



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK
LİSANS
TEZİ**

**MANGANEZ SÜPEROKSİT DİSMUTAZ VE
GLUTATYON PEROKSİDAZ
GEN POLİMORFİZMLERİNİN
PARKİNSON HASTALIĞINDAKİ ROLÜ**

EVİRİM SAYGIN

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

EYLÜL 2016



**MANGANEZ SÜPEROKSİT DİSMUTAZ VE GLUTATYON PEROKSİDAZ
GEN POLİMORFİZMLERİNİN PARKİNSON HASTALIĞINDAKİ ROLÜ**

Evrin SAYGIN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

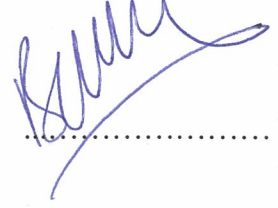
EYLÜL 2016

Evrin SAYGIN tarafından hazırlanan "Manganez Süperoksit Dismutaz ve Glutasyon Peroksidaz Gen Polimorfizmlerinin Parkinson Hastalığındaki Rolü" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Benu KARAHALİL

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



Başkan : Prof. Dr. Halit Sinan SÜZEN

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

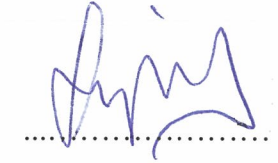
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Sevgi AKAYDIN

Biyokimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



Tez Savunma Tarihi: 30/09/2016

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Evrin SAYGIN

30/09/2016

MANGANEZ SÜPEROKSİT DİSMUTAZ VE GLUTATYON PEROKSİDAZ GEN
POLİMORFİZMLERİNİN PARKİNSON HASTALIĞINDAKİ ROLÜ

(Yüksek Lisans Tezi)

Evrin SAYGIN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eylül 2016

ÖZET

Parkinson hastalığı (PH), 65 yaş üstü popülasyonun %1-2'sini etkileyen, Alzheimer Hastalığı (AH)'ndan sonra en sık görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır. PH'nın etiyolojisindeki faktörlerden birisi oksidatif strestir. Serbest radikalleri de içeren Reaktif Oksijen Türleri (ROT), DNA, RNA, lipitler ve proteinler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek hasar meydana getirmektedir. Sunulan tez çalışmasında amaç, manganez süperoksit dismutaz (*Mn-SOD*) ve glutatyon peroksidaz 1 (*GPZ1*) genlerinde ortaya çıkan genetik farklılığa sahip bireylerin PH'ya yakalanma riskinin test edilmesidir. PH tanısı almış 99 birey hasta grubu; 96 sağlıklı birey ise kontrol grubu olarak alınmıştır. *Mn-SOD Ala16Val* ve *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmlerinin analizi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RPUP) yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmi ile PH riski arasındaki ilişki *Ala/Ala* genotipi referans alınarak incelenmiştir. *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmi ile PH riski arasında bir ilişki tespit edilmemiştir. *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmi yabanıl tip *Pro/Pro* genotipi referans alınarak incelenmiştir. *GPZ1 Pro/Leu* ve *Leu/Leu* varyant genotipini taşıyanlarda hasta ve kontrol grubu arasında PH riski açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Her iki polimorfizmi birlikte taşımanın PH riskinde herhangi bir artışa neden olmadığı tespit edilmiştir. Serbest radikalleri de içeren ROT'un detoksifikasyonunda önemli rol oynayan *Mn-SOD* ve *GPZ1* enzimlerinde görülen polimorfizmler ile PH riski arasındaki ilişkinin daha geniş örnek popülasyonunda tekrar edilmesi hastalık riskinde genetik faktörlerin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

Bilim Kodu : 1021

Anahtar Kelimeler : Parkinson hastalığı, polimorfizm, *Mn-SOD*, *GPZ1*, oksidatif stres

Sayfa Adedi : 69

Danışman : Prof. Dr. Bensu KARAHALİL

THE ROLE OF MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE AND GLUTATHIONE
PEROXIDASE GENE POLYMORPHISMS IN PARKINSON'S DISEASE

(M. Sc. Thesis)

Evrin SAYGIN

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

September 2016

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer Disease, affecting 1–2% of the population over the age of 65. Oxidative stress is one of the factors in the etiology of PD. Reactive Oxygen Species (ROS), including free radicals, can damage biomolecules such as lipids, proteins, DNA and RNA due to react with them. The purpose of this study is to determine that individuals with inherited differences of the genes manganese superoxide dismutase (*Mn-SOD*) and glutathione peroxidase 1 (*GPX1*) are at an increased risk of PD. A total of 99 PD patients and a group of 96 healthy individuals is selected as a control group. *Mn-SOD Ala16Val* and *GPX1 Pro198Leu* gene polymorphisms were determined by using Polymerase Chain Reaction (PCR) and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). The relationship of *Mn-SOD Ala16Val* gene polymorphism and PD risk were examined by selecting *Ala/Ala* genotype as a reference. There is no association between *Mn-SOD Ala16Val* gene polymorphism and PD risk. The relationship of *GPX1 Pro198Leu* genotype and PD risk were examined by selecting *Pro/Pro* wild type genotype as a reference. There is not a statistically significant result between patients and control in individuals with *GPX1 Pro/Leu* and *Leu/Leu* variant genotype. Carrying the two gene polymorphisms together has not been found to have an increased risk factor for PD. Investigation of polymorphisms in *Mn-SOD* and *GPX1* enzymes, have a crucial role in detoxification of ROS including free radicals, with a large sample size again, contribute to understanding the role of genetic factors in development of PD.

Science Code : 1021

Key Words : Parkinson's disease, polymorphism, *Mn-SOD*, *GPX1*, oxidative stress

Page Number : 69

Advisor : Prof. Dr. Benu KARAHALİL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince gösterdiği sabır, anlayış, çaba ve verdiği bilgiler ile yanımda olan, sevgi ve saygı duyduğum hocam Prof. Dr. Bensu KARAHALİL' e, sonsuz desteği ve deneyimleri ile her zaman kapısını çalabildiğim sayın hocam Prof. Dr. Ali Esat KARAKAYA' ya, yüksek lisans eğitimim esnasında gece gündüz demeden her an tüm yardımı, desteği ve güler yüzü ile yanımda olan sevgili arkadaşım Uzm. Ecz. Aylin ELKAMA' ya, sonsuz yardım ve destekleri için arkadaşlarım Uzm. Ecz. Mevlüt ULUKAYA'ya, Nazlıcan ILIK' a, Uzm. Ecz. Özge Çevik'e ve canım aileme yürekten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serbest Radikaller	3
2.1.1. ROT	5
2.1.2. Süperoksit radikali (O_2^-)	7
2.1.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2).....	8
2.2. Antioksidanlar	8
2.2.1. Süperoksit dismutaz (SOD).....	11
2.2.2. Glutasyon sistemleri.....	15
2.3. Oksidatif Stres	19
2.3.1. Oksidatif stresin DNA'ya etkisi	21
2.3.2. Oksidatif stres ve hastalıklar	21
2.4. PH'nın Tarihçesi	22
2.5. PH'nın Epidemiyolojisi.....	23
2.6. PH ve Oksidatif Stres	24
2.7. Genetik Polimorfizm	26

Sayfa

2.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Çalışma Grubundan Biyolojik Materyalin Toplanması	29
3.2. DNA İzolasyonu.....	29
3.2.1. DNA izolasyonunda kullanılan aletler	29
3.2.2. DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler.....	30
3.2.3. Deneyin yapılışı.....	31
3.3. Bireylerin <i>Mn-SOD Ala16Val</i> ve <i>GPZ1 Pro198Leu</i> Genotiplerinin Analizi.....	32
3.3.1. Yöntemde kullanılan aletler.....	32
3.3.2. Yöntemde kullanılan kimyasal maddeler	32
3.3.3. Yöntemde kullanılan çözeltiler.....	33
3.3.4. <i>Mn-SOD Ala16Val</i> gen polimorfizmini içeren bölgenin PZR ile amplifikasyonu	34
3.3.5. PZR ürünlerinin jele uygulanması ve elektroforez.....	35
3.3.6. <i>GPZ1 Pro198Leu</i> gen polimorfizmini içeren bölgenin PZR ile amplifikasyonu	36
3.3.7. PZR ürünlerinin jele uygulanması ve elektroforez.....	37
3.3.8. <i>Mn-SOD Ala16Val</i> gen polimorfizmini içeren bölgenin <i>BsaW I</i> enzimi ile kesimi	37
3.3.9. <i>GPZ1 Pro198Leu</i> gen polimorfizmini içeren bölgenin <i>Apa I</i> enzimi ile kesimi	38
3.3.10. Kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile ayrılması	39
3.4. İstatistiksel Analiz	39
4. BULGULAR	41
4.1. Demografik Bulgular	41
4.2. <i>Mn-SOD Ala16Val</i> ve <i>GPZ1 Pro198Leu</i> Gen Polimorfizmi Bölgelerinin Hardy Weinberg Dağılımları	41
4.3. <i>Mn-SOD Ala16Val</i> Gen Polimorfizmi Genotip Analiz Sonuçları	42

	Sayfa
4.4. <i>GPZ1 Pro198Leu</i> Gen Polimorfizmi Genotip Analiz Sonuçları	45
4.5. <i>Mn-SOD Ala16Val</i> ve <i>GPZ1 Pro198Leu</i> Gen-Gen Etkileşimi.....	48
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ	55
KAYNAKLAR	57
EKLER.....	67
EK-1 Anket formu	68
ÖZGEÇMİŞ	69

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Serbest radikaller ve oluşturdıkları reaksiyonlar	5
Çizelge 2.2. ROT	7
Çizelge 2.3. Biyolojik sistemdeki antioksidan koruma sistemi elemanları	9
Çizelge 2.4. Türk popülasyonu ve beyaz ırkta Mn-SOD Ala16Val genotip ve allel sıklıkları.....	14
Çizelge 2.5. Türk popülasyonu ve beyaz ırkta GPZ1 Pro198Leu genotip ve allel sıklıkları.....	18
Çizelge 2.6. Oksidatif stres etkeni olan ve PH ile ilişkisi olabilecek olası genler	25
Çizelge 4.1. Genel özellikler.....	41
Çizelge 4.2. <i>Mn-SOD Ala16Val</i> ve <i>GPZ1 Pro198Leu</i> gen polimorfizmi bölgelerinin Hardy Weinberg dağılımı.....	42
Çizelge 4.3. <i>Mn-SOD Ala16Val</i> gen polimorfizmine ait allel frekans dağılımı	44
Çizelge 4.4. <i>Mn-SOD Ala16Val</i> gen polimorfizmi ve PH riski	44
Çizelge 4.5. <i>GPZ1 Pro198Leu</i> gen polimorfizmine ait allel frekans dağılımı	47
Çizelge 4.6. <i>GPZ1 Pro198Leu</i> gen polimorfizmi ve PH riski	48
Çizelge 4.7. <i>Mn-SOD Ala16Val</i> ve <i>GPZ1 Pro198Leu</i> gen-gen etkileşimi.....	48
Çizelge 5.1. <i>Mn-SOD Ala16Val</i> gen polimorfizmi Beyaz ırk frekans dağılımları	50
Çizelge 5.2. Beyaz ırkta <i>Mn-SOD Ala16Val</i> gen polimorfizmi ile PH riskini araştıran çalışmalardan elde edilen frekans dağılımları.....	51

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. ROT'un hücrede temel endojen kaynakları	6
Şekil 2.2. ROT oluşumu ve aktif oksijen tarafından oluşturulan hasara karşı savunma mekanizmaları	10
Şekil 2.3. Kromozom 6'da Mn-SOD gen lokalizasyonu	12
Şekil 2.4. Kromozom 3'de GPZ1 gen lokalizasyonu	16
Şekil 2.5. GPZ1 geni üzerindeki polimorfik bölgeler	17
Şekil 2.6. Oksidatif stres	20
Şekil 2.7. Oksidatif stresin insanlarda neden olduğu hastalıklar	22
Şekil 3.1. Mn-SOD geni PZR ile çoğaltılan gen sekansı	35
Şekil 3.2. GPZ1 geni PZR ile çoğaltılan gen sekansı	37
Şekil 3.3. <i>BsaW I</i> restriksiyon enzimi uygulanan 172 bç'lik gen sekansı	38
Şekil 3.4. <i>Apa I</i> restriksiyon enzimi uygulanan 338 bç'lik gen sekansı	38
Şekil 4.1. Mn-SOD Ala16Val gen polimorfizmi bölgesinin <i>BsaW I</i> enzimi ile kesiminin şematik gösterimi	43
Şekil 4.2. GPZ1 Pro198Leu gen polimorfizmi bölgesinin <i>Apa I</i> enzimi ile kesiminin şematik gösterimi	46

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. İnsan SOD gen ailesi	11
Resim 4.1. Mn-SOD Ala16Val gen polimorfizmi 172 bç'lik PZR ürünleri.....	42
Resim 4.2. Mn-SOD Ala16Val gen polimorfizmi BsaW I kesim ürünleri	43
Resim 4.3. GPZ1 Pro198Leu gen polimorfizmi 338 bç'lik PZR ürünleri.....	45
Resim 4.4. GPZ1 Pro198Leu gen polimorfizmi Apa I ile kesim ürünleri	46

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
Da	Dalton
dk	Dakika
Fe ⁺²	Demir iyonu
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
HO ₂	Hidroperoksil
HOBr	Hipobromöz asit
HOCl	Hipokloröz asit
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
Mn	Mangan
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali
O ₂ , ¹ Δ _g	Singlet oksijen
O ₃	Ozon
OH ⁻	Hidroksil radikali
RO	Alkoksil
RO ₂	Peroksil
Se	Selenyum
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre

Kısaltmalar	Açıklama
2NFE2L2	Nükleer faktör (eritroid türetilmiş 2)
8-OHdG	8-hidroksi-2-deoksiguanozin
ABD	Amerika Birleşik Devletleri

Kısaltmalar**Açıklama**

ACO2	Akonitaz 2
AH	Alzheimer hastalığı
ALS	Amyotrofik lateral skleroz
ATP	Adenozin trifosfat
CAT	Katalaz
cGPZ veya GPZ1	Mitokondriyal glutatyon peroksidaz
Cu/Zn SOD, SOD1	Bakır/Çinko süperoksit dismutaz
DMT1	Divalan metal transporter 1
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECSOD, SOD3	Ekstraselüler süperoksit dismutaz
EPHX1	Epoksit hidrolaz
EPHX2	Sitoplazmik epoksit hidrolaz
FTH1	Ağır ferritin polipeptid
FTL	Hafif ferritin polipeptid
FXN	Frataksin
GPZ	Glutatyon peroksidaz
GPZ2 (GPZ-G1)	Sitozolik glutatyon peroksidaz
GPZ3 (GPZ-P)	Ekstraselüler glutatyon peroksidaz
GPZ4 veya PHGPZ	Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz
GSH	Glutatyon
HFE	Hemokromatoz
HO	Hem oksijenaz
HOGG1	İnsan oksoguanin DNA glikozilaz 1
HP	Haptoglobin
IREB1	Demir yanıt elemanı bağlayıcı protein 1
IREB2	Demir yanıt elemanı bağlayıcı protein 2
MnSOD, SOD2	Manganez-süperoksit dismutaz
MS	Multipl skleroz
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit
NUDT1	Nudix nükleosit difosfat pay X'e bağlı)-tür motif
OGDH ve ya AKGDH	Alfa ketoglutarat dehidrogenaz
PANK2	Pantotenat kinaz 2

Kısaltmalar**Açıklama****PH**

Parkinson hastalığı

PZR

Polimeraz zincir reaksiyonları

RNA

Ribonükleik asit

RNT

Reaktif nitrojen türleri

ROS, ROT

Reaktif oksijen türleri

RPUP

Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi

SLC11A2

Çözünmüş taşıyıcı ailesi (11) 2

SN

Substantia nigra

SOD

Süperoksit dismutaz

TF

Tranferrin

TFRC1

Transferrin reseptör 1

TNP, SNP

Tek nükleotit polimorfizmleri

1. GİRİŞ

Parkinson Hastalığı (PH), 65 yaş üstü popülasyonun %1-2'sini etkileyen, Alzheimer Hastalığı (AH)'ndan sonra en sık görülen ikinci nörodejeneratif (sinir hücrelerinde fonksiyon bozukluğu) hastalıktır (Thomas ve Beal, 2011). PH, Substantia Nigra (SN)'nın pars kompakt bölgesinde dopaminerjik nöronların progresif kaybı ve hücre içi bir bileşen olan Lewy cisimciğinin canlı nöronlarda bulunması ile karakterize çok etkenli nörodejeneratif bir durumdur (Henchcliffe ve Beal, 2008). PH'nın temel nedeninin tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen mitokondriyal disfonksiyon ile birlikte oksidatif stresin nörodejeneratif süreçte önemli bir neden olabileceği varsayılmaktadır (Babusikova, Andrea, Jozef, Dobrato ve Jurecekova, 2013).

Endojen ve eksojen olmak üzere iki temel Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) hasarı çeşidi bulunmaktadır. Endojen DNA hasarının nedeni genellikle normal hücre metabolizmasının ürünleri olan Reaktif Oksijen Türleri (ROT)'dir. Eksojen DNA hasarı ise ultraviyole ışınları (UV ışınları), iyonize radyasyon ve kimyasallar gibi çevresel ajanlardan dolayı oluşmaktadır (Karahalil, Hogue, de Souza-Pinto ve Bohr, 2002). Oksidatif stres, hücre hasarı ve ölümüne neden olabilen ROT'un üretimi, endojen antioksidan sistemlerinin kapasitesini aştığı durumlarda oluşmaktadır (Asanuma, Miyazaki ve Ogawa, 2003). Oksidatif stresin PH'nın patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir (Farin ve diğerleri, 2001).

Toplumda %1'den daha fazla sıklıkta bulunan genetik çeşitlilik tipi veya gen seçenekleri polimorfizm olarak tanımlanmaktadır. İnsan genomunda en çok bulunan genetik çeşitlilik tipi, tek nükleotid polimorfizmleridir (TNP; Single Nucleotide Polymorphism, SNP) (Ekmeççi, Konaç ve Önen, 2008). Antioksidan savunma sistemleri arasında DNA onarım enzimlerinde meydana gelen hasarların birçoğundan tek nükleotid polimorfizmleri sorumludur. Bu enzim sistemleri ile hastalıklar arasındaki ilişkilendirilme çalışmalarının sayısı her geçen gün artmaktadır.

Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GPZ) gibi enzim sistemlerini kodlayan genlerde meydana gelen genetik varyasyonlar ROT'ların detoksifikasyonunda değişikliklere neden olmaktadır. Bu nedenle hücreleri ROT'a karşı koruyan enzimlerde oluşan genetik varyasyonlar hastalık riskleri ile ilişkilidir (Süzen ve diğerleri, 2009). Manganez süperoksit dismutaz (*Mn-SOD*, *SOD2*) ve sitozolik ve

mitokondriyal glutatyon peroksidaz (*cGPZ* veya *GPZ1*) enzimlerinin her ikisi de antioksidan enzimlerdir. Bu iki enzimde meydana gelen farklı polimorfizmlerin, enzimlerin hücrelerden ROT'u uzaklaştırmadaki etkililiklerini azalttığı gösterilmiştir (Cox, Tamimi ve Hunter, 2006). Mitokondriyal yerleşimi göz önüne alındığında *Mn-SOD*, PH'nın patolojisinde en olası enzim olarak görünmektedir (Belluzi ve diğerleri, 2012). Enzimatik antioksidan savunmasında *GPZ* enzim sistemleri ikinci sırada yer almaktadır. *Mn-SOD* ve *GPZ1* enzimleri üzerinde çeşitli polimorfizmler tanımlanmıştır (Souiden ve diğerleri, 2016). Antioksidan enzim sistemlerinde yer alan genetik polimorfizmlerin analiz edilmesi, PH'ya genetik yatkınlıkların ya da oksidatif stresin yol açtığını ortaya koymak açısından önem taşımaktadır.

Sunulan bu tez çalışmasında *Mn-SOD* ve *GPZ1* gen polimorfizmlerinin nörodejeneratif bir hastalık olan PH ile ilişkisi araştırılmıştır. Antioksidan savunma sisteminin en önemli enzimlerindeki gen polimorfizmlerin popülasyon taraması, Türk toplumunda PH'nın gelişiminde genetik yatkınlığın ortaya konması açısından bilimsel katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmada, *Mn-SOD Ala16Val* ve *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmlerinin PH'daki olası etkisi ve öneminin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışma sonucunda elde edilecek veriler doğrultusunda PH'nın teşhis ve tedavisinde yeni ve farklı yaklaşımların oluşmasına katkı sağlanabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

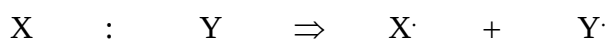
2.1. Serbest Radikaller

Atom ve moleküllerin yapısında elektronlar genellikle çiftler halinde bulunmaktadır. Her çift elektron orbital adı verilen dış yörüngede hareket etmektedir (Halliwell, 2001). Bir atom genellikle merkezi bir çekirdek ve yörüngesinde yer alan elektron çiftlerinin birleşiminden oluşmaktadır. Ancak, bazı atom ve moleküller yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulundurulur (Yoshikawa ve Naito, 2002). Serbest radikaller bir veya birden fazla çiftleşmemiş elektron içeren ve bağımsız olarak bulunan yapılardır. Çiftleşmemiş elektronlar orbitalde tek başına bulunmaktadır. Serbest radikaller, kimyasal ve biyolojik sistemlerde geniş bir çeşitlilikte oluşmaktadır (Halliwell, 2001). Eşleşmemiş elektronların diğer elektronlar ile eşleşme eğiliminden dolayı serbest radikaller oldukça kararsız ve reaktif yapıdadır (Yoshikawa ve Naito, 2002). En basit serbest radikal hidrojen elementinin atomudur (Aruoma, 1998).

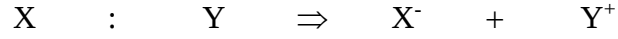
Biyolojik sistemlerde enzimatik ve non-enzimatik reaksiyonların sonuçları olarak hücrelerde sürekli olarak serbest radikal oluşumu meydana gelmektedir. Serbest radikal kaynağı olan enzimatik reaksiyonlara solunum zinciri, fagositoz olayları, prostaglandin sentezi ve sitokrom P450 sistemleri örnek olarak verilebilir. Serbest radikaller, oksijenin (O₂) organik bileşikler ile oluşturdukları non-enzimatik reaksiyonlar sırasında da meydana gelmektedir. Hücrelerde metabolik reaksiyonlar sırasında oluşabileceği gibi, bazı dış etkenler sebebi ile de oluşmaktadır. Bu dış etkenlere sigara dumanı, çevresel kirlilikler, radyasyon, UV ışınları, bazı ilaçlar, pestisitler, bazı endüstriyel solventler ve ozon örnek olarak verilebilir. Mitokondri, fagositoz, ksantin oksidaz, demir ve diğer metal reaksiyonları, araşidonik asit yolları, peroksizom, egzersiz, inflamasyon ve iskemik reperfüzyon ise serbest radikal oluşmasına neden olan endojen etkenler olarak sıralanabilir (Bagchi ve Puri, 1998).

Bir serbest radikal 3 farklı yol ile ortaya çıkmaktadır (Altan, Sepici ve Koca, 2006):

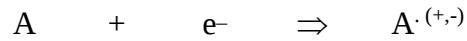
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır.



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi sonucu heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomlardan birisinde kalır.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.



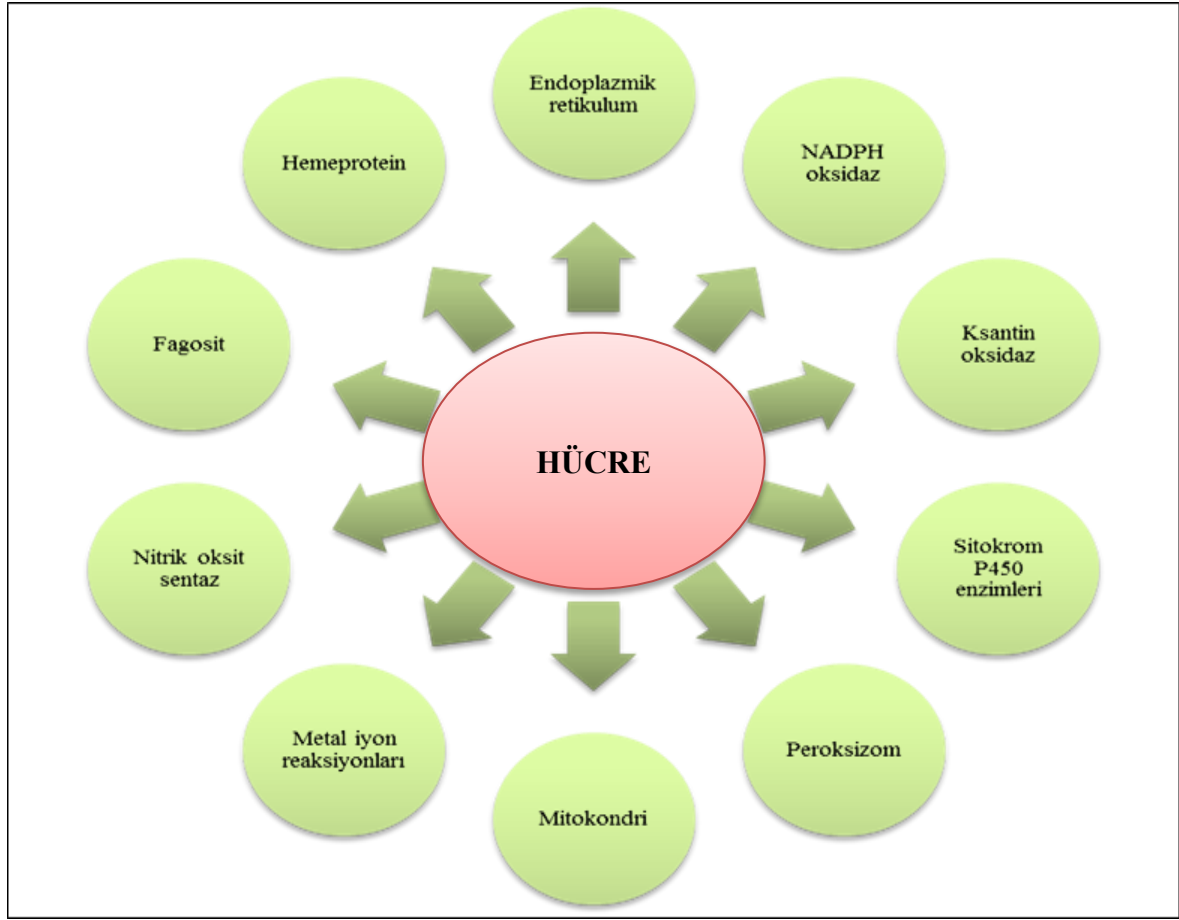
Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötr olabilir. Biyolojik sistemlerde en çok elektron transferi sırasında oluşmaktadırlar. Her ne kadar serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da, serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Altan ve diğerleri, 2006).

Çizelge 2.1. Serbest radikaller ve oluşturdıkları reaksiyonlar (Ogut ve Atay, 2012)

Serbest Radikal	Reaksiyonlar
Süperoksit	$\cdot\text{O-O}\cdot$ Fe^{2+} ve Cu^{+} iyonlarını geri kazanma yoluyla Haber-Weiss reaksiyonunu katalizleme, hidrojen peroksit veya peroksinitrit oluşumu
Hidrojen peroksit	HO-OH Hidroksil radikali oluşumu, enzim inaktivasyonu, biyomoleküllerin oksidasyonu
Hidroksil radikali	$\text{OH}\cdot$ Hidrojen çıkarılması, serbest radikallerin ve lipid peroksitlerin üretimi, tiyol oksidasyonu
Oksijen	O=O Çifte bağlarla reaksiyon, peroksitlerin oluşumu, aminoasitlerin ve nükleotidlerin oluşumu
Nitrik oksit	$\cdot\text{N=O}$ Peroksinitrit oluşumu, diğer radikallerle reaksiyon
Peroksinitrit	$\text{O=N-O-O}\cdot$ Hidroksil radikali oluşumu, tiyollerin ve aromatik grupların oksidasyonu, ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaza dönüşümü, biyomoleküllerin oksidasyonu
Hipoklorit	$\text{ClO}\cdot$ Amino ve kükürt içeren grupların oksidasyonu, klorin oluşması
Hidroperoksit	R-O-OH Biyomoleküllerin oksidasyonu, biyolojik membranların bozulması
Bakır ve demir iyonları	$\text{Cu}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$ Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla hidroksil radikali oluşumu

2.1.1. ROT

ROT, aerobik organizmalarda bazı fizyolojik olaylar esnasında oluşmaktadır. Fizyolojik şartlardaki başlıca ROT kaynağı mitokondriyal elektron transport zinciridir. Genellikle hücrelerde kullanılan O_2 'nin %95'i mitokondrilerde kademeli olarak dört elektron ilavesiyle suya indirgenir. Normal şartlar altında bu mitokondriyal olay esnasında O_2 'nin %1-2'si de süperoksit radikaline ($\text{O}_2\cdot$) dönüşmektedir (Aydın, Sayal ve Işimer, 2001).



Şekil 2.1. ROT'un hücrede temel endojen kaynakları (Babusikova ve diğerleri, 2013)

ROT insan hayatı için gereklidir. Endojen ve eksojen olarak üretilen ROT'un temel karakteristik özellikleri küçük konsantrasyonlarda bile yüksek etkili ve yüksek derecede reaktif olmalarıdır. ROT'un potansiyel zararları hücrede farklı metabolik yolak ve bölümlerde normal fizyolojik durum esnasında ortaya çıkmaktadır. Hücreler tarafından üretilen oksidanların büyük bir çoğunluğundan mitokondri, fagositoz, peroksizom ve sitokrom P450 enzim sistemi olmak üzere 4 endojen kaynak sorumludur. ROT'un ana endojen kaynağı sürekli olarak ROT üreten mitokondridir. Mitokondri bir enerji kaynağı olarak hizmet eder. Normal bir aerobik solunum esnasında mitokondri bir seri basamaklarla H_2O sayesinde oluşan O_2 'i kullanır. Mitokondri, insan ve hayvan hücrelerinde solunum zinciri esnasında sızan elektronlar tarafından tamamlanamamış O_2 'in indirgenmesi sebebiyle ROT'un temel kaynağıdır (Babusikova ve diğerleri, 2013).

O_2 yaşamın sürekliliği için değiştirilemez bir elementtir. Hücreler O_2 'i enerji üretmek için kullanırken, mitokondride adenosin trifosfat (ATP) üretimi esnasında serbest radikaller oluşmaktadır. Bu reaksiyonlar esnasında oluşan ürünler genellikle ROT'dur, ancak ROT'un

yanı sıra hücrel redoks döngüsü sırasında reaktif nitrojen türleri (RNT) de oluşmaktadır (Pham-Huy, He ve Pham-Huy, 2008). ROT terimi sadece hidroksil radikali ($\text{OH}^\cdot$) ve $\text{O}_2^\cdot$ gibi O_2 merkezli radikalleri değil, aynı zamanda hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen (O_2 , $^1\Delta_g$) ve hipokloröz asit (HOCl) gibi radikal olmayan O_2 türlerini de içermektedir. Bu türlerin bazıları diğerlerinden daha az aktiftir (Halliwell, 2001).

Çizelge 2.2. ROT (Halliwell, 2001)

ROT	
Radikaller	Radikal olmayanlar
Süperoksit ($\text{O}_2^\cdot$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil ($\text{OH}^\cdot$)	Hipokloröz asit (HOCl)
Peroksil (RO_2)	Hipobromöz asit (HOBr)
Alkoksil (RO)	Ozon (O_3)
Hidroperoksil (HO_2)	Singlet oksijen (O_2 , $^1\Delta_g$)

2.1.2. Süperoksit radikali ($\text{O}_2^\cdot$)

Hücresin majör O_2 kullanııcı organeli olan mitokondri, aynı zamanda başta $\text{O}_2^\cdot$ olmak üzere hücrede ROT'un de ana kaynağıdır. $\text{O}_2^\cdot$, diğer radikallerin oluşumunda da rol almaktadır (Aeron, Vasudevan, Joyce ve Daret, 2011). Elektron transport zincirindeki birçok enzim $\text{O}_2^\cdot$ oluşumundan sorumludur (Brand, 2010).

$\text{O}_2^\cdot$, moleküler oksijene ekstra bir elektron bağlanmasıyla meydana gelir. Milisaniyelik yarı ömrü ile zayıf bir oksidan fakat güçlü bir redüktandır. Zayıf bir oksidan olarak kendi başına önemli bir hücre hasarına yol açması muhtemel görülmesi de oksidatif strese yol açabilen bir dizi reaksiyonları başlatabilmektedir. Bu önemli reaksiyonlardan bir tanesi Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinen, $\text{O}_2^\cdot$ ve H_2O_2 'nin demir varlığında etkileşerek son derece reaktif $\text{OH}^\cdot$ vermesi reaksiyonudur (Aydın ve diğerleri, 2001).

$\text{O}_2^\cdot$, diğer moleküller ile reaksiyona girebilme ve bu çerçevede ikincil ROT'un oluşumuna neden olma özelliğinden dolayı birincil ROT olarak adlandırılmaktadır. $\text{O}_2^\cdot$ şekerler, polipeptitler veya nükleik asitler ile doğrudan reaksiyon vermez (Halliwell ve Gutteridge, 2007).

$\text{O}_2^\cdot$, selektif reaktiviteye sahip oksijen merkezli bir radikaldır. Bu radikal otooksidasyon reaksiyonları olarak bilinen bir dizi enzim reaksiyonları sırasında ve moleküler oksijene

enzimatik olmayan elektron transferi sonucu oluşur. H_2O içeren ortamlarda askorbik asidi okside edebildiği gibi aynı zamanda bazı demir komplekslerini indirgeyebilmektedir. *SOD* enzimi, O_2^- 'nin H_2O_2 ve O_2 'e dönüşümünden sorumludur (Aruoma, 1998).

2.1.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

H_2O_2 , son derece güçlü bir oksitleyici ajan olmasına rağmen nispeten yavaş reaksiyon vermektedir. O_2^- 'nin dismutasyon reaksiyonuyla veya direk olarak O_2 'nin indirgenmesiyle meydana gelmektedir (Aydın ve diğerleri, 2001). H_2O_2 , serbest bir radikal değildir. Membranları geçebilme özelliğine sahiptir ve bu sayede bazı bileşikleri yavaşça okside edebilmektedir. H_2O_2 'in düşük seviyeleri zayıf reaktif özellik gösterirken yüksek H_2O_2 seviyesi bazı hücresel enerji üretim sistemlerini etkileyebilmektedir (Aruoma, 1998).

2.2. Antioksidanlar

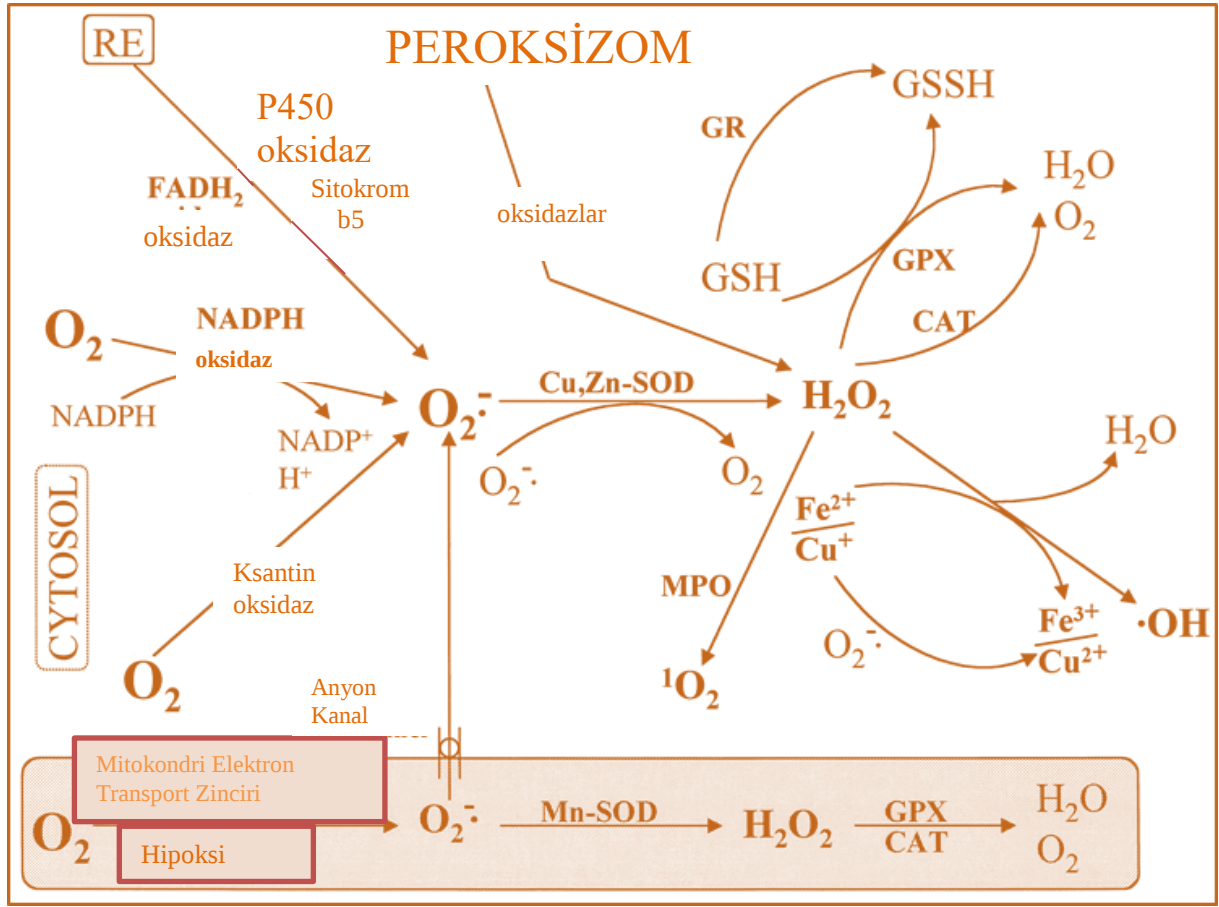
Antioksidanlar, serbest radikalleri veya serbest radikallerin etkilerini nötralize eden maddelerdir (Sies, 1996). Bir antioksidan, molekülleri okside olmaktan koruma veya bu oksidasyonu yavaşlatma yeteneğine sahip olan moleküldür. Oksidasyon, bir maddeden oksidasyon ajanına elektron transferinin gerçekleştiği kimyasal bir reaksiyondur. Oksidasyon reaksiyonları, hücre hasarına yol açan zincir reaksiyonlarını başlatma özelliğine sahip serbest radikalleri üretmektedir (Aher, Wahi ve Sonawane, 2011). Antioksidan savunma mekanizmaları serbest radikaller aleyhine çalışan bir mekanizmadır. Her bir antioksidan, serbest radikallerin etkisini ROT 'u indirgeyen enzim sistemleri de dahil olmak üzere farklı mekanizmalar ile azaltmaktadır (Pourvali, Abbasi ve Mottaghi, 2016).

Antioksidanlar, serbest radikallerin ortadan kaldırılması, ROT 'un ve ROT prekürsörlerinin süpürülmesi, ROT oluşumunun inhibisyonu ve ROT oluşumunu katalize etmek için gerekli olan metal iyonlarının bağlanmasından sorumlu ekzojen (doğal veya sentetik) yada endojen kaynaklı bileşiklerdir. Doğal antioksidan sistemler enzimatik ve non-enzimatik olmak üzere iki ana grup altında sıralanmıştır. Enzimatik antioksidanlar *KAT*, *GPZ*, *SOD* enzimleri yanında bazı destekleyici diğer enzimler gibi sınırlı sayıda proteinlerden oluşmaktadır. Non-enzimatik antioksidanlar ise savunma mekanizmaları arasında oldukça önemli yeri olan doğrudan etkili ve doğrudan etkili olmayan antioksidanları içermektedir. Doğrudan etkili antioksidanların bir çoğu besin kaynaklı askorbik asit, lipoik asit, polifenol ve karotenoid

içerir. Hücrelerin bu molekülleri az miktarda sentezleyebilme özellikleri vardır. Doğrudan etkili olmayan antioksidanlar çoğunlukla serbest radikal oluşumunu engellemek için redoks metallerini bağlayıcı ve şelatlayıcı özelliktedirler (Uttara, V.Singh, Zamnoni ve Mahajan, 2009). Enzimatik ve enzimatik olmayan tüm antioksidan sistemleri ROT'un detoksifikasyonu için intrasellüler ve ekstrasellüler sıvıda bulunmaktadır (Lobo, Patil, Phatak ve Chandra, 2010).

Çizelge 2.3. Biyolojik sistemdeki antioksidan koruma sistemi elemanları (Aydın ve diğerleri, 2001)

Enzimatik antioksidanlar	Enzimatik olmayan antioksidanlar
Süperoksit dismutaz	Vitamin E
Se bağımlı Glutasyon Peroksidaz	Vitamin C
Glutasyon-S-Transferaz	Glutasyon
Katalaz	Flavonoidler
Paraoksonaz	Bütillenmiş Hidroksianizol
Epoksit Hidrolaz	Bütillenmiş Hidroksitoluen
UDP-Glukuronil Transferaz	Ebselen
Sülfonil Transferaz	β karoten
Glutasyon Redüktaz	Ürat
Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz	Seruloplazmin
6-fosfoglukonat dehidrojenaz	Transferrin
İzositrat Dehidrojenaz	Albümin
GSSG ve Konjugat Taşıyıcılar	Haptogloblin
NADPH-Kinon Oksidoredüktaz	Likopen
	Metallotiyonein
	Bilirubin
	Ubikinon
	Deferoksamin
	Melatonin
	Sistein
	Ferritin
	Mannitol
	Oksipürinol
	Probukol

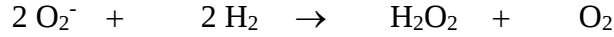


Şekil 2.2. ROT oluşumu ve aktif oksijen tarafından oluşturulan hasara karşı savunma mekanizmaları (Mates, Perez-Gomez ve Nunez De Castro, 1999)

Antioksidan mekanizması, zincir reaksiyonlarını kırıcı (chain-breaking) ve koruma olmak üzere iki yol ile gerçekleşir. Zincir kırıcı reaksiyonlar bir radikalın elektron alması ya da kaybetmesi sonucu ikinci bir radikalın oluşması esnasında görülmektedir. Oluşan ikinci radikal başka bir moleküle aynı şekilde etki etmektedir. Bu durum serbest radikalın zincir kırıcı bir antioksidan tarafından stabil ve etkisiz hale dönüştürülmesine kadar devam etmektedir. Zincir reaksiyonlarına verilebilecek en klasik örnek lipid peroksidasyonudur. Koruma yolu ise SOD, KAT veya GPZ gibi antioksidan enzimlerin, serbest radikalleri süpürücü etkiyi başlatarak ve demir, bakır gibi geçiş metal iyonları miktarını sabitleyerek zincir reaksiyonlarının başlama oranının azaltılması esasına dayanmaktadır (Young ve Woodside, 2001).

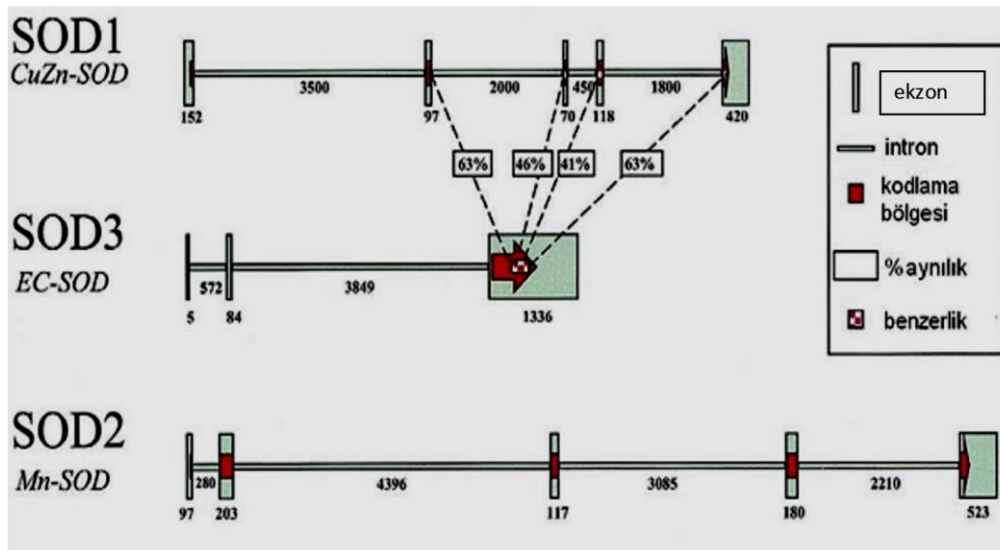
2.2.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

ROT'un oluşturduğu zararlı etkiler, onları detoksifiye eden çeşitli antioksidan enzim sistemleri tarafından önlenmektedir. SOD süpürücü enzimleri, hücreleri normalden fazla miktarda ROT'un oluşturduğu potansiyel hasardan koruyan detoksifikasyon enzimleridir. SOD, $O_2^{\cdot -}$ 'ni H_2O_2 ve O_2 'ne dönüştürmektedir (Candaş ve Li, 2014).



SOD enzimleri, $O_2^{\cdot -}$ 'nin detoksifikasyonunda anahtar antioksidan enzim görevini üstlenmektedir. SOD enzimleri, hızlı elektron değişimine olanak sağlayan ve $O_2^{\cdot -}$ 'ni serbest oksijene dönüştüren aktif metal iyonları içermektedir (Silig, Taş ve Pınarbaşı, 2015).

Memeli hücrelerinde üç adet SOD enzimi tanımlanmıştır. Sitozolde yer alan *Bakır/Çinko SOD* (*Cu/Zn SOD*, *SOD1*) aynı zamanda mitokondrinin zar boşluğunda da yer almaktadır. *Mn-SOD*, mitokondriyal bir enzim olup, mitokondri matriksinde yer almaktadır. Üçüncü SOD enzimi ise ekstrasellüler boşlukta yer alan ekstrasellüler *SOD* (*EC-SOD*, *SOD3*) enzimidir (Candaş ve Li, 2014). Diğer antioksidan enzimler ile karşılaştırıldığında *SOD* enzimleri, reaksiyon hızı bakımından daha yüksek bir hıza sahiptir (Pourvali ve diğerleri, 2016).



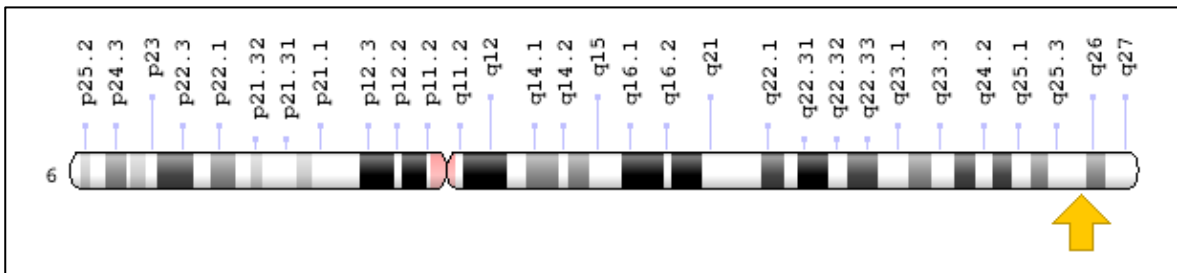
Resim 2.1. İnsan SOD gen ailesi (Zelko, Mariani ve Folz, 2002)

Mn-SOD

İlk kez *Escherichia coli*'den izole edilen *Mn-SOD* başka bakterilerden, bitki ve hayvan dokusu ekstraktlarından da izole edilmiştir. Aktivitesi doku ve türe bağlı olarak değişmektedir. Yüksek organizmalardan elde edilen *Mn-SOD* enzimlerinin hepsi 4 protein alt ünitesi içermektedir. *Mn-SOD* enzimi kofaktör olarak Mn içerir. Enzimden Mn iyonunun çıkarılması ile enzim aktivitesi kaybolur ve genellikle başka metal iyonları Mn iyonunun yerine geçememektedir (Aydın ve diğerleri, 2001).

Mn-SOD enzimi mitokondride yer almaktadır. Homotetramerik yapıdaki bu enzimin moleküler ağırlığı 23.000 Da'dur. *Mn-SOD* gen yapısı insanlar, fareler ve sıçanlarda tam olarak tanımlanmıştır. *Mn-SOD* geni 5 ekzon ve 4 intron içermektedir (Zelko ve diğerleri, 2002).

İnsan *Mn-SOD* enzimi 6.kromozomda (6q25) yer almakta ve 223 aminoasit içermektedir. O_2^- 'nin başlıca kaynağı olan mitokondriyal oksidatif fosforilasyon reaksiyonlarının gerçekleştiği mitokondriyal matriksde yer almaktadır (Candaş ve Li, 2014). *Mn-SOD*, mitokondride yer alan bilinen tek antioksidan enzimdir ve mitokondriyal O_2^- 'ne karşı antioksidan savunma mekanizmasının ana bileşenidir (Pourvali ve diğerleri, 2016). Mitokondriyi serbest radikallerin oluşturabileceği hasardan korumada önemli bir rol oynamaktadır (Yorikata, Hattori, Mori, Kato ve Mizuno, 1997). Şekil 2.3'de Kromozom 6'da *Mn-SOD* geni lokalizasyonu sunulmuştur.



Şekil 2.3. Kromozom 6'da *Mn-SOD* gen lokalizasyonu (United States National Library of Medicine, 2016)

Nükleer genomlar tarafından dizgilenmiş mitokondriyal enzim olan *Mn-SOD*, hücreleri koruyan temel antioksidan görevi görmektedir (Wang ve diğerleri, 2006).

İnsan *Mn-SOD* enziminde en az 190 TNP tanımlanmıştır (Bresciani, Cruz, de Paz, Cuevas ve Gonzalez Galleo, 2013). Az sayıda polimorfizm etkisiz iken, bir çoğu protein modülasyonu ve işlevlerinde dengeyi etkileyecek şekilde değişikliklere neden olmaktadır (Forsberg, Ulf ve Morgenstern, 2001). *Mn-SOD* geninin belirli bölgelerinde tanımlanmış çeşitli polimorfizmler arasında 2.ekzonda yer alan ve *rs4880* olarak isimlendirilen polimorfizm, üzerinde en çok çalışılan polimorfizmdir (Silig ve diğerleri, 2015).

Mn-SOD geninde mitokondriyal hedef sekansında 9.pozisyon, 16.kodonda oluşan TNP, alanin (GCT) ya da valini (GTT) kodlayan aminoasitte değişikliğe neden olmaktadır (Li, ve diğerleri, 2005). *Mn-SOD* gen diziliminde 16. Aminoasiti kodlayan kodonda Sitozin (C) bazının yerini Timin (T) bazının alması sonucu alanin (GCT) → valin (GTT) dönüşümü gerçekleşmektedir. Sıklıkla *Ala16Val* ve *Ala9Val* olarak isimlendirilen bu polimorfizme ait literatürde farklı isimlendirmeler mevcuttur (Wang, ve diğerleri, 2010; Souiden ve diğerleri, 2016).

Mn-SOD Ala16Val gen polimorfizmine ait allel ve genotip sıklıkları etnik kökenlere göre farklılık göstermektedir. Türk popülasyonu ve beyaz ırka ait genotip ve allel sıklıkları Çizelge 2.4’de sunulmuştur.

Çizelge 2.4. Türk popülasyonu ve beyaz ırkta *Mn-SOD Ala16Val* genotip ve allel sıklıkları

Ülke	Örnek sayısı (sağlıklı birey)	Genotip sıklığı			Allel frekansı		Referans
		<i>Ala/Ala</i> %	<i>Ala/Val</i> %	<i>Val/Val</i> %	<i>Ala</i> %	<i>Val</i> %	
Türkiye	96	14,6	52,1	33,3	40,6	59,4	Bizim çalışmamız
Türkiye	196	23,5	42,3	34,2	44	54	(Akyol ve diğerleri, 2005)
Türkiye	440	17,5	50,5	32	43	57	(Silig ve diğerleri, 2015)
Türkiye	50	16	38	46	35	65	(Atılğan ve diğerleri, 2014)
Türkiye	104	12,5	65,4	22,1	45,2	54,8	(Kalkan ve diğerleri, 2015)
Türkiye	40	22,5	57,5	20	51	49	(Kadıoğlu, Sardas, Ergün, Ünal ve Karakaya, 2010)
Türkiye	50	0	64	36	18	82	(Ergen, Narter, Tımcı ve Isbir, 2007)
Türkiye	69	17,4	47,8	34,8	41,3	58,7	(Seckin ve diğerleri, 2016)
Türkiye	167	17	49	34	41	59	(Kalkan ve diğerleri, 2014)
İtalya	257	21	54,1	24,9	48	52	(Ventriglia ve diğerleri, 2006)
Fransa	214	25,2	53,7	21	52	48	(Hung ve diğerleri, 2004)
Amerika (Beyaz ırk)	764	25,5	49,6	24,9	50,3	49,7	(Li ve diğerleri, 2005)

Mn-SOD Ala16Val gen polimorfizmine ait *Val* allel sıklıkları Asya ırkına mensup Çin popülasyonunda %85 (Yu ve diğerleri, 2014), Japon popülasyonunda %88 olarak bulunmuştur. Asya ırkında *Val* alleli sıklığı beyaz ırka oranla daha yüksektir (Ambrosone ve diğerleri, 1999).

Mn-SOD Ala16Val gen polimorfizimde Alanin aminoasitinin Valin ile yer değiştirmesi proteinin ikincil yapısında değişikliğe neden olmaktadır (Choi ve diğerleri, 2007). Alfa-helikal yapının beta-tabakalı yapıya dönüşmesi amfibik helikal yapıdaki mitokondri hedef sekansından geçişi zorlaştırmaktadır (Shimoda-Matsubayashi ve diğerleri, 1996). *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmi üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar bu polimorfizmden kaynaklanan aminoasit değişiminin, enzimin mitokondri içine girişi ve işlevi üzerinde etkili olduğunu ve O₂’e karşı hücrelerin savunmasız hale geldiğini göstermektedir (Ambrosone

ve diğerleri, 1999). Enzimin mitokondri içine girememesi sonucu mitokondri matriksinde enzim aktivitesinin azalması DNA’da hasara neden olmaktadır. Ayrıca yetersiz enzim seviyesi O_2^- ’nin ve diğer ROT’un artmasına neden olur (Van Remmen ve diğerleri, 2003). *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmi *Ala* alleli, *Val* alleli ile karşılaştırıldığında enzimin mitokondriyal matrikste %30-40 daha etkili olduğu bulunmuştur (Sutton ve diğerleri, 2003). Bu nedenle *Mn-SOD Ala/Ala* genotipine sahip bireylerde enzim aktivitesi *Ala/Val* ve *Val/Val* genotipli bireylere oranla daha yüksektir (Choi ve diğerleri, 2007).

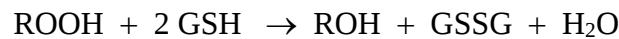
Mn-SOD Ala16Val gen polimorfizmi insanlarda birçok kronik hastalığa ve metabolik disfonksiyona neden olmaktadır. Bu gen polimorfizminin göğüs ve prostat kanseri, kardiyovasküler disfonksiyon gibi birçok hastalık ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Bica ve diğerleri, 2010; Bresciani ve diğerleri, 2013).

2.2.2. Glutasyon sistemleri

Glutasyon (GSH) sistemleri GSH, glutasyon redüktaz, GPZ ve glutasyon S-transferaz (GST) olmak üzere dört öğeden oluşmaktadır. Bu sistem hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır (Meister ve Anderson, 1983). GPZ, kofaktör olarak 4 selenyum (Se) içeren, H_2O_2 ve organik hidroperoksitleri katalizleyen bir enzimdir. GST, lipid peroksidasyonunda yüksek aktiviteye sahiptir. Bu enzimler karaciğerde yüksek seviyede bulunmakta ve detoksifikasyon metabolizmasında görev almaktadır (Lobo ve diğerleri, 2010).

GPZ

Se içeren peroksidaz olarak bilinen GPZ enzimi, enzim aktivitesi için gerekli olan her bir alt birimden geriye kalan tek bir selenosistein içermektedir. GPZ enzimi, GSH kullanarak hidroperoksitlerin indirgenme reaksiyonlarını katalize etmekte ve bu sayede memeli hücrelerini oksidatif hasara karşı korumaktadır. GSH metabolizması, en önemli antioksidan savunma mekanizmalarından birisidir (Mates ve diğerleri, 1999).

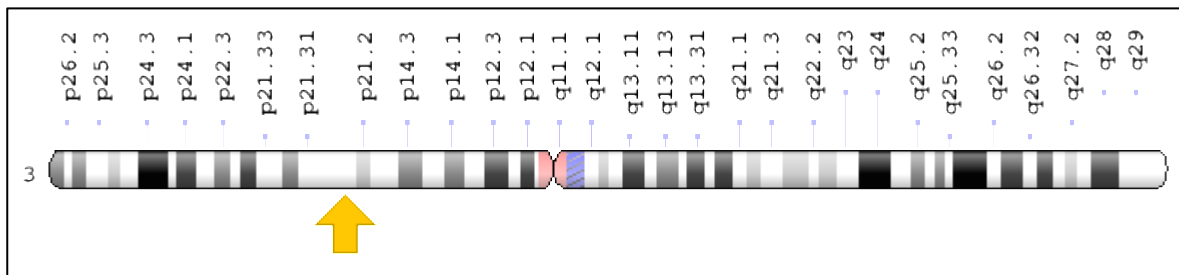


Memelilerde en az beş GPZ izoenzimi bulunmaktadır. Birçok yerde bulundukları açıkça ortaya konmasına rağmen her izoenzim seviyesi bulundukları dokuya göre çeşitlilik

göstermektedir. *GPZ1*, hidroperoksit yağ asitlerini ve H_2O_2 'i, GSH bulunan ortamda indirgemektedir. *GPZ1* ve fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (*GPZ4* veya *PHGPZ*) birçok dokuda bulunmaktadır. *GPZ4* hem sitozolde hem de membranda bulunmaktadır. *GPZ4*, membranların aşırı oksitlenmesi ve lipoproteinlerin oksitlenmesi sonucu oluşan fosfolipit hidroperoksitleri, hidroperoksit yağ asitlerini ve kolesterol hidroperoksitlerini doğrudan indirgemektedir. *GPZ1* ağırlıklı olarak eritrositler, böbrek ve karaciğerde bulunmakta iken, *GPZ4* çoğunlukla renal epitel hücre ve dokularda bulunmaktadır. Sitozolik *GPZ2* (*GPZ-G1*) ve ekstraselüler *GPZ3* (*GPZ-P*) gastrointestinal yol ve böbrekler dışında bir çok dokuda az miktarda bulunmaktadır. Son yıllarda, Se'den bağımsız yeni bir *GPZ* üyesi, *GPZ5*, fare epidimidisinde tanımlanmıştır (Mates, 2000).

GPZ, substrat olarak H_2O_2 'i katalaz enzimi ile paylaşıyor olmasına rağmen tek başına da lipitler ve diğer organik hidroperoksitlere karşı oldukça etkili olmasından dolayı düşük seviyede bile oksidatif stres karşısında temel koruyucu sistemdir (Mates ve diğerleri, 1999). Ancak, ekzojen kaynaklı H_2O_2 toksisitesine karşı *GPZ* ve KAT enzimleri birlikte daha etkilidir (Smeyne ve Smeyne JAY, 2013).

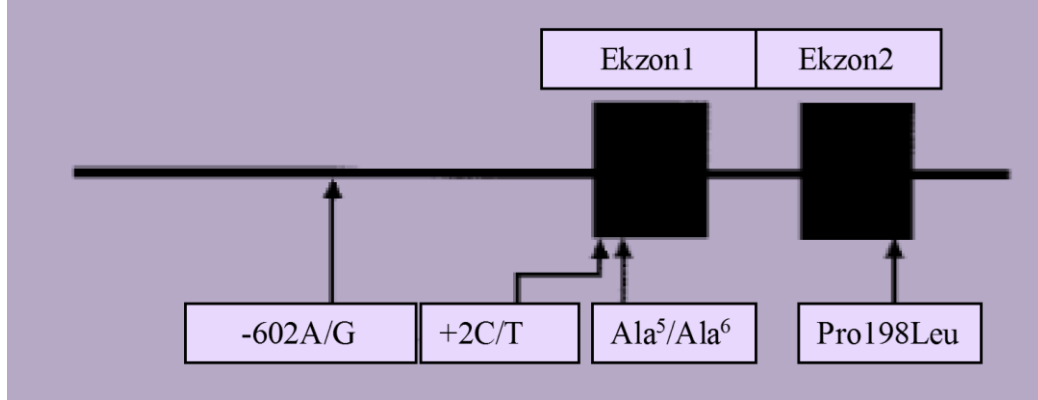
GPZ1 insan hücrelerinde geniş bir dağılım göstermektedir ve en sık rastlanan *GPZ* formudur (Forgione, ve diğerleri, 2002). *GPZ1* enzimi 3.kromozomda (3q21.3) yer almakta ve iki ekzon içermektedir (Ishida, Morino, Kenkichi ve Sukenaga, 1987). Şekil 2.4'de kromozom 3'de *GPZ1* gen lokalizasyonu sunulmuştur.



Şekil 2.4. Kromozom 3'de *GPZ1* gen lokalizasyonu (United States National Library of Medicine, 2016)

GPZ1 geninde 38 tane TNP tanımlanmıştır. 198.kodonda sitozin (C) bazının timin (T) bazı ile yer değiştirmesi sonucu prolin (CCC) aminoasiti lösin (CTC) aminoasidine dönüşmektedir. Protein kod bölgesinde değişikliklere neden olan bu polimorfizm *GPZ1* aminoasit dizisinde değişiklik oluşturması ve görülme sıklığı açısından en sık çalışılan

polimorfizmdir. *Pro/Leu* polimorfizmi veya *rs1050450* olarak bilinen bu polimorfizm sıklıkla *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmi olarak ifade edilmektedir (Lubos, Loscalzo ve Handy, 2011). Şekil 2.5’de *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmi üzerindeki polimorfik bölgeler gösterilmiştir.



Şekil 2.5. *GPZ1* geni üzerindeki polimorfik bölgeler (Hamanishi, ve diğerleri, 2004)

GPZ1 Pro198Leu gen polimorfizmine ait allel ve genotip sıklıkları etnik kökenlere göre farklılık göstermektedir. Beyaz ırka ait genotip ve allel sıklıkları Çizelge 2.5’de sunulmuştur.

Çizelge 2.5. Türk popülasyonu ve beyaz ırkta *GPZ1 Pro198Leu* genotip ve allel sıklıkları

Ülke	Örnek sayısı (sağlıklı birey)	Genotip sıklığı			Allel frekansı		Referans
		<i>Pro/Pro</i> %	<i>Pro/Leu</i> %	<i>Leu/Leu</i> %	<i>Pro</i> %	<i>Leu</i> %	
Türkiye	96	33,3	55,2	11,5	60,9	39,1	Bizim çalışmamız
Türkiye	167	45	41	14	65	35	(Kalkan ve diğerleri, 2014)
Türkiye	224	52,3	38,8	8,9	71,65	28,35	(Kucukgergin, Sanli, Amasyalı, Tevik ve Seckin, 2012)
Türkiye	104	41,4	49	9,6	65,9	34,1	(Kalkan, ve diğerleri, 2015)
Türkiye	69	42	39,1	18,9	61,6	38,4	(Seckin ve diğerleri, 2016)
Türkiye	56	37,5	48,2	14,3	61,6	38,4	(Akbas, Inanir, Benli, Onder ve Aydogan, 2014)
Türkiye	250	41,6	44	14,4	64	36	(Süzen ve diğerleri, 2010)
Almanya	117	49,6	43,6	6,8	71,4	28,6	(Zarbock, Hendig, Szliska, Kleesiek ve Gotting, 2007)
İngiltere	761	57,6	35,2	7,2	75,2	24,8	(Lightfoot ve diğerleri, 2006)
Danimarka	798	43,6	44,9	11,5	66	34	(Raaschou-Nielsen ve diğerleri, 2007)

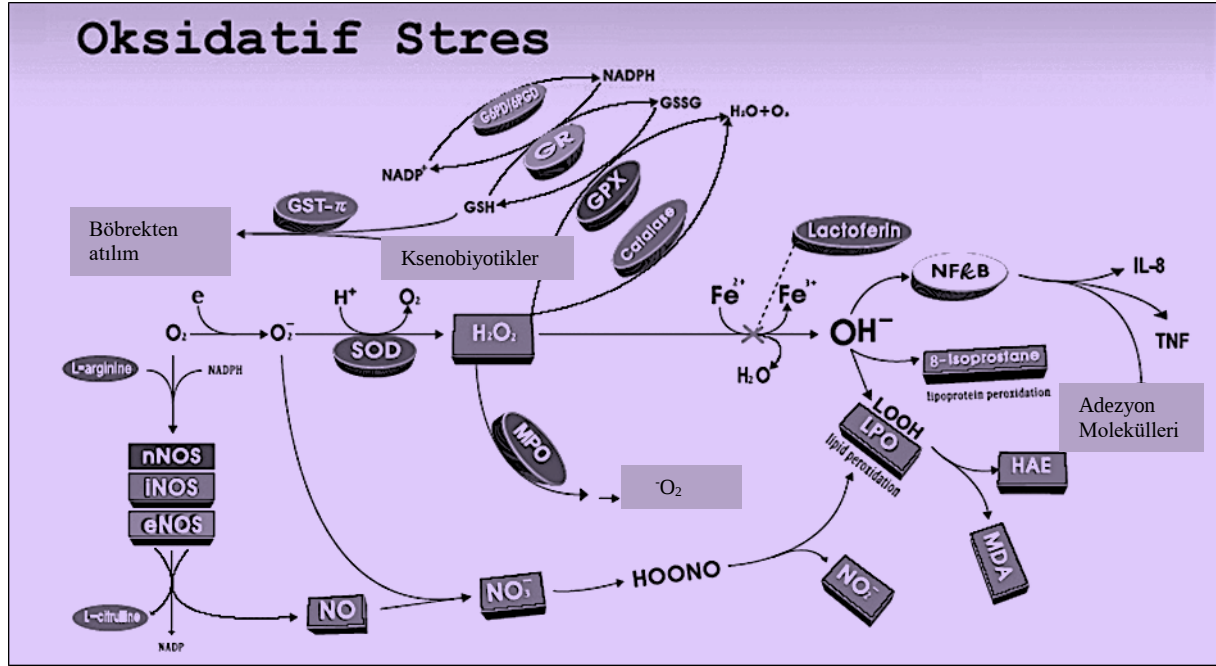
GPZ1 Pro198Leu gen polimorfizmine ait *Leu* allel sıklığı Asya ırkına mensup Japon popülasyonunda %5,3 (Ichimura, ve diğerleri, 2004); Çin popülasyonunda %8 olarak bulunmuştur (Tang ve diğerleri, 2008). *GPZ1 Pro198Leu Leu* allel sıklığı beyaz ırkta Asya ırkına oranla daha yüksektir.

Birçok çalışma Se'un *GPZ1* enzim aktivitesini arttırdığını ortaya koymuştur. Se hücrenin antioksidan kapasitesini artırarak hücresel oksidatif stresi azaltmaktadır. Se bağımlı *GPZ1* enziminde oluşan polimorfizmler enzim yapısının aktif bölgesinde ve enzim aktivitesinde değişikliğe neden olmaktadır (Ratnasinghe ve diğerleri, 2000). Bazı çalışmalarda oksidatif stres parametrelerinin *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizminden etkilenmediği ileri sürülmüştür. Ancak *Leu* alleli varlığının azalmış *GPZ1* aktivitesi ile ilişkili olduğunu ortaya koyan çalışmalar da mevcuttur. *Leu* alleleline sahip bireylerde *GPZ1* enzim aktivitesinin *Pro/Pro* genotipine sahip bireyler ile karşılaştırıldığında %20 daha düşük olduğu bulunmuştur. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (Karunasinghe ve diğerleri, 2012; Cardoso ve diğerleri, 2016; Ravn-Haren ve diğerleri, 2006).

GPZ1 Pro198Leu gen polimorfizminin, başta kanser olmak üzere birçok hastalık riskini arttırdığı ortaya konmuştur (Arsova-Saradinovska ve diğerleri, 2009; Ichimura ve diğerleri, 2004; Banescu ve diğerleri, 2016).

2.3. Oksidatif Stres

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılmaktadır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir azalma bu dengenin bozulmasına neden olmaktadır (Altan ve diğerleri, 2006). Sağlıklı bir insan vücudunda, ROT ve RNT gibi pro-oksidan ajanlar çeşitli antioksidan savunma sistemleri aracılığıyla kontrol altında tutulmaktadır. Ancak, çevre kirleticileri, sigara dumanı, UV ışınları, radyasyon, toksik kimyasallar ve aşırı beslenme durumlarında fizikokimyasal, çevresel veya patolojik ajanlara maruz kalma sonucu, dikkatle korunan denge pro-oksidanlar lehine bozulmaktadır ve bu durum oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır (Devasagayam ve diğerleri, 2004).



Şekil 2.6. Oksidatif stres (Altan ve diğerleri, 2006)

Oksidatif stres kavramı, serbest radikal üretimi ve antioksidan savunma mekanizması arasındaki kritik dengenin tersine dönmesi sonucu oluşan oksidatif hasar durumu olarak da tanımlanabilir. Serbest radikal ürünleri ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengesizlik sonucu oluşan oksidatif stres lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi moleküler yapılarıdaki geniş çaplı hasar ile ilişkilidir (Lobo ve diğerleri, 2010). Azalmış antioksidan enzim düzeyi de oksidatif strese neden olmaktadır. Reaktif türlere ve oksidatif strese karşı birincil savunma mekanizması olan antioksidan enzimler *SOD*, *GPZ* ve *KAT* formlarıdır (Crawford ve diğerleri, 2011).

Prensipite oksidatif stres iki temel neden sonucu oluşmaktadır. Bunlardan ilki, antioksidan savunma sistemi enzimlerini etkileyen mutasyonlar veya bu enzim mekanizmalarını tüketen toksik ajanlardan dolayı antioksidanların azalmasıdır. İkinci neden ise toksisiteye maruz kalma sonucu artan ROT ve RNT üretimidir. Oluşan oksidatif stresin organizmada meydana getirebileceği sonuçlar adaptasyon, doku hasarı ve hücre ölümü olarak sıralanabilir (Halliwell, 2001). Oksidatif strese karşı bir çok DNA onarım ve antioksidan sistemi vardır. Ancak, enzimlerde ortaya çıkan TNP'leri bu onarım sistemlerinde hasar oluşturma eğilimindedir (Orhan, Elkama, Mungan, Eruyar ve Karahalil, 2016).

2.3.1. Oksidatif stresin DNA'ya etkisi

İnsan vücudundaki tüm biyolojik moleküller serbest radikaller aracılığı ile oluşabilecek ataklar karşısında risk altındadır. Hasarlı moleküller hücre fonksiyonlarına zarar vermek ile kalmayıp hastalık durumlarında hücre ölümlerine neden olmaktadır (Devasagayam ve diğerleri, 2004). Yüksek konsantrasyonlardaki ROT hücre yapıları, lipidler, nükleik asitler ve proteinlerde oluşan hasarın nedeni olabilecek önemli araçlardır (Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic ve Mazur, 2006). OH⁻, DNA molekülünün pürin ve pirimidin bazları ve hatta DNA'nın temel yapıtaşı deoksiriboz ile reaksiyona girebilme özelliğindedir (Halliwell ve Gutteridge, 1999). Yapılan bir çok çalışma DNA ve Ribonükleik asit (RNA)'nın oksidatif hasara karşı duyarlı olduğunu göstermiştir. Mitokondriyal DNA, oksidatif hasara karşı daha duyarlıdır. Kanserde dahil olduğu birçok hastalıkta DNA hasarlarının rol oynadığı rapor edilmiştir. Özellikle 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) oksidatif stresi belirlemede biyolojik gösterge olarak kullanılabilmektedir (Lobo ve diğerleri, 2010).

Endojen ve ekzojen olmak üzere iki çeşit DNA hasarı vardır. Endojen DNA hasarının öncelikli nedeni normal hücre metabolizmasının ürünleri olan ROT'dur. Ekzojen DNA hasarı ise UV ışınları, radyasyon ve kimyasallar gibi çevresel etkenlerden dolayı oluşmaktadır (Karahalil, Bohr ve DE Souza-Pinto, 2010).

DNA'da meydana gelen değişimler DNA glikozilaz enzimi tarafından onarılabilmektedir. Düşük seviyelerdeki DNA baz hasarları sağlıklı insanların hücrelerinde bulunmaktadır. Ancak, romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastaları veya oksidatif stres altındaki insanlarda okside DNA baz konsantrasyonu artmıştır. Oksidatif stresin çok yüksek olduğu durumlarda DNA onarım sisteminin kullandığı glikozilaz enziminin yetersiz kalması sonucu mutagenез veya karsinogenез oluşabilmektedir (Lee, Koo ve Min, 2004).

2.3.2. Oksidatif stres ve hastalıklar

DNA'da gerçekleşen oksidatif hasar, mutasyona neden olabilecek farklı oksidatif DNA lezyonlarının oluşmasına neden olmaktadır. İnsan vücudunda DNA onarım enzimlerini ve antioksidanları kullanarak bu atakları etkisiz hale getirmek için çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. Bu mekanizmaların düzenli olarak işlemediği durumlarda, oksidatif stres çeşitli kronik ve dejeneratif hastalıkların oluşmasına, yaşlanmaya, travma ve felç gibi bazı

akut patolojilere neden olmaktadır (Pham-Huy ve diğerleri, 2008). Çevresel ve genetik faktörler sık rastlanan hastalıkların gelişimine katkıda bulunmaktadır (Süzen ve diğerleri, 2009).

Beyin, yüksek oksijen kullanımı ve içerdiği yüksek miktarda okside olabilen çoklu doymamış yağ asitleri ile redoks aktif metallerinin varlığından dolayı oksidatif strese karşı oldukça dayanıksızdır. Oksidatif stres yaş ile orantılı bir şekilde artar ve bu durum birçok nörodejeneratif hastalıkta göz önünde bulundurulması gereken önemli bir faktördür (Valko ve diğerleri, 2007).

ROT hücre ölümü, motor nöron hastalıkları ve aksonal hasarı içeren nörodejeneratif prosesin nedenleri arasında yer almaktadır (Sun ve Chen, 1998). Nörodejeneratif hastalıklar beyin ve spinal kordda yer alan sinir hücrelerinin öncülük ettiği fonksiyon kaybı (ataksi) ve duyumsal disfonksiyon (demans) durumlarını içermektedir. Yaşlanma, PH, AH, Multipl Skleroz (MS) ve Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) gibi nörodejenaratif hastalıkların nedeni olarak mitokondriyal disfonksiyon ve eksitotoksisite ve bunların sonucu olarak oluşan apoptoz rapor edilmiştir (Mattson, 2004).



Şekil 2.7. Oksidatif stresin insanlarda neden olduğu hastalıklar (Pham-Huy ve diğerleri, 2008)

2.4. PH'nın Tarihçesi

Parkinsonizm kısmi olarak daha önceki yıllarda tanımlanmış olmasına rağmen PH, tıbbi olarak ilk kez 1817 yılında James Parkinson tarafından nörolojik bir sendrom olarak tanımlanmıştır (Parkinson, 1817). James Parkinson, klinik olarak hastalığı, destek görmesine

rağmen sürekli olmasa da parça parça, azalmış kas hareketleri sonucu istemsiz titreyen hareketler olarak tanımlarken; Jean Martin Charcot titrete felç (shaking palsy) terimini red ederek PH terimini kullanan ilk araştırmacı olmuştur (Goetz, 2011).

2.5. PH'nın Epidemiyolojisi

PH, 65 yaş üstü popülasyonun %1-2'sini etkileyen, AH'dan sonra en sık görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır (Thomas ve Beal, 2011). Yapılan bazı vaka çalışmalarında PH'ya yakalanma oranının 50 yaşından sonra hızlı bir artış gösterdiği ortaya konmuştur. Aynı zamanda cinsiyet farkının da hastalığın oluşmasında bir etken olduğu ve erkeklerin hastalığa yakalanma oranının kadınlara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Hastalığın beyaz ırkta görülme sıklığı siyah ırkta oranla daha yüksektir (Van Den Eeden ve diğerleri, 2003). Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD), her yaş grubu için PH insidansı yaklaşık 100.000'de 150, 50 yaş altında 100.000'de 30 ve 75-80 yaş grubunda 100.000'de 800 olarak belirtilmiştir (Checkoway ve diğerleri, 2002).

PH'nın beynin substantia nigra (SN) bölgesindeki nöromelanin içeren dopaminerjik nöronların şiddetli ve progresif kaybı ve yabancı bir madde olan Lewy cisimciği varlığı sonucunda oluştuğu düşünülmektedir. PH, hayatın son evrelerinde başlayan ve genellikle sporadik bir hastalıktır. Hastalığın nedenleri tam olarak aydınlatılamamıştır. Oksidatif strese ve mitokondriyal disfonksiyona karşı savunma yollarında defekt bulunan bireylerin SN'sindeki dopamin üreten nöronlarda hasara yol açan çevresel faktörlerin hastalığın nedenleri arasında yer aldığı düşünülmektedir (Thomas ve Beal, 2011). Ancak, SN'daki dopaminerjik nöronların selektif dejenerasyonunun sebebi açıklanamamıştır. Çevresel faktörlerin çoklu etkisi ve genetik yatkınlığın PH'nın oluşumunda rol aldığı varsayılmaktadır (Warner ve Schapira, 2003).

Hastalığın semptomları arasında bradikinezi, rijidite, postural instabilite ve tremor yer almaktadır. Hareket kaslarındaki zayıflık ve uyku bozuklukları, demans ve bilinç kaybı gibi non-motor semptomlar da hastalığın semptomları arasında sayılmaktadır. Ailesel PH toplam vakaların sadece %5-10'nunu oluşturmaktadır. Günümüzde bazı gen mutasyonları seyrek ailesel PH formları ile ilişkilendirilmiştir. Şimdiye kadar hiçbir genetik değişiklik sporadik veya idiyopatik PH ile kesin olarak ilişkilendirilmemiştir. Ancak PH'nın yaygın formu çok

etmenlidir. Çevresel ve genetik faktörler yaşlılık ile birlikte hastalığın oluşmasına katkıda bulunmaktadır (Babusikova ve diğerleri, 2013).

2.6. PH ve Oksidatif Stres

PH'nın temel oluşum nedeni günümüzde bilinmemesine rağmen mitokondriyal disfonksiyonun eşlik ettiği oksidatif stresin nörodejeneratif proses ile hastalığı olumsuz etkilediği düşünülmektedir. PH'da aşırı derecede oluşmuş ROT ve RNT lipidler, yağlar ve DNA gibi hücrel moleküllerde hasar oluşturmaktadır. SN'daki artmış lipid peroksidasyon oluşan oksidatif hasarın temel kanıtıdır (Dexter, ve diğerleri, 1989). Oksidatif stres, PH'da nigral dopaminerjik hücre ölümüne neden olmaktadır (Yoo ve diğerleri, 2003). ROT tarafından hasara uğratılan SN'daki dopaminerjik nöronların PH'nın patogenezinde yer aldığı düşünülmektedir (Jenner, 1998).

Dopamin, monoamin oksidaz tarafından katabolize edilmektedir. Bu katabolizyon sonucu hücreler için toksik olan H_2O_2 ve serbest radikaller oluşmaktadır (Razzaghi, 2010). Dopamin metabolizması sırasında ROT artmaktadır. Dopaminin otooksidasyonu ve nöromelanine polimerizasyonu özellikle O_2^- olmak üzere ROT'un oluşumuna neden olmaktadır. Dopaminin vücuttaki demiri (Fe) koordine etme eğiliminde olduğu, OH^- ve O_2^- 'nin oluşumunda kaynak olan Fe^{+2} iyonunu oluşturduğu da bilinmektedir (Babusikova ve diğerleri, 2013). Genellikle SN'daki yükselmiş Fe seviyeleri PH'da gözlenmiştir (Sofic ve diğerleri, 1998).

Dopaminerjik nöronların oksidatif strese karşı korunmasında antioksidan molekül olan GSH önemli bir role sahiptir. GSH, hücrel metabolizma sırasında oluşan H_2O_2 'in uzaklaştırılmasında görevlidir (Perry, Godin ve Hansen, 1982). GSH depleasyonu hastalığın şiddeti ile ilişkilendirilmiş görünmektedir ve oksidatif stresin ilk göstergesi sayılmaktadır (Jenner, 1993).

Genetik ve çevresel faktörlerin olası etkisi, TNP içeren aday genler ve PH riski arasındaki ilişkilendirme çalışmalarının sayısının artmasına yol açmıştır. Son yıllarda yapılan geniş çaplı genom çalışmaları TNP'lerin PH'daki etkisini ölçmeye çalışmaktadır. Oksidatif stres etkeni olan ve PH ile ilişkisi olabilecek olası genlere ait bilgi çizelge 2.6'da sunulmuştur. (Alonso-Navarro, Jimenez-Jimenez, Garcia-Martin ve Agundez, 2014).

Çizelge 2.6. Oksidatif stres etkeni olan ve PH ile ilişkisi olabilecek olası genler (Alonso-Navarro ve diğerleri, 2014)

Gen	Gen adı	Kromozom
NAPH-guanin redüktaz (NOQ)	NOQ1 ve ya NADPH- menadion redüktaz (1728)	16q22.1
	NQO2 (4835)	6p25.2
Süperoksit dismutaz (SOD)	Cu/Zn-SOD (SOD1) (6647)	21q2.11
	Mn-SOD (SOD2) (6648)	6q25.3
Glutasyon peroksidaz (GPZ)	Glutasyon peroksidaz 1 (GPZ1) (2876)	3p2.13
Katalaz	Katalaz (847)	11p13
Epoksit hidrolaz	EPHX1 (mikrozomal EPHX) (2052) EPHX2 (sitoplazmik EPHX) (2053)	1q42.1 8p21
Demir metabolizması genleri	Hemokromatoz (HFE) (3077)	6p21.3
	Tranferrin (TF) (7018) Transferrin reseptör 1 (TFRC1) (7038)	3q22.1 3q29
	Hafif ferritin polipeptid (FTL) (2512) Ağır ferritin polipeptid (FTH1) (2495)	19q13.33 11q13
	Demir yanıt elemanı bağlayıcı protein 1 (IREB1) ve ya akonitaz 1 (48)	9p21.1
	Demir yanıt elemanı bağlayıcı protein 2 (IREB2) (3658)	15q25.1
	Frataksin (FXN) (2395)	9q22.11
	Haptoglobin (HP) (3240)	16q22.2
	Çözülmüş taşıyıcı ailesi (11) 2 (SLC11A2) ve ya Divalan metal transporter 1(DMT1) (4891)	12q13

Çizelge 2.6. (devam) Oksidatif stres etkeni olan ve PH ile ilişkisi olabilecek olası genler (Alonso-Navarro ve diğerleri, 2014)

Gen	Gen adı	Kromozom
Hem oksijenaz (HO)	HMOX-1 ve ya HO-1 ve ya HSP32 (3162) HMOX-2 ve ya HO-2 (3163)	22q13.1 16p13.3
Pantotenat kinaz 2 (PANK2)	Pantotenat kinaz 2 (PANK2) (80025)	20p13
Alfa ketoglutarat dehidrogenaz	Oksoglutarat (Alfa ketoglutarat dehidrogenaz) (OGDH ve ya AKGDH) (4967)	7p14-p13
Mitokondriyal akonitaz	Mitokondriyal akonitaz, akonitaz 2 ve ya ACO2 (50)	22q13.2
8-okso-dGTPase	NUDT1, (nudix nükleosit difosfat pay X'e bağlı)-tür motif, 8-okso-dGTPase ve ya MTH1 (4521)	7p22
İnsan oksoguanin DNA glikozilaz 1	HOGG1 (4968)	3p26.2
Faz II antioksidan cevap regülatörleri	Nükleer faktör (eritroid türetilmiş 2)- 2NFE2L2 (4780) Kelch benzeri ECH-ilişkili protein 1 ve ya KEAP1 (9817)	2q31 19p13.2
Ürik asit taşıyıcılar	Çözünen taşıyıcı ailesi (9) 2 ve ya SLC2A9 (56606)	4p16.1

2.7. Genetik Polimorfizm

Gen polimorfizmleri, genomik DNA'nın bir popülasyonun normal bireyleri arasında farklılık gösterdiği baz değişiklikleridir. Gen polimorfizmleri etnik ve coğrafik farklılıklar göstermektedir. Birçok durumda hücre metabolizması için önemli yollarda (DNA onarımı, hücre döngüsü kontrolü, sinyal iletimi vb.) rol alan genlerin kritik pozisyonlarında yer almaktadırlar. Bazı durumlarda genin kodladığı proteinin fonksiyonu ya da enzim aktivitesi bu değişikliklerden önemli ölçüde etkilenmektedir. Hücre metabolizması için kritik önem taşıyan proteinlerin fonksiyonunun bozulması çeşitli hastalıklara yol açmakta veya bazı hastalıklar için riski artırmaktadır (Deligezer, Akışık ve Dalay, 2004). Antioksidan enzimlerin tek nükleotid değişiklikleri, oksidatif stres ile ilişkili hastalıklara neden olabilmektedir (Christiansen ve diğerleri, 2004). *SOD*, *KAT* ve *GPZ* gibi enzim sistemlerini

kodlayan genlerde meydana gelen genetik varyasyonlar ROT'un detoksifikasyonunda değişikliklere neden olmaktadır. Bu nedenle hücreleri ROT'a karşı koruyan enzimlerde oluşan genetik varyasyonlar hastalık riskleri ile ilişkili olabilmektedir (Süzen ve diğerleri, 2009).

2.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RPUP, Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP)

PZR, DNA'da yer alan ve dizisi bilinen iki bölüm arasında belirli bir bölgeyi enzimatik yol ile çoğaltma esasına dayanan bir yöntemdir. PZR yönteminin esası; 94°C-98°C arası sıcaklıkta DNA zincirlerinin birbirinden ayrılması (denatürasyon), 37°C-65°C arası sıcaklıkta doğal olmayan nükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (annealing) ve 72°C'de zincirin uzaması (extension) aşamalarından oluşur ve bu döngüler çoklu sayıda tekrarlanır. PZR yöntemi ile çoğaltılmış bölgede söz konusu polimorfizmlerin belirlenebilmesi için RPUP yöntemi kullanılır. Bu yöntem DNA molekülünün ilgili kesim enzimi ile biraraya getirilmesi sonucu ayrılan DNA parçalarının, jel elektroforezi ile görüntülenmesi esasına dayanmaktadır (Campell ve Reece, 2006).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, Ankara Numune Eğitim ve Araştırması Hastanesi Etik Kurul İzni ve yazılı hasta onayı alındıktan sonra, yine aynı hastanenin Nöroloji Anabilim Dalı'na başvuran PH tanısı almış 99 hastadan alınmış kan örneklerinden izole edilen DNA örnekleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubunda ise hasta grubu ile uyumlu olacak şekilde 96 sağlıklı bireyden alınmış kan örneklerinden izole edilmiş DNA'lar kullanılmıştır. *Mn-SOD Ala16Val* ve *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmleri PZR ve RPUP yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir.

Çalışmada değerlendirilecek parametrelerin tespiti amacıyla, yaş, cinsiyet, sigara kullanımı gibi soruları içeren anket formu tüm hastalara uygulanmıştır. Bu anket formunun bir örneği ekte sunulmuştur.

3.1. Çalışma Grubundan Biyolojik Materyalin Toplanması

Biyolojik materyal olarak, çalışma grubunu oluşturan hastaların periferik kan örnekleri steril EDTA'lı tüplere alınarak toplanmıştır. Bu örneklerden sodyum perklorat / kloroform ekstraksiyon yöntemi ile DNA izole edilmiştir. Bu yöntem genel olarak bir lizis işleminden sonra proteinlerin denatürasyonu ve nükleik asitlerin etanol ile çöktürülmesi esasına dayanmaktadır. Çalışmamızda başka proje kapsamında izolasyonları yapılmış DNA'lar kullanılmıştır. Ancak, örnek sayısını arttırmak için ilave toplanan kanlardan DNA izolasyonu aşağıda belirtildiği gibi yapılmıştır.

3.2. DNA İzolasyonu

3.2.1. DNA izolasyonunda kullanılan aletler

- Terazî (Sartorius BA 610)
- Su banyosu (Nuve BM 102)
- EDTA'lı steril vakumlu kan tüpü (Greiner)
- Falkon tüpü (Greiner)
- Kromozom tüpü (Greiner)
- Plastik Pastör pipeti (Greiner)

- Ağzı vidalı ependorf tüpü (Greiner)
- Steril Bioloop
- Mikropipetler
- Mavi ve sarı mikropipet uçları
- Otoklav bandı
- Etüv
- Mikrosantrifüj (Spectrofuqe 24D-Labnet)

3.2.2. DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

- 1M Tris HCl çözeltisi:

12.1 g Trizma Baz tartıldı, 80 ml'ye distile su ile tamamlandı. Derişik HCl ile çözeltinin pH'sı 8'e ayarlandıktan sonra son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

- Lizis Tamponu (Reaktif A):

109.5 sukroz ve 1.0 g magnezyum klorür ($MgCl_2$) tartıldı, 800 ml distile suda çözüldü. Üzerine 10 ml 1M Tris HCl çözeltisi ilave edildi ve 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı. Otoklavda sterilizasyon işleminin ardından 10 ml Triton X-100 çözeltisi eklendi. Berraklaşıp soğuyan çözelti $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de saklandı.

- Reaktif B:

48.5 g Trizma Baz, 22.3 g EDTA ve 8.8 g NaCl tartıldı, distile suda çözülerek 800 ml'ye tamamlandı. Derişik HCl ile çözeltinin pH'sı 8'e ayarlandı ve distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Otoklavda sterilizasyon işleminin ardından 10 g Sodyum dodesil sülfat (SDS) eklendi. Soğuyan çözelti $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de saklandı.

- 5M Sodyum Perklorat:

70.2 sodyum perklorat tartıldı, distile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

- 10 x Tris-Borat-EDTA Tamponu (TBE):

108g Tris, 55 g borik asit, 9.3 g EDTA 800 ml distile suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı 8.3'e HCl ile ayarlandıktan sonra çözelti distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Otoklavda sterilize edildi.

3.2.3. Deneyin yapılışı

1. 5-10 ml kan örnekleri EDTA'lı tüplere alındı. Kan örnekleri izolasyon yapılincaya kadar -20°C'de saklandı. Kan örneklerinden sodyum perklorat-kloroform yöntemiyle DNA izolasyonu yapıldı.
2. Her birey için bir falkon tüpü kullanıldı. Her falkona soğuk Lizis tampondan (Reaktif A) 35ml ilave edildi.
3. Kan örnekleri falkonlara boşaltıldı. Tüpler alt üst edilerek karıştırıldı.
4. 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi.
5. Bu arada kromozom tüplerine 5M Sodyumperklorat çözeltisinden 0.5 ml koyuldu.
6. Santrifüjden çıkartılan falkonların süpernatantları çamaşır suyu dolu behere boşaltıldı.
7. Pelletlerin üzerine Reaktif B'den pastör pipeti yardımıyla 2 ml ilave edildi.
8. Falkondaki Reaktif B'li pellet sodyumperklorat içeren kromozom tüplerinin üzerine aktarıldı.
9. 15 dakika el ile alt üst edildi.
10. 65°C'de 30 dakika etüvde inkübe edildi.
11. Etüvden alınan tüplere soğuk kloroformdan 2 ml ilave edildi.
12. 10 dakika alt üst edildi.
13. 10 dakika 1400 rpm'de santrifüj edildi.
14. Üst fazın hepsi pastör pipeti ile yeni kromozom tüplerine aktarıldı.
15. Yeni tüpe aktarılan süpernatantların üzerine 5ml soğuk etanol ilave edildi.
16. Etanollü tüpler iyice alt üst edilerek, DNA sarmalının oluşumu gözlendi.
17. Bioloop ile oluşan DNA sarmalı alındı. Kuruması için ependorfa aktarılarak 5-10 dk bekletildi.
18. Kuruyan DNA'lar ependorfların içine aktarıldı ve DNA'nın büyüklüğüne göre 200/300 µL steril distile su ilave edildi.
19. 60°C'de 1 gece su banyosunda inkübe edildi.
20. Çözünen DNA'lar +4°C'de saklandı.

3.3. Bireylerin *Mn-SOD Ala16Val* ve *GPZ1 Pro198Leu* Genotiplerinin Analizi

3.3.1. Yöntemde kullanılan aletler

- PZR aleti (Thermal Cyclers-Techne)
- Mikrosantrifüj (Spectrofuze 24D-Labnet)
- Mikrodalga fırın
- Hassas terazi
- Etüv
- Kuru ısıtıcı (hot block)
- Elektroforez tankı (Maxicell Primo)
- Elektroforez güç kaynağı (Therma EC 250)
- Jel kalıbı
- Jel tarakları
- Mikrotiter kabı
- UV-transilluminatör ve jel görüntüleme sistemi (Syngene)
- Mikropipetler (Finntip)
- DNAaz, RNAaz free steril ependorf tüpleri (0,5-1,5 ml)
- Steril mavi, sarı ve beyaz pipet uçları

3.3.2. Yöntemde kullanılan kimyasal maddeler

- 100 mM dATP (Fermentas)
- 100 mM dGTP (Fermentas)
- 100 mM dTTP (Fermentas)
- 100 mM dCTP (Fermentas)
- Taq DNA polimeraz (5U/ μ l) (Fermentas)
- 10X Taq Buffer (Fermentas)
- 25 mM MgCl₂ (Fermentas)
- 100 bç'lik DNA marker (Amresco)
- *BsaW I* restriksiyon enzimi (10 U/ μ l) (Fermentas)
- *Apa I* restriksiyon enzimi (5U/ μ l) (Fermentas)
- Steril su (AppliChem)

- %2'lik rutin agaroz çözeltisi (Sigma, ABD)
- %3.0'lük agaroz çözeltisi (Sigma, ABD)
- Trizma Baz (Sigma, T-1503)
- Etilendiamin Tetra Asetik Asit (EDTA) (Sigma, ED2SS)
- Borik asit (Sigma, B-0252)
- 6X Loading dye çözeltisi (Fermentas)
- Etidyum Bromür (Sigma)

3.3.3. Yöntemde kullanılan çözeltiler

- 12,5 mM dNTP çözeltisi:

100 mM'lık dATP, dGTP, dTTP ve dCTP nükleotid stok çözeltileri karıştırılıp seyreltildi. Bunun için her bir stok çözeltiden 5 µl alınıp steril distile su ile 40 µl'ye tamamlandı.

- TBE Tamponu (10X)

Trizma Baz	108 g
Borik Asit	55 g
EDTA	9,3 g
Distile su	1000 ml

Otoklavda sterilize edilip oda sıcaklığında saklandı.

- TBE Tamponu (1X)

10X TBE tamponu 1:10 oranında steril distile su ile seyreltilerek hazırlandı.

- Etidyum Bromür çözeltisi (10 mg/ml)

Etidyum Bromür	100 mg
Distile su	10 ml

- %2'lik Normal agaroz jel:

Kullanılacak jelin boyutuna göre gerekli olan çözelti miktarı belirlendi. Buna göre normal agarın 1X TBE içindeki %2'lik çözeltisi hazırlandı. Bunun için 2.0 g normal agar 100 ml 1X TBE tamponu ile karıştırıldı, mikrodalgada ısıtılarak çözüldü. Bu karışım tarakları yerleştirilmiş jel kalıplarına hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü ve katılaşması için bir süre oda sıcaklığında bekletildi. Sonra taraklar dikkatlice çekildi.

- %3.0'lük Nusieve agaroz jel

Kullanılacak jelin boyutuna göre gerekli olan çözelti miktarı belirlendi. 3.0 g agar tartıldı ve üzerine 100 ml 1X TBE tamponundan ilave edildi. Mikrodalgada düşük sıcaklıkta ısıtılarak çözüldü. Bu karışım tarakları yerleştirilmiş jel kalıplarına hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü ve katılaşması için bir süre oda sıcaklığında bekletildi. Sonra taraklar dikkatlice çekildi.

- DNA ladder çözeltisi:

10 µl 0,5 µg/ml DNA ladder, 10 µl (6X) loading dye çözeltisi ve 40 µl steril distile su karıştırılarak buzdolabında saklandı.

3.3.4. *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmini içeren bölgenin PZR ile amplifikasyonu

Kullanılan Primer Dizileri:

Primer F: 5' CAG CCC AGC CTG CGT AGA CGG 3'

Primer R: 3' GCG TTG ATG TGA GGT TCC AG 5'

PZR karışımı:

0.25 mM dNTP	0.5 µl
1.5 mM MgCl ₂	1.2 µl
0.6 mM Primer F	1.2 µl
0.6 mM Primer R	1.2 µl
1x Tag buffer (KCl)	2 µl
1.5 U Tag DNA polimeraz	0.3 µl
Steril su	12.6 µl
	19 µl

PZR şartları:

Başlangıç denatürasyonu	94°C’de 2 dk	
Denatürasyon	94°C’de 1 dk	} 33 döngü
Bağlanma	66°C’de 1 dk	
Uzama	72°C’de 1 dk	
Son uzama	72°C’de 7 dk	

Şekil 3.1’de *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizminin PZR yöntemi ile çoğaltılan 172 bç’lik gen sekansı sunulmuştur.

```

5'..CAGCCCAGCCTGCGTAGACGGTCCCGCGGCGCTGACTGACCGGGCTGTGCTTTCT
CGTCTTCAGCACCAGCAGGCAGCTGGCTCCGGCTTTTGGGTATCTGGGCTCCGGGCA
GAAGCACAGCCTCCCCGACCTGCCCTACGACTACGGCGCCCTGGAACCTCACATCAA
CGC..3'

```

Şekil 3.1. *Mn-SOD* geni PZR ile çoğaltılan gen sekansı

3.3.5. PZR ürünlerinin jele uygulanması ve elektroforez

Enzim amplifikasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek amacı ile örnekler, PZR işlemi bitiminde %2’lik rutin agaroz jellere tatbik edildi. Bu amaçla önce mikrotiter kaplara her örnek için 3 µl yükleme tamponu konuldu. Yükleme tamponu üzerine PZR ürününden 5 µl ilave edilerek, pipetaj ile karıştırıldı. Bu arada jel 1X TBE tamponu içeren elektroforez tankına alındı. Yükleme tamponlu PZR ürünleri, tarak dişleri sayesinde oluşan boşluklara teker teker uygulandı. Bir jele oluşan ürünün büyüklüğünü ölçebilmek için gerekli olan 100 bç’lik DNA marker uygulandı. Amplifikasyon ürünleri direkt olarak 120V akım varlığında 20 dakika jel elektroforez’e tabi tutuldu. İşlem sonunda

amplifiye edilen *Mn-SOD Ala16Val* genine spesifik 172 bp'lik bant UV-transillüminator'da kontrol edildi.

3.3.6. *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmini içeren bölgenin PZR ile amplifikasyonu

Kullanılan primer dizileri:

Primer F: 5' TGT GCC CCT ACG GAG GTA 3'

Primer R: 3' CCA AAT GAC AAT GAC ACA GG 5'

PZR karışımı:

0.2 mM dNTP	0.4 µl
1.5 mM MgCl ₂	1.2 µl
1 pM Primer F	2 µl
1 pM Primer R	2 µl
1x Tag buffer (KCl)	2 µl
0.5 U Tag DNA polimeraz	0.1 µl
Steril su	10.3 µl
	18 µl

PZR şartları:

Başlangıç denatürasyonu	95°C'de 3 dk	} 35 döngü
Denatürasyon	95°C'de 0.5 dk	
Bağlanma	58°C'de 0.5 dk	
Uzama	72°C'de 1.5 dk	
Son uzama	72°C'de 10 dk	

Şekil 3.2’de *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizminin PZR yöntemi ile çoğaltılan 338 bç’lik gen sekansı sunulmuştur.

**5’...TGTGCCCCCTACGCAGGTACAGCCGCGACTTCCAGACCATTGACATCGAGGCTG
TCATCGAACTCCCGCTGTGTCAAGGGCCCAGCCGTGCTTAGGGCGCCCTCCTAA
ACTGGCTGCTTAGCAGTTGCAGGGCTGCCATCTCGGGGGGGTTTTTCATCTATGAG
GGTATTTCTCTAAACCTACGAGGGAGGAACACCTGATCTTACAGAAAATACCAGC
TCGAGATGGGTGCTGGTCCTGTTGATCCCAGTATATGCCAGACCAAGGCGAGTTTC
CCCACTAATAAAGTGCCGGGTGTCAGCAGAACTGTGTGTATGTCCTGTGTTCATTGT
CATTTGG...3’**

Şekil 3.2. *GPZ1* geni PZR ile çoğaltılan gen sekansı

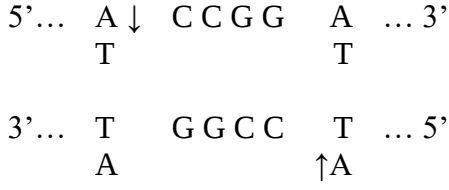
3.3.7. PZR ürünlerinin jele uygulanması ve elektroforez

Enzim amplifikasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek amacı ile örnekler, PZR işlemi bitiminde %2’lik rutin agaroz jellere tatbik edildi. Bu amaçla önce mikrotiter kaplara her örnek için 3 µl yükleme tamponu konuldu. Yükleme tamponu üzerine PZR ürününden 5 µl ilave edilerek, pipetaj ile karıştırıldı. Bu arada jel 1X TBE tamponu içeren elektroforez tankına alındı. Yükleme tamponlu PZR ürünleri, tarak dişleri sayesinde oluşan boşluklara teker teker uygulandı. Bir jele oluşan ürünün büyüklüğünü ölçebilmek için gerekli olan 100 bç’lik DNA marker uygulandı. Amplifikasyon ürünleri direkt olarak 120V akım varlığında 20 dakika jel elektroforez’e tabi tutuldu. İşlem sonunda amplifiye edilen *GPZ1 Pro198Leu* genine spesifik 338 bç’lik bant UV-transillüminator’de kontrol edildi.

3.3.8. *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmini içeren bölgenin *BsaW I* enzimi ile kesimi

Steril su	7.6 µl	} 60°C’de 16 saat inkübe
Reaksiyon buffer (NEB buffer)	2 µl	
<i>BsaW I</i> enzimi	0.4 µl	
PZR ürünü	10 µl	

BsaW I kesim enzimi tanıma bölgesi :



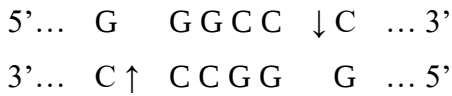
5'..**CAGCCAGCCTGCGTAGACGG**TCCCGCGGCGCTGACTGACCGGGCTGTGCT
TTCTCGTCTTCAGCACAGCAGGCAGCTGGCT**T/CCGGT**TTTTGGGTATCTGGGC
TCCGGGCAGAAGCACAGCCTCCCGACCTGCCCTACGACTACGGCGCC**CTGGA**
ACCTCACATCAACGC..3'

Şekil 3.3. *BsaW I* restriksiyon enzimi uygulanan 172 bp'lik gen sekansı (*Mn-SOD-F* ve *Mn-SOD-R* primerleri ve kesim enziminin tanıma bölgesi kırmızı renk ile gösterilmiştir)

3.3.9. *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmini içeren bölgenin *Apa I* enzimi ile kesimi

Steril su	9 µl	} 37°C'de 16 saat inkübe
10x B buffer	2 µl	
<i>Apa I</i> enzim	1 µl	
PZR ürünü	5 µl	

Apa I kesim enzimi tanıma bölgesi :



5'...**TGTGCCCCCTACGCAGGTA**CAGCCGCGACTTCCAGACCATGACATCGAGGC
TGTCATCGAACTCCCGCTGTGTCAAG**GGC/C**CAGCCGTGCTTAGGGCGCCCCCTC
CTAAACTGGCTGCTTAGCAGTTGCAGGGCTGCCATCTCGGGGGGGTTCATCT
ATGAGGGTATTTCTCTAAACCTACGAGGGAGGAACACCTGATCTTACAGAAAA
TACCAGCTCGAGATGGGTGCTGGTCCTGTTGATCCAGTATATGCCAGACCAAG
GCGAGTTTCCCCACTAATAAAGTGCCGGGTGTCAGCAGAACTGTGTGTATGT**CC**
TGTGTCATTGTCATTGG...3'

Şekil 3.4. *Apa I* restriksiyon enzimi uygulanan 338 bp'lik gen sekansı (*GPZ1-F* ve *GPZ1-R* primerleri ve kesim enziminin tanıma bölgesi kırmızı renk ile gösterilmiştir)

3.3.10. Kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile ayrılması

Kesilen örnekler, PZR ürünlerinin jele uygulanması ve elektroforez bölümünde açıklandığı şekilde hazırlanarak, 120 V akım varlığında 30 dakika jel elektroforez'e tabi tutuldu. İşlem sonunda spesifik bantları UV transilluminator'da incelenerek genotip analizleri yapıldı.

3.4. İstatistiksel Analiz

Gruplar arasında demografik özellikler bakımından farklılıklar kategorik değişkenler için ki kare testi, sayısal değişkenler için ise Student t test testi kullanılarak test edilmiştir. Hardy-Weinberg dengesi ki-kare testi ile test edilmiştir. Odds oranları ve %95 güven aralıklarının hesaplanmasında univariate ve multivariate lojistik regresyon analizleri kullanılmıştır. İstatistiksel analizler için SPSS for Windows version 23.0 paket programı kullanılmış ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Genotip frekansları bakımından hem hasta hem de kontrol grubunda HW dengesinden sapma gözlenmemiştir. Örneklem sayısı küçük olduğu için power analiz gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Demografik Bulgular

Mn-SOD Ala16Val ile *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmleri ile PH arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amacı ile kontrol grubunu oluşturan 96 sağlıklı birey ve PH tanısı almış 99 birey analiz edilmiştir. Kontrol grubunu oluşturan bireylerin %49'u kadınlardan oluşurken, %51'i erkeklerden oluşmaktadır. Hasta grubunun ise %45,5'i kadın, %54,5'i erkektir. Her iki grupta da cinsiyet dağılımının dengeli olduğu bulunmuştur ($p = 0,624$). Kontrol ve hasta grubuna ait yaş ortalamaları sırasıyla $62,07 \pm 9,61$ ve $65,61 \pm 11$ 'dir. Hasta ve kontrol gruplarının sigara alışkanlıkları değerlendirildiğinde; kontrol grubunu oluşturan bireylerin 46'sı (%48.4) sigara içmekte, 49'u (%51.6) ise sigara içmemektedir; hasta grubunun ise; 36'sı (%38.7) sigara içmekte iken, 57'si (%61.3) sigara içmemektedir. Kontrol grubunda 1 birey ve hasta grubunda 6 bireyin sigara kullanımı ile ilgili bilgisi yoktur. Sigara içmenin kontrol ve hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı gözlenmiştir ($p = 0.179$). Gruplara ait genel özellikler çizelge 4.1'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Genel özellikler

		Kontrol	Hasta	p
Yaş (Ort $\pm$ SD)	Total	62,07 $\pm$ 9,61	65,61 $\pm$ 11,87	0,023
	Kadın	60,34 $\pm$ 8,42	64,40 $\pm$ 11,85	0,063
	Erkek	63,73 $\pm$ 10,44	66,61 $\pm$ 11,91	0,197
Cinsiyet N (%)	Kadın	47 (49,0)	45 (45,5)	0,624
	Erkek	49 (51,0)	54 (54,5)	
Sigara Kullanımı N (%)	Sigara içenler	46 (48,4)	36 (38,7)	0,179
	Sigara içmeyenler	49 (51,6)	57 (61,3)	

4.2. *Mn-SOD Ala16Val* ve *GPZ1 Pro198Leu* Gen Polimorfizmi Bölgelerinin Hardy Weinberg Dağılımları

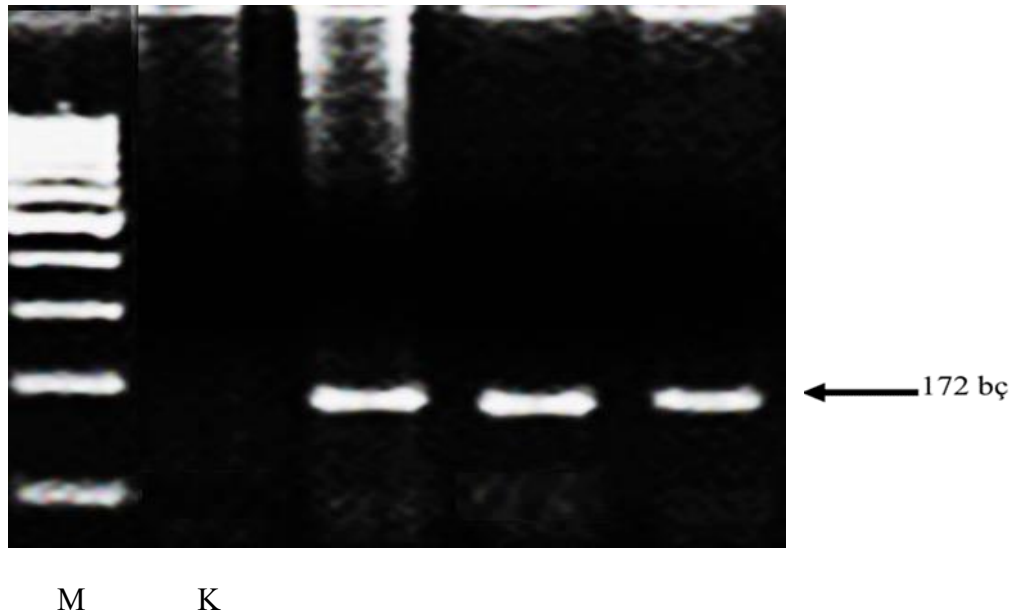
Hardy Weinberg dağılımına uygunluk test edilirken p değerlerinin 0.05'den büyük olması beklenir. p değerleri 0,05'den büyük olduğundan kontrol grubu her iki gen polimorfizmi açısından Hardy Weinberg dengesindedir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. *Mn-SOD Ala16Val* ve *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmi bölgelerinin Hardy Weinberg dağılımı

Gen	χ^2	p
<i>Mn-SOD</i>	0,609	0,435
<i>GPZ1</i>	2,447	0,117

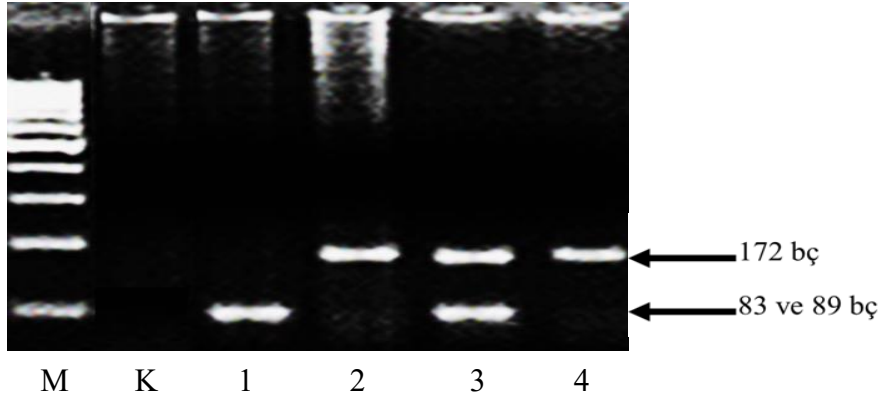
4.3. *Mn-SOD Ala16Val* Gen Polimorfizmi Genotip Analiz Sonuçları

Şekil 4.1’de *Mn-SOD* genine PZR uygulaması sonucunda elde edilen 172 bç büyüklüğündeki PZR ürünleri görülmektedir.



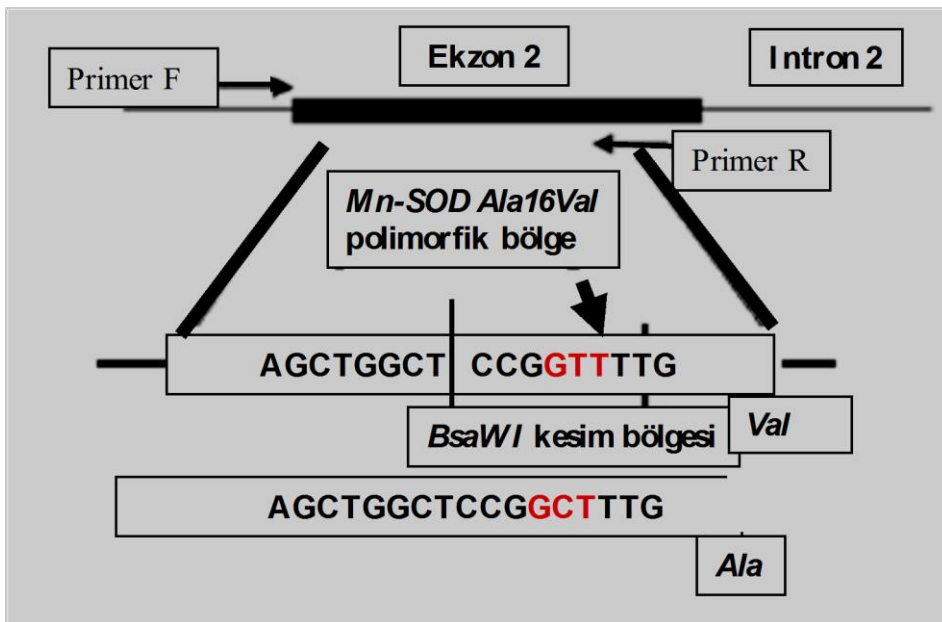
Resim 4.1. *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmi 172 bç’lik PZR ürünleri (M; 100 bç moleküler ağırlık merdiveni ve K; Kör)

Mn-SOD Ala16Val genotipinin belirlenmesi amacıyla PZR ürünleri *BsaW I* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Kesim sonucunda ürünlerin %3’lük agaroz jele yüklenmesiyle; *Ala/Ala* genotipi için 172 bç’de tek bant, *Ala/Val* genotipi için 172 bç, 89 bç ve 83 bç’de iki bant, *Val/Val* genotipi için ise 89 bç ve 83 bç’de tek bant görülmektedir.



Resim 4.2. *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmi *BsaW I* kesim ürünleri (M; 100 bç moleküler ağırlık merdiveni; kör, K; 1; *Val/Val*, 2; *Ala/Ala*, 3; *Ala/Val* 4; *Ala/Ala*)

Mn-SOD Ala16Val gen polimorfizmi bölgesinin *BsaW I* enzimi ile kesimi şekil 4.1’de şematik olarak sunulmuştur.



Şekil 4.1. *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmi bölgesinin *BsaW I* enzimi ile kesiminin şematik gösterimi

Mn-SOD Ala16Val gen polimorfizminin allel frekansları kontrol grubu için *Ala* 0,406; *Val* 0,594, hasta grubu için ise *Ala* 0,364; *Val* 0,636 olarak bulunmuştur. *Val* alleli taşıyan bireylerdeki PH riski analiz edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. *Val* alleleline sahip olmak PH açısından bir riske neden olmamaktadır (COR = 1,197; %95 CI =0,796-1,801; p = 0,387). *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmine ait allel frekans dağılımı çizelge 4.3’de sunulmuştur.

Çizelge 4.3. *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmine ait allel frekans dağılımı

Allel sıklığı	Kontrol	Hasta	COR (%95 CI)	p
<i>Ala</i>	78 (0,406)	72 (0,364)	1 (Referans)	
<i>Val</i>	114 (0,594)	126 (0,636)	1,197 (0,796-1,801)	0,387

Kontrol ve hasta grubunda *Mn-SOD Ala16Val* genotip frekansları incelenmiştir. *Ala/Ala*, *Ala/Val* ve *Val/Val* genotip frekansları kontrol grubunda sırasıyla %14,6; %52,1 ve %33,3; hasta grubunda ise %11,1; %50,5 ve %38,4 bulunmuştur. *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizminin genotip dağılımı Türk ve diğer Beyaz Avrupa popülasyonunda yapılan çalışmalar ile uyumludur. Belirtilen genotip dağılımları kontrol ve hasta grubu arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık göstermemektedir (*Mn-SOD Ala/Val* COR = 1,273; %95 CI = 0,527-3,073; p = 0,592; *Mn-SOD Val/Val* COR = 1,511; %95 CI = 0,603-3,789; p = 0,378). *Ala/Val* ve *Val/Val* genotipleri toplamı (*Ala/Val+Val/Val*) kontrol ve hasta grubunda *Ala/Ala* genotipi referans alınarak karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (COR = 1,366; %95 CI = 0,587-3,180; p = 0,470). Sonuçlar yaş, cinsiyet ve sigara içme alışkanlıklarına göre düzeltildikten sonra her iki genotip için değerlendirme yapıldığında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir (*Mn-SOD Ala/Val* AOR = 1,173; %95 CI = 0,459-3,000; p = 0,739; *Mn-SOD Val/Val* AOR = 1,646; %95 CI = 0,617-4,391; p = 0,608; *Mn-SOD Ala/Val+Val/Val* AOR = 1,346; %95 CI = 0,549-3,304; p = 0,516). *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmi ve PH riski ilişkisine ait veriler çizelge 4.4’de sunulmuştur.

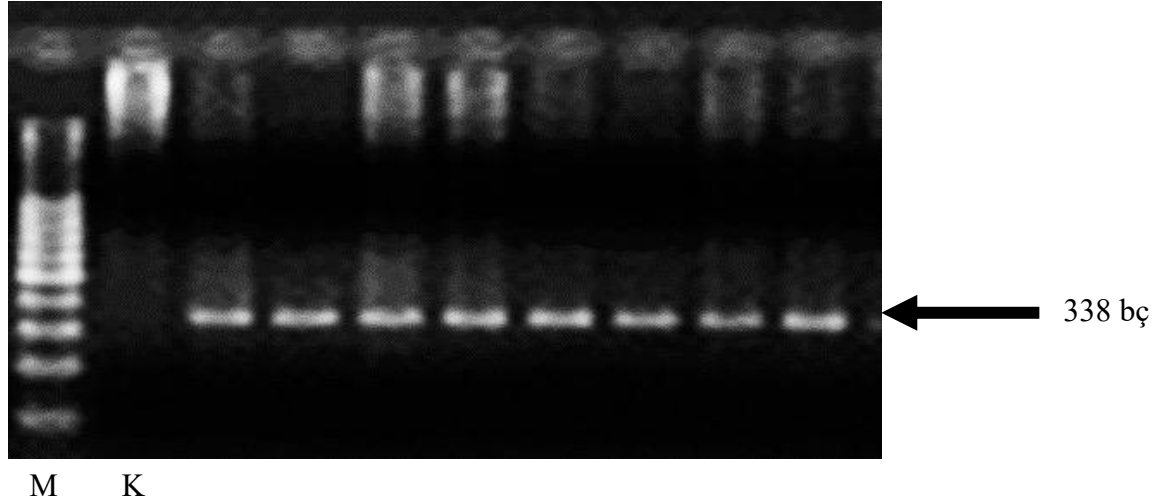
Çizelge 4.4. *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmi ve PH riski

Genotip	Kontrol N (%)	Parkinson N (%)	COR (%95 CI)	p	AOR (%95 CI)	p
<i>Ala16Val</i>						
<i>Ala/Ala</i>	14 (14,6)	11 (11,1)	1 (Referans)		1 (Referans)	
<i>Ala/Val</i>	50 (52,1)	50 (50,5)	1,273 (0,527-3,073)	0,592	1,173 (0,459-3,000)	0,739
<i>Val/Val</i>	32 (33,3)	38 (38,4)	1,511 (0,603-3,789)	0,378	1,646 (0,617-4,391)	0,608
<i>Ala/Val+Val/Val</i>	82 (85,4)	88 (88,9)	1,366 (0,587-3,180)	0,470	1,346 (0,549-3,304)	0,516

COR; Crude Odds Ratio, AOR; Adjusted Odds Ratio

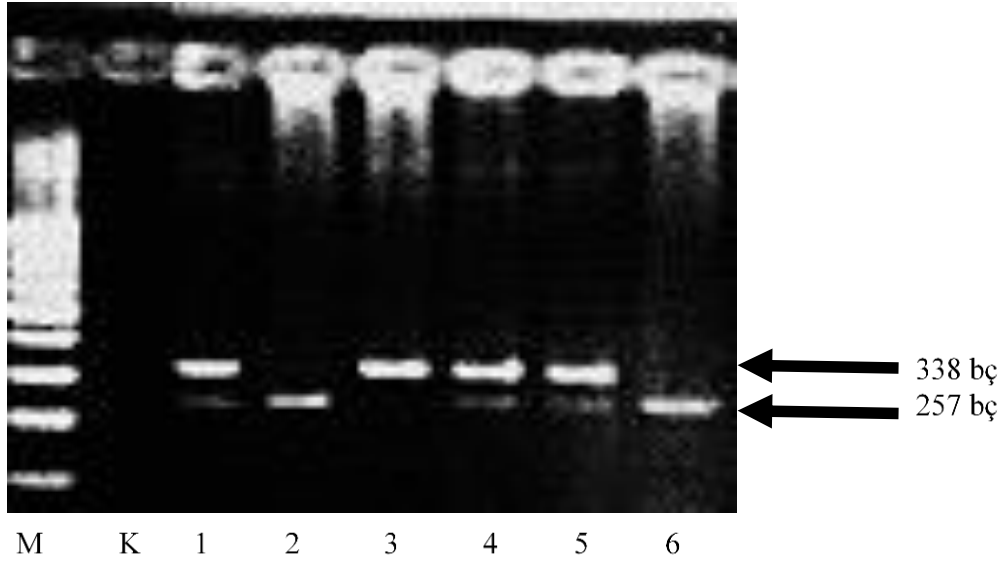
4.4. *GPZ1 Pro198Leu* Gen Polimorfizmi Genotip Analiz Sonuçları

Resim 4.3’de *GPZ1* genine PZR uygulaması sonucunda elde edilen 338 bç büyüklüğündeki PZR ürünleri görülmektedir.



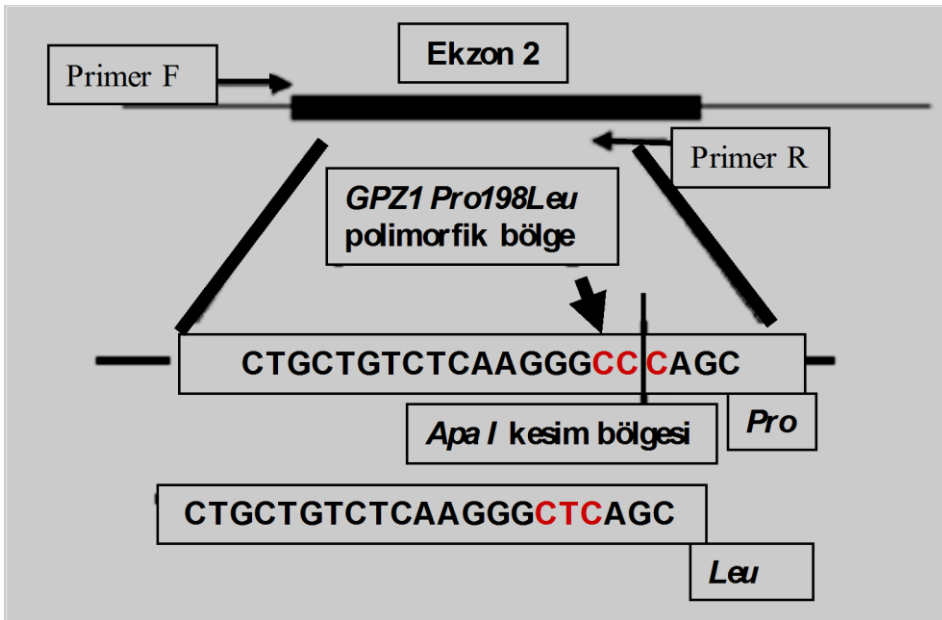
Resim 4.3. *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmi 338 bç’lik PZR ürünleri (M; 100 bç moleküler ağırlık merdiveni ve K; Kör)

GPZ1 Pro198Leu genotipinin belirlenmesi amacıyla PZR ürünleri *Apa I* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Kesim sonucunda ürünlerin %2’lik agaroz jele yüklenmesiyle; *Pro/Pro* genotipi için 257 bç ve 81 bç’de iki bant, *Pro/Leu* genotipi için 338 bç, 257 bç ve 81 bç’de üç bant, *Pro/Pro* genotipi için ise 338 bç’de tek bant görülmektedir. 81 bç’lik bantların görüntülenmesi zayıf olduğu için resimde görünmemektedir. Diagnostik bant olmadığı için değerlendirme sorunsuz yapılmıştır.



Resim 4.4. *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmi *Apa I* ile kesim ürünleri (M; 100 bç moleküler ağırlık merdiveni, K; kör, Heterozigot (*Pro/Leu*), 1; Vahşi tip (*Pro/Pro*), 2; Varyant (*Leu/Leu*), 3; Heterozigot (*Pro/Leu*), 4; Heterozigot (*Pro/Leu*), 5; Vahşi tip (*Pro/Pro*), 6;

GPZ1 Pro198Leu gen polimorfizmi bölgesinin *Apa I* enzimi ile kesimi şekil 4.2’de şematik olarak sunulmuştur.



Şekil 4.2. *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmi bölgesinin *Apa I* enzimi ile kesiminin şematik gösterimi

GPZ1 Pro198Leu gen polimorfizminin allel frekanslarını kontrol grubu için *Pro* 0,609; *Leu* 0,391, hasta grubu için ise *Pro* 0,641; *Leu* 0,359 olarak bulunmuştur. Mutant *Leu* alleli taşıyan bireylerdeki PH riski analiz edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. *Leu* alleleline sahip olmak PH açısından bir riske neden olmamaktadır (COR = 0,872; %95 CI = 0,579-1,315; p = 0,513). *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmine ait allel frekans dağılımı çizelge 4.5’de sunulmuştur.

Çizelge 4.5. *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmine ait allel frekans dağılımı

Allel sıklığı	Kontrol n	Hasta n	COR (%95 CI)	p
<i>Pro</i>	117 (0,609)	127 (0,641)	1 (Referans)	
<i>Leu</i>	75 (0,391)	71 (0,359)	0,872 (0,579-1,315)	0,513

Kontrol ve hasta grubunda *GPZ1 Pro198Leu* genotip frekansları incelenmiştir. *Pro/Pro*, *Pro/Leu* ve *Leu/Leu* genotip frekansları kontrol grubunda sırasıyla %33,3; %55,2 ve %11,5; hasta grubunda ise %39,4; %49,5 ve %11,1 bulunmuştur. *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizminin genotip dağılımı Türk ve diğer Beyaz Avrupa popülasyonunda yapılan çalışmalar ile uyumludur. Kontrol ve hasta grubundaki *GPZ1 Pro198Leu* heterozigot ve mutant genotipi frekansı ile PH riski arasındaki ilişki değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (*GPZ1 Pro/Leu*; COR = 0,759; %95 CI = 0,413-1,393; p = 0,373; *GPZ1 Leu/Leu*; COR = 0,821; %95 CI = 0,315-2,138; p = 0,686). *Pro/Leu* ve *Leu/Leu* genotipleri toplamı (*Pro/Leu+Leu/Leu*) kontrol ve hasta grubunda *Pro/Pro* genotipi referans alınarak karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (COR = 0,769; %95 CI = 0,428-1,381; p = 0,380). Sonuçlar yaş, cinsiyet ve sigara içme alışkanlıklarına göre düzeltildikten sonra her iki mutant genotip için değerlendirme yapıldığında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir (*GPZ1 Pro/Leu* AOR = 0,811; %95 CI = 0,428-1,539; p = 0,522; *GPZ1 Leu/Leu* AOR = 0,818; %95 CI = 0,299-2,239; p = 0,695; *GPZ1 Pro/Leu+Leu/Leu* AOR = 0,812; %95 CI = 0,438-1,537); p = 0,510) *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmi ve PH riski ilişkisine ait veriler çizelge 4.6’da sunulmuştur.

Çizelge 4.6. *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmi ve PH riski

Genotip	Kontrol N (%)	Parkinson N (%)	COR (%95 CI)	p	AOR (95%CI)	p
<i>Pro198Leu</i>						
Pro/Pro	32 (33,3)	39 (39,4)	1 (Referans)		1 (Referans)	
Pro/Leu	53 (55,2)	49 (49,5)	0,759 (0,413-1,393)	0,373	0,811 (0,428-1,539)	0,522
Leu/Leu	11 (11,5)	11 (11,1)	0,821 (0,315-2,138)	0,686	0,818 (0,299-2,239)	0,695
Pro/Leu+Leu/Leu	64 (66,7)	60 (60,6)	0,769 (0,428-1,381)	0,380	0,812 (0,438-1,537)	0,510

COR; Crude Odds Ratio, AOR; Adjusted Odds Ratio

4.5. *Mn-SOD Ala16Val* ve *GPZ1 Pro198Leu* Gen-Gen Etkileşimi

Mn-SOD ve *GPZ1* enzimleri aynı yolda yer aldıklarından bu proteinlerde yer alan TNP'nin sinerjik etkileri değerlendirilmiştir. *Mn-SOD Ala16Val* ve *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmi kombinasyonlarının PH riski yönünden değerlendirilmesi amacı ile *Mn-SOD* ve *GPZ1* gen polimorfizmlerinde *Ala/Ala* ve *Pro/Pro* genotipleri referans alınmıştır. *Ala/Val*, *Val/Val*, *Pro/Leu*, *Leu/Leu* genotiplerin toplamı hasta ve kontrol gruplarında referans grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Gen-gen etkileşimlerine ait veriler çizelge 4.7'de sunulmuştur. Tabloda koyu puntolarla belirtilen sayıların istatistiki analiz için yetersiz olduğu görülmektedir. Ancak, yine de tabloda bu karşılaştırmalara yer verilmiştir.

Çizelge 4.7. *Mn-SOD Ala16Val* ve *GPZ1 Pro198Leu* gen-gen etkileşimi

Genotip	Kontrol N (%)	Parkinson N (%)	p	COR (95%CI)	AOR (95%CI)	p
Val/Val+TT vs Ala/Ala	4 (30,8)	3 (37,5)	0,292	0,556 (0,211- 8,617)	0,001 (0,064-7,585)	0,087
Ala/Val+Val/Val+CT+TT vs Ala/Ala	59 (86,8)	58 (92,1)	0,331	1,769 (0,559- 5,598)	1,849 (0,553-6,177)	0,671
Ala/Val+CT vs Ala/Ala	33 (78,6)	27 (84,4)	0,529	0,679 (0,203- 2,267)	0,817 (0,222-2,999)	0,760
Val/Val+TT vs CC	4 (17,4)	3 (11,1)	0,527	0,594 (0,118- 2,981)	0,565 (0,099-3,229)	0,521
Ala/Val+Val/Val+CT+TT vs CC	59 (75,6)	58 (70,7)	0,484	0,778 (0,385- 1,571)	0,799 (0,376-1,701)	0,561
Ala/Val+CT vs CC	33 (63,5)	27 (52,9)	0,280	0,648 (0,295- 1,424)	0,614 (0,257-1,463)	0,271

COR; Crude Odds Ratio, AOR; Adjusted Odds Ratio

5. TARTIŞMA

Genetik polimorfizmler, birçok hastalığa karşı bireysel duyarlılıktaki önemli faktörlerden birisidir. ROT'un DNA, RNA gibi makromoleküllerle etkileşimi sonucu meydana gelen hasarlar DNA onarım sistemi ve antioksidan savunma sistemleri ile bertaraf edilmektedir. Ancak hem DNA onarım sistemi hem de antioksidan savunma sistemlerinde rol oynayan enzimlerdeki polimorfizmler bireysel farklılıklara neden olmaktadır (Süzen ve diğerleri, 2009). ROT'a karşı koruma sağlayan antioksidan enzimler arasında, *Mn-SOD* O_2^- 'ni, H_2O_2 'ne çevirirken; *GPZ1* H_2O_2 'in H_2O 'ya dönüşümünde rol oynamaktadır (Soerensen, Christensen, Stevnsner ve Christiansen, 2009). Bu enzimlerde çeşitli polimorfizmler tanımlanmıştır. Bu polimorfizmlerin yaşa bağlı gelişen kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar ile bazı kanser türleri arasında ilişki olduğunu gösteren birçok çalışma vardır (Antonella ve diğerleri, 1999; Atılgan ve diğerleri, 2014; Zejnilovic, Akev, Yılmaz ve Isbir, 2009; Cardoso ve diğerleri, 2012).

PH, beyin ve merkezi sinir sisteminin farklı bölgelerindeki nöronları etkileyen ve en sık görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır. Etiyolojisinde özellikle genetik ve çevresel faktörlerin etkisi olduğu bilinmektedir. PH ile ilişkili genetik çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır (Li, Liao, Xia ve Yang, 2015). PH'nın görülme sıklığında en etkili faktörlerden birisi yaşıdır. 65 yaş üstü popülasyonun hastalıktan etkilenme oranı 50 yaş altı popülasyona göre daha yüksektir (Tanner, 1992). Oksidatif stresin PH'nın gelişimine yol açan patolojik yollardan biri olduğu ve PH'nın gelişiminde bir risk faktörü olarak görüldüğü bilinmektedir (Gui ve diğerleri, 2016). Günümüzde gerçekleştirilen araştırmalar ROT ve oksidatif hasarın PH'nın patolojik prosesinin bir parçası olduğunu göstermektedir. Ancak oksidatif stres ürünlerinin mi doğrudan PH'ya neden olduğu ya da oksidatif stres sonucu meydana gelen hücrelerdeki fonksiyon bozukluklarının mı PH'ya neden olduğu tam olarak bilinmemektedir. Antioksidan enzimlerdeki polimorfizmlerin analiz edilmesi, oksidatif stres kaynaklı PH'nın gelişimde genetik farklılıkların aydınlığa kavuşturulması açısından yardımcı olacaktır (Babusikova ve diğerleri, 2013).

Mn-SOD Ala16Val gen polimorfizmi ile PH riski arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan iki tanesi Beyaz ırk üzerinde gerçekleştirilmiştir (Grasbon-Frodl ve diğerleri, 1999; Farin ve diğerleri, 2001). Farin ve arkadaşlarının Amerikan popülasyonunda yaptıkları çalışmada *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmi genotip

dağılımları ve allel frekansları bizim çalışmamızla benzer bulunmuş ve *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmi ile PH riski arasında bir ilişki saptanmamıştır. Farin ve arkadaşlarının kontrol ve hasta grubundaki örnek sayısı bizim çalışmamıza göre daha geniştir (Farin ve ark. kontrol 235, hasta 155; bizim çalışmamız kontrol 96, hasta 99). Daha yüksek örnek sayısına sahip bu çalışmada da bizim çalışmamızla benzer sonuçlar elde edilmiştir (Farin ve diğerleri, 2001). Grasbon ve arkadaşlarının Alman ırkında *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmi ile PH riski arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmada, kontrol ve hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p = 0.97$). Bu çalışmadan elde edilen sonuç, bizim çalışma sonuçlarımızla uyushmaktadır. Grasbon ve arkadaşlarının çalışmasında dikkat çeken nokta *Ala* allel frekansının, Alman popülasyonunda diğer Beyaz ırkta yapılan çalışmalara göre daha yüksek saptanmasıdır (Grasbon-Frodl ve diğerleri, 1999). Türk popülasyonunda yapılan çalışmalarda *Val* allel frekansı daha yüksektir. Diğer Beyaz ırkta yapılan çalışmalarda ise *Ala* ve *Val* allel frekansları birbirine çok yakın bulunmuştur. *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizminin Beyaz ırkta frekans dağılımları Çizelge 5.1’de sunulmuştur.

Çizelge 5.1. *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmi Beyaz ırk frekans dağılımları

Ülke	Örnek sayısı (Sağlıklı birey)	<i>Ala</i> %	<i>Val</i> %	Referans
Türkiye	96	40,6	59,4	Bizim çalışmamız
Türkiye	196	44	54	(Akyol ve diğerleri, 2005)
Türkiye	440	43	57	(Silig ve diğerleri, 2015)
Türkiye	50	35	65	(Atılgan ve diğerleri, 2014)
Türkiye	104	45,2	54,8	(Kalkan ve diğerleri, 2015)
Türkiye	50	18	82	(Ergen ve diğerleri, 2007)
Türkiye	69	41,3	58,7	(Seckin ve diğerleri, 2016)
Türkiye	167	41	59	(Kalkan ve diğerleri, 2014)
İtalya	257	48	52	(Ventriglia ve diğerleri, 2006)
Fransa	214	52	48	(Hung ve diğerleri, 2004)
Almanya	42	55,95	44,05	(Grasbon-Frodl ve diğerleri, 1999)

Alman ırkında *Ala* alellinin diğer Beyaz ırka göre daha yüksek saptanması kontrol grubundaki örnek sayısının azlığı ya da alt etnik farklılıklar nedeniyle olabilir.

Beyaz ırk üzerinde gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen sonuçlar bizim çalışma sonuçlarımız ile benzerlik göstermektedir. Beyaz ırkta *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmi

ile PH riski arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile bizim çalışma sonuçlarımızı içeren tablo çizelge 5.2’de sunulmuştur.

Çizelge 5.2. Beyaz ırkta *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmi ile PH riskini araştıran çalışmalardan elde edilen frekans dağılımları

Ülke	Grup	Örnek sayısı	<i>Ala/Ala</i> %	<i>Ala/Val</i> %	<i>Val/Val</i> %	<i>Ala</i> %	<i>Val</i> %	Referans
Türkiye	Kontrol	96	14,6	52,1	33,3	40,6	59,4	Bizim çalışmamız
	Hasta	99	11,1	50,5	38,4	36,4	63,6	
Almanya	Kontrol	42	26,2	59,5	14,3	55,95	44,05	(Grasbon-Frodl ve diğerleri, 1999)
	Hasta	44	25	59,1	15,9	54,5	45,5	
Amerika	Kontrol	231	22,1	54,1	23,8	49,13	50,87	(Farin ve diğerleri, 2001)
	Hasta	155	22,6	49,7	27,7	47,42	52,58	

Asya ırkında yapılan çalışmaların birçoğunda, bizim çalışmamız gibi *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmi ile PH riski arasında ilişki saptanmamıştır. Yu ve arkadaşlarının Asya ırkında örnek sayısını yüksek tutarak yaptıkları çalışmada, *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmi ile PH riski arasında bir ilişki saptanmamıştır (Yu ve diğerleri, 2014). Singh ve arkadaşları, *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmi ile PH riski arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmada Beyaz ırkta yapılan çalışmalar ile aynı sonuca ulaşmış ve bu polimorfizmin PH riski taşımadığını saptamışlardır (Singh ve diğerleri, 2008). Wang ve arkadaşlarının 295 hasta ve 111 sağlıklı birey üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmi ile PH riski arasında bir ilişki saptanmamıştır. Kontrol grubunda ise *Ala/Ala* genotipi taşıyan birey bulunmamıştır. Tüm *Ala/Ala* genotiplerinin hasta grubunda yer alması ve *Ala* allel frekansının hasta grubunda (%12.2) kontrol grubuna (%8.6) oranla daha yüksek bulunması iki grup arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamasına rağmen Wang ve arkadaşlarına, *Ala* allelinin PH riski ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Benzer bir durum ile Shimoda-Matsubayashi ve arkadaşlarının Japon popülasyonunda yaptıkları bir çalışmada rastlanmıştır. *Ala/Ala* genotipini taşıyan bireylerin tamamının hasta grubunda gözlenmesi ile *Ala* allelini taşımanın ailesel PH riski ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Wang ve diğerleri, 2010; Shimoda-Matsubayashi ve diğerleri, 1997).

Fong ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, *Mn-SOD Ala16Val* gen polimorfizmi ile PH riski arasındaki ilişki *Val/Val* genotipi referans alınarak gerçekleştirilmiş ve kontrol ve hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ancak hasta grubunda *Ala*

allel frekansı kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur (*Ala* alleli; kontrol %6,45, hasta %12,42). Ayrıca pestisit maruziyeti yaşamış bireylerde *Ala* allelinin PH riskinde artışa neden olduğu bulunmuştur (Fong ve diğerleri, 2007).

Pestisit maruziyeti yaşamış bireylerde *Ala* allelinin artmış PH riski ile ilişkilendirilmesine, *Ala* allelinin oksidatif stresin biyogöstergelerinden olan 8-OHdG'nin artmış seviyeleri ile ilişkilendirilmiş olması neden olarak gösterilebilir (Fong ve diğerleri, 2007). Oksidatif stresin PH'ya neden olduğu bilinmektedir (Shimoda-Matsubayashi ve diğerleri, 1996). PH'nın nedenleri arasında genetik faktörlerin yanısıra çevresel etkenler de yer almaktadır. Pestisit maruziyeti çevresel etkenler arasında yer almaktadır.

İnsan *Mn-SOD* geni üzerindeki ilk çalışma Shimoda-Matsubayashi ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Japon popülasyonu üzerinde gerçekleştirilen bu çalışmada *Ala* allel frekansı, hasta grubunda kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuş ve bu durum PH riski ile ilişkilendirilmiştir (*Ala* alleli; kontrol %12,1, hasta %19,3, $p = 0,04$). Bu çalışmada ayrıca mitokondri hedef sekansının alfa helikal yapıda olduğu ve bu yapılanmanın mitokondriyal taşıma için gerekli olduğu bulunmuştur. *Mn-SOD* genindeki bu polimorfizm proteinin ikincil yapısında değişikliğe neden olmaktadır. Bu değişiklik sonucu alfa helikal yapı beta tabakaya dönmektedir. Bu durum mitonkondriyal taşımayı etkilemekte ve enzim aktivitesinde değişikliğe neden olmaktadır (Shimoda-Matsubayashi ve diğerleri, 1996).

Mn-SOD Ala16Val gen polimorfizmi aminoasit değişimine dolayısıyla protein fonksiyonunda ve enzimin mitokondri içine girişinde farklılıklara neden olmaktadır. Bu değişimler hücrelerin O_2^- 'e karşı savunmasız hale gelmesine neden olmaktadır (Ambrosone, ve diğerleri, 1999). Enzimin mitokondri içine girememesi yada protein fonksiyonunun değişmesi sonucu enzim aktivitesi azalarak DNA'da hasarlar meydana gelebilmektedir. Ayrıca yetersiz enzim seviyesi O_2^- 'nin ve diğer ROT'un artmasına neden olmaktadır (Van Remmen ve diğerleri, 2003).

GPZ1 gen polimorfizmi ile PH riski arasındaki ilişkiyi inceleyen bir tane çalışmaya ulaşılmıştır. Gasser ve arkadaşları, birçok aile üyesinin ABD ve Kanada'da yaşadığı, ancak kökenlerinin Almanya ve Danimarka'nın küçük kasabalarına kadar dayandığı 3 jenerasyon boyunca, birçok aile üyesinde otozomal dominant PH görülmüş 3 farklı aile üzerinde *GPZ1*

gen polimorfizminin PH riskini araştırmışlardır. Belirtilen bu ailelerde *GPZ1* gen polimorfizminin PH'nın etiyolojisinde rol almadığı saptanmıştır (Gasser ve diğerleri, 1994). Gasser ve arkadaşlarının elde ettiği sonuç bizim çalışma sonuçlarımız ile benzerlik göstermektedir.

Glutasyon içeren enzimlerin aktivite seviyelerinde ortaya çıkan değişiklikler PH gibi nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde rol almaktadır (Johnson, Wilson-Delfosse ve Mieyal, 2012). Yapılan bir çalışmada Parkinson hastalarında, *GPZ1* enzim aktivitesinin beynin SN bölgesi de dahil olmak üzere birçok bölgesinde kontrol grubuna kıyasla azaldığı bulunmuştur (Kish, Morito ve Hornykiewicz, 1985). *GPZ1* enziminde oluşan polimorfizmler enzim yapısının aktif bölgesinde ve enzim aktivitesinde değişikliğe neden olmaktadır (Ratnasinghe ve diğerleri, 2000). *Leu* alleli varlığının azalmış *GPZ1* aktivitesi ile ilişkili olduğunu ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmi ile enzim aktivitesi arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada *Pro/Pro* genotipine sahip bireylerde *GPZ1* enzim aktivitesi, *Pro/Leu* ve *Leu/Leu* genotipine sahip bireylere oranla daha yüksek bulunmuştur (Cardoso ve diğerleri, 2012). Benzer şekilde *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmi ve *GPZ1* enzim aktivitesi ilişkisini araştıran bir çalışmada enzim aktivitesinin *Leu/Leu* genotipine sahip erkeklerde *Pro/Pro* ve *Pro/Leu* genotipine sahip erkeklere oranla daha düşük olduğu saptanmıştır. Kadınlarda ise *GPZ1* enzim aktivitesinin 3 genotip açısından farklılık göstermediği bulunmuştur (Bastaki ve diğerleri, 2006). Bir başka çalışmada ise *GPZ1* enzim aktivitesi cinsiyet ile ilişkilendirilmiş ve premenopozal kadınlarda erkeklere oranla %10 daha yüksek bulunmuştur (Massafra ve diğerleri, 2002). Haminishi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Leu* alleleline sahip olmanın *GPZ1* enzim aktivitesini %40 oranında azalttığı bulunmuştur (Hamanishi ve diğerleri, 2004).

GPZ1 Pro198Leu gen polimorfizminin enzimatik aktivite ve fenotip üzerine etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Cinsiyetler arasında oluşan farklılıklar, *GPZ1* enziminin Se bağımlı olmasından dolayı diyetle alınan antioksidan miktarı ile ilişkilendirilebilir (Arthur, 2000). Erkeklerde *GPZ1* enzim aktivitesinin düşük olması erkeklerin kadınlara oranla daha düşük sebze ve meyve tüketmesi ile açıklanabilir (Bastaki ve diğerleri, 2006).

GPZ1 antioksidan savunma mekanizmasının en önemli enzimleri arasında yer almaktadır. Bu enzimin üzerinde en sık çalışılan polimorfizm olan *Pro198Leu* gen polimorfizmi, birçok hastalık riski ile ilişkilendirilmiştir. Bu hastalıkların başında kanser gelmektedir. *GPZ1*

Pro198Leu gen polimorfizminin mesane kanseri, (Paz-y-Mino ve diğlerleri, 2010; Men ve diğlerleri, 2014), meme kanseri (Ravn-Haren, ve diğlerleri, 2006), akciğler kanseri (Ratnasinghe ve diğlerleri, 2000), akut myeloid lösemi (Banescu ve diğlerleri, 2016), Non-hodkin lenfoma (Lightfoot ve diğlerleri, 2006) ve AH ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Paz-y-Mino ve diğlerleri, 2010). Ancak *GPZ1* gen polimorfizmi ile PH riski arasında yapılan çalışma sayısı yetersizdir. Bu gen polimorfizmi ile PH riski üzerinde daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

GPZ1 Pro198Leu gen polimorfizmi ve PH riski arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışma sayısının azlığı ve bu polimorfizmin *GPZ1* enzim aktivitesi üzerine etkili olması, polimorfizm ve enzim aktivitesinin birlikte değlerlendirildiğı yeni çalışmalara ihtiyaç ortaya koymaktadır.

6. SONUÇ

PH, Dünya’da yaklaşık 10 milyon insanı etkileyen ve AH’dan sonra en sık görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır. Fakat PH’ya yol açan öncül sebepler henüz aydınlatılamamıştır. Hastalığın genetik olarak yatkın bireylerde, birçok çevresel faktörün de etkisiyle ortaya çıktığı bilinmektedir.

Mn-SOD ve *GPZ1* gen polimorfizmleri ile PH riski ilişkisinin tespit edilmesi amacı ile yapılan bu tez çalışmasında Türk popülasyonunda; *Mn-SOD Ala16Val* ve *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmlerinin PH’da bir risk faktörü olmadığı bulunmuştur. Çalışmamızda PH’ya bireysel duyarlılığı saptamak amacı ile *Mn-SOD Ala16Val* ve *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmlerinin kombinasyonları da incelenmiştir. Ancak bu kombinasyonlardan hiçbirinin hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda incelediğimiz *Mn-SOD Ala16Val* ve *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmlerinin kontrol grubu dağılımlarının Beyaz ırk ve Türk popülasyonunda yapılmış diğer çalışmalar ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Çalışmamız Türk popülasyonunda bu gen polimorfizmleri ile PH riski arasındaki ilişkiyi ortaya koyduğu için önemlidir. Çalışmamız sonucunda antioksidan savunma sisteminin önemli enzimleri olan *Mn-SOD* ve *GPZ1* genlerindeki polimorfizmlerin PH riski açısından bir risk faktörü oluşturmadığı bulunmuştur. Ancak, çalışmanın örnek sayısının azlığı ve enzim aktivitelerinin değerlendirilmemiş olması göz önüne alındığında ileride gen polimorfizmleri ile birlikte enzim aktivitelerinin de beraber değerlendirildiği aynı zamanda örnek sayısının daha geniş tutulduğu çalışmaların yapılması *Mn-SOD Ala16Val* ve *GPZ1 Pro198Leu* gen polimorfizmleri ile PH riski arasındaki ilişkinin daha sağlıklı değerlendirilmesine yardımcı olacaktır.

Çalışmamızda incelediğimiz genlerin yanı sıra, antioksidan savunma mekanizmasında yer alan diğer genlerin de bir arada araştırılması gelecekteki çalışmalara hedef olarak alınabilir.

KAYNAKLAR

- Aeron, K. H., Vasudevan, B., Joyce, M. V.-R., and Daret, K. S. (2011). Manganese Superoxide Dismutase: Guardian of the Powerhouse. *International Journal of Molecular Science*, 7114-7162.
- Aher, V. D., Wahi, A., M., P. A., and Sonawane, A. (2011). Antioxidants as immunomodulator: an expanding research avenue. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 3(1), 8-10.
- Akbas, A., Inanir, A., Benli, I., Onder, Y., and Aydogan, L. (2014). Evaluation of some antioxidant enzyme activities (SOD and GPX) and their polymorphisms (MnSOD2 Ala9Val, GPX1 Pro198Leu) in fibromyalgia. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 18, 1199-1203.
- Akyol, O., Yanik, M., Elyas, H., Namlı, M., Canatan, H., Akin, H., Yuce, H., Yilmaz, H. R., Tutkun, H., Sogut, S., Herken, H., Özyurt, H., Savas, H. A., and Zoroglu, S. (2005). Association between Ala-9Val polymorphism of Mn-SOD gene and schizophrenia. *Progress in Nueropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, 29(1), 123-131.
- Alonso-Navarro, H., Jimenez-Jimenez, F. J., Garcia-Martin, E., and Agundez, J. A. (2014). Genomic and pharmacogenomic biomarkers of parkinson's disease. *Current Drug Metabolism*, 15, 129-181.
- Altan, N., Sepici, D. A., and Koca, C. (2006, June). Diabetes mellitus and oxidative stress. *Turkish Journal of Biochemistry*, 51-56.
- Ambrosone, C., Freudenheim, J., Thompson, P., Bowman, E., Vena, J.E., Marshall, J., Graham, S., Laughlin, R., Nemoto, T., and Shields, P. (1999). Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. *Cancer Research*, 59(3), 602-606.
- Antonella, B., Claudio, C., Anna, C., Palmira, B., Salvatore, C., and Roberto, F. (1999). Oxidative stress and ventricular dsyfunction in Ischemic Heart disease. *Heart Failure Reviews*, 4(2), 1-10.
- Arsova-Saradinovska, Z., Matevska, N., Eken, A., Petrovski, D., Banev, S., Dzikova, S., Georgiev, V., Sikole, A., Erdem, O., Sayal, A., Aydin, A., and Dimovski, A. (2009). Glutathione peroxidase 1 (GPX1) genetic polymorphism, erythrocyte GPX activity, and prostate cancer risk. *International Urology and Nephrology*, 41(1), 63-70.
- Arthur, J. (2000). The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(13-14), 1825-1835.
- Aruoma, O. (1998). Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *JAOCS*, 75(2), 199-212.
- Asanuma, M., Miyazaki, I., and Ogawa, N. (2003). Dopamine or L-DOPA-induced neurotoxicity : the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of parkinson's disease. *Neurotox Research Journal*, 5(3), 165-176.

- Atılğan, D., Parlaktas, B., Uluocak, N., Kolukcu, E., Erdemir, F., Ozyurt, H., and Erkorkmaz, U. (2014). The relationship between Ala16Val single gene polymorphism and renal cell carcinoma. *Advances in Urology*, 932481.
- Aydın, A., Sayal, A. ve Işimer, A. (2001). *Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi*. Ankara: Gülhane Askeri Tıp Akademisi.
- Babusikova, E., Andrea, E., Jozef, H., Dobrato, D., and Jurecekova, J. (2013). Oxidative changes and possible effects of polymorphism of antioxidant enzymes in neurodegenerative disease. In U. KISHORE, *Neurodegenerative Disease* (pp. 421-455). USA: InTech.
- Bagchi, K., Puri, S. (1998). Free radicals and antioxidants in health and disease. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 4(2), 350-360.
- Banescu, C., Iancu, M., Trifa, A., Candea, M., Benedek Lazar, E., Moldovan, V., Duicu, C., Tripon, F., Crauciuc, A., and Dobreanu, M. (2016). From six gene polymorphisms of the antioxidant system, only GPX Pro198Leu and GSTP1 Ile105Val modulate the risk of acute myeloid leukemia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2536705.
- Bastaki, M., Huen, K., Manzanillo, P., Chande, N., Chen, C., Balmes, J., Huen, K., Chen, C., Tager, I. B., and Holland, N. (2006). Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans. *Pharmacogenetics and Genomics*, 16, 279-286.
- Belluzi, E., Bisaglia, M., Lazzarini, E., Tabares, L., Beltramini, M., and Bubacco, L. (2012). Human SOD2 modification by dopamine quinones affects enzymatic activity by promoting its aggregation : possible implications for parkinson's disease. *Plos One*, 7(6), e38026.
- Bica, C., da Silva, L., Toscani, N., Zettler, C., Gottlieb, M., Alexandre, C., Graudenz, M. S., and Manica de Cruz, I. (2010). Polymorphism (Ala16Val) correlates with regional lymph node status in breast cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 196(2), 153-158.
- Brand, M. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental Gerontology*, 45(7), 466-472.
- Bresciani, G., Cruz, I. B., de Paz, J. A., Cuevas, M., and Gonzalez Galleo, J. (2013). The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. *Free Radical Research*, 47(10), 781-792.
- Campbell, N., Reece, J. (2006). *Biology* (6th ed.). San Francisco: Benjamin Cummingspearson Education.
- Candaş, D., Li, J. J. (2014). MnSOD in oxidative stress response-potential regulation via mitochondrial protein influx. *Antioxidants and Redox Signaling*, 20(10), 1599-1617.
- Cardoso, B., Busse, A., Hare, D., Cominetti, C., Horst, M., McColl, G., Magaldi, R.M., Jacob-Filho, W., and Cozzolino, S. (2016). Pro198Leu polymorphism affects the selenium status and GPx activity in response to Brazil nut intake. *Food Function*, 7(2), 825-833.

- Cardoso, B., Ong, T., Jacob-Filho, W., Jaluul, O., Freitas, M., Cominetti, C., and Cozzolino, S. (2012). Glutathione peroxidase 1 Pro198Leu polymorphism in Brazilian Alzheimer's disease patients: relations to the enzyme activity and selenium status. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, 5(2), 72-80.
- Checkoway, H., Powers, K., Smith-Weller, T., Franklin, G., Longstreth, W., and Swanson, P. (2002). Parkinson's disease risks associated with cigarette smoking, alcohol consumption, and caffeine intake. *American Journal of Epidemiology*, 155(8), 732-738.
- Choi, Y., Neuhouser, M., Barnett, M., Hudson, M., Kristal, A., Thornquist, M., King, I. B., Goodman, G. E., and Ambrosone, C. (2007). Polymorphisms in oxidative stress-related genes are not associated with prostate cancer risk in heavy smokers. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 16(6), 1115-1120.
- Christiansen, L., Petersen, H., Bathum, L., Frederiksen, H., Mcgue, M., and Christensen, K. (2004). The catalase -262C/T promoter polymorphism and aging phenotypes. *Journal of Gerontology: Biological Sciences*, 59A(9), 886-889.
- Cox, D., Tamimi, R., and Hunter, D. (2006). Gene-gene interaction between MnSOD and GPX1 and breast cancer risk: a nested case-control study. *BMC Cancer*, 6(217).
- Crawford, A., Fassett, R. G., Coombes, J. S., Kunde, D. A., Ahuja, K. D., Robertson, I. K., Ball, M. J., and Geraghty, D. P. (2011). Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase genotypes and activities and the progression of chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 1-8.
- Deligezer, U., Akışık, E. E., and Dalay, N. (2004). Gen polimorfizmlerinin analizinde lightcycler floresan PCR tekniğinin kullanılması: myeloid lösemili çocuk ve yetişkin hastalarda MTHFR C677T gen polimorfizm dağılımının belirlenmesi. *Türk Onkoloji Dergisi*, 134-139.
- Devasagayam, T., Tilak, J., Bloor, K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., and Lele, R. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicians of India*, 52, 794-804.
- Dexter, D. T., Carter, C. J., Wells, F. R., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Lees, A., Jenner, P., and Marsden, C. (1989). Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 52(2), 381-389.
- Ekmekçi, A., Konaç, E. ve Önen, H. (2008). Gen polimorfizmi ve kansere yatkınlık. *Marmara Medical Journal*, 21(3), 282-295.
- Ergen, H., Narter, F., Tımcı, O., and Isbir, T. (2007). Effects of manganese superoxide dismutase Ala-9Val polymorphism on prostate cancer: a case control study. *Anticancer Research*, 27, 1227-1230.
- Farin, F., Hitoşis, Y., Hallagan, S., Kushleika, J., Woods, J., Janssen, P.S., Smith-Weller, T., Franklin, G.M., Swanson, P.D., and Checkoway, H. (2001, July). Genetic polymorphisms of superoxide dismutase in parkinson's disease. *Movement Disorder*, 16(4), 705-707.
- Fong, C., Wu, R., Shieh, J., Chao, Y., Fu, Y., Kuao, C., and Cheng, C. (2007, March). Pesticide exposure on southwestern Taiwanese with MnSOD and NQO1

- polymorphisms is associated with increased risk of Parkinson's disease. *Clinica Chimica Acta*, 378(1-2), 136-141.
- Forgione, M. A., Weiss, N., Heydrick, S., Cap, A., Klings, E. S., Bierl, C., Eberhardt, R.T., Farber, H.W., and Loscalzo, J. (2002). Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 282, 1255-1261.
- Forsberg, L., Ulf, D. F., and Morgenstern, R. (2001, May). Oxidative stress, human genetic variation, and disease. *Archives Biochemistry and Biophysics*, 389(1), 84-93.
- Gasser, T., Wszolek, Z., Trofatter, J., Ozelius, L., Uitti, R., Lee, C., Gusella, J., Pfeiffer, R.F., Calne, D.B., and Breakefield, X. (1994). Genetic linkage studies in autosomal dominant parkinsonism: evaluation of seven candidate genes. *Annals of Neurology*, 36(3), 387-396.
- Goetz, C. G. (2011). The history of parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, a008862.
- Grasbon-Frodl, E., Kösel, S., Riess, O., Müller, U., Mehraein, P., and Graeber, M. (1999, February). Analysis of mitochondrial targeting sequence and coding region polymorphisms of the manganese superoxide dismutase gene in German Parkinson disease patients. *Biochem Biophys Res Commun*, 255(3), 749-752.
- Gui, Y., Zhang, L., Lv, W., Zhang, W., Zhao, J., and Hu, X. (2016). NFE2L2 variations reduce antioxidant response in patients with Parkinson disease. *Oncotarget*, 7(10), 10756-10764.
- Halliwell, B. (2001). Free radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of Life Sciences*. Retrieved from Encyclopedia of Life Sciences (ELS).
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (1999). *Free radicals in biology and medicine* (3rd edition ed.). New York: Oxford University Press.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (2007). *Free radicals in biology and medicine*. USA: Oxford University Press.
- Hamanishi, T., Furuta, H., Kato, H., Doi, A., Tamai, M., Shimomura, H., Sakagashira, S., Nishi, M., Sasaki, H., Sanke, T., and Nanjo, K. (2004). Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (GPx-1) gene are associated with increased intima-media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular diseases in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes*, 53(9), 2455-60.
- Henchcliffe, C., Beal, M. (2008). Mitochondrial biology and oxidative stress in parkinson's disease pathogenesis. *Nature Clinical Practice Neurology*, 4(11), 600-609.
- Hung, R., Boffetta, P., Brennan, P., Malaveille, C., Gelatti, U., Placidi, D., Carta, A., Hautefeuille, A., and Porru, S. (2004). Genetic Polymorphism of MPO, COMT, MnSOD, NQO1, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk. *Carcinogenesis*, 25(6), 973-978.
- Ichimura, Y., Habuchi, T., Tsuchiya, N., Wang, L., Oyama, C., Sato, K., Nishiyama, H., Ogawa, O., and Kato, T. (2004). Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon 198 variant. *Journal of Urology*, 172, 728-732.

- Ishida, K., Morino, T., Kenkichi, T., and Sukenaga, Y. (1987). Nucleotide sequence of a human gene for glutathione peroxidase. *Nucleic Acids Research*, 15, 10051.
- İnternet: Genetics Home Reference. *United states national library of medicine*. URL:<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2F+https%3A%2F%2Fghr.nlm.nih.gov%2Fgene%2FGPX1%23location&date=2016-09-03>, Son Erişim Tarihi: 22.08.2016.
- İnternet: Genetics Home Reference. *United states national library of medicine*. URL:<http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fghr.nlm.nih.gov%2Fgene%2FSOD2%23location&date=2016-09-03>, Son Erişim Tarihi: 22.08.2016.
- Jenner, P. (1993). Presymptomatic detection of parkinson's disease. *Journal of Neural Transmissions*, 23-36.
- Jenner, P. (1998). Oxidative mechanism in nigral cell death in parkinson's disease. *Movement Disorder*, 13, 24-34.
- Johnson, W., Wilson-Delfosse, A., and Mieyal, J. (2012). Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. *Nutrients*, 4, 1399-1440.
- Kadioglu, E., Sardas, S., Ergün, M., Ünal, S., and Karakaya, A. (2010). The role of oxidative DNA damage, DNA repair, GSTM1, SOD2 and OGG1 polymorphisms in individual susceptibility to Barrett's esophagus. *Toxicology and Industrial Health*, 26, 67-79.
- Kalkan, G., Seckin, H., Bas, Y., Benli, I., Ozyurt, H., Ates, O., Özdemir, A., and Pancar, G. (2014). Analysis of manganese superoxide dismutase (MnSOD Ala-9Val) and glutathione peroxidase (GPx1 Pro198Leu) gene polymorphisms in psoriasis. *Archives of Dermatological Research*, 306(3), 253-258.
- Kalkan, G., Seckin, H., Benli, İ., Akbas, A., Bas, Y., Karakus, N., Bütün, İ., and Ozyurt, H. (2015). Relationship between manganese superoxide dismutase (Mn-SODAla-9Val) and glutathione peroxidase (GPx Pro197Leu) gene polymorphisms and alopecia areata. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 5(11), 21533-21540.
- Karahalil, B., Bohr, V. A., and DE Souza-Pinto, N. C. (2010). Base excision repair activities differ in human lung cancer cells and corresponding normal controls. *Anticancer Research*, 30(12), 4963-4973.
- Karahalil, B., Hogue, B., de Souza-Pinto, N., and Bohr, V. (2002). Base excision repair capacity in mitochondria and nuclei: tissue-specific variations. *The FASEB Journal*, 16(14), 1895-1902.
- Karunasinghe, H., Han, D., Zhu, S., Yu, J., Lange, K., Duan, H., Medhora, R., Singh, N., Kan, J., Alzahr, W., Chen, B., Ko, S., Triggs, C.M., and Ferguson, L. (2012). Serum selenium and single-nucleotide polymorphisms in genes for selenoproteins: relationship to markers of oxidative stress in men from Auckland, New Zealand. *Genes Nutrition*, 7(2), 179-190.
- Kish, S., Morito, C., and Hornykiewicz, O. (1985). Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease brain. *Neuroscience Letters*, 58(3), 343-346.

- Kucukgergin, C., Sanli, O., Amasyalı, A., Tevik, T., and Seckin, S. (2012). Genetic variants of MnSOD and GPX1 and susceptibility to bladder cancer in a Turkish population. *Medical Oncology*, 29(3), 1928-1934.
- Lee, J., Koo, N., and Min, D. (2004). Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 21-33.
- Li, H., Kantoff, P., Giovannucci, E., Leitzmann, M., Gaziano, J., Stampfer, M., and Ma, J. (2005). Manganese superoxide dismutase polymorphism, prediagnostic antioxidant status, and risk of clinical significant prostate cancer. *Cancer Research*, 65(6), 2498-2504.
- Li, X.-X., Liao, Q., Xia, H., and Yang, X.-L. (2015). Association between Parkinson's disease and G2019S and R1441C mutations of the LRRK2 gene. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 10(4), 1450-1454.
- Lightfoot, T.J., Skiloba, C.F., Smith, A.G., Forrest, M.S., Adamson, P.J., Morgan, G.J., Bracci, P.M., Roman, E., Smith, M.T., and Holly, E. (2006). Polymorphisms in the oxidative stress genes, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase and risk of non-hodgking's lymphoma. *Haematologica*, 91, 1222-1227.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., and Chandra, N. (2010, Jul-Dec). Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacognosy Review*, 118-126.
- Lubos, E., Loscalzo, J., and Handy, D. (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidant Redox Signaling Journal*, 15(7), 1957-1997.
- Massafra, C., Gioia, D., De Felice, C., Muscettola, M., Longini, M., and Buonocore, G. (2002). Gender related differences in erythrocyte glutathione peroxidase activity in healthy subjects. *Clinical Endocrinology (Oxford)*, 57, 663-667.
- Mates, J. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species. *Toxicology*, 153, 83-104.
- Mates, J. M., Perez-Gomez, C., and Nunez De Castro, I. (1999, november). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32, 595-603.
- Mattson, M. (2004). Metal-catalyzed disruption of membrane protein and lipid signaling in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 37-50.
- Meister, A., Anderson, M. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 712, 711-760.
- Men, T., Zhang, X., Yang, J., Shen, B., Li, X., Chen, D., and Wang, J. (2014). The rs1050450 C > T polymorphism of GPX1 is associated with the risk of bladder but not prostate cancer: evidence from a meta-analysis. *Tumor Biology*, 35(1), 269-275.
- Ogut, S., Atay, E. (2012). Yaşlılık ve oksidatif stres. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 19(2), 68-74.

- Orhan, G., Elkama, A., Mungan, S. Ö., Eruyar, E., and Karahalil, B. (2016). The impact of detoxifying and repair gene polymorphisms on oxidative stress in ischemic stroke. *Neurological Sciences*, 1-7.
- Parkinson, J. (1817). *An essay on the shaking palsy*. London: Wiley Blackwell.
- Paz-y-Mino, C., Carrera, C., Lopez-Cortes, A., Munoz, M., Cumbal, N., Castro, B., Cabrera, A., and Sanchez, M. (2010). Genetic polymorphisms in apolipoprotein E and glutathione peroxidase 1 genes in the Ecuadorian population affected with Alzheimer's disease. *The American Journal of the Medical Sciences*, 340(5), 373-377.
- Paz-y-Mino, C., Munoz, M., Lopez-Cortes, A., Cabrera, A., Palacios, A., Castro, B., Paz-y-Mino, N. and Sanchez, M. (2010). Frequency of polymorphisms pro198leu in GPX-1 gene and ile58thr in MnSOD gene in the altitude Ecuadorian population with bladder cancer. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 18(8), 395-400.
- Perry, T., Godin, D., and Hansen, S. (1982). Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency. *Neuroscience Letters*, 305-310.
- Pham-Huy, L. A., He, H., and Pham-Huy, C. (2008, June). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Boimedical Science*, 4(2), 89-96.
- Pourvali, K., Abbasi, M., and Mottaghi, A. (2016). Role of Superoxide Dismutase Gene Ala16Val Polymorphism and Total Capacity in Diabetes and its Complications. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 8(2), 48-56.
- Raaschou-Nielsen, O., Sorensen, M., Hansen, R., Frederiksen, K., Tjonneland, A., Overvad, K., and Vogel, U. (2007). GPX1 Pro198Leu polymorphism, interactions with smoking and alcohol consumption, and risk for lung cancer. *Cancer Letters*, 247, 293-300.
- Ratnasinghe, D., Tangrea, J. A., Aandersen, M. R., Barrett, M. J., Virtamo, J., Taylor, P. R., and Albanes, D. (2000). Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. *Cancer Research*, 60, 6381-6383.
- Ravn-Haren, G., Olsen, A., Tjonneland, A., Dragsted, L., Nexø, B., Wallin, H., Overvad, K., Raaschou-Nielsen, O., and Vogel, U. (2006, April). Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis*, 27(4), 820-825.
- Razzaghi, A. (2010). Parkinson disease. In L. Shargel, A. H. Mutnick, P. F. Souney, and L. N. Swanson, *Comprehensive Pharmacy Review* (pp. 1010-1030). Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins.
- Reszka, E., Jablonowski, Z., Wieczorek, E., Jablonska, E., Krol, M., Gromadzinska, J., Grzegorzczak, A., Sosnowski, M., and Wasowicz, W. (2014). Polymorphisms of NRF2 and NRF2 target genes in urinary bladder cancer patients. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 140, 1723-1731.
- Süzen, H., Emel, G., Sakallı, O., Uçgun, Z., Köse, G., Ustel, D., and Duydu, Y. (2009, May). CAT C-262T and GPX1 Pro198Leu polymorphisms in a Turkish population. *Molecular Biology Reports*, 37, 87-92.

- Süzen, H., Gucyener, E., Sakalli, O., Uckun, Z., Kose, G., Ustel, D., and Duydu, Y. (2010). CAT C-262T and GPX1 Pro198Leu polymorphisms in a Turkish population. *Molecular Biology Reports*, 37(1), 87-92.
- Seckin, H., Kalkan, G., Butun, I., Akbas, A., Bas, Y., Karakus, N., and Benli, I. (2016). Analysis of manganese superoxide dismutase and glutathione peroxidase 1 gene polymorphisms in vitiligo. *Biochemical Genetics*, 54(4), 438-447.
- Shimoda-Matsubayashi, S., Hattori, T., Matsumine, H., Shinohara, A., Yoritaka, A., Mori, H., Kondo, T., Chiba, M., and Mizuno, Y. (1997). MnSOD activity and protein in a patient with chromosome 6-linked autosomal recessive parkinsonism in comparison with Parkinson's disease and control. *Neurology*, 49, 1257-1262.
- Shimoda-Matsubayashi, S., Matsumine, H., Kobayashi, T., Nakagawa-Hottori, Y., Shimizu, Y., and Mizuno, Y. (1996). Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 226(2), 561-565.
- Sies, H. (1996). *Antioxidants in disease, mechanisms and therapy*. New York: Academic Press.
- Silig, Y., Taş, A., and Pınarbaşı, H. (2015). Manganese-superoxide dismutase (MnSOD) polymorphisms. *Turkish Journal of Biochemistry*, 40(2), 163-168.
- Singh, M., Khan, A., Shah, P., Shukla, R., Khanna, V., and Parmar, D. (2008). Polymorphism in environment responsive genes and association with Parkinson disease. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 312(1-2), 131-138.
- Smeyne, M., Smeyne JAY, R. (2013). Glutathione metabolism and parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 13-25.
- Soerensen, M., Christensen, K., Stevnsner, T., and Christiansen, L. (2009). The Mn-superoxide dismutase single nucleotide polymorphism rs4880 and the glutathione peroxidase 1 single nucleotide polymorphism rs1050450 are associated with aging and longevity in the oldest old. *Mechanisms of Ageing and Development*, 130(5), 308-314.
- Sofic, E., Riederer, P., Heinsen, H., Beckmann, H., Reynolds, G., Hebenstreit, G., and Youdim, M. (1998). Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *Journal of Neural Transmission*, 199-205.
- Souiden, Y., Mallouli, H., Meskhi, S., Chaabouni, Y., Rebai, A., Cheour, F., and Mahdouani, K. (2016). MnSOD and GPx1 polymorphism relationship with coronary heart disease risk and severity. *Biological Research*, 49, 1-12.
- Sun, A., Chen, Y. (1998). Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Journal of Biomedical Science*, 401-414.
- Sutton, A., Khoury, H., Prip-Buus, C., Capanec, C., Pessayre, D., and Degoul, F. (2003). The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics*, 13(3), 145-157.

- Tang, N., Wang, L., Yang, L., Gu, H., Sun, Q., Cong, R., Zhoua, B., Zhu, H.J., and Wang, B. (2008). Genetic variant in glutathione peroxidase 1 gene is associated with an increased risk of coronary artery disease in Chinese population. *Clinica Chimica Acta*, 395(1-2), 89-93.
- Tanner, C. (1992). Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurologic Clinics*, 10(2), 317-329.
- Thomas, B., Beal, M. F. (2011). Molecular insights into parkinson's disease. *F1000 Medicine's Report*, 3(7), 1-8.
- Uttara, B., V.Singh, A., Zamnani, P., and Mahajan, R. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, (7), 65-74.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 44-84.
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006). Free radical, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemical-Biological Interactions*, 160, 1-40.
- Van Den Eeden, S. K., Tanner, C., Bernstein, A. L., Fross, R. D., Leimpeter, A., Bloch, D. A., and Nelson, L. M. (2003). Incidence of parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *American Journal of Epidemiology*, 157(11), 1015-1022.
- Van Remmen, H., Ikeno, Y., Hamilton, M., Pahlavani, M., Wolf, N., Thorpe, S., Alderson, N.L., Baynes, J.W., Epstein, C.J., Huang, T.T., Nelson, J., Strong, R., and Richardson, A. (2003). Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiology Genomics*, 16(1), 29-37.
- Ventriglia, M., Scassellati, C., Bonvicini, C., Squitti, R., Bevacqua, M., Foresti, G., Tura, G.B., and Gennarelli, M. (2006). No association between Ala9Val functional polymorphism of MnSOD gene and schizophrenia in a representative Italian sample. *Neuroscience Letters*, 400, 208-211.
- Wang, S. S., Davis, S., Cerhan, J. R., Hartge, P., Severson, R. K., Cozen, W., Lan, Q., Welch, R., Chanock, S. J. and Rothman, N. (2006). Polymorphisms in oxidative stress genes and risk for non-hodgkin lymphoma. *Carcinogenesis*, 27(9), 1828-1834.
- Wang, V., Chen, S., Chuang, T., Shan, D., Soong, B., and Kao, M. (2010). Val-9Ala and Ile + 58Thr polymorphism of MnSOD in parkinson's disease. *Clinical Biochemistry*, 43, 979-982.
- Warner, T. T., Schapira, A. (2003). Genetic and environmental factors in the cause of parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 53, 16-25.
- Yoo, M., Chun, H., Son, J., Degiorgio, L., Kim, D., Peng, C., and Son, H. (2003). Oxidative stress regulated genes in nigral dopaminergic neuronal cells: correlation with the known pathology in parkinson's disease. *Molecular Brain Research*, 110, 76-84.

- Yorikata, A., Hattori, N., Mori, H., Kato, K., and Mizuno, Y. (1997). An immunohistochemical study on manganese superoxide dismutase in parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 148, 181-186.
- Yoshikawa, T., Naito, Y. (2002). What is oxidative stress? *Japan Medical Association Journal*, 45(7), 271-276.
- Young, I. S., Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, (54), 176-186.
- Yu, W., Li, N., Tan, E., Cheng, L., Zhang, J., Mao, X., Chang, X. L., Zhao, D. M. Liao, Q. and Peng, R. (2014). No association of four candidate genetic variants in MnSOD and SYNIII with Parkinson's disease in two chinese populations. *Plos One*, 9(2), e88050.
- Zarbock, R., Hendig, D., Szliska, C., Kleesiek, K., and Gotting, C. (2007). Pseudoxanthoma elasticum: genetic variations in antioxidant genes are risk factors for early disease onset. *Clinical Chemistry*, 53, 1734-1740.
- Zejnilovic, J., Akev, N., Yilmaz, H., and Isbir, T. (2009). Association between manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of lung cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 189(1), 1-4.
- Zelko, I. N., Mariani, T. J., and Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3), 337-349.

EKLER

EK-1 Anket formu

ANKET FORMU

Hasta Protokol No:

1-Adı Soyadı:

2-Yaş:

3- Cinsiyet:

4- Hastalığın evresi;

Hastalık kaç yaşında:

5-Rutin biyokimyasının fotokopisi eklenmeli.

6. Folat Düzeyi:

B12 düzeyi:

Homosistein düzeyi:

Sistein düzeyi:

7- Doğum Yeri:

8- Vücut Kitle İndeksi (BMI)= Ağırlık= Boy=

9- Meslek/çalışma süresi:

10- Yaşadığınız şehir ve süresi:

11- Sigara içme alışkanlığı:

Hiç içmedim () Eskiden içerdim ()

Sigaraya başlama ve bırakma yaşı= ve

Ne kadar süre önce sigarayı bıraktınız?

Ne kadar süredir sigara içiyorsunuz?

Miktarı (Günde kaç adet) :

12-Sigara içilen ortamlarda sıkça bulunuyor musunuz? Evet () Hayır ()

13. Diyabet yada herhangi bir kalp rahatsızlığı var mı= Varsa Nedir=?

14- Düzenli alınan ilaçlar ve süreleri (Vitamin dahil):

15-Kadın ise; Menarş yaşı: menapoz yaşı:

16-Alkol alıyor musunuz? Hayır () Evet () Kaç yıldır kullanıyorsunuz?:

Nadiren () Haftada bir() Haftada 2-3() Haftada 4-5() Her gün ()

17- Kahve içme alışkanlığınız var mı? Var () Yok ()

Günde 1 bardak () Günde 2 bardak () 3 ve daha fazla ()

18-Çay içme alışkanlığınız var mı? Var ()Yok ()

Günde 1 bardak () Günde 2 bardak () 3 ve daha fazla ()

19- Beslenme alışkanlığınız nedir?

Et ağırlıklı () Sebze-meyve ağırlıklı ()

Kuru bakliyat ağırlıklı () Balık ve diğer deniz ürünleri ağırlıklı ()

Karışık beslenme () Kızartma ağırlıklı yağlı diyet ()

20-Aile bireylerinde genetik bir hastalık var mı? Hayır () Evet () Nedir= Sizde

21-Ailenizde, Parkinson veya başka hastalık varmı? Türü:

Nedir?: Göğüs Röntgeni () Diş () Diğer () Belirtiniz

22. Şu anda herhangi bir enfeksiyon (grip, nezle vs) var mı=?

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Saygın, Evrim
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 15.08.1986, Polatlı
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0507 487 13 93
e-mail : evrimsayginnn@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi	2016
Lisans	Ankara Üniversitesi	2010
Lise	Polatlı Anadolu Lisesi	2004

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2011-	TC Sağlık Bakanlığı	
	Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu	Eczacı
2010	Ankara Eczacı Odası, Ankara, Türkiye	Eczacı

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Kitap okumak, yüzmek, sinema.



GAZİ GELECEKTİR..

