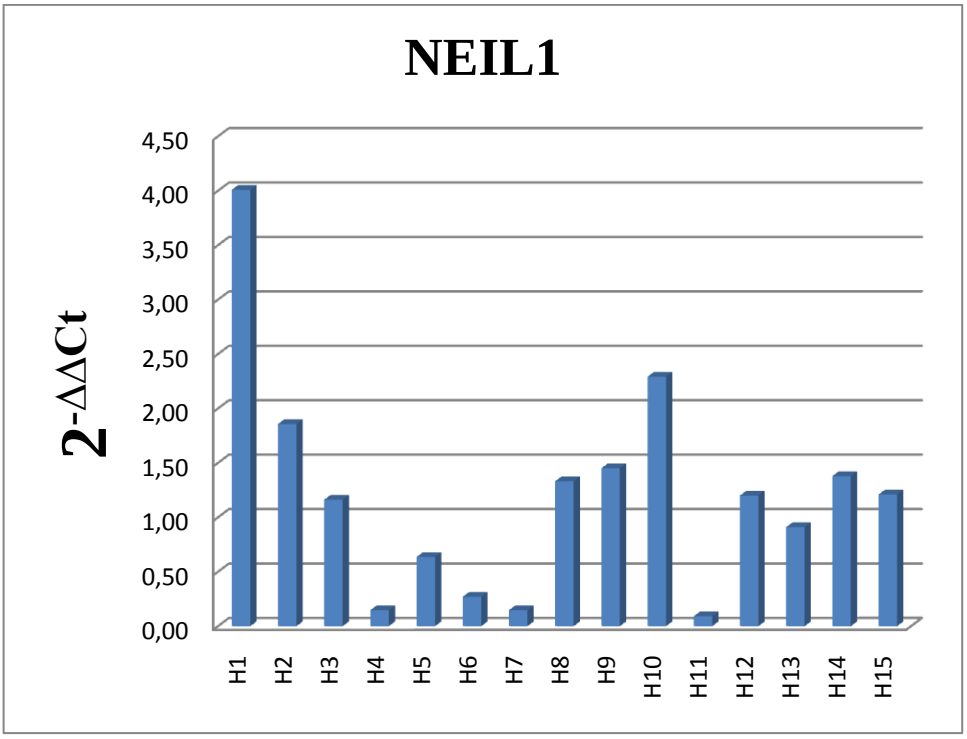
Şekil 64. Hasta ve kontrol örneklerinde OGG 1 (182 bps) ve β-aktin (99 bps) RT-PCR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jel görüntüsü (1 ve 6. kuyucuklar negatif kontrol, 2-4. kuyucuklar OGG1, 7-11. kuyucuklar β-aktin hasta ve kontrol örneklerine ait RT-PCR ürünleri, 5. kuyucuk DNA Marker)

Hasta örneklerinin herbirinin OGG1 gen ekspresyonu değişim katsayısı kontrol (referans) gene göre hesaplandı. Buna göre (Şekil 65.); 1 no'lu hastanın OGG1 gen ekspresyonunun kontrole göre 0,04 kat arttığı, 2 no'lu hastanın 0,21 kat arttığı, 3 no'lu hastanın OGG1 gen ekspresyonunun kontrol ile aynı oranda olduğu, 4 no'lu hastanın OGG1 gen ekspresyonunun kontrole göre 0,66 kat azaldığı, 5 no'lu hastanın 1,09 kat arttığı, 6 no'lu hastanın 0,33 kat azaldığı, 7 no'lu hastanın 0,12 kat azaldığı, 8 no'lu hastanın 0,07 kat arttığı, 9 no'lu hastanın 0,23 kat arttığı, 10 no'lu hastanın 0,15 kat arttığı, 11 no'lu hastanın 0,47 kat azaldığı, 12 no'lu hastanın 0,29 kat azaldığı, 13 no'lu hastanın 0,12 kat azaldığı, 14 no'lu hastanın 0,42 kat azaldığı, 15 no'lu hastanın ise OGG1 gen ekspresyonunun kontrole göre 0,34 kat arttığı gözlendi.



Şekil 65. Hasta örneklerinin OGG1 ekspresyon profili grafiği

Hasta örneklerinin herbirinin NEIL1 gen ekspresyonu değişim katsayısı kontrol (referans) gene göre hesaplandı. Buna göre (Şekil 66.); 1 no'lu hastanın NEIL1 gen ekspresyonunun kontrole göre 3,01 kat arttığı, 2 no'lu hastanın 0,86 kat arttığı, 3 no'lu hastanın 0,16 kat arttığı, 4 no'lu hastanın 0,85 kat azaldığı, 5 no'lu hastanın göre 0,36 kat azaldığı, 6 no'lu hastanın 0,73 kat azaldığı, 7 no'lu hastanın 0,85 kat azaldığı, 8 no'lu hastanın 0,33 kat arttığı, 9 no'lu hastanın 0,45 kat arttığı, 10 no'lu hastanın 1,29 kat arttığı, 11 no'lu hastanın 0,91 kat azaldığı, 12 no'lu hastanın 0,20 kat arttığı, 13 no'lu hastanın 0,09 kat azaldığı, 14 no'lu hastanın 0,38 kat arttığı, 15 no'lu hastanın ise NEIL1 gen ekspresyonunun kontrole göre 0,21 kat arttığı gözlendi.



Şekil 66. Hasta örneklerinin NEIL1 ekspresyon profili

4.3.3. Korelasyon Analizleri

Hasta örneklerinde NEIL1 enzim ekspresyon düzeyleri ile bu enzimin substratları olan ve GC-MS/MS ile düzeyleri belirlenen DNA lezyonları (FapyAde, FapyGua, 5-OH-5-MeHyd) arasında korelasyon analizleri gerçekleştirildi.NEIL1 ekspresyon düzeyi ile FapyAde/10^6 DNA bazı düzeyi arasında olumlu yönde, orta düzeyde, anlamlı olmayan (ρ= 0,404, p>0,05), FapyGua/10^6 DNA bazı düzeyleri arasında olumlu yönde, zayıf, anlamlı olmayan (ρ=0,195 p>0,05), 5-OH-5MeHyd/10^6 DNA bazı düzeyleri arasında olumlu yönde, orta, anlamlı olmayan (ρ=0,310, p>0,05) ilişki bulundu.

Aynı zamanda hasta örneklerinde OGG1 enzim ekspresyon düzeyleri ile bu enzimin substratları olan ve GC-MS/MS ile düzeyleri belirlenen DNA lezyonları (FapyGua, 8-OHGua) arasındaki korelasyon analizleri de gerçekleştirildi. OGG1 ekspresyon düzeyi ile 8-OHGua/10^6 DNA bazı düzeyleri arasında olumsuz yönde, zayıf, anlamlı olmayan (ρ=-0,152, p>0,05), FapyGua/10^6 DNA bazı düzeyleri arasında olumsuz yönde, zayıf, anlamlı olmayan bir ilişki bulundu (ρ=-0,061, p>0,05).

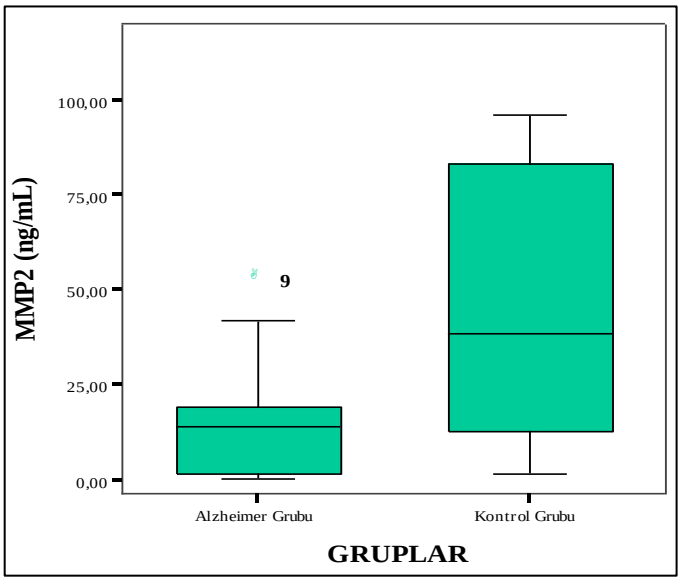
Hastaların minimental durum değerlendirme testleri ile NEIL1 ve OGG1 mRNA ekspresyonları arasında da anlamlı bir ilişki saptanmadı (sırasıyla ρ=0.065, 0.025, p>0,05).

4.4. Matriks Metalloproteinazlar ve İnhibitörlerinin Ölçümü

AH grubundan 30 ve kontrol grubundan 30 plazma örneğinde MMP2, MMP9, TIMP1 ve TIMP2 düzeyleri ölçüldü.

4.4.1. MMP2 Düzeyi

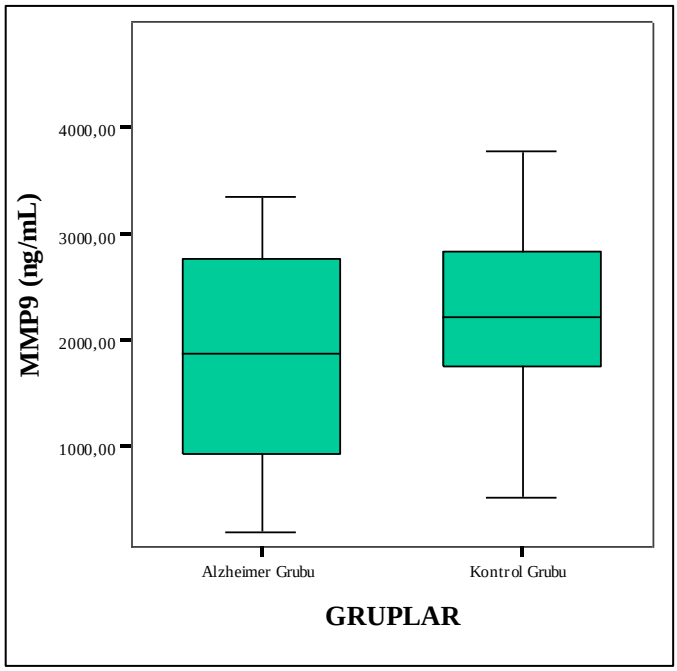
MMP2 düzeyleri ortalaması AH grubunda 13,68±2,38 ng/mL (min: 0,2 - maks: 52,7 ng/mL), kontrol grubunda ise 44,02±6,24 ng/mL (min: 1,5 - maks: 96,1 ng/mL) olarak saptandı. Alzheimer hastalarında MMP2 düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (p=0,000) (Şekil 67.).



Şekil 67. Hasta ve kontrol grupları MMP2 düzeyleri kutu nokta grafiği

4.4.2. MMP9 Düzeyi

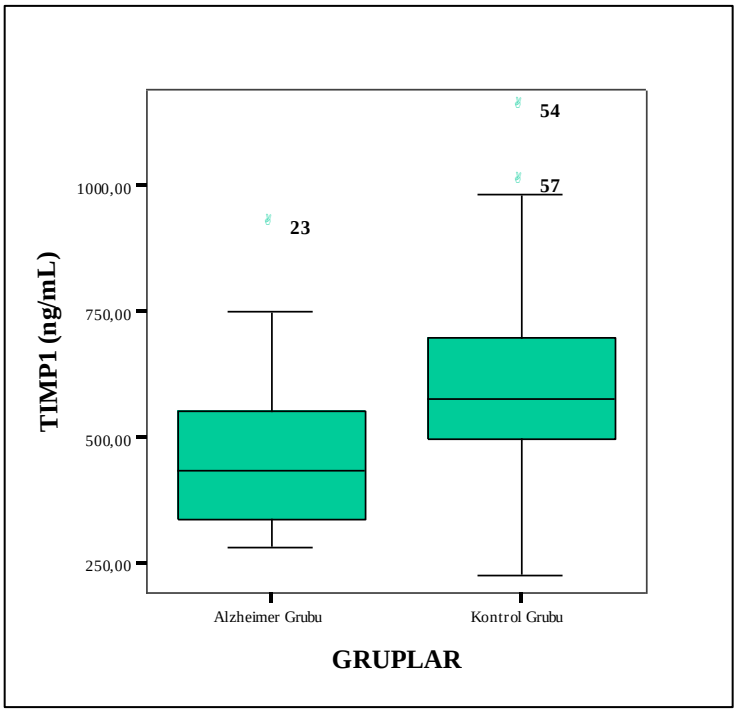
MMP9 düzeyleri ortalaması AH grubunda 1810,34±184,0 ng/mL (min: 197,7 - maks: 3350,2 ng/mL), kontrol grubunda ise 2230,81±132,2 ng/mL (min: 524,0 - maks: 3792,0 ng/mL) olarak saptandı. AH grubu ile kontrol grubu arasında MMP9 düzeyi açısından anlamlı fark bulunmadı (p=0,069) (Şekil 68.).



Şekil 68. AH ve kontrol grupları MMP9 düzeyleri kutu nokta grafiği

4.4.3. TIMP1 Düzeyi

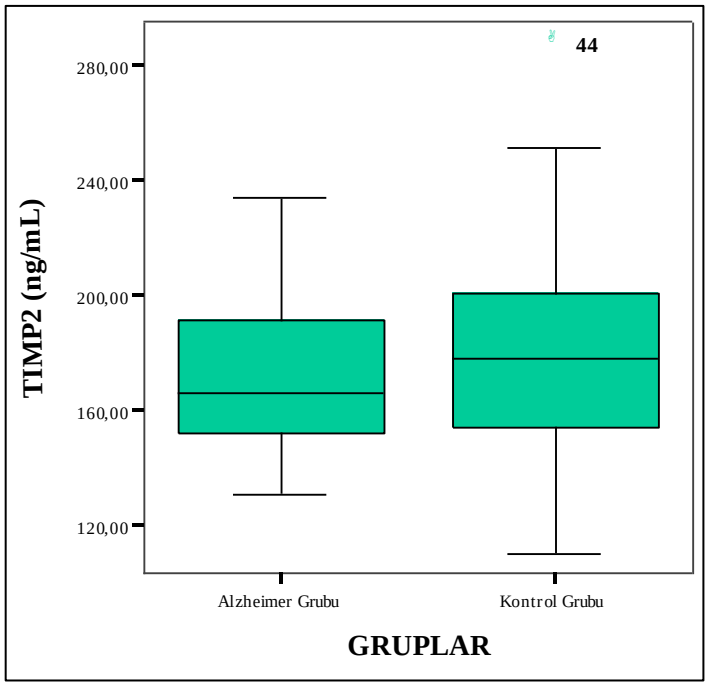
TIMP1 düzeyleri ortalaması AH grubunda 473,44±28,89 ng/mL (min: 280,6 - maks: 920,7 ng/mL), kontrol grubunda ise 624,52±38,96 ng/mL (min: 225,8 - maks: 1152,8 ng/mL) olarak saptandı. Alzheimer hastalarında TIMP1 düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu (p=0,003) (Şekil 69.).



Şekil 69. AH ve kontrol grupları TIMP1 düzeyleri kutu nokta grafiği

4.4.4. TIMP2 Düzeyi

TIMP2 düzeyleri ortalaması AH grubunda 172,97±5,14 ng/mL (min: 131,0 - maks: 234,1 ng/mL), kontrol grubunda ise 182,34±7,56 ng/mL (min: 110,5 - maks: 287,3 ng/mL) olarak saptandı. AH grubu ile kontrol grubu arasında TIMP2 düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı (p=0,309) (Şekil 70.).



Şekil 70. AH ve kontrol grupları TIMP2 düzeyleri kutu nokta grafiği

4.4.5. Korelasyon Analizleri

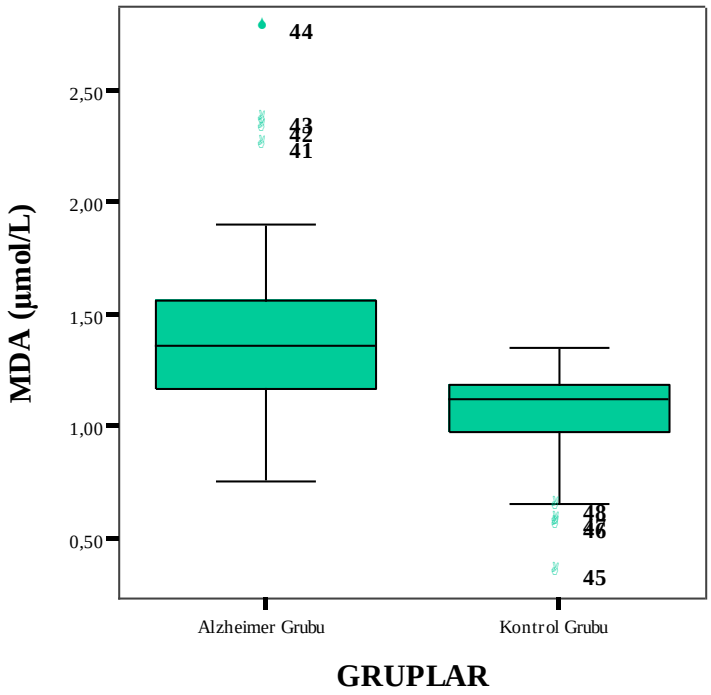
Alzheimer hastalarında MMP2 ve inhibitörü TIMP2 düzeyleri arasında ve MMP9 ve inhibitörü TIMP1 düzeyleri arasındaki korelasyon analizleri bulgularına göre; MMP2 düzeyi ile TIMP2 düzeyi arasında olumlu yönde, güçlü, anlamlı bir ilişki (r=0,578, p=0,001), MMP9 düzeyi ile TIMP1 düzeyi arasında olumlu yönde, orta düzeyde, anlamlı bir ilişki (r=0,389, p=0,034) saptandı. Ayrıca MMP2 düzeyi ile MMP9 düzeyi arasında olumlu yönde, güçlü, anlamlı bir ilişki (r=0,548, p=0,002), TIMP1 ile TIMP2 düzeyleri arasında ise olumlu yönde, zayıf, anlamlı olmayan bir ilişki (r=0,016, p=0,933) belirlendi.

Alzheimer hastalarında MMP2, MMP9, TIMP1 ve TIMP2 düzeyleri ile hastaların minimental durum değerlendirme testleri arasındaki ilişki de incelendi. MMDT değerleri ile MMP2 düzeyleri arasında olumsuz yönde, zayıf, anlamlı olmayan bir ilişki (r=-0,171, p>0,05), MMP9 düzeyleri arasında olumsuz yönde, orta düzeyde, anlamlı olmayan (r=-0,329, p>0,05), TIMP1 düzeyleri arasında olumsuz yönde, zayıf, anlamlı olmayan (r=-0,064, p>0,05), TIMP2 düzeyleri arasında ise olumlu yönde, zayıf, anlamlı olmayan bir ilişki bulundu (r=-0,071 p>0,05). Ayrıca hasta grubunda düzeyi düşük bulunan MMP2 verileri ile düzeyi kontrol grubuna göre yüksek bulunan FapyAde ve MDA verileri arasındaki ilişki de

incelendi. MMP2 düzeyi ile FapyAde ve MDA düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (sırasıyla r=0,219, 0,316, p>0,05).

4.5. Malondialdehit Düzeyi Bulguları

AH grubundan 44 ve kontrol grubundan 45 plazma örneğine ait MDA düzeyleri ölçüldü. Tüm örnekler çift çalışılarak elde edilen ikili sonuçların ortalamaları alındı. MDA düzeyleri ortalaması AH grubunda 1,43±0,06 µmol/L, kontrol grubunda ise 1,04±0,035 µmol/L olarak saptandı. Alzheimer hastalarında MDA düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0,000) (Şekil 71.).



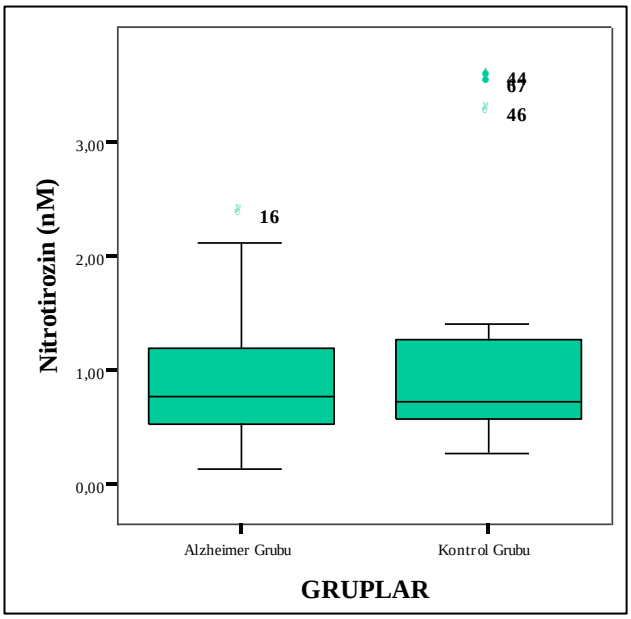
Şekil 71. AH ve kontrol grupları MDA düzeyleri kutu nokta grafiği

4.5.1. Korelasyon Analizleri

Alzheimer hastalarında MDA düzeyleri ile hastaların minimental durum değerlendirme testleri arasında ilişki incelendi. MDA düzeyleri ile MMDT değerleri arasında olumsuz yönde, orta düzeyde, anlamlı olmayan bir ilişki bulundu (ρ=-0,282, p>0,05)

4.6. Nitrotirozin Düzeyi Bulguları

AH grubundan 44 ve kontrol grubundan 45 plazma örneğine ait nitrotirozin düzeyleri ölçüldü. Nitrotirozin ölçümlerinin tek örnekte 10 kez tekrarı sonucu elde edilen %CV değeri 10,2 olarak hesaplandı. Nitrotirozin düzeyleri ortalaması AH grubunda 1,15 ±0,29 nM, kontrol grubunda ise 1,22±0,20 nM olarak saptandı. AH grubu ile kontrol grubu arasında nitrotirozin düzeyi açısından anlamlı fark bulunmadı (p=0,709) (Şekil 72).



Şekil 72. AH ve kontrol grupları nitrotirozin düzeyleri kutu nokta grafiği

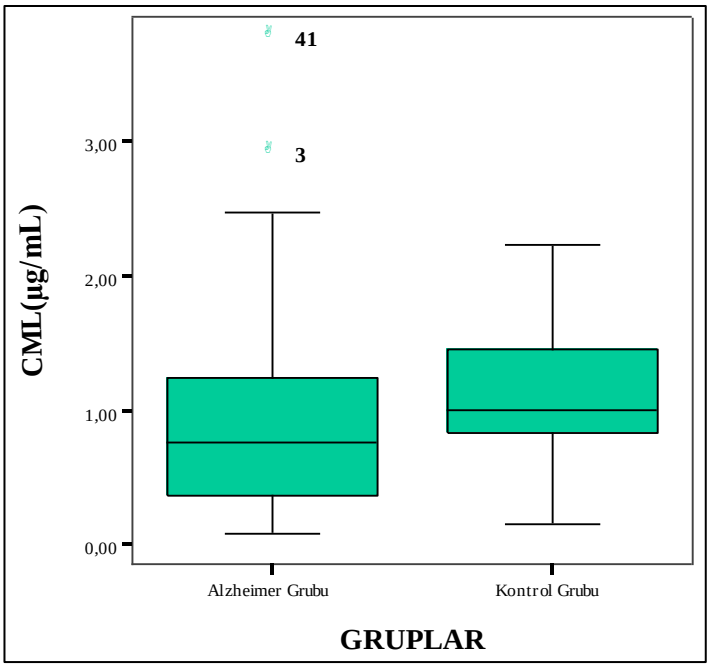
4.6.1. Korelasyon Analizleri

Alzheimer hastalarında nitrotirozin düzeyleri ile hastaların minimental durum değerlendirme testleri arasında ilişki incelendi. Nitrotirozin düzeyleri ile MMDT değerleri arasında olumlu yönde, zayıf, anlamlı olmayan bir ilişki bulundu (ρ=0,218, p>0,05)

4.7. N^{ε}-Karboksimetillizin Düzeyi Bulguları

AH grubundan 44 ve kontrol grubundan 45 plazma örneğine ait CML düzeyleri ölçüldü. Tüm örnekler çift çalışılarak elde edilen ikili sonuçların ortalamaları alındı. CML ölçümlerinin tek örnekte 10 kez tekrarı sonucu elde edilen %CV değeri 7,9 olarak hesaplandı. CML düzeyleri ortalaması AH grubunda 0,996±0,13 µg/mL, kontrol grubunda ise 1,102±0,08

µg/mL olarak saptandı. AH grubu ile kontrol grubu arasında CML düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p=0,061) (Şekil 73.).



Şekil 73. AH ve kontrol grupları CML düzeyleri kutu nokta grafiği

4.7.1. Korelasyon Analizleri

Alzheimer hastalarında CML düzeyleri ile hastaların minimental durum değerlendirme testleri arasında ilişki incelendi. CML düzeyleri ile MMDT değerleri arasında olumsuz yönde, zayıf, anlamlı olmayan bir ilişki bulundu (ρ=-0,154, p>0,05)

Hasta ve kontrol gruplarına ait elde edilen tüm bulgular Tablo 13. ve 14.'de gösterilmektedir.

Tablo 13. Hasta ve kontrol gruplarına ait tüm veriler

		AH Grubu Ort±SEM	Kontrol Grubu Ort±SEM	Değişim Katsayısı	p değeri
DNA Baz Hasarı	FapyAde/ 10^6 DNA bazı	2,00±0,24	0,95±0,13		**0,000**
	FapyGua/ 10^6 DNA bazı	0,22±0,05	0,17±0,03		0,892
	8-OHGua/ 10^6 DNA bazı	2,50±0,28	2,03±0,13		0,120
	5-OH-5MeHyd/ 10^6 DNA bazı	8,85±0,79	8,90±0,83		0,902
	5-OHCyt/ 10^6 DNA bazı	4,47±0,31	5,27±0,55		0,711
DNA Onarım Enzimleri	OGG1 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)			0,21 (↑)	0,877
	NEIL1 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)			0,02 (↓)	0,755
Lipid Hasarı	MDA (µmol/L)	1,43±0,06	1,04±0,04		**0,000**
Protein Hasarı	Nitrotirozin (nM)	1,15 ±0,29	1,22±0,20		0,709
Karbohidrat Hasarı	CML (µg/mL)	0,99±0,13	1,10±0,08		0,061
MMP'ler ve inhibitörleri	MMP2 (ng/mL)	13,68±2,3	44,02±6,2		**0,000**
	TIMP2 (ng/mL)	172,9±5,1	182,3±7,6		0,309
	MMP9 (ng/mL)	1810,3±184	2230,8±132		0,069
	TIMP1(ng/mL)	473,4±28,9	624,5±39,0		**0,003**

Tablo 14. Alzheimer hastalarına ait korelasyon analizi bulguları

Alzheimer hastaları bulguları arasındaki korelasyonlar	**Anlamlılık düzeyi**
MMDT değerleri- FapyAde hasarı	p>0,05
MMDT değerleri - FapyGua hasarı	p>0,05
MMDT değerleri - 8-OHGua hasarı	p>0,05
MMDT değerleri - 5-OH-5MeHyd hasarı	p>0,05
MMDT değerleri - 5-OHCyt hasarı	p>0,05
MMDT değerleri – OGG1 ekspresyonu	p>0,05
MMDT değerleri – NEIL1 ekspresyonu	p>0,05
NEIL1 ekspresyonu – 5-OH-5MeHyd hasarı	p>0,05
NEIL1 ekspresyonu – FapyAde hasarı	p>0,05
NEIL1 ekspresyonu – FapyGua hasarı	p>0,05
OGG1 ekspresyonu – FapyGua hasarı	p>0,05
OGG1 ekspresyonu – 8-OHGua hasarı	p>0,05
MMDT değerleri – MDA verileri	p>0,05
MMDT değerleri – Nitrotirozin verileri	p>0,05
MMDT değerleri – CML verileri	p>0,05
MMDT değerleri – MMP2 verileri	p>0,05
MMDT değerleri – MMP9 verileri	p>0,05
MMDT değerleri – TIMP1 verileri	p>0,05
MMDT değerleri – TIMP2 verileri	p>0,05
MMP2 verileri – TIMP2 verileri	p=0,001 (pozitif korelasyon)
MMP9 verileri – TIMP1 verileri	p= 0,034 (pozitif korelasyon)
MMP2 verileri – MMP9 verileri	p= 0,002 (pozitif korelasyon)
TIMP1 verileri – TIMP2 verileri	p>0,05
MMP2 verileri – FapyAde hasarı	p>0,05
MMP2 verileri – MDA verileri	p>0,05

5. TARTIŞMA

İlk kez 1907'de Dr. Alois Alzheimer tarafından tanımlanan Alzheimer hastalığı yaşlılarda en sık görülen nörodejeneratif bir bozukluktur. Klinik olarak ilerleyici, geri dönüşümsüz hafıza kaybı ve bilişsel bozukluklarla karakterizedir. Yaşlılarda demansın en sık nedenidir, 65 yaşından sonra her beş yılda bir etkilenen sayısı iki katına çıkar. 85 yaş ve üzerinde % 40 gibi değerlere ulaşmaktadır (184). Son on yılda artan kanıtlar, AH'nın patolojik belirteci olan lezyonların (amiloid plak ve nörofibriler yumak) sinaps kaybı, masif nöronal dejenerasyon, yoğun gliozis, mikroglia aktivasyonu, enflamatuar süreç ve ROT aracılı oksidatif hasar gibi birtakım tanısal olmayan ek anormalliklerle ilişkili olduğunu desteklemektedir (49).

Alzheimer hastalığının etiyolojisine ilişkin olarak önerilen mekanizmaların birçoğunda, son dönemlerdeki araştırmalarda ilgi odağı haline gelen "oksidatif stres" teorisi merkezi bir rol oynamaktadır (3). Serbest radikaller ve bunlara karşı vücudun en önemli savunma sistemi olan antioksidanlar arasındaki dengesizlik sonucu protein oksidasyonu, DNA oksidasyonu, lipid peroksidasyonu şeklinde ortaya çıkan oksidatif stres, sonuç olarak bozulmuş nöronal metabolizma ve apoptoza yol açar (185).

Alzheimer hastalarının postmortem beyin dokularında, oksidatif stres göstergesi olan histopatolojik incelemeler ya da biyobelirteçlerin düzeylerinin belirlenmesi konusunda birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda reaktif oksijen türleri kaynaklı hasarın gösterilmesine yönelik olarak; Alzheimer hastalarının beyinlerinde serbest radikal oluşumuna destek olan Fe, Al ve Hg gibi elementlerin artmış olması (186), artmış lipid peroksidayon ürünleri (MDA, 4-hidroksinonenal, F_2-izoprostanlar) ve azalmış çoklu doymamış yağ asitleri (187), artmış DNA oksidasyon (8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, tek zincir kırıkları) ve protein oksidasyon (protein karbonil grupları, nitrotirozin düzeyleri) ürünleri (188), nörofibriller yumaklarda SOD-1, hem-oksijenaz-1, peroksinitrit, karbonil grupları, MDA ve AGE'lerin bulunması, amiloid plaklarda SOD-1, hem-oksijenaz-1 ve AGE'lerin bulunması (189), azalmış enerji metabolizması ve düşük COX aktivitesi, Aβ agregatlarının serbest radikal oluşumuna neden olması (190) şeklinde sonuçların elde edildiği bildirilmektedir.

Oksidatif stres hipotezine göre;

- Amiloid plaklar ve nörofibriller yumaklar sonucunda oluşan oksidatif stres kaynaklı nöronal dejenerasyonun gerçekleşmesi,
- Oksidatif stresin amiloid plaklar ve nörofibriller yumakların oluşumunu tetikleyen erken bir olay olduğu ve AH'nin ilerlemesine neden olan daha fazla düzeyde oksidatif reaksiyonun aktive olmasını sağladığı şeklinde iki farklı senaryo söz konusudur (191).

Postmortem dokularda yapılan çalışmalar, hastalık patogenezinin oluşumunda oksidatif stresin erken bir belirteç mi yoksa AH'daki nörodejeneratif süreçlerin ortak bir sonucu mu olduğu konularını desteklemek adına yetersiz kalmaktadır. Bunun yanısıra postmortem dokularda gerçekleştirilecek çalışmalarda kullanılacak örneklerin ölümden sonra ortalama 20-46. saatler arasında alınması gerektiği, daha uzun bekleme süresinin oksidasyonun artmasına neden olduğu bildirilmektedir (192). Bu nedenlerle son yıllarda araştırmalar AH'nın klinik teşhisinde oksidatif stres biyobelirteçlerinin yaşayan hastalar üzerinde araştırılması yönünde gelişmiştir. Bu sebeple beyin omurilik sıvısı (BOS), Alzheimer hastalığında beyinde gerçekleşen olayların aydınlatılmasında önemli yer tutar ancak BOS'un invazif alınma şekli nedeniyle araştırma çalışmalarında rutin kullanımı yaygın değildir. Kan ve idrar örneklerinin ise elde edilmesi daha kolaydır ancak santral sinir sistemi ile ilişkileri BOS'a göre daha zayıftır. Bu nedenle kan ve idrar örnekleri alınarak yapılan araştırmalarda yanlış pozitif sonuçlardan kaçınmak için hasta ve kontrol gruplarının seçim kriterleri ayrıntılı bir şekilde belirlenmelidir.

Tüm bu bilgiler ışığında ve ilgili literatürün taranması sonucunda eksik olduğunu düşündüğümüz, aşağıdaki parametrelerin dahil olduğu dolayısıyla oksidatif hasarın daha detaylı çalışıldığı bu araştırmayı planladık. Bu tez çalışmasında Alzheimer hastalarında ve kontrol gruplarında oksidatif hasar düzeyinin belirlenmesi amacıyla DNA baz hasarlarını (FapyAde, FapyGua, 8-OH-Gua, 5-OH-5-MeHyd, 5-OHCyt, ThyGly, 5-OH-MeUra, 5-OH-Ura, 5,6-diOH-Ura) kantitatif olarak izotop dilüsyonlu GC-MS/MS ile ölçtük. Söz konusu modifiye bazların onarımında rol alan OGG1 ve NEIL1 enzimlerinin ekspresyon düzeylerini optimizasyonunu sağladığımız her iki gene özgü primer dizilerini kullanarak RT-PCR yöntemi ile belirledik, HPLC yöntemi ile malondialdehit ve N^{ε}- karboksimetillizin

düzeylerini, ELISA yöntemi ile nitrotirozin, MMP2, MMP9, TIMP1 ve TIMP2 düzeylerini ölçtük.

ROT kaynaklı DNA hasar ürünleri; baz ve şeker modifikasyonları, 8-5'-siklopürin-2' deoksinüklozidler, DNA protein çapraz bağları, abazik bölgeler, tek ve çift DNA zincir kırıkları şeklinde gruplandırılabilir. Mullaart ve ark. (193) alkali elusyon yöntemi ile Alzheimer hastalarının beyinlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artmış düzeyde DNA zincir kırıklarının olduğunu gösterdiklerini rapor etmektedirler. Alzheimer hastalarının lenfositlerindeki azalmış plazma antioksidan ve artmış 8-OHdG düzeyleri AH'da oksidan hasarın santral sinir sisteminin yanı sıra periferal hücrelerde de tespit edildiğini göstermektedir (194,195). Migliore ve ark. modifiye comet yöntemini kullanarak Alzheimer ve hafif bilişsel bozukluğu olan hastaların lökositlerinde sağlıklı kontrollere göre bazal DNA hasarının yüksek olduğunu ve bu hastalarda okside pürin ve pirimidin DNA bazlarının önemli ölçüde arttığını göstererek, AH'nın erken evrelerinde oksidatif hasarın oluştuğunu ve nörodejenerasyonda primer rol oynayabileceğini savunmaktadırlar (110). Hafif bilişsel bozukluğu olan hastaların postmortem beyin dokularının farklı bölgelerindeki mitokondriyal ve nükleer DNA örneklerinde GC-MS/SIM yöntemi ile yapılan başka bir çalışmada da AH'nın erken evrelerinde oksidatif hasarın oluştuğunu gösteren bulgular elde edildiği bildirilmektedir. Bu çalışmada 8-OHGua düzeylerinin hasta grubunda kontrol grubuna göre beynin frontal ve temporal loblarındaki nükleer DNA örneklerinde ve temporal lobdaki mitokondriyal DNA örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte hasta grubunda beynin parietal, temporal ve frontal loblarından elde edilen nükleer DNA örneklerinde FapyAde ve 8-OHAde düzeylerinin, mitokondriyal DNA örneklerinde ise yalnızca FapyAde düzeylerinin kontrol grubua göre istatistiksel anlamlı yüksek bulunduğu rapor edilmektedir (196). Kadıoğlu ve arkadaşlarının da 24 Alzheimer hastası ve bunların yaşa göre eşleştirilmiş 21 sağlıklı kontrolü ile modifiye comet yöntemi ile yaptıkları çalışmada hastaların periferal lenfositlerinde okside pürin ve pirimidin düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı arttığı bildirilmektedir (7). Abe ve ark.'nın HPLC yöntemi ile yaptığı başka bir çalışmada ise (197) 8-OHdG düzeyinin AH'larının BOS örneklerinde kontrole göre artış gösterdiği, serum örneklerinde ise anlamlı bir değişim olmadığı bildirilmektedir. Koppele ve ark.'nın HPLC-ECD yöntemi ile yaptıkları çalışmada ise AH beyinlerinde 8-OHdG düzeyinin hastalıkla ilişkili olmadığı belirtilmiştir (198). Son dönemlerde güvenilir analitik yöntemlerle görece kolay ölçümü ve güçlü

mutajenik etkisi nedeniyle dikkati en çok çeken bileşik 8-OH-Gua'dır. Ancak bu durum diğer eşit derecede önemli DNA lezyonlarının biyolojik etkilerinin ve yapılarının yetersiz derecede araştırılmasına neden olmaktadır. Ayrıca analitik ölçüm farklılıklarından dolayı oksidatif DNA hasarı düzeyi ile AH arası ilişki konusunda kesin bir sonuç gözlenmemektedir. DNA hasarı ile ilgili literatür incelendiğinde özellikle 8-OHGua (8-Hidroksiguanin) ve 8-OHdG (8-hidroksi-2'-deoksiguanozin) terimlerinin birbirleri yerine kullanıldığı görülmektdir. 8-OHGua, oksidatif DNA baz hasarı lezyonu iken 8-OHdG onun nükleozit formudur (114).

Bu tez çalışmasında ise sadece tek bir baz hasarı yerine Fpg ve Nth enzimlerinin (FapyAde, FapyGua, 8-OHGua ve pirimidin lezyonları için spesifik glikozilazlardır) hidrolizi sonucu serbestleşen pürin ve pirimidin bazları incelendi. Literatürde Alzheimer hasta ve kontrol periferal kan örneklerinden elde edilen DNA'lar üzerinde DNA lezyonlarını bu şekilde geniş bir hasar yelpazesinde inceleyen başka çalışmaya rastlanmadı. Çalışma sonuçlarına göre, Alzheimer hastaları lökositlerinden elde edilen DNA örneklerinde FapyAde /10^6 DNA baz hasarı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0,00). 8-OHGua/10^6 DNA bazı, FapyGua/10^6 DNA bazı, 5-OH-5-MeHyd/10^6 DNA bazı ve 5-OHCyt/10^6 DNA bazı düzeylerinde ise anlamlı farklılık gözlenmedi (sırasıyla p değerleri= 0.12, 0.89, 0.90, 0.71). ThyGly, 5-OH-MeUra, 5-OH-Ura, 5,6-diOH-Ura hasarları ise hasta ve kontrol örneklerinde saptanmadı. Hasta DNA örneklerinde artmış olduğu gözlenen FapyAde lezyonunun da günümüzde oldukça yaygın olarak kullanılan 8-OH-Gua gibi oksidatif belirteçlerin yanı sıra literatüre kazandırılması mümkündür.

Yaşlanma ile tüm potansiyel hasar verici radikallere karşı antioksidan savunmadaki yetersizliğin hasarın birikmesine ve fonksiyonun aşamalı olarak kaybedilmesine neden olduğu bilinmektedir (199). Yapılan pek çok çalışma ile yaşlanma ve oksidatif stres arasındaki ilişki güçlü bir şekilde ortaya konmuştur (200). Yaş ile oksidatif stres belirteçleri arasındaki korelasyonlar araştırılmış ve hasta bireylerin yanı sıra farklı yaşlardan sağlıklı bireyler arasında yapılan çalışmalarda da yaşa bağlı olarak serum 8-OH-dG düzeyinin arttığı savunulmaktadır (201). Çalışmamızda hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık bulunmayan DNA lezyonlarının (8-OHGua, FapyGua, 5-OH-5-MeHyd ve 5-OHCyt hasarlı bazları) her iki grubun da yaş ortalamalarının yakın olması nedeniyle olduğu düşünülebilir.

Modifiye bazların oluşumu sulu ortamdaki oksijen varlığına ve radikal çevresine bağlıdır (202). Pürin bazlarından guaninde C4-, C5- ve C8-pozisyonlarına $^{\bullet}$OH radikalinin

eklenmesi sonucu guaninin C4-OH, C5-OH ve C8-OH-eklenti radikalleri oluşur. $^{\bullet}$OH radikalinin eklenmesi sonucu adeninde ise C4-OH ve C8-OH-eklenti radikalleri oluşur. C8-OH-eklenti pürin radikallerinden bir elektron oksidasyonu sonucu 8-hidroksiadenin (8-OH-Ade) ve 8-hidroksiguanin (8-OH-Gua) oluşumu gerçekleşir. Diğer taraftan, imidazol halkasının açılması ve bir elektron indirgenmesi sonucu 4,6-diamino-5-formamidopirimidin (FapyAde) ve 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin (FapyGua) bileşikleri oluşur. Bu durumda AH'da hasarlı pürin bazlarının oluşum mekanizmasının oksidasyondan çok redüksiyon kaynaklı olduğu düşünülebilir.

Oksidatif DNA hasarı lezyonları birçok yöntemle belirlenebilmektedir. Ancak bu tekniklerin çoğu ile yalnızca bir hasar ürünü ölçülebilmekte ya da total hasar düzeyi belirlenebilmektedir. Bunun yanında kütle spektrometrik tekniklerle hem tanımlama hem de oluşan baz hasar ürünlerinin miktar tayini yapılabilmektedir (113). Kadıoğlu ve ark. nın (7), Morocz ve ark.nın (8) AH'da yaptıkları çalışmada 'comet yöntemi' ile okside pürin ve pirimidin düzeylerininin AH'da kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunduğu rapor edilmektedir. Ancak her iki çalışmada da örnekler, E.*coli* DNA tamir endonükleazları Fpg ve Endo III ile inkübe edilmiş ve açığa çıkan pürin ve pirimidinlerin total ölçümü göreli bir hesaplama yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntem ile oluşan hasarın hangi bazdan ya da bazlardan kaynaklandığının belirlenmesi ve bu hasarlı ürünlerin kantitasyonu, moleküler yapısı ve iyon değerleri ile ilgili bilgilerin elde edilmesi mümkün olmamaktadır. Bu tez çalışmasında izotop dilüsyonlu gaz kromatografi-sıralı kütle spektrometre ile hasarlı DNA bazlarının ölçümü MRM modunda gerçekleştirildi. Bu teknik ile ~1 fmol düzeyinde hasarlı bazların eş zamanlı ölçümü ve kantitasyonu mümkün olmaktadır. Bu tekniğin duyarlılık ve seçicilik düzeyi canlı hücrelerdeki DNA lezyonlarının 1 lezyon/10^6 DNA bazı seviyesinden daha düşük miktarlarda dahi ölçümüne olanak vermektedir (176). Bu yöntemde ayrıca çalışmanın başından itibaren her bir örneğe belirli konsantrasyondaki stabil izotoplarla işaretlenmiş internal standartlar (IS) eklenerek MS öncesi (ekstraksiyon, GC enjeksiyonu vb.) ve MS koşullarında (iyonizasyon vb.) oluşabilecek değişiklikler normalize edildi ve analizden önce DNA örneğine uygun internal standartlar eklenmesiyle kompleks karışımdaki bileşenlerin miktarı belirlendi.

Yapılan araştırmalarda; DNA ekstraksiyon şartlarında modifiye olmamış bazların da yapay oksidasyonuna sebep olan çeşitli kimyasalların (fenollü bileşikler gibi) kullanımının

hatalı sonuçlara (yalancı pozitif sonuçlar) neden olabileceği bildirilmektedir. Bu nedenle DNA izolasyonu çalışmaları yapay oksidasyona sebep olan kimyasalları içermeyen tuzla çöktürme metodu ile gerçekleştirildi.

DNA baz hasarlarının düzeyi, bu hasarları onaran mekanizmaların etkinliğine de bağlıdır. Bu nedenle DNA onarım enzimlerinin incelenmesi oksidatif DNA hasarı ve Alzheimer hastalığı arasındaki ilişkinin daha iyi aydınlatılması için önem teşkil etmektedir. Bu nedenle çalışmamızda baz hasarlarının onarımında görev alan OGG1 ve NEIL1 enzimlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri incelendi. OGG1 enziminin substratları FapyGua ve 8-OHGua'dır. NEIL1 enziminin substratları ise FapyAde, FapyGua, 5-OH-5-MeHyd, Thygly'dir. AH grubunda NEIL1 ekspresyonu kontrol grubuna göre 0,21 kat artmış olarak bulundu. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,877). AH grubunda artmış FapyAde hasarına oranla NEIL1 ekspresyonunda kontrol grubuna göre fark bulunmaması, hasarlı baz düzeyinin enzimin onarım kapasitesini aştığını düşündürmektedir.

Weissman ve ark.'nın AH oluşturulmuş fare modeli beyinlerinde, OGG1 glikozilaz aktivitesinin kontrol grubuna göre değişmediği belirtilmektedir (238). AH grubunda OGG1 ekspresyonu kontrol grubuna göre 0,02 kat azalmış olarak bulundu, ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,755). OGG1 enziminin substratları olan FapyGua, 8-OHGua düzeylerinin de hasta ve kontrol grupları arasında farklı bulunmaması Alzheimer hastalığında OGG1 enziminin onarım etkinliğinin değişmediğini göstermektedir. Onarım, özellikle DNA'da kodlanan genetik bilginin doğruluğunun sürdürülmesi için önemlidir. DNA onarım mekanizmasına rağmen insan dokularında oksidatif olarak modifiye olmuş DNA'ların bulunması gerçekte serbest radikal hasarının tam olarak engellenemediğini gösterir. İnsan dokularından izole edilen DNA'daki 8-OHGua ve diğer okside olmuş bazların oluşumu ve onarımı neredeyse birbirine eşittir. Bu oran vücut antioksidan durumuna bağlı olarak kişiden kişiye değişebilmektedir (203).

Hanaoka ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada periferal kan hücrelerinde OGG1 mRNA ekspresyonlarının bireyler arası ve birey içi değişimini değerlendirmek için RT-PCR yöntemi ile 1 yıllık süreçte sağlıklı ve sigara kullanmayan 5 kişinin üç ayrı dönemde ölçümü yapılmıştır. Buna göre ekspresyon düzeylerinde birey içi ve bireyler arası değişimlerin gözlendiği belirtilmektedir (203). Bizim çalışmamızda da hasta örneklerinin herbirinin OGG1

ve NEIL1 gen ekspresyonları değişim katsayıları incelendiğinde bu enzimlerin ekspresyonlarının bireyler arasında farklılıklar gösterdiği saptandı.

Protein oksidasyonu, proteinlerin reaktif oksijen türevleri veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu meydana gelir (204). Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları enzim aktivitesindeki azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen aktivitedeki artış olarak sıralanabilir (205, 206). Nitrotirozin, peroksinitritin proteinin yapısındaki tirozin ile reaksiyonundan meydana gelen oldukça kararlı bir ürünüdür. Proteinlerde oluşan nitrasyon reaksiyonu enzim ve/veya proteinleri inaktif hale getirmektedir. Nitrotirozin düzeyi Korolainen ve ark.nın (207) yaptıkları çalışmada Alzheimer hastalarının serebrospinal sıvılarında, serum ve plazma örneklerinde ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. Nitrotirozin düzeylerinin her üç biyolojik materyale ait birçok örnekte ölçülemediği belirtilmektedir. Bulunan sonuçlarla yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu hasta ve kontrol grupları arasında NT düzeyi açısından anlamlı fark bulunmadığı rapor edilmektedir. Tohgi ve ark.'nın çalışmasında (208) ise, Alzheimer hastalarının BOS örneklerinde kontrole göre artmış nitrotirozin düzeyleri belirtilirken, buna karşılık olarak Ryberg ve ark.'nın çalışmasında ise (209) anlamlı fark bulunmadığı bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda da AH grubu ile kontrol grubu arasında nitrotirozin düzeyi açısından anlamlı fark bulunmadı ($p=0,709$). Ayrıca ölçülen NT düzeyi ortalamaları her iki grupta da (AH grubunda 1,15 ±0,29 nM, kontrol grubunda ise 1,22±0,20 nM) düşük bulundu. Bu durum nitrotirozin düzeyinin protein oksidasyonunun AH'da gösterilmesine yönelik olarak daha hassas yöntemler ile ölçülmesi gerekliliğini ortaya koyduğu gibi bu hastalarda protein oksidasyonu belirteci olarak başka bir olası bileşiğin olabileceğini düşündürmektedir.

Reaktif oksijen türevlerinin oluşumu sadece DNA'ya hasar vermekle kalmaz aynı zamanda oksidasyona son derece duyarlı olan fosfolipidlerin çoklu doymamış yağ asidi kalıntıları gibi diğer hücresel bileşenlerde de hasara neden olur. Peroksil radikalleri bir kez oluştuktan sonra bir döngüsel tepkime aracılığı ile endoperoksitlere peroksidasyon sürecinin son ürünü MDA olacak şekilde dönüşebilirler (63). MDA ölçümü, lipid peroksidasyonunun değerledirilmesinde kullanılan yöntemlerden biridir (210).

Alzheimer hastalığında çeşitli membran fonksiyonlarında rol oynayan beyin fosfolipidlerinde değişiklik olabileceği düşünülmüştür. Fosfolipidler beyinde bol miktarda bulunan araşidonik asit ve doksaheksanoik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri içerir. Çoklu doymamış yağ asitleri reaktif oksijen türevleri tarafından kolaylıkla hidrojen kaybına imkan tanıyan çift bağlarından dolayı serbest radikal hasarına duyarlıdır. Pekçok çalışmada Alzheimer hastalarının beyinlerinde lipid peroksidasyonunun arttığı gösterilmiştir (3). Orta dereceli kognitif bozukluğu olan hastalarda lipid peroksidasyon ürünlerinin serebrospinal sıvı, plazma ve idrarda anlamlı düzeydeki artışları, lipid peroksidasyonunun hastalığın patogenezindeki erken dönem fizyopatolojik değişiklik olduğunu düşündürmüştür.

Bourdel ve arkadaşlarının çalışmalarında HPLC yöntemi ile belirledikleri plazma MDA düzeylerinin Alzheimer hastalarında arttığı gösterilmektedir (211). Kalman ve arkadaşlarının (212) yaptığı çalışmadan elde edilen veriler ise Alzheimer hastalarında plazma MDA düzeylerinde değişme olmadığı şeklindedir. Barnham ve ark. yaptığı bir çalışmada, MDA'nın AH'li hastaların beyinlerinde artmış olduğu rapor edilmektedir (213). Çalışmamızda da Alzheimer hastalarında plazma MDA düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0,000). Bu çalışmada elde edilen MDA değerleri literatür çalışmaları ile benzerlik göstermektedir.

Bermejo ve ark.'nın yaptığı çalışmada (214) Alzheimer tipi demans hastalarında MDA düzeylerinin kontrol gruplarına göre yüksek olduğu bildirilmektedir. Bu araştırıcılar Alzheimer hastalarında MDA konsantrasyonunlarının oksidatif hasarın bir belirteci olarak kullanılabileceğini savunmaktadırlar. Yapılan bu çalışmada eritrosit içi MDA düzeyi ölçümü yüksek performanslı sıvı kromotografisi (HPLC) ve tiyobarbitürik asit testi (TBA) yöntemlerinin kullanıldığı belirtilmektedir. HPLC yönteminin TBA yönteminden daha iyi olduğu savunulmaktadır (214). Bu tez çalışmasında da plazma MDA seviyesi HPLC yöntemi ile ölçüldü.

Beyin, diğer dokularla karşılaştırıldığında enerji üretmek için yüksek miktarda oksijen kullanır ve diğer dokulara oranla düşük katalaz ve GPx aktivitesi nedeni ile antioksidan sistem kısmen yetersizdir. Orta dereceli kognitif bozukluğu olan hastalar ile Alzheimer hastalarının enzimatik olmayan antioksidan periferik düzeyleri ve enzimatik antioksidanların aktiviteleri açısından kontrol grubu ile karşılaştırıldığı bir çalışmada; orta dereceli kognitif bozuklukta ve Alzheimer hastalarında A, C ve E vitaminleri ile ürik asit düzeylerinin düşük olduğu

gösterilmektedir. Aynı zamanda her iki hasta grubunda plazma ve eritrosit SOD ve GPx aktivitesinin düşük olduğu belirtilmektedir. Bu veriler ışığında her iki hasta grubunda oksidatif stres durumunda, aşırı miktarda üretilen serbest radikallere karşı yeterli korumanın sağlanamayacağı ileri sürülmektedir (210).

AH patogenezinde serebral kan damarlarında ve senil plaklarda Amiloid β proteininin oluşumu ve ekstrasellüler agregasyonunun, önemli bir etken olduğu bilinmektedir. MMP'ler, ECM komponentlerini çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik durumlarda degrade edebilmektedirler. MMP'lerin AH patogenezinde (Amiloid β işleme yolunda) de rol aldığı bilinmektedir (215, 216). Ancak AH patogenezindeki bu fonksiyonunun yıkıcı mı yoksa koruyucu mu rolde olup olmadığı kesin olarak net değildir.

Alzheimer hastalığı, beyinde amiloid plaklarda ekstraselülar amiloid-β (Aβ) birikimi ile karakterizedir. Genetik geçişli AH'da genellikle Aβ üretiminin artışına neden olan genetik mutasyonlar söz konusu iken (217), sporadik geçişli AH'da Aβ temizlenme mekanizmasında bir bozukluk olduğu düşünülmektedir (218) Aβ temizlenme mekanizmasında MMP2 (219) ve MMP9'un da (166) rol aldığı birçok proteaz tanımlanmaktadır. Yin ve ark.'nın (220) bu konu üzerine yaptıkları çalışmada MMP2 ve MMP9 genleri susturulmuş farelerde Aβ düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek bulunduğunu ve proteazların Aβ katabolizmasında rol aldıkları belirtilmektedir.

MMP'lerin aktivitesi ve ekspresyonu transkripsiyon düzeyi de dahil olmak üzere birçok aşamada kontrol edilmektedir. Ekspresyonu büyüme faktörleri, sitokinler ve serbest radikallerce düzenlenirken (221), aktiviteleri MMP'lerin latent proformları ve endojen doku inhibitörleri (TIMP'ler) tarafından regüle edlir (222). MMP ekspresyonları Alzheimer hastalarının postmortem beyin dokusunda tanımlanmaktadır. MMP9 hipokampusta lokalizedir ve Aβ peptidin degredasyonu ile ilişkilidir (166). TIMP'lerin ise amiloid plaklarda, nörofibriller yumaklarda ve Purkinje hücrelerinde lokalize olduğu belirtilmektedir (223).

Lorenzl ve ark. tarafından ELISA yöntemi ile (224) Alzheimer hastaları ve kontol grubu plazma örneklerinde MMP2, MMP9, TIMP1 ve TIMP2 düzeyleri belirlenmiştir. Çalışmada MMP9 düzeyinin hasta grubunda kontrole göre artış gösterdiği, TIMP1 ve TIMP2 düzeylerinin ise değişmediği savunulmaktadır. Aynı çalışmada hem TIMP1 ve MMP9 arasında hem de TIMP2 ve MMP9 arasında pozitif korelasyon olduğu vurgulanmaktadır.

Ayrıca literatürde (225, 226) MMP2'nin alfa-sekretaz aktivitesine sahip olduğu ve amiloid prekürsör proteinin kesilmesinden sorumlu olduğu belirtilmekte, buna karşın MMP2 düzeyinin değişmediği bildirilmektedir. Çalışmada artmış MMP9 düzeyinin ise AH'nın endotelial patolojisine katkıda bulunabileceği şeklinde yorumlanmaktadır.

S. Horstmann ve arkadaşları, MMP 2 ve 9 düzeylerini AH ve kontrol grupları plazma ve BOS örneklerinde zimografi yöntemiyle belirlediklerini ve (167) MMP2 düzeyi açısından hasta ve kontrol plazma örnekleri arasında anlamlı fark bulunmadığını savunmaktadırlar. BOS örneklerinde ise MMP2 düzeylerinin AH grubunda kontrole göre düşük bulunduğu gösterilmektedir. MMP9 düzeyi, AH grubu plazma örneklerinde kontrole göre düşük bulunurken, BOS örneklerinde tespit edilemediği belirtilmektedir.

Çalışmamızda ise, Alzheimer hastalarında MMP2 düzeyi (AH grubu ortalaması; 13,68±2,38 ng/mL, kontrol grubu ortalaması; 44,02±6,24 ng/mL) kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılıkta düşük (p=0,000), TIMP2 düzeyi açısından ise AH grubu (AH grubu ortalaması; 172,97±5,14 ng/mL, kontrol grubu ortalaması; 182,34±7,56 ng/mL) ve kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunmadı (p=0,309). Ayrıca Alzheimer hastalarında MMP2 ve TIMP2 düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptandı (p=0,001, r=0,578). Alfa-sekretaz aktivitesine sahip olduğu ve amiloid prekürsör proteinin kesilmesinden sorumlu olduğu bilinen MMP2'nin Alzheimer hastalarında düşük bulunması hastalığın patolojisinin ilerlemesine (Amiloid beta peptit agregatlarının birikimini arttırıcı yönde) katkıda bulunduğu şeklinde yorumlanabildi. Bu durum MMP2'lerin AH'da koruyucu rol oynadığı düşüncesini kuvvetlendirmektedir. MMP2 ve inhibitörü TIMP2 arasında pozitif yönde ilişki bulunması AH'da birbirlerini kompanse ettiği düşünülebilir. Çalışmamızda MMP9 düzeyleri Alzheimer hasta örneklerinde kontrol grubuna göre düşük bulundu (AH grubu ortalaması: 1810,34±184,0 ng/mL, kontrol grubu ortalaması: 2230,81±132,2 ng/mL) ancak bu düşüklük anlamlı olarak farklı bulunmadı (p=0,069). Bu durum MMP9 düzeyi açısından Alzheimer grubu bireylerin heterojenite göstermesinden (min: 197,7 – maks.: 3350,2 ng/mL) kaynaklandığını düşündürmektedir. Alzheimer hastalarında TIMP1 düzeyi ise (AH grubu ortalaması: 473,44±28,89 ng/mL, kontrol grubu ortalaması: 624,52±38,96 ng/mL) kontrol grubuna göre düşük (p=0,003) bulundu. Alzheimer hastalarında MMP9 ve TIMP1 düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptandı (p=0,034, r=0,389). Elde edilen sonuçlar MMP'lerin Aβ katabolizmasında rol aldıklarını doğrular niteliktedir.

İleri glikasyon son ürünlerinden N^{ε}-karboksimetillizin çalışmalarımızın sonuçlarını incelediğimizde, CML düzeyleri ortalaması AH grubunda 0,996±0,13 μg/mL, kontrol grubunda ise 1,102±0,08 μg/mL olarak saptandı. AH grubu ile kontrol grubu arasında CML düzeyi açısından anlamlı fark bulunmadı (p=0,061). Son çalışmalarda, AH'larının ve yaş eşleştirilmesi yapılmış kontrol gruplarının beyinlerinde AGE'lerin biriktiği ve bu durumun yaşlanmada ve AH patogenezinde rol oynadığı savunulmaktadır (27,28, 229, 230, 231). Buna rağmen AGE'lerin AH'nın patogenezinde rol oynayıp oynamadıkları halen tartışmalıdır. *İn vitro* çalışmalarda AGE ile modifiye olan Aβ proteininin çözünür Aβ'nın agregasyonunu hızlandırdığı ve AH beyin amiloid plak kesiti incelendiğinde artmış AGE ürünlerinin olduğu gösterilmektedir (229). Ek olarak AGE modifye rekombinant Tau proteininin de reaktif oksijen ara ürünlerini oluşturduğu belirtilmektedir (232). Başka bir çalışmada, AGE spesifik reseptörlerin (RAGE) Aβ için özel hücre yüzey akseptörü oldukları ve RAGE'lerin Aβ-ilişkili nöronal hücre toksisitesinde rol aldıkları bildirilmektedir (233). Bunlara karşılık Aβ glikasyonunun AH patolojisinde geç evrede meydana geldiğini ve Aβ tarafından oluşturulan serbest radikallerin bir sonucu olduğu savunulmaktadır (234). Ek olarak, Aβ toksisitesinde RAGE proteinlerine gerek duyulmadığı da belirtilmektedir (235). CML düzeyi ile ilgili yaptığımız literatür taraması sonucunda Alzheimer hastalığı üzerine yapılan çalışmaların çoğunlukla beyin dokularındaki lokalizasyonu üzerine gerçekleştirildiği görülmektedir. Bär ve ark.'nın Alzheimer hastalarının serum ve BOS örneklerinde ELISA yöntemi ile yaptıkları CML düzeyi incelenmesine yönelik çalışmada (236) AH grubu BOS örneklerinde kontrol grubuna göre artmış CML düzeyleri, serum örneklerinde ise anlamlı bir fark bulunmadığı rapor edilmektedir. Bu durum için serumda ekstra-serebral faktörlerin etkili olabileceği şeklinde yorum yapılmaktadır.

Çalışmamızda incelenen makromoleküler hasar belirteçleri ve DNA onarım enzim ekspresyonlarının Alzheimer hastalarında prognostik önemlerinin incelenmesi amacı ile gerçekleştirilen istatistik değerlendirmeler sonucu oksidatif hasar belirteçleri ile hastaların MMDT değerleri arasında anlamlı ilişki bulunmadı.

Çalışmamızın literatüre getirdiği yenilikleri değerlendirdiğimizde;

- Alzheimer hastalarının lökositlerinden elde edilen DNA örneklerinde DNA baz hasarı lezyonları ilk kez oldukça hassas bir yöntem olan izotop dilüsyonlu GC-MS/MS ile ölçüldü ve kantite edildi. FapyAde düzeyi Alzheimer hastalarında yüksek bulundu. Bu

durum FapyAde hasarının da AH'nin etiyolojisinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

- Çalışmada DNA baz hasarı düzeyleri ile birlikte bu lezyonların onarımında görev alan OGG1 ve NEIL1 enzimlerinin de incelenmesi, AH'da hasar düzeyinin, DNA onarım enzimlerinin etkinliğiyle birlikte değerlendirilerek daha iyi anlaşılmasını mümkün kılmaktadır.
- Hastalarda incelenen matriks metalloproteinazlar ve inhibitörlerinin düzeylerinin sonuçları doğrultusunda AH'nın patogenezinde bu proteazların ve inhibitörlerin rolünün belirlenmesine katkı sağlayıcı bilgiler elde edildi. Özellikle MMP2 düzeyinin AH'nın Aβ katabolizmasında rol aldığı görüşü bu çalışma ile de desteklenmiş oldu.
- Çalışmamız AH'da lipid peroksidasyonun varlığının gösterilmesi açısından da önem taşımaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışma Alzheimer hastalarında oksidatif makromolekül hasarı belirteçlerinin ve DNA onarım enzim ekspresyonlarının ilk kez bu kadar geniş bir biçimde araştırılmış olması açısından önem taşımaktadır. Oksidatif makromolekül hasarı, Alzheimer hastalığının patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Bu sürece hangi moleküllerin ne derece dahil olduğunun bilinmesi hastalığın tedavisinde uygulanacak stratejilerin seçiminde ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır. Aynı zamanda yaptığımız çalışmalar sonucunda matriks metalloproteinazların ve inhibitörlerin Alzheimer hastalığının patogenezinden sorumlu Aβ peptidlerin katabolizmasında rol aldıklarını destekleyici bulguların elde edilmesinin literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Alzheimer hastalarında artmış olduğu gözlenen FapyAde lezyonunun ve bu lezyonun onarımında rol alan enzimlerin BOS, idrar ve postmortem beyin dokularında da daha geniş çapta incelenmesi hastalığın etiyolojisinin aydınlatılması açısından önem taşımaktadır. Çalışmamızda DNA baz hasarı düzeyleri National Institute of Standards and Technology (NIST) kurumunun Biomolecular Measurement Bölümü'nün DNA Ölçümleri Grubu Laboratuvarı'nda (Maryland, U.S.A) ölçüldü. Bu çalışmaların üniversitemiz bünyesinde de gerçekleştirilebilmesi için Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı'nda (ARLAB) bulunan gaz kromatografi-kütle spektrometre cihazı kullanılarak optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Her iki kurumda da gerçekleştirilen karşılıklı çalışmalar sonucunda birbirine oldukça yakın bulgular elde edildi. Tez çalışmamızda düzeyi belirlenen hasarlı bazların ölçümü bu sayede üniversitemiz bünyesinde de gerçekleştirilebilecektir.

Çalışma kapsamında hasta ve kontrol gruplarından elde edilen DNA örnekleri sadece GC-MS/MS ile DNA baz hasarı düzeylerinin ölçümü için yeterli oldu. Çok az sayıda örnekte (Alzheimer grubunda 10 örnek, kontrol grubunda ise 3 örnek) sıvı kromatografi sıralı kütle spektrometre ile DNA nükleozit hasarı düzeyleri belirlendi ve istatistiksel hesaplama yapılamadığından tez kapsamına dahil edilemedi. AH'da DNA nükleozit hasarının da ölçülmesine yönelik olarak yeni çalışmaların planlanmasının literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

DNA onarım enzim ekspresyon düzeyleri RT-PCR tekniği kullanılarak belirlendi. Bu çalışma AH'da tespit edilen hasarlı DNA bazlarının düzeylerindeki değişimin, ölçülen DNA

onarım enzimlerinin ekspresyon düzeylerinden kaynaklanıp kaynaklanmadığını göstermek adına önemlidir. Ayrıca bu noktada DNA onarım enzimlerinin polimorfik yapılarının ve enzimlerin protein düzeyinde incelenmesinin de önemli olacağı düşünülmektedir. Bu konuda NIST kurumunda protein düzeyinde DNA onarım enzimlerinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi çalışmalarını izotop dilüsyonlu sıvı kromatografi sıralı kütle spektrometre ile gerçekleştirdik (237, 177). DNA onarım enzimlerinin protein düzeyinde AH'da ve diğer çeşitli hastalıklarda belirlenmesi adına çalışmalarımız devam etmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Kawas C, Epidemiology of Alzheimer's Disease in: dementia update, American Academy of Neurology 49th Annual Meeting, American Academy of Neurology Press, 1997; 1997: 23-38

2. Chauhan V, Chauhan A, Oxidative stress in Alzheimer's disease, Pathophysiology, 2006; 13: 195–208

3. Markesbery WR, Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease, Free Rad. Bio. & Med, 1997; Vol: 23; 134-147

4. Hensley K, Carney JM, Mattson MP, Aksenova M ve ark, A model for β-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease, Proceeding of the National Academy of Sciences, 1994; 91:1270–4

5. Butterfield DA, Amyloid beta-peptide- (1–42) induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain, Free Radical Research, 2002: 36; 1307–1313

6. Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M, Butterfield DA, Alzheimer's amyloid β-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity, Journal of Structural Biology, 2000; 130:184–208

7. Kadioglu E, Sardaş S, Aslan S, Işık E, Esat Karakaya A, Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's diseases. Biomarkers, 2004; 9: 203-9

8. Morocz M, Kalman J, Juhasz A, Sinko I ve ark, Elevated levels of oxidative DNA damage in lymphocytes from ptients with Alzheimer's disease, Neurobiol Aging 2002; 23: 47-53

9. Lu T, Pan Y, Kao SY, Li C ve ark., Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain, Nature, 2004; 429(6994): 883-91

10. Fraga CG, Shigenaga MK, Park J, Degan P ve ark., Oxidative damage to DNA during aging: 8- hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine, Proc. Natl. Acad. Sci, 1990; 87: 4533-4537

11. Lovell MA, Markesbery WR, Ratio of 8-hydroxyguanine in intact DNA to free 8-hydroxyguanine is increased in Alzheimer disease ventricular cerebrospinal fluid, Arch Neurol, 2001; 58: 392-6

12. American Psychiatric Association, Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders (DSM-IV), 4th edn. 1994, American Psychiatric Association: Washington, DC.

13. Dede SD, Arıoğul S, Yaşlı hastada demans değerlendirmesi ve önemi, Türkiye Tıp Dergisi Geriatri Özel Sayısı, 2005

14. Cankurtaran M, Yavuz BB, Halil M, Dagli N ve ark., Are serum lipid and lipoprotein levels related to dementia? Arch Gerontol Geriatr, 2005; 41(1): 31-9.

15. Terry RD, Katzman R, Bick KL, Sisodia SS, Alzheimer hastalığı, Çeviri editörü, Hakan Gürvit. Yelkovan yayıncılık, İstanbul, 2001.

16. Karaman Y, Alzheimer hastalığı ve diğer demanslar, 1.baskı. Ankara, Lebib Yalkın Matbaası, 2002.

17. Souder E, Beck C, Overview of Alzheimer's disease, Nurs Clin North Am, 2004; 39(3): 545-559.

18. Öge AE, Nöroloji İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları Nobel Tıp Kitapevleri, 2004; 369

19. Yener G, Turkuaz Alzheimer Working (TAC) Group, The neuropsychiatric inventory scores change across the mini mental state examination ranges in patients with Alzheimer's disease: a multicenter study in Turkey, Cog Behav Neurol, 2009; 22: 264–269

20. Kaplan HI, Sadock BJ, Textbook of Psychiatry, V. Williams and Wilkins, Baltimore 1989; 612-617

21. Emery AEH, Vassilopovlos D, The presenile dementias, Principles and Practice ofmedical Genetic, 1990; 1: 473-77

22. Gürvit H, Emre M, Tinaz S, ve ark. The prevalence of dementia in an urban Turkish population, Am J. Alzheimers Dis. Other Demen. 2008; 23(1): 67-76

23. Rowland LP, Dementias In: Merritt's Neurology, 10th ed, 2000: 633-636

24. Torreilles F, Touchon J, Pathogenic theories and intrathecal analysis of the sporadic form of Alzheimer's disease, Progress in Neurobiology, 2002; 66: 191–203

25. Selko DJ, The molecular pathology of Alzheimer's disease, Neuron, 1991; 6:487-498

26. Mesulam MM, Aging, Alzheimer's Disease and Dementia: Clinical and Neurobiological Perspectives. In: M.-Marsel Mesulam (ed): Principles of Behavioral

and Cognitive Neurology, New York, Oxford University Press, 2nd edition, 2000; 439-522

27. Lippa CF, Swearer JM, Kane KJ, Nochlin D ve ark., Familial Alzheimer's Disease: Site of mutation influences clinical phenotype, Ann Neurol, 2000; 48(3): 376-379

28. Guo Q, Furukawa K, Sopher BL, Pham DG, ve ark., Alzheimer's PS-1 mutation perturbs calcium homeostasis and sensitizes PC 12 cells to death induced amyloid β peptide, Neuroreport, 1996; 8:379-383

29. Lewy-Lahad E, Bird TD, Genetic factors in Alzheimer's disease: a review of recent advances, Ann Neurol, 1996; 40:829–840

30. Tanzi RE, Bertram L, New frontiers in Alzheimer's disease genetics, Neuron., 2001; 25; 32(2): 181-4

31. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST ve ark., Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria, Lancet Neurol., 2007; 8: 734-46

32. Skoumalova A, Jakub H, Blood markers of oxidative stress in Alzheimer's disease, J. Cell. Mol. Med., 2012; 16: 2291-2300

33. Scinto LFM., Daffner KR, Early diagnosis of Alzheimer's disease. Current Clinical Neurology, 2000: 1-27

34. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R ve ark., Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease, Neurology, 1984;34(7):939–44

35. Folstein MF, Folstein SE, McHaugh ĞR, Mini-mental state: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinican, J. Psychiatr. Res. 1975;12:189–198

36. Blessed G, Blessed-Roth Dementia Scale, Psychopharmacol Bull. 1988;24:705-708

37. Reisberg B, Ferris SH, de Leon MJ, Crook T, The Global Detereoration Scale (GDS) for assesment of primary degenerative dementia. American Journal of Psychiatry 139:1136-9

38. Collins AR, Oxidative DNA damage, antioxidnts and cancer, BioEssays, 1999;21:238-46

39. Burçak G, Andican G, Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. Cerrahpaşa J. Med., 2004;35:159-169

40. Pratico D, Alzheimer's disease and oxygen radicals: new insight. Biochemical pharmacology, 2002; 63: 563-567

41. Gonzalaz M, Marcos A, Klaus P, Nutrition and cognitive impairment in elderly. British J Nutrition, 2001; 86: 313-321

42. Bulut S, Alzheimer hastalığında oxidative stres. Türkiye Klinikleri Nöroloji Dergisi 2003; 1(1): 54-62

43. Tokçaer AB, Alzheimer hastalığında hormonlar ve menopoz. Türkiye Klinikleri Nöroloji Dergisi 2003;1(1): 49-54

44. Butterfield A, Drake J, Pocernich C, Castegna A, Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid β-peptide, Trends in Molecular Medicine, 2001; 7: 548-553

45. Cui K, Luo X, Xu K, Murthy V, Role of oxidative stres in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stres and nutraceuitical antioxidants. Progress in Neuro-Psychopharmacology & biological Psychiatry. 2004; 28: 771-799

46. Reiter RJ, Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. FASEB J.,1995; 9:526– 533

47. Muller DPR, Neurological disease, Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy. Academic Press, New York, 1997; 557– 580

48. Olanow CW, A radical hypothesis for neurodegeneration, Trends Neurosci. 1993; 16: 439–444

49. Butterfield DA, Lauderback CM, Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amiloid β-peptide associated free radical oxidative stres. Free Rad Biol Med. 2002; 32(11): 1050-1060

50. Pratico D, Delanty N, Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's Disease. Am J Med., 2000; 109: 577–585

51. Smith MA, Rottkamp C, Nunomura A, Raina AK, Perry G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. Biochimica et Biophysica Acta. 2000; 1502: 139-144.

52. ChristenY, Oxidative stress and Alzheimer disease. Am J Clin Nutr. 2000; 71: 621-629

53. Sözmen E. Y, İnsan biyokimyası, (Onat T., Emerk K., Sözmen E.Y, Ed.), Palme Yayıncılık, Ankara, 2002, 666

54. Larson, RA, Naturally Occuring Antioxidants, Lewis Publishers, New York, 1997, 25

55. Caporaso N, The molecular epidemiology of oxidative damage to DNA and cancer, J. of the National Cancer Inst, 2003; 95(17): 1263-65

56. Yamada K, Takayagani M, Kamei H, Nagai ve ark., Effects of memantine and donepezil on amyloid β-induced memory impairment in a delayed-matching to position task in rats, Behav Brain Res., 2005; 162 (2):191-9

57. Bagchi K, Purı S, Free radicals and antioxidants in health and disease, EMHJ, 1998; 4 (2): 350-360

58. Halliwell B, Free radicals and antioxidants:A personal view, Nutrition Reviews, 1994; 52(8): 253-265

59. Bondy SC, Naderi S, Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species. Biochem Pharmacol 1994;48:155-9.

60. Babior B, NADPH Oxidase: An update. Blood, 1999; 93: 1464-1476

61. Meydani M, Antioxidants and cognitive function, ILSI Nutr. Rev, 2001; 59(8): 75 82

62. Simic G, Free Radical Mechanisms in Autoxidation Processes, J. Chem. Educ, 1981; *58* (2): 125

63. Valko M, Leıbfrıtz D, Moncol J, Cronın MTD ve ark., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol, 2007; 39 (1): 44-84

64. Halliwell B, Handbook of antioxidants, Packer L., Cadenas E., Ed., 3, Marcel Dekker, New York, 2002:1-46

65. Ji LL, Antioxidants and oxidative stres in exercise, Exp Biol Med, 1999; 222: 283-292

66. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL, Antioxidants and prevention of chronic disease, Critica Reviews in Food Science And Nutrition, 2004;44:275-295

67. Miller DM, Buettner GR, Aust SD, Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. Free Radic. Biol. Med, 1990; 8:95-108

68. Nordberg J, Arner ESJ, Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, Free Radic Biol Med., 2001; 31(11):1287-1312

69. De Gray AD, HO_2, The forgotten radical, DNA Cell Biol.2002;21:251-257

70. Bolann BJ, Ulvık RJ, On limited ability of superoxide to release iron from ferritin, Eur J Biochem.1990; 193:899-904

71. Droy-Leafix MT, Packer L, Antioxidant food suplements in human health, (Packer L., Hıramatsu M., Yoshıkawa T), Academic Pres, California, USA, 1999, 343-357

72. Halliwell, B, Role of free radicals in the neurodegenerative disease: therapeutic implications for antioxidant treatment, Drugs&Aging, 2001;18(9): 685-716

73. Leeuwenburgh C, Heinecke W, Oxidative Stres And Antioxidants İn Exercise. Curr Med Chem, 2001;8:829-838

74. Zhu YZ, Huang SH, Tan BKH, Sun J, Whiteman M, Zhu YC, Antioxidants in chinese herbal medicines: a biochemical perspective, Nat. Prod. Rep.2004; 21:478-489

75. Karlson J, Antioxidants And Exercise, Human Kinetics, Usa.,1997- 26

76. Jackson MJ, Papa S, Bolanos J, Bruckdorfer R, Carlsen H, Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitocondrial function, Mol Aspects Med, 2002; 23: 209-85

77. Milton NGN, Role of hydrogen peroxide in the aetiology of Alzheimer disease, Drugs Aging. 2004;21(2):81-100

78. Stichtenoth DO, Frolich JC. Nitric oxide and inflammatory joint diseases. Br J Rheumatol, 1998;37:246-57

79. Aslan M, Ozben T, Reactive Oxygen And Nitrogen Species in Alzheimer's Disease. Curr Alzheimer Res, 2004;1 (2): 111-119

80. Ridnour LA, Thomas DD, Mancardi D, Espey MG ve ark., The chemistry of nitrosative stres induced by nitric oxide and reactive nitrogen species: putting perspective on stressful biological situations. Biol. Chem. 2004; 385(1): 1-10

81. Halliwell B, Free Radicals in Biology and Medicine. fourth ed: Oxford University Press, 2007;79:100

82. Zwart de LL, Meerman JH, Commandeur JNM, Vermulen NPE. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. Free Radical Biology & Medicine. 1999;26: 202–226

83. Defeng W, Cederbaum AI, Alcohol, oxidative stres and free radical damage, Alcohol Res Heath, 2003;27(4): 277-284

84. Chakravarti B, Chakravarti DN, Oxidative modification of proteins: age-related changes. Gerontology, 2007;53:128-39

85. Berlett BS, Stadtman ER, Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem, 1997;272:20313-6

86. Stadtman ER, Berlett BS, Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. Chem Res Toxicol 1997;10:485-94

87. Stadtman ER, Levine RL, Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. Amino Acids 2003;25:207-18

88. Kayalı R, Çakatay U, Protein Oksidasyonunun Ana Mekanizmaları. Cerrahpaşa J Med 2004;35:83-9

89. Ter Steege JCA, Koster-Kamphuis L, van Straaten EA, Forget PP, Buurman WA. Nitrotyrosine in plasma of celiac disease patients as detected by a new sandwich ELISA. Free Radic Biol Med 1998; 25: 953-963

90. Halliwell B, Gutteridge JMC, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an owerview, Methods Enzymol, 1990;186(1):85

91. Seven A, Candan G, Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu. Klinik Gelişim, 1995;8: 3906-3911

92. Uysal M, Serbest Radikaller, lipit peroksitleri ve organizmada prooksidan- antioksidan dengeyi etkileyen koşullar, Klinik Gelişim, 1998;11: 336-341

93. Catala A, An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. Int J Biochem Cell Biol 2006;38:1482-95

94. Holley A, Cheeseman KH, Measuring free radical reactions in vivo, Br Med Bull.1993; 49 (3): 494-505

95. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA ve ark, Oxygen radicals and human disease, Ann Intern Med., 1987; 107(4): 526-45

96. Akkus I, Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Mimoza yayınları, Kuzucular Ofset, Konya, 1995, 1-57

97. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L, Advanced glycation end-products: a review. Diabetologia 2001;44:129-46

98. Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. Cardiovasc Res 1998;37: 586-600

99. Lapolla A, Traldi P, Fedele D, Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. Clin Biochem 2005;38: 103-15

100. Thorpe SR, Baynes JW, Maillard reaction products in tissue proteins: New products and new perspectives. Amino acids. 2003;25: 275-81

101. Niwa T, Katsuzaki T, Miyazaki S, et al. Immunohistochemical detection of imidazolone, a novel advanced glycation end product, in kidneys and aortas of diabetic patients. J Clin Invest 1997;99:1272–80

102. Silacci P, Advanced glycation end-products as a potential target for treatment of cardiovascular disease. J Hypertens, 2002;20:1483-5

103. Gasser A, Forbes JM, Advanced glycation: implications in tissue damage and disease. Protein Pept. Lett. 2008; 15: 385–391

104. Loske C, Neumann A, Cunningham AM, Nichol K ve ark, Cytotoxicity of advanced glycation endproducts is mediated by oxidative stress. J. Neural Transm, 1998; 105: 1005–1015

105. Castellani RJ, Harris PL, Sayre LM, Fujii J ve ark, Active glycation in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease: N(epsilon)-(carboxymethyl) lysine and hexitol-lysine. Free Radic. Biol. Med.2001; 31: 175–180

106. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. Oxford University Press. Inc, London 1999

107. Evans MD, Dizdaroğlu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB J. 2003; 17: 1195-1214

108. Lovell MA, Markesbery WR. Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. Nucleic Acid Research 2007; 35(22): 7497-7504

109. Mecocci P, Polidori MC, Cherubini A, Ingegni T, Mattioli P, Catani M, et. al. Lymphocyte Oxidative DNA Damage and Plasma Antioxidants in Alzheimer Disease. Arch Neurol 2002; 59:794-8

110. Migliore L, Fontana I, Trippi F, Colognato R, Coppede F ve ark, Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients. Neurobiol. Aging 2005; 26: 567-73

111. Moreira PI, Nunomura A, Nakamura M, Takeda A, Shenk JC ve ark. Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease. Free Radical Biology & Medicine 2008; 44(8): 1493-505

112. Reddy P, Jaruga P, O'Connor T, Rodriguez H, Dizdaroglu M. Overexpression and rapid purification of Escherichia coli formamidopyrimidine-DNA glycosylase. Protein expression and purification 2004;34(1):126-133

113. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radicalinduced damage to DNA: mechanisms and measurement. Free radical biology & medicine 2002;32(11):1102-1115

114. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. Miral Dizdaroglu. Cancer Letters, 2012;327:26-47

115. O'Neill P, Pulse radiolytic study of the interaction of thiols and ascorbate with OH adducts of dGMP and dG: implications for DNA repair processes, Radiat. Res. 1983;96 :198–210

116. Steenken S, Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e^- and OH adducts, Chem. Rev. 1989;89: 503–520

117. Vieira A, Steenken S, Pattern of OH radical reaction with adenine and its nucleosides and nucleotides. Characterization of two types of isomeric OH adduct and their unimolecular transformation reactions, J. Am. Chem. Soc. 1990;112: 6986–6994

118. Candeias LP, Steenken S, Reaction of HO^- with guanine derivatives in aqueous solution: Formation of two different redox-active OH-adduct radicals and their unimolecular transformation reactions. Properties of $G(-H)^-$, Chem. Eur. J. 2000;6 : 475–484

119. Sonntag C, The Chemical Basis of Radiation Biology,Taylor and Francis, New York, 1987

120. Steenken S, Addition–elimination paths in electron-transfer reactions between radicals and molecules, J. Chem. Soc., Faraday Trans. I 1987;83:113–124

121. Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. Mutation research 1992;275(3-6):331-342

122. Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. Free radical biology & medicine 1995;18(6):1033-1077

123. Teoule R, Radiation-induced DNA damage and its repair. International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine 1987;51(4):573-589

124. Wagner JR, Van Lier JE, Berger M, Cadet J, Thymidine hydroperoxides: structural assignments, conformational features and thermal decomposition in water, J. Am. Chem. Soc. 1994;116:2235–2242

125. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. Mutat Res 2004;567:1-61

126. Halliwell B, Auroma OI, DNA damage by oxygen-derived species: its mechanism and measurement in mammalian systems. FEBS Letter, 1991; 281: 9-19

127. David SS, O'Shea VL, Kundu S, Base-excision repair of oxidative DNA damage. Nature, 2007;447(7147):941–950

128. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K, Linn S, Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. Annual Review of Biochemistry, 2004;73:39–85

129. Madhusudan S, Middleton MR. The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. Cancer Treat Rev 2005;31:603-17

130. Liu M, Doublié S, Wallace SS, NEIL3, the final frontier for the DNA glycosylases that recognize oxidative damage, Mutation Research, 2013;743–744:4– 11

131. Dizdaroglu M, Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. Mutation research 2005;591(1-2):45-59

132. Hazra TK, Hill JW, Izumi T, Mitra S. Multiple DNA glycosylases for repair of 8 oxoguanine and their potential in vivo functions. Progress in nucleic acid research and molecular biology 2001;68:193-205

133. Wallace SS, Bandaru V, Kathe SD, Bond JP. The enigma of endonuclease VIII. DNA repair 2003;2(5):441-453

134. Dizdaroglu M, Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases, Mutation Research, 2005;591:45-59

135. McCullough AK, Dodson ML, Lloyd RS. Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures. Annual review of biochemistry 1999;68:255-285

136. Hoeijmakers J, Genome maintenance mechanisms for preventing cancer, Nature, 2001;441: 366-374

137. Martin LJ, DNA damage and repair: Relevance to mechanisms of neurodegeneration. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 2008; 67 (5): 377-387

138. Hegde ML, Hazra KT, Sankar M, Early steps in the DNA base excision/single strand interruption repair pathway in mammalian cells. Cell Research, 2008; 18 (1): 27-47

139. Marsin S, Vidal AE, Sossou M, Menissier-de Murcia J ve ark, Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1, The Journal of Biological Chemistry, 2003;278: 44068–44074

140. Nishioka K, Ohtsuba T, Oda H, Fujiwara T ve ark, Expression and differential intracellular localization of two majör forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alteratively spiced OGG1 mRNAs, Mol Biol Cell,1999; 10:1637-1652

141. Takao M, Aburatami H, Kobayashi K, Yasui A ve ark., Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage, Nucl. Acids Res, 1998; 26: 2917-2922

142. Boiteux S, Radicella JP, The human OGG1 gene: structure, functions and its implication in the process of carcinogenesis, Arch Biochem Biophys, 2000; 177: 1-8

143. Andreassi MG, Foffaa I, Manfredi S, Bottoa N, Cioppac A, Picano E, ve ark. Genetic polymorphisms in XRCC1, OGG1, APE1 and XRCC3 DNA repair genes, ionizing radiation exposure and chromosomal DNA damage in interventional cardiologists. Mutation Research 2009; 666:57–63

144. Bandaru, V, Sunkara, S., Wallace, S., Bond, J.P., A novel human DNA glycosylase that removes oxidative DNA damage and is homologous to Escherichia coli endonuclease VIII, DNA Repair, 2002;1:517-529

145. Takao, M., Kano, S., Kobayashi, K., Zhang, Q.M., Yonei, S., Van der Horst, G.T.J., Yasui, A., A back-up glycosylase in Nth1 knock-out mice is a functional Nei (endonuclease VIII) homologue, J. Biol. Chem, 2002;277: 42205-42213

146. Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. FASEB J 1998; 12(12):1075-95

147. Garcia-Touchard A, Henry TD, Sangiorgi G, Spagnoli LG, Mauriello A, Conover C, et al. Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25(6):1119-27

148. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem 1999; 274(31):21491-4

149. Vihinen P, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. Int J Cancer 2002; 99(2):157-66

150. Kuzuya M, Iguchi A. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. J Atheroscler Thromb 2003; 10(5):275-82

151. Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. Mol Aspects Med 2008; 29(5):290-308

152. Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. FASEB J 1991; 5(8):2145-54

153. Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, et al. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. J Leukoc Biol 2001; 69(6):851-9

154. Sethi CS, Bailey TA, Luthert PJ, Chong NH. Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders. Br J Ophthalmol 2000; 84(6):654-66

155. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. Eur J Cell Biol 1997; 74(2):111-22

156. Evans JD, Ghaneh P, Kawesha A, Neoptolemos JP. Role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. Digestion 1997; 58(6):520-8

157. S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. Exp Lung Res 2005; 31(6):599-621

158. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. Circ Res 1995; 77(5):863-8

159. Murphy G. The regulation of connective tissue metalloproteinases by natural inhibitors. Agents Actions Suppl 1991; 35:69-76

160. Tanaka H, Miyazaki N, Oashi K, Tanaka S, Ohmichi M, Abe S. Sputum matrix metalloproteinase-9: tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio in acute asthma. J Allergy Clin Immunol 2000; 105(5):900-5

161. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. J Clin Oncol 2000; 18(5):1135-49.

162. Thorgeirsson UP, Lindsay CK, Cottam DW, Gomez DE. Tumor invasion, proteolysis, and angiogenesis. J Neurooncol 1994; 18(2):89-103

163. Elshaw SR, Henderson N, Knox AJ, Watson SA, Buttle DJ, Johnson SR. Matrix metalloproteinase expression and activity in human airway smooth muscle cells. Br J Pharmacol 2004; 142(8):1318-24

164. Lukes A, Mun-Bryce S, Lukes M, Rosenberg GA, Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases, Mol Neurobiol. 1999;19(3):267-84

165. Vincenti MP, The matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genes. Transcriptional and posttranscriptional regulation, signal transduction and cell-type-specific expression. Methods in Molecular Biology, 2001;151: 121–148

166. Backstrom JR, Lim GP, Cullen MJ, Tokes ZA, Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1–40). J. Neurosci.,1996; 16: 7910–7919

167. Horstmann S, Budig L., Gardner H., Koziol J. ve ark., Matrix metalloproteinases in peripheral blood and cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease, Int. Psyc., 2010; 22(6):966-972

168. Güngen C, Ertan T, Eker E, Yaşar R, ve ark. Standardize Mini Mental Test'in Türk Toplumunda Hafif Demans Tanısında Geçerlik ve Güvenilirliği. Turk Psikiyatri Dergisi. 2002; 13(4):273-281

169. Hinton R, Dobrota M., Density gradient centrifugation, 1978;6:1

170. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988;16:1215

171. Dizdaroglu M, Kirkali G, Jaruga P. Formamidopyrimidines in DNA: mechanisms of formation, repair, and biological effects. Free Radic Biol Med 2008;45:1610-21

172. Hoffmann, E, Mass Spectrometry Principles and Applications. Second edition. Wiley-Interscience., 2007

173. Watson JT, Sparkman DO, Introduction to the Mass Spectrometry. Wiley-Interscience.2007

174. Siuzdak G, Mass Spectrometry for Biotechnology. Academic press.1996

175. Erdik E, Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler, Ankara:Fersa Matbaacılık, 1998

176. Jaruga P, Kirkali G, Dizdaroglu M, Measurement of formamidopyrimidines in DNA. Free Radic. Biol. Med. 2008;45: 1601-1609

177. Reddy P, Jaruga P, Kirkali G, Tuna G, Nelson B, Dizdaroglu M, Mass Spectrometric Assays for the Identification and Quantification of Human DNA Repair Protein NEIL1 by Liquid Chromatography/Isotope-Dilution Tandem Mass Spectrometry Using Its

Fully ^{15}N-Labeled Analogue as an Internal Standard, Journal of Proteome Research, 2013; 1;12(2):1049-61

178. Reddy P, Jaruga P, Nelson BC, Lowenthal M, Dizdaroglu M, Stable isotopelabeling of DNA repair proteins, and their purification and characterization. Protein Expr. Purif. 2011; 78: 94-101

179. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR –a perspective. J Mol Endocrinol 2005; 34:597-601

180. Shipley GL, An introduction to real-time PCR. Real Time PCR (Dorak MT, ed) New York, Taylor & Francis Group. 2006;1-38

181. Pfaffl MW, Relative quantification. Real Time PCR (Dorak MT, ed) New York, Taylor & Francis Group. 2006;39-62

182. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A ve ark, The real-time polymerase chain reaction Mol Aspects Med 2006;27:95-125

183. Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl Mw. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. Biotechnol Lett. 2006;28(19):1601-13

184. Topçuoğlu ES, Selekler K. Alzheimer Hastalığı. Geriatri. 1998;1(2):63-67

185. Montine TJ, Neely MD, Quinn JF, Beal F, Markesbery WR. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's Disease. Free Radic Biol Med. 2002; 33(5):620-626

186. Alzheimer, A. Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnride. Allg. Z. Psychiatr. 1907; 64:146–148

187. Evans DA, Funkenstein HH, Albert M.S, Scherr P.A, ve ark, Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. JAMA, 1989;262:2551–2556

188. Katzman R, The prevalence and malignancy of Alzheimer's disease: A major killer. Arch. Neurol.1976; 33:217–218

189. National Institute on Aging. Progress report on Alzheimer's disease (NIH publications no. 95-3994, Washington DC:US Government Printing Office, 1995

190. Khachaturian ZS, Diagnosis of Alzheimer's disease. Arch. Neurol. 1985; 42:1097–1105

191. Pratico D, Peripheral biomarkers of oxidative damage in Alzheimer's disease: the road ahead, Neurobiology of Aging, 2005; 26: 581-583

192. Markesbery W, Lovell M, DNA Oxidation in Alzheimer's Disease, Antioxidants & Redox Signaling, 2006;8:11-12

193. Mulluart E, Boerrigter MET., Radid R., Swaab DF. ve ark., Increased levels of DNA breaks in cerebral cortex of Alzheimer's disease patients. Neurobiol Aging, 1990; 11:169-73

194. Mecocci P, Polidori C, Cherubini A, Chionne F ve ark, Oxidative damage to DNA lymphocytes from AD patients, Neurology, 1998; 51: 1014-1017

195. Mecocci P, Polidori C, Cherubini A, Ingegni T ve ark, Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer's disease, Arch. Neurol., 2002; 59: 791-798

196. Wang J, Markesbery WR, and Lovell MA. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment. J Neurochem 2006; 96: 825–832

197. Abe T, Tohgi H, Isobe C ve ark, Remarkable increase in the concentration of 8-hydroxyguanosine in cerebrospinal fluid from patients with AD, J. Neuroscience Res, 2002; 70:447-50

198. Koppele J, Lucassen PJ, Sakkee AN, van Asten JG ve ark, 8-OHdG levels in bran do not indicate oxidative DNA damage in Alzheimer's disease, Neurobiol. Aging, 1996; 17: 819–826

199. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. Physiological reviews 1998;78(2):547-581

200. Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. Free radical biology & medicine 2002;33(5):575-586

201. Rattan S, Siboska G E, Wikmar FP, Clark BFC. ve ark. Levels of oxidative DNA damage product 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human serum increase with age, Medical Science Research, 1995; 23:469-470

202. Dizdaroglu M, Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin, Mutat. Res. 1992;275: 331–342

203. Hanaoka T, Yamano Y, Hashimoto H, Kagawa J ve ark, A Preliminary Evaluation of Intra- and Interindividual Variations of hOGG1 Messenger RNA Levels in Peripheral Blood Cells as Determined by a Real-Time Polymerase Chain Reaction Technique, Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 2000;9: 1255–1258

204. Shacter E, Protein oxidative damage. Methods Enzymol 2000; 319: 428-436

205. Shacter E, Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. Drug Metab Rev 2000; 32: 307-326

206. Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. Free Radic Biol Med 1999; 27: 1151-1163

207. Korolainen MA, Pirttila T, Cerebrospinal fluid, serum and plasma protein oxidation in AD, Acte Neurol Scand, 2009; 119:32-38

208. Tohgi H, Abe T, Yamazaki K et al. Alterations of 3-nitrotyrosine concentration in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimers disease. Neurosci Lett 1999;269:52–4

209. Ryberg H, So¨derling AS, Davidsson P et al. Cerebrospinal fluid levels of free 3-nitrotyrosine are not elevated in the majority of patients with amyotrophic lateral sclerosis or Alzheimers disease. Neurochem Int 2004; 45:57–62

210. Mariani E, Polidori, MC, Cherubini A, Mecocci P, Oxidative stres in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An Overview, J.Chromatogr B, 2005;827:65-75

211. Bourdel MI, Beauvieux M.D, Peuchant E, Harston S, Decamps A, Reignier B, Emeriau J, Rainfray M, Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. Age and Ageing, 2001;30:235-241

212. Kalman J, Dey I, Ilona SV, Matkovics B, Brown D, Janka Z, Platelet membrane fluidity and plazma malondialdehyde levels in alzheimer's demented patients with and without family history of dementia. Biol Psychiatry,1994; 35(3), 190-194

213. Barnham KJ, Masters CL, Bush AI, Neurodegenerative diseases and oxidative stres. Natue Reviews Orug Discovery, 2004;3: 205-214

214. Bermejo P, Gomez-Serranillos P, Santos J, Pastor E ve ark, Determination of malondealdehyde in Alzheimer's disease: a comparative study of high-performance liquid chromatography and thiobarbituric acid test, Gerontology, 1997; 43:218-222)

215. Yoshiyama Y, Asahina M, Hattori, T, Selective distribution of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) in Alzheimer's disease brain. Acta Neuropathologica, 2000;99: 91–95

216. Saarela MS, Interaction between matrix metalloproteinase 3 and the epsilon4 allele of apolipoprotein E increases the risk of Alzheimer's disease in Finns. Neuroscience Letters, 2004; 367: 336–339

217. Tanzi RE, Kovacs DM, Kim TW, Moir RD, Guenette SY, Wasco W, The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease. Neurobiol Dis, 1996,3:159 –168

218. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β-peptide. Nature reviews 2007; 8:101-12

219. Roher AE, Kasunic TC, Woods AS, Cotter RJ, Ball MJ, Fridman R, Proteolysis of A beta peptide from Alzheimer disease brain by gelatinase A. Biochem Biophys Res Commun, 1994;205:1755–1761

220. Yin KJ, Cirrito JR, Yan P, et al. Matrix metalloproteinases expressed by astrocytes mediate extracellular amyloid-beta peptide catabolism. J Neurosci 2006; 26: 10939–48

221. Beuche W, Yushchenko M, Mader M, Maliszewska M, Felgenhauer K, Weber F, Matrix metalloproteinase-9 is elevated in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. Neuroreport, 2000;11:3419–3422

222. Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H, Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. Biochim. Biophys. Acta, 2000;1477:267–283

223. Peress N, Perillo E, Zucker S, Localization of tissue inhibitör of matrix metalloproteinases in Alzheimer's disease and normal brain. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1195;54: 16–22

224. Lorenzl S, Albers D, Relkin N, Ngyuena T ve ark., Increased plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with Alzheimer's disease, Neurochemistry International, 2003; 43: 191–196

225. Miyazaki K, Hasegawa M, Funahashi K, Umeda M, A metalloproteinase inhibitor domain in Alzheimer amyloid protein precursor. Nature, 1993; 362: 839–841

226. LePage RN, Fosang AJ, Fuller SJ, Murphy G ve ark, Gelatinase A possesses a beta-secretase-like activity in cleaving the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. FEBS Lett. 1995; 377: 267–270

227. Li JJ, Surini M, Catsicas S, Kawashima E, Bouras C, Age-dependent accumulation of advanced glycosylation end products in human neurons. Neurobiol Aging, 1995; 16: 69–76

228. Kimura T, Takamatsu J, Araki N, Goto M ve ark, Accumulation of advanced glycation end products of the Maillard reaction with age in human hippocampal neurons. Neurosci Lett, 1996;208: 53–56

229. Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening M, Stopa E, Vlassara H, Bucala R, Manogue K, Cerami A, Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci USA, 1994;91: 4766–4770

230. Takeda A, Yasuda T, Miyata T, Mizuno K ve ark, Immunohistochemical study of advanced glycation end products in aging and Alzheimer's disease brain. Neurosci Lett, 1996;221: 17–20

231. Horie K, Miyata T, Yasuda T, Takeda A ve ark, Immunohistochemical localization of advanced glycation end products, pentosidine and carboxymethyllysine in lipofuscin pigments of Alzheimer's disease and aged neurons. Biochem Biophys Res Commun, 1997;236:327–332

232. Yan SD, Chen X, Schmidt AM, Brett J ve ark, Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress. Proc Natl Acad Sci USA, 1994;91: 7787–7791

233. Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M ve ark, RAGE and amyloid-β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. Nature, 1996; 382: 685–691

234. Mattson MP, Carney JW, Butterfield DA, A tombstone in Alzheimer's? Nature 1995;373: 481

235. Liu Y, Dargusch R, Schubert D, Beta amyloid toxicity does not require RAGE protein. Biochem Biophys Res Commun, 1997;237: 37–40

236. Bär KJ, Franke S, Wenda B, Müller S ve ark, Pentosidine and N^{ε}-(carboxymethyl)-lysine in Alzheimer's disease and vascular dementia, Neurobiology of Aging, 2003; 24: 333–338

237. Dizdaroglu M, Reddy PT, Jaruga P, Identification and quantification of DNA repair proteins by liquid chromatography/isotope-dilution tandem mass spectrometry using their fully ^{15}N-labeled analogues as internal standards, J Proteome Res. 2011;10(8):3802-13

238. Weissman L, Souza-Pinto N, Mattson M, Bohr V, DNA base excision repair activities in Mouse models of Alzheimer's disease, Neurobiology of Aging, 2009; 3: 2080-2081

8.EKLER

EK-1. GÖNÜLLÜ İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAY FORMU

Araştırmanın adı: Farklı Dejeneratif Demans Hastalıklarında Oksidatif Hasar

Demans, erişkin çağda bilişsel yıkım sonucu gelişen işlevsellik kaybıdır. Demans oluşumunda dejeneratif nedenler ilk sırada yer almaktadır. Bu dejeneratif nedenler farklı demans tiplerine yol açmaktadır. En sık görülen Alzheimer tipi demanstır. Bunu ikinci sırada Lewy cisimcikli demans takip eder ve Alzheimer ile sık karışan bir klinik tablo sergiler. Bir diğer demans tipi ise daha nadir görülen Frontotemporal demanstır. Son çalışmalarda Alzheimer tipi demansa sahip kişilerden alınan dokularda, dejenerasyon ve yaşlanmada önemli rol oynayan oksidatif DNA hasarının yüksek olduğu gösterilmiştir fakat diğer iki dejeneratif hastalığa yönelik henüz böyle bir çalışma yapılmamıştır. Bu bilgilerden yola çıkarak yürüteceğimiz bu çalışmada, söz konusu üç demans tipine sahip kişilerin periferik kanlarından elde ettiğimiz plazmalarında, protein, lipid, karbonhidrat ve DNA düzeyinde, oksidatif hasarı ve antioksidan durumunu saptamayı amaçladık. Böylece bu hasarların onarımı hakkında da yorum yapabilmeyi beklemekteyiz.

Bu arada klinik tanıyı desteklemek için bir dizi soru-cevap niteliğinde testler uygulanacaktır. Bu testler yaklaşık 1.5 saat sürecektir. Bu sayede çalışmamızın, farklı dejeneratif hastalıkların tanı ve tedavisine yönelik yapılacak araştırmalara ışık tutacağı düşünülmektedir. Ancak söz konusu çalışmalardan size dolaysız olarak yansıyacak bir yarar bulunmamaktadır.

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Nöroloji Anabilim Dalı ve Biyokimya Anabilim Dalı tarafından yürütülecektir. Çalışmamızda, toplam 100-110 katılımcı yer alacaktır. Sizden gönüllü olarak katılmanızı isteme nedenimiz, sizde her hangi bir demans hastalığının bulunmaması ve sağlıklı bir birey olmanızdır. Bu da bize, hastaları, sağlıklı bireylerle karşılaştırma fırsatını verecektir. Kabul ettiğiniz takdirde, çalışmayı yapabilmek için sizden 10+10 ml. (15 ml'lik bir tüp içine) kadar kan örneği almamız gerekecektir. Nöroloji Anabilim Dalı'nda almış olduğumuz kan örneğiniz, soğukta saklanarak hızla Biyokimya Anabilim Dalı'na götürülecektir. Ölçümler, National Institute of Standards and Technology (NIST) kurumunun Biochemical Science Bölümü'nün DNA Ölçümleri Grubu laboratuvarlarında (Gaithersburg, Maryland, U.S.A) gerçekleştirilecektir. Bu kandan alınan ölçümler çalışmanın hedefine yönelik incelenecektir.

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: 1-) İğne batmasına bağlı olarak çok hafif bir acı duyabilirsiniz. 2-) Çok düşük bir ihtimal de olsa iğne batması sonrasında, kanamanın uzaması veya enfeksiyon gibi bir risk olabilmektedir.

Yukarıda sayılanlar bu gibi araştırmalarda genellikle belirtilmesi gereken fakat görülme olasılığı çok düşük olan risklerdir. Bununla birlikte yapacağımız işlemlerin herhangi bir yan etkisi yoktur. Fakat araştırma süresince her hangi bir risk ile karılaşma durumunuzda tedaviniz tarafımızca karşılanacaktır.

Yapılacak araştırmanın getireceği olası yararlar: Bu çalışma, 3 farklı dejeneratif demans tipinin nedeni ve gelişiminin öğrenilmesinde yararlı olacaktır. Bu hastalıkların temelinde yatan nedenlerin öğrenilmesi ise tedavide yeni yaklaşımlara ve ileride bu hastalıklardan etkilenmiş bireylere fayda sağlayacaktır. Bu çalışmaya katılmaktan dolayı maddi bir çıkarınız olmayacaktır.

Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi yada özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Gönüllü bu çalışmaya katılmayı red etme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığı'na açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda

kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır. DNA örnekleri sadece bu çalışmada kullanılmak üzere alınacaktır. Alınan biyolojik materyaller yurt dışına gözetimimiz ve kontrolümüz dahilinde götürülerek analiz yapılacaktır.

Gönüllünün Beyanı

Sayın Dr. …… ……..…… tarafından Dokuz Eylül Ünversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı ve Biyokimya Anabilim Dalında tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı.

Bu araştırmaya katılmam durumunda, kişisel bilgilerimin korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi. Çalışmanın yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (*Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim).* Ayrıca sağlık durumumda herhangi bir olumsuz risk durumu düşünülürse, araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, hangi araştırıcıyı, hangi telefon ve adresten arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımıma ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Katılımcı
Adı, soyadı:
Adres:
Tel.
İmza

Katılımcı ile görüşen araştırmacı
Adı soyadı, unvanı:
Adres:
Tel.
İmza:

VE/VEYA

Bu çalışmaya katılması düşünülen kişi onay formunu anlayabilecek mental yeterliliğe sahip değil veya okuyamıyor veya imzalayamıyor. Bu kişinin çalışmaya katılması konusunda benim iznim soruldu. Bu çalışmaya katılmayı red edecek herhangi bir olası nedeni olmadığını biliyorum.

Görüşme tanığı
Adı, soyadı:
Adres:
Tel:
İmza:

EK-2. KATILIMCI İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAY FORMU

Araştırmanın adı: Farklı Dejeneratif Demans Hastalıklarında Oksidatif Hasar

Demans, erişkin çağda bilişsel yıkım sonucu gelişen işlevsellik kaybıdır. Demans oluşumunda dejeneratif nedenler ilk sırada yer almaktadır. Bu dejeneratif nedenler farklı demans tiplerine yol açmaktadır. En sık görülen Alzheimer tipi demanstır. Bunu ikinci sırada Lewy cisimcikli demans takip eder ve Alzheimer ile sık karışan bir klinik tablo sergiler. Bir diğer demans tipi ise daha nadir görülen Frontotemporal demanstır. Son çalışmalarda Alzheimer tipi demansa sahip kişilerden alınan dokularda, dejenerasyon ve yaşlanmada önemli rol oynayan oksidatif DNA hasarının yüksek olduğu gösterilmiştir fakat diğer iki dejeneratif hastalığa yönelik henüz böyle bir çalışma yapılmamıştır. Bu bilgilerden yola çıkarak yürüteceğimiz bu çalışmada, söz konusu üç demans tipine sahip kişilerin perifer kanlarından elde ettiğimiz plazmalarında, protein, lipid, karbonhidrat ve DNA düzeyinde, oksidatif hasarı ve antioksidan durumunu saptamayı amaçladık. Böylece bu hasarların onarımı hakkında da yorum yapabilmeyi beklemekteyiz.

Bu arada klinik tanıyı desteklemek için bir dizi soru-cevap niteliğinde testler uygulanacaktır. Bu testler yaklaşık 1.5 saat sürecektir. Bu sayede çalışmamızın, farklı dejeneratif hastalıkların tanı ve tedavisine yönelik yapılacak araştırmalara ışık tutacağı düşünülmektedir. Ancak söz konusu çalışmalardan size dolaysız olarak yansıyacak bir yarar bulunmamaktadır.

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Nöroloji Anabilim Dalı ve Biyokimya Anabilim Dalı tarafından yürütülecektir. Çalışmamızda, toplam 100-110 katılımcı yer alacaktır. Sizden katılmanızı isteme nedenimiz, sizin bu 3 farklı demans tipinden birine sahip olmanızdır. Kabul ettiğiniz takdirde, çalışmayı yapabilmek için sizden 10+10 ml. (15 ml'lik bir tüp içine) kadar kan örneği almamız gerekecektir. Nöroloji Anabilim Dalı'nda almış olduğumuz kan örneğiniz, soğukta saklanarak hızla Biyokimya Anabilim Dalı'na götürülecektir. Ölçümler, National Institute of Standards and Technology (NIST) kurumunun Biochemical Science Bölümü'nün DNA Ölçümleri Grubu laboratuvarlarında (Gaithersburg, Maryland, U.S.A) gerçekleştirilecektir. Bu kandan alınan ölçümler çalışmanın hedefine yönelik incelenecektir.

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: 1-) İğne batmasına bağlı olarak çok hafif bir acı duyabilirsiniz. 2-) Çok düşük bir ihtimal de olsa iğne batması sonrasında, kanamanın uzaması veya enfeksiyon gibi bir risk olabilmektedir.

Yukarıda sayılanlar bu gibi araştırmalarda genellikle belirtilmesi gereken fakat görülme olasılığı çok düşük olan risklerdir. Bununla birlikte yapacağımız işlemlerin herhangi bir yan etkisi yoktur. Fakat araştırma süresince her hangi bir risk ile karılaşma durumunuzda tedaviniz tarafımızca karşılanacaktır.

Yapılacak araştırmanın getireceği olası yararlar: Bu çalışma, 3 farklı dejeneratif demans tipinin nedeni ve gelişiminin öğrenilmesinde yararlı olacaktır. Bu hastalıkların temelinde yatan nedenlerin öğrenilmesi ise tedavide yeni yaklaşımlara ve ileride bu hastalıklardan etkilenmiş bireylere fayda sağlayacaktır. Bu çalışmaya katılmaktan dolayı maddi bir çıkarınız olmayacaktır.

Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Katılımcı, bu çalışmada yer almayı red etme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Bu çalışmaya katılmanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir. Araştırmacı da katılımcının kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kişisel bilgilerinizin yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız da kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığı'na açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın veya raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır. DNA örnekleri sadece bu çalışmada kullanılmak üzere alınacaktır.

Alınan biyolojik materyaller yurt dışına gözetimimiz ve kontrolümüz dahilinde götürülerek analiz yapılacaktır.

Katılımcının Beyanı

Sayın Dr. …… ……..…… tarafından Dokuz Eylül Ünversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı ve Biyokimya Anabilim Dalında tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı.

Bu araştırmaya katılmam durumunda, kişisel bilgilerimin korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi. Çalışmanın yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (*Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim).* Ayrıca sağlık durumumda herhangi bir olumsuz risk durumu düşünülürse, araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, hangi araştırıcıyı, hangi telefon ve adresten arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımıma ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Katılımcı
Adı, soyadı:
Adres:
Tel:
İmza:

Katılımcı ile görüşen araştırmacı
Adı soyadı, unvanı:
Adres:
Tel:
İmza:

VE/VEYA

Bu çalışmaya katılması düşünülen kişi onay formunu anlayabilecek mental yeterliliğe sahip değil veya okuyamıyor veya imzalayamıyor. Bu kişinin çalışmaya katılması konusunda benim iznim soruldu. Bu çalışmaya katılmayı red edecek herhangi bir olası nedeni olmadığını biliyorum.

Görüşme tanığı
Adı, soyadı:
Adres:
Tel:
İmza:

EK-3. STANDARDİZE MİNİ MENTAL TEST ÖRNEĞİ

Ad Soyad: **Tarih:** **Yaş:**
Eğitim (yıl): **Meslek:** **Aktif El:**
T. Puan:

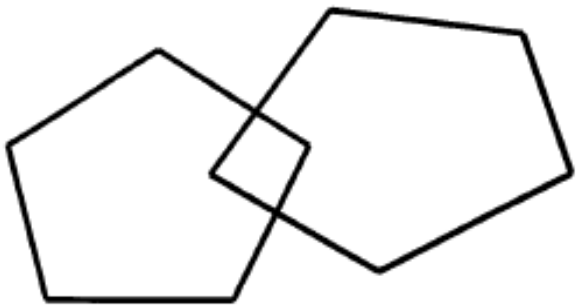
YÖNELİM (Toplam puan 10)
Hangi yıl içindeyiz..... ( )
Hangi mevsimdeyiz ..... ( )
Hangi aydayız ..... ( )
Bu gün ayın kaçı ..... ( )
Hangi gündeyiz ..... ( )

Hangi ülkede yaşıyoruz ..... ( )
Şu an hangi şehirde bulunmaktasınız ..... ( )
Şu an bulunduğunuz semt neresidir ..... ( )
Şu an bulunduğunuz bina neresidir ..... ( )
Şu an bu binada kaçıncı kattasınız ..... ( )

KAYIT HAFIZASI (Toplam puan 3)
Size birazdan söyleyeceğim üç ismi dikkatlice dinleyip ben bitirdikten sonra tekrarlayın
(Masa, Bayrak, Elbise) (20 sn süre tanınır) Her doğru isim 1 puan ..... ( )
DİKKAT ve HESAP YAPMA (Toplam puan 5)
100'den geriye doğru 7 çıkartarak gidin. Dur deyinceye kadar devam edin.
Her doğru işlem 1 puan. (100, 93, 86, 79, 72, 65) ..... ( )

HATIRLAMA (Toplam puan 3)
Yukarıda tekrar ettiğiniz kelimeleri hatırlıyor musunuz? Hatırladıklarınızı söyleyin.
(Masa, Bayrak, Elbise)..... ( )

LİSAN (Toplam puan 9)
a) Bu gördüğünüz nesnelerin isimleri nedir? (saat, kalem) 2 puan (20 sn tut)
..... ( )
b) Şimdi size söyleyeceğim cümleyi dikkatle dinleyin ve ben bitirdikten sonra tekrar
edin. "Eğer ve fakat istemiyorum" (10 sn tut) 1 puan..... ( )
c) Şimdi sizden bir şey yapmanızı isteyeceğim, beni dikkatle dinleyin ve söylediğimi
yapın. "Masada duran kağıdı sağ/sol elinizle alın, iki elinizle ikiye katlayın ve yere
bırakın lütfen" Toplam puan 3, süre 30 sn, her bir doğru işlem 1 puan..... ( )
d) Şimdi size bir cümle vereceğim. Okuyun ve yazıda söylenen şeyi yapın. (1 puan)
"GÖZLERİNİZİ KAPATIN" (arka sayfada)..... ( )
e) Şimdi vereceğim kağıda aklınıza gelen anlamlı bir cümleyi yazın (1 puan)..... ( )
f) Size göstereceğim şeklin aynısını çizin. (arka sayfada) (1 puan) ..... ( )



EK-4. NEIL1 VE OGG1 mRNA EKSPRESYONLARI OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR

Ekspresyon analizi çalışmalarının optimizasyonu için bazı hasta ve kontrol örnekleri ile ön deneme çalışmaları gerçekleştirildi.

Ön deneme çalışmalarında gerçekleştirilen basamaklar;

- Her iki gen bölgesi için 3 ayrı primer dizisi "Vector® NTI (Life Science-Invitrogen-Almanya)" programında tasarlandı ve bu primer setleriyle ön çalışmalar gerçekleştirildi.
- Farklı amplifikasyon sıcaklıklarında PCR protokolleri oluşturuldu ve elde edilen PCR ürünleri ayrıca %1,5'luk agaroz jel elektroforezinde yürütülerek sonuçlar kontrol edildi.

SYBR Green (N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine) tekniği ile gen ekspresyonu kantitasyonu için uygun primer seçimi en önemli noktadır. Bu tekniğin başarıyla uygulanabilmesi için PCR primerlerinin sadece özgül cDNA'ya bağlanması, primer dimer veya özgül olmayan amplifikasyon ürünü vermemesi gereklidir. Bu prensipler göz önüne alınarak kullanılan primerler ve amplikon uzunlukları Tablo 15'de verilmiştir.

Tablo 15. Primer dizileri ve PCR ürün uzunlukları

Primer Adı	Primer Dizisi	PCR Ürün Uzunluğu
OGG1 (253a)-F	5' -CTACGGGGCGGTGCCTGCTG- 3'	302 bps
OGG1 (253b)-R	5' -GCTCGTCTGGTGTGGGCCTG- 3'	
OGG1 (385a)-F	5' -GCCCGCGCGTTCTGCCCAG- 3'	286 bps
OGG1 (385b)-R	5' -TGCGCACGGCCTCCAGCTCG- 3'	
OGG1 (955a)-F	5' -CCGAGGAGACAAGAGCCAGG- 3'	182 bps
OGG1 (955b)-R	5' -CGATGGGGTCTTGTCGCAGC- 3'	
NEIL1 (3a)-F	5' -TGGCCCTGGTCTTCCGCTTC- 3'	281 bps
NEIL1 (3b)-R	5' -CAGGAGGGCCTCGCAGATGG- 3'	
NEIL1 (192a)-F	5' -GTTCGGCCGCTGGGACCTTG- 3'	247 bps
NEIL1 (192b)-R	5' -CAGGGCCTCCAGGACCGAGC- 3'	
NEIL1(GK111a)-F	5' -CGGCGGCTGCGTGGAGAAGTC- 3'	300 bps
NEIL1(GK111b)-R	5' -GTCCCAGCGGCCGAACCGGC- 3'	
β-AKTİN-F	5' -CCACACTGTGCCCATCTACG- 3'	99 bps
β-AKTİN-R	5' -AGGATCTTCATGAGGTAGTCAGTCAG- 3'	

Seçilen bazı hasta ve kontrol cDNA örnekleriyle NEIL1, OGG1 ve β-aktin gen ekspresyonları tüm primer çiftleri için ayrı ayrı olacak şekilde RT-PCR ile analiz edildi. Ön deneme çalışmalarında RT-PCR analizinde amplifikasyon basamağındaki bağlanma ve uzama sıcaklıkları ve süreleri optimize edildi. Tüm genlere ait primerlerin aynı çalışmada DNA'ya bağlanıp çoğalmasını sağlayan RT-PCR protokolü Tablo 16.'da gösterilmektedir.

Tablo 16. RT-PCR çalışma protokolü

	İşlem	**Sıcaklık**	**Süre**	**Artış (°C/s)**	**Veri Alımı**
1.Denatürasyon (1 siklus)	İlk denatürasyon	95 °C	5'	20	-
2.Amplifikasyon (40 siklus)	Denatürasyon	95 °C	15''	20	-
	Bağlanma	65 °C	10''	20	-
	Uzama	72 °C	30''	20	Tek
3.Erime eğrisi (1 siklus)	Denatürasyon	95 °C	0	20	-
	"Reannealing"	65 °C	15''	20	-
	Denatürasyon	95 °C	0	0,1	Sürekli
4.Soğuma	Soğuma	40 °C	30''	20	-

OGG1 geni erime eğrisi analizi sonuçlarında;

- OGG1 253a-b primerleri ile spesifik olmayan bir ürünün daha amplifiye olduğu gözlendi (2 adet pik mevcut) (Şekil 74.)
- OGG1 385a-b ve 955a-b primerleri ile yapılan RT-PCR erime eğrisi analizi sonuçlarında ise, tek pik gözlenmesi istenilen bölgelerin dışında farklı bir ürünün amplifiye olmadığı görüldü (Şekil 74.)

Elde edilen RT-PCR sonuçlarını kontrol etmek amacıyla %1,5'luk agaroz jel elektroforezine uygulanan ürünlere ait sonuçlarda ise;

- OGG1 253a-b, 385a-b ve 955a-b primerleriyle yapılan RT-PCR çalışmasından elde edilen ürünlerin hepsinde tek bant gözlendi (Şekil 75.).

NEIL1 geni erime eğrisi analizi sonuçlarında;

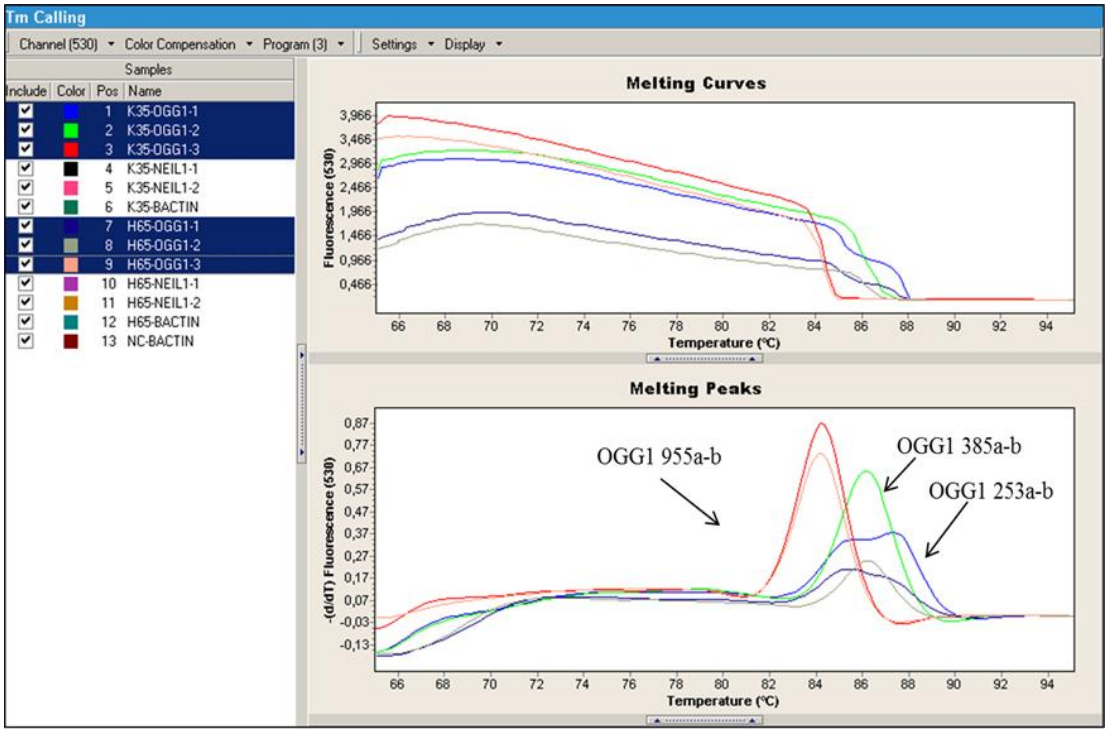
- NEIL1 3a-b primerleri ile spesifik olmayan bir ürünün daha amplifiye olduğu gözlendi (2 adet pik mevcut) (Şekil 76.).
- NEIL1 192a-b primerleri ile yapılan RT-PCR erime eğrisi analizi sonuçlarında ise tek pik gözlenmesi istenilen bölgelerin dışında farklı bir ürünün amplifiye olmadığı görüldü (Şekil 76.).
- NEIL1 GK111a-b primerleri ile yapılan RT-PCR erime eğrisi analizi sonuçlarında da tek pik gözlenmesi istenilen bölgelerin dışında farklı bir ürünün amplifiye olmadığını gösterdi (Şekil 77.).

Elde edilen RT-PCR sonuçlarını kontrol etmek amacıyla %1,5'luk agaroz jel elektroforezine uygulanan ürünlere ait sonuçlarda ise;

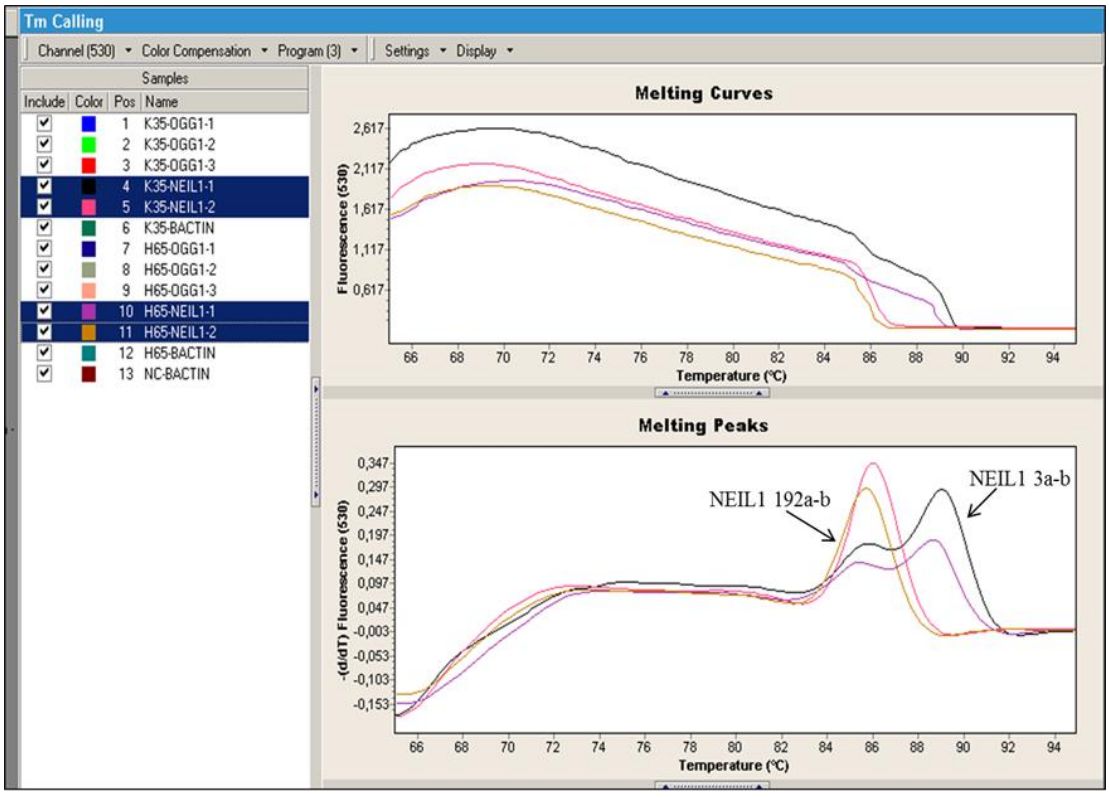
- NEIL1 3a-b primerleriyle yapılan RT-PCR çalışmasıyla elde edilen ürünlerde tek bant gözlendi. RT-PCR analizinde gözlenen 2. pik elektroforez sonucunda gözlenmedi (Şekil 75.).
- NEIL1 192a-b primerleriyle yapılan RT-PCR çalışmasıyla elde edilen ürünlerde ise iki bant gözlendi. Bu durum spesifik olmayan bir ürünün de aynı primerlerle çoğaldığını gösterdi (Şekil 75.).
- NEIL1 GK111a-b primerleriyle yapılan RT-PCR çalışmasıyla elde edilen ürünlerde tek bant gözlendi (Şekil 78.).

β-Aktin primerleriyle yapılan RT-PCR analizlerinde ise tek pik ve elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezi görüntüsünde de tek bant gözlendi (Şekil 75, 77, 78.).

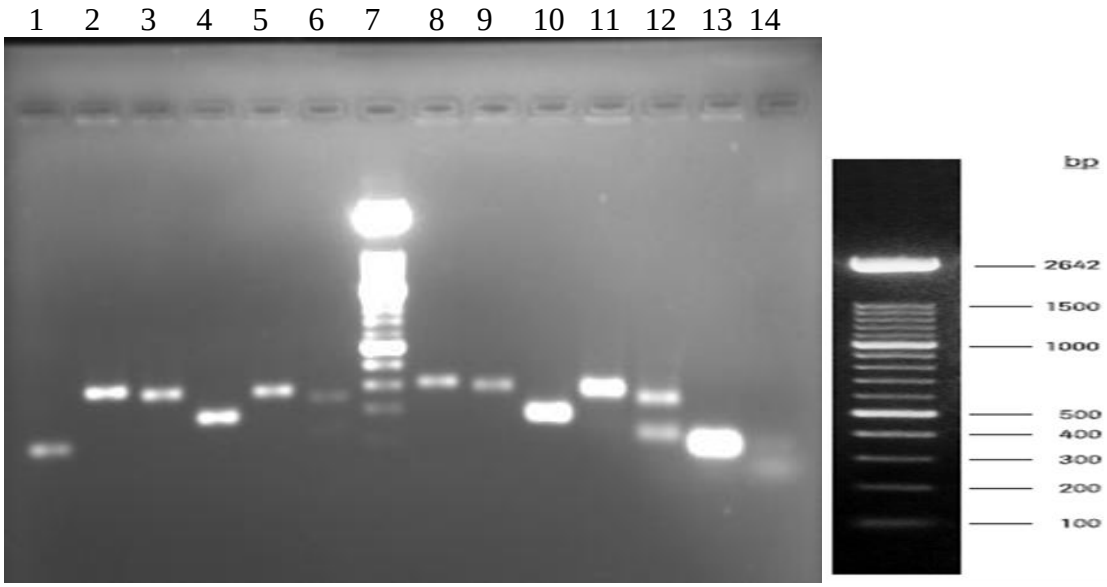
Elde edilen bulgular doğrultusunda OGG1 955a-b, NEIL1 GK111a-b ve β-Aktin primerleriyle hasta ve kontrol örneklerinde bu primerlere özgü genlerin ekspresyon çalışmaları gerçekleştirildi.



Şekil 74. Kontrol (K35) ve hasta (H65) örneklerine ait OGG1(955a-b, 385a-b, 253 a-b primerleri kullanıldı) erime eğrisi analizi

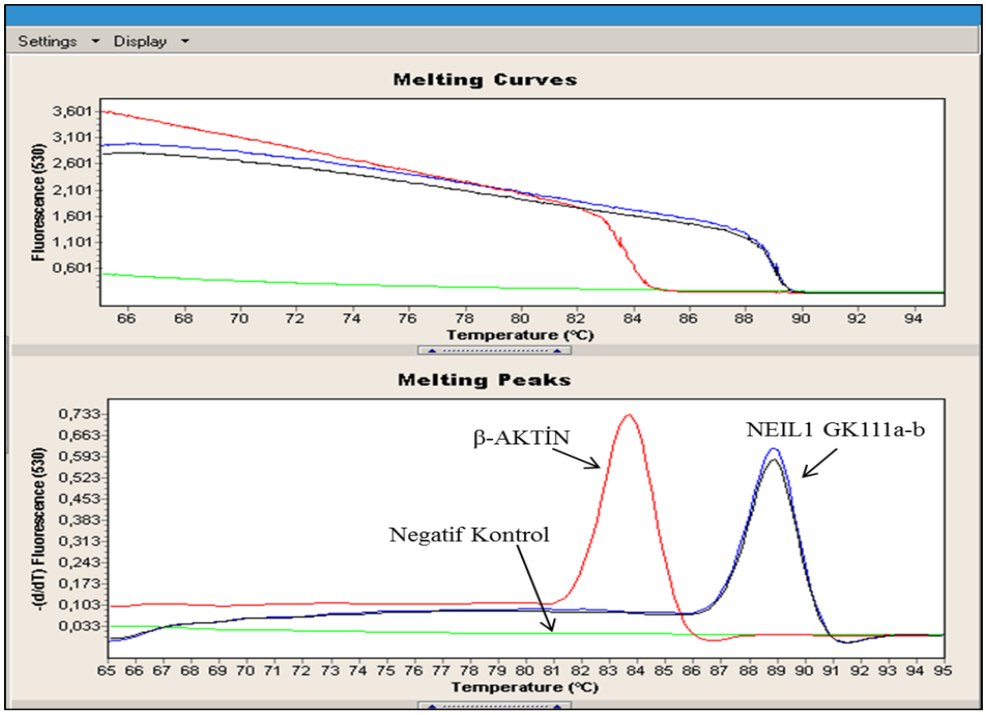


Şekil 76. Kontrol (K35) ve hasta (H65) örneklerine ait NEIL1 (192a-b, 3a-b primerleri kullanıldı) erime eğrisi analizi

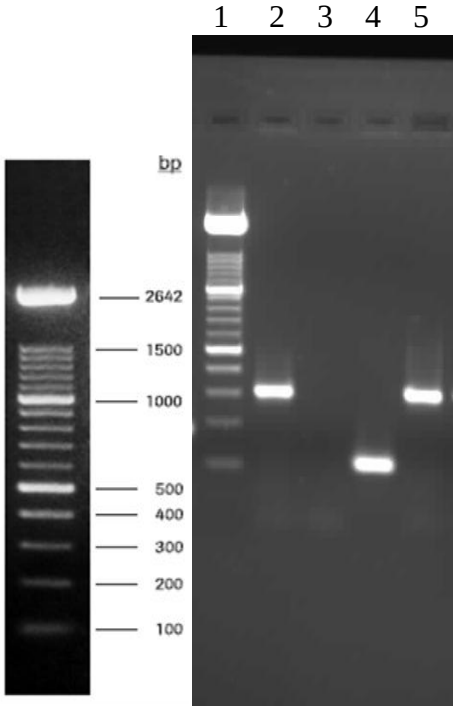


Kuyucuk No	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**
Örnek sırası	**Kontrol β-aktin**	**Kontrol OGG1 253a-b**	**Kontrol OGG1 385a-b**	**Kontrol OGG1 955a-b**	**Kontrol NEIL1 3a-b**	**Kontrol NEIL1 192a-b**	**Marker**	**Hasta OGG1 253a-b**	**Hasta OGG1 385a-b**	**Hasta OGG1 955a-b**	**Hasta NEIL1 3a-b**	**Hasta NEIL1 192a-b**	**Hasta β-aktin**	**Negatif Kontrol β-aktin**
Bant sayısı	Tek bant	Tek bant	Tek bant	**Tek bant**	Tek bant	İki bant		Tek bant	Tek bant	**Tek bant**	Tek bant	İki bant	Tek bant	Tek bant
RT-PCR pik sayısı	1 pik	2 pik	1 pik	**1 pik**	2 pik	1 pik		2 pik	1 pik	**1 pik**	2 pik	1 pik	1 pik	-
Ürün Uzunluğu (bps)	99	302	286	**182**	281	247		302	286	**182**	281	247	99	-

Şekil 75. NEIL1(3 a-b, 192 a-b), OGG1 (253 a-b, 385 a-b, 955 a-b) primerleri ile gerçekleştirilen RT-PCR çalışması ürünlerinin %1,5'luk agaroz jel elektroforezi görüntüsü



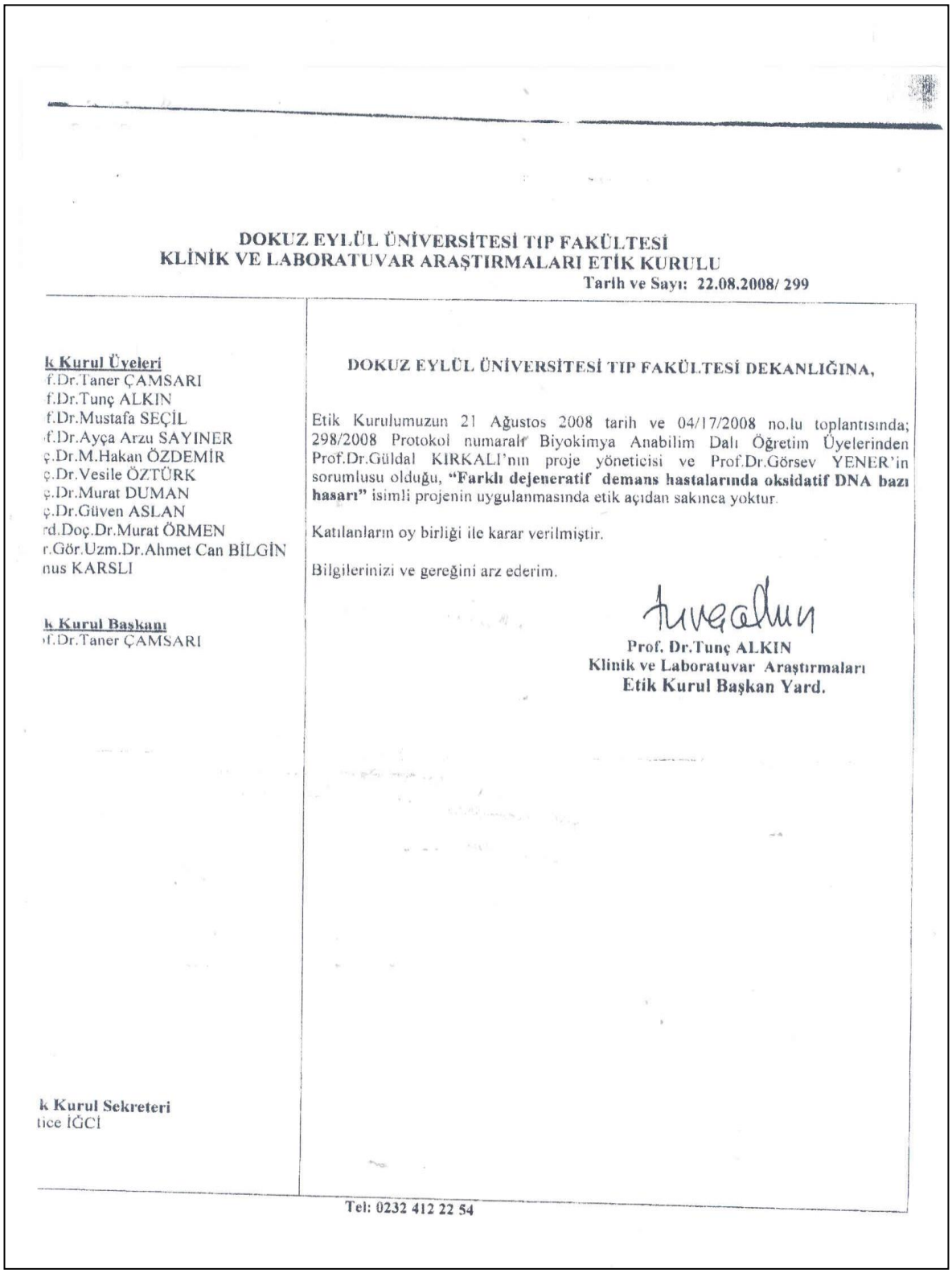
Şekil 77. Kontrol (K35) ve hasta (H65) örneklerine ait NEIL1 (GK111a-b primerleri kullanıldı) ve β-Aktin erime eğrisi analizi



Kuyucuk No	1	2	3	4	5
Örnek sırası	Marker	Hasta NEIL1 GK111a-b	Negatif Kontrol NEIL1 GK111a-b	Hasta NEIL1 B-Aktin	Kontrol NEIL1 GK111a-b
Bant sayısı	Tek bant	-	Tek bant	Tek bant	Tek bant
RT-PCR pik sayısı		1 pik		1 pik	1 pik
Ürün Uzunluğu (bps)		300		99	300

Şekil 78. NEIL1 (GK111 a-b) ve β-Aktin primerleri ile gerçekleştirilen RT-PCR çalışması ürünlerinin %1,5'luk agaroz jel elektroforezi görüntüsü

EK-5. ETİK KURUL ONAYI



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

Tarih ve Sayı: 22.08.2008/ 299

k Kurul Üyeleri
f.Dr.Taner ÇAMSARI
f.Dr.Tunç ALKIN
f.Dr.Mustafa SEÇİL
f.Dr.Ayça Arzu SAYINER
ç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR
ç.Dr.Vesile ÖZTÜRK
ç.Dr.Murat DUMAN
ç.Dr.Güven ASLAN
rd.Doç.Dr.Murat ÖRMEN
r.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN
nus KARSLI

k Kurul Başkanı
f.Dr.Taner ÇAMSARI

k Kurul Sekreteri
tice İĞCİ

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 21 Ağustos 2008 tarih ve 04/17/2008 no.lu toplantısında; 298/2008 Protokol numaralı Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Güldal KIRKALI'nın proje yöneticisi ve Prof.Dr.Görsev YENER'in sorumlusu olduğu, **"Farklı dejeneratif demans hastalarında oksidatif DNA bazı hasarı"** isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr.Tunç ALKIN
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkan Yard.

Tel: 0232 412 22 54

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:2013/21-21**	**Tarih: 06.06.2013**
	Prof.Dr.Güldal KIRKALI ve Prof.Dr.Görsev YENER'in sorumlusu olduğu **"Farklı Dejeneratif Demans Hastalarında Oksidatif DNA Bazı Hasarı"** isimli klinik araştırmaya ait 06.06.2013 tarihli araştırıcı dilekçesine ilişkin olarak; **-"Farklı Dejeneratif Demans Hastalarında Oksidatif DNA Bazı Hasarı"** isimli çalışma adının **"Farklı Dejeneratif Demans Hastalarında Oksidatif Hasar:Alzheimer Hastalığında Oksidatif Makromolekül Hasarının ve Onarımının İncelenmesi"** olarak değiştirilmesi ile ilgili belgeler incelenmiş ve uygun görülmüştür	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr..Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Psikiyatri Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Bilgin CÖMERT	İç Hastalıkları (Yoğun Bakım B.D)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Işıl TEKMEN	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Müge KİRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	

EK-6. ARBİS FORMATINDA ÖZGEÇMİŞ

GAMZE TUNA

TC Kimlik No / Pasaport No:	47599765248
Doğum Yılı:	1982
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya AD. 35340 İzmir/Türkiye
Telefon :	0232 412 4428
Faks :	-
e-posta :	tungamze@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Hacettepe Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji Bölümü	Lisans	2004
Türkiye	Hacettepe Üniversitesi	Tıp Fakültesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Biyokimya	Yüksek Lisans	2008
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Tıp Fakültesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Biyokimya	Doktora	-

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Deppo Özel Kontrol Laboratuvarı	Türkiye	İzmir	Moleküler Biyoloji Analiz Birimi	Birim Sorumlusu	2012-
National Institute of Standards and Technology (NIST)	U.S.A.	Gaithersburg, MD	Biochemical Science Division	Konuk Araştırmacı	1 Haziran-31 Ağustos 2012
MST (Makro-Schottdorf-Labor) Laboratuvar	Türkiye	İzmir	Biyokimya Birimi	Birim Sorumlusu	2008-2009
Düzen Laboratuvarlar Grubu	Türkiye	Ankara	Moleküler Biyoloji ve Genetik Birimi	Birim Sorumlusu	2005-2008
Düzen Laboratuvarlar Grubu	Türkiye	Ankara	Protein Biyokimyası ve Özel İmmünoloji Birimi	Biyolog	2004-2005

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Oksidatif stres, DNA hasarı ve onarımı, Alzheimer hastalığı, Reaktif oksijen türleri kaynaklı oksidatif makromolekül hasarı
Polymerase Chain Reaction (PCR), Real-Time PCR, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Indirect Immunofluorescence (IFA), ELISA, Fluorescent Enzyme Immunoassay (FEIA), Time-resolved fluoroimmunoassay, Kapiller Elektroforez, Southern Blot, protein saflaştırma ve elektroforez teknikleri, Spektrofotometri, Sıvı Kromatografi- Sıralı Kütle Spektrometri (LC-MS/MS), Gaz Kromatografi- Sıralı Kütle Spektrometri (GC-MS/MS), Hücre kültürü çalışmaları, FISH (Floresan In Situ Hibridizasyon), Microarray yöntemi

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			8
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		**Tamamlanan**	**Devam Eden**
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		

Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/ sorumluluk/olay/üyelik vb.)	Türk Biyokimya Derneği Üyeliği-Türkiye
	The Society For Free Radical Biology and Medicine-Indianapolis/U.S.A- Üyelik
	Düzenleme Kurulu Üyeliği, Oksidatif Stres, DNA Hasarı, DNA Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi Kursu, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir (Konuşmacı: Dr. Miral Dizdaroğlu, NIST, DNA Teknolojileri Grubu Başkanı) (2012)
	Düzenleme Kurulu Üyeliği, Kanser Biyolojisinde Güncel Konular Kursu, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir (Konuşmacı: Dr. Bülent Özpolat, MD Anderson Cancer Center) (2011)
	Çalıştay ve Poster Oturumları Organizasyonu Görevi, 6th ORPHEUS Conference. "PhD Quality Indicators for Biomedicine and Health Sciences" Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, Turkey (2011)

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐	EMBO Kısa Dönem Araştırma Bursu	European Molecular Biology Organization (EMBO)	2012
☐	Özerdem A, Ceylan D, **Tuna G**, Kırkalı G, Akdede B B, Yeşilyurt S, Tunca Z, 15th Annual Meeting and Clinical Education Symposium of Psychiatric Association of Turkey, Antalya, Turkey. Association of Oxidative Stress and Neurothrophic Factors in Bipolar Disorder, (Research Project Encouragement Prize by Psychiatric Association)	Psikiyatri Birliği	2012
☐	**Tuna G,** Özkaya F, Ertaş T, Yener G, Dizdaroğlu M, Kırkalı G, 23. Ulusal Biyokimya Kongresi-Adana, Türkiye. Alzheimer hastalığında oksidatif DNA baz hasarının ve DNA onarım enzimlerinin ekspresyon düzeyleri, Turk J Biochem, 2011; 36 (S), Syf 285, Poster No:159 (Poster ödülü).	23. Ulusal Biyokimya Kongresi- Türk Biyokimya Derneği	2011

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Uludag I.F, Bilgin S, Zorlu Y, **Tuna G**, Kirkali G, Interleukin-6, interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist levels in epileptic seizures, Seizure, 2013; pii: S1059-1311(13)00069-1
Reddy P, Jaruga P, Kirkali G, **Tuna G**, Nelson B, Dizdaroglu M, Mass Spectrometric Assays for the Identification and Quantification of Human DNA Repair Protein NEIL1 by Liquid Chromatography/Isotope-Dilution Tandem Mass Spectrometry Using Its Fully ^{15}N-Labeled Analogue as an Internal Standard, Journal of Proteome Research, 2013;12(2):1049-61
Demirhan E, Purdas-Eskut N, Zorlu Y, Çukurova I, Kirkali G, **Tuna G**, Blood Levels of TNF-α, IL-10, and IL-12 in Idiopathic Sudden Sensorineural Hearing Loss, The Laryngoscope. 2013 Feb 4, DOI: 10.1002/lary.23907
Kulaksiz-Erkmen G, Dalmizrak O, **Dincsoy-Tuna G**, Dogan A, Ogus I.H, Ozer N, Amitriptyline may have a supportive role in cancer treatment by inhibiting glutathione S-transferase pi (GST-π) and alpha (GST-α), Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2011;(1): 1–6
Tuna G, Kulaksiz-Erkmen G, Dalmizrak O, Dogan A, Ogus I.H, Ozer N, Inhibition characteristics of hypericin on rat small intestine glutathione-S-transferases, Chem. Biol. Interact. 2010;188(1):59-65

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Jaruga P, Reddy P.T, Nelson B.C, **Tuna G**, Kirkali G, Dizdaroglu M, Identification and Quantification of Human DNA Repair Proteins: OGG1 and NEIL1 by Liquid Chromatography / Isotope- Dilution Tandem Mass Spectrometry Using Its Fully ^{15}N-Labeled Whole Proteins as Internal Standards, SFRBM, 19th Annual Meeting-San Diego,CA, U.S.A (14-18 Kasım 2012, Poster Sunumu), Free Radical Biology & Medicine, 2012; Vol. 53, Supp.2, P:144, PN:351
Ceylan D, **Tuna G**, Kırkalı G, Dizdaroglu M, Tunca Z, Yesilyurt S, Özerdem A, Quantitative assessment of DNA base damage in bipolar disorder, New directions in psychiatry - A forum for European young psychiatrists, Sorrento, Italy (23-25 Mayıs 2012-Poster Sunumu). Özet kitabı sayfası: 92 P58.
Ceylan D, **Tuna G**, Kırkalı G, Dizdaroglu M, Tunca Z, Yesilyurt S, Özerdem A, DNA damage in bipolar disorder: a quantitative assessment by using GC-MS, Journal of Bipolar Disorders, 5th Biennial Conference of the International Society for Bipolar Disorders, İstanbul, Türkiye (14-17 Mart 2012, Poster Sunumu). 2012, 1(14): 66 P45.
Tuna G, Stabil İzotop İşaretli DNA Tamir Proteini ^{15}N-hOGG1'ın Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Oksidatif Stres, DNA Hasarı, DNA Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi Kursu, (22-25 Mayıs 2012, Sözlü Sunum), Dokuz Eylül Üniversitesi, Dekanlık Binası, İzmir
Tuna G, Özkaya F, Ertaş T, Yener G, Dizdaroğlu M, Kırkalı G, Alzheimer hastalığında oksidatif DNA baz hasarının ve DNA onarım enzimlerinin ekspresyon düzeyleri, Turk J Biochem, 23. Ulusal Biyokimya Kongresi-Adana, Türkiye (29 Kasım-2 aralık 2011, Poster Sunumu), 2011; 36 (S), Syf 285, Poster No:159
Kant M, Akış M, **Tuna G**, İşlekel H, Kırkalı G, Dizdaroğlu M, Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi ile hasarlı DNA nükleozidleri S-cdA ve 8-OH-dG'nin idrarda ölçümü için yöntem geçerlilik çalışması, Turk J Biochem, 23. Ulusal Biyokimya Kongresi-Adana, Türkiye, (29 Kasım-2 Aralık 2011, Poster Sunumu), 2011; 36 (S), Syf 209, Poster No:084
Tuna G, Ozkaya F, Dizdaroglu M, Kirkali G**,** Oxidatively Induced DNA Base Damage and DNA Repair Enzyme Expression Levels in Alzheimer's Disease**,** Free Radical Biology & Medicine**,** SFRBM, 18th Annual Meeting-Atlanta, GA, U.S.A (16-20 Kasım 20011, Poster Sunumu), 2011; Vol. 51, P:32-33, PN:56

Eskut N, Ozkaya F, **Tuna G**, Zorlu Y, Kirkali G, Evaluating the Lipid Profiles, Lipoprotein(A), Oxidized LDL and Adiponectin Levels in Patients Using Carbamazepin And Valproic Acid, 4th International Congress of Molecular-İstanbul, Türkiye, (27-30 Haziran 2011, Poster Sunumu) (Poster No:222)
Tuna G, Dalmizrak O, Kulaksiz-Erkmen G, Dogan A, Ogus H, Ozer N, Characterization of the inhibitory behaviour of hypericin on glutathione-S-transferase-pi from rat small intestine**,** FEBS Journal, 36th FEBS Congress-Torino, Italy, (25-30 Haziran 2011, Poster Sunumu), 2011; 278 (Suppl. 1) 392-393 (P26.13)
Tuna G, Kulaksiz-Erkmen G, Dalmizrak O, Dogan A, Ogus H, Ozer N, The inhibition kinetics of hypericin on glutathione-S-transferase-alpha from rat small intestine**,** FEBS Journal, 36th FEBS Congress-Torino, Italy, (25-30 Haziran 2011, Poster Sunumu), 2011; 278 (Suppl. 1) 398 (P26.31)
Kulaksiz-Erkmen G, Dalmizrak O, **Tuna G**, Dogan A, Ogus H, Ozer N, The inhibition kinetics of glutathione S-transferase pi by amitriptyline, FEBS Journal, 36th FEBS Congress-Torino, Italy, (25-30 Haziran 2011, Poster Sunumu), 2011; 278 (Suppl. 1) 399-400 (P26.34)
Zorlu Y, Eskut N, Filiz C, Balaban G, **Tuna G**, Ozkaya F, Calis N, Are antiepileptic drugs causes of premature atherosclerosis by disturbing lipid metabolism? Journal of Neurology, 21st Meeting of the European-Neurological-Society, Lisbon, PORTUGAL (28-31 Mayıs 2011, Poster Sunumu), 2011; Vol. 258, Suppl. 1, (193-193)
Kant M, **Tuna G**, Akıs M, Islekel H, Kirkali G, The PhD program in the department of medical biochemistry institute of health sciences, Orpheus Conference Book, 6th ORPHEUS Conference-İzmir, Turkey, (27-30 Nisan 2011, Poster Sunumu), 2011; Page 74,Poster No: 69
Akdemir N, **Tuna G**, Özkaya F, Kırkalı G, Demir N, Farelerde preterm doğumun önlenmesinde anti-makrofaj migrasyon inhibitör faktör antikorunun etkinliği, Turk J Biochem, 22. Ulusal Biyokimya Kongresi-Eskişehir, Türkiye, (27-30 Ekim 2010, Poster Sunumu), 2010; 35 (S), Syf 218, Poster No:098
Sarı İ, **Dinçsoy G**, Öğüş H**,** Nonlineer Regresyon Analizi İle 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enziminin Kinetik Parametrelerinin Tayini, X. Biyoistatistik Kongresi-Sivas, Türkiye, (Sözlü Sunum)